

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 32 879

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/68* (2018.01)  
*C12Q 1/6844* (2018.01)  
*C12Q 1/686* (2018.01)  
*C12Q 1/6876* (2018.01)  
*C12Q 1/6888* (2018.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36090**  
(22) Přihlášeno: **04.04.2019**  
(47) Zapsáno: **21.05.2019**

(73) Majitel:  
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV  
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy,  
CZ

(72) Původce:  
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ  
Mgr. Lucie Valentová, Dobrá Voda u Hořic, CZ

(54) Název užitého vzoru:  
**Sada pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV,  
SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu**

CZ 32879 U1

## Sada pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu

### Oblast techniky

5

Řešení se týká sady primerů a sond pro PCR detekci virů Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), Strawberry crinkle virus (SCV), Strawberry vein banding virus (SVBV), Strawberry mottle virus (SMoV) a Strawberry polerovirus-1 (SPV-1) v biologickém materiálu.

10

### Dosavadní stav techniky

Jahody patří mezi velmi vyhledávané ovoce a v České republice má jejich pěstování dlouholetou tradici. Pro úspěšnou produkci této komodity je proto nezbytné sledovat zdravotní stav nejen produkčních výsadeb, ale zejména rozmnožovacího materiálu, neboť jahodníkové plochy jsou obměňovány po třech až čtyřech letech produkce.

Mezi hlavní příčiny snížení výnosů patří choroby jahodníku, které jsou způsobeny viry, a to: Virové okrajové žloutnutí listů jahodníku, původce: Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV); Virová kadeřavost jahodníku, původce: Strawberry crinkle virus (SCV); Virové lemování žilek jahodníku, původce: Strawberry vein banding virus (SVBV); a Virová strakatost jahodníku, původce: Strawberry mottle virus (SMoV). Všechny výše uvedené viry se primárně přenáší mšicemi (*Chaetosiphon* spp.) a vegetativním množením rostlinného materiálu. Nedávno byl popsán nový virus nazvaný Strawberry polerovirus 1 (SPV-1), který se v komplexu s ostatními viry též podílí na virovém chřadnutí jahodníku (Xiang Y, 2015). Uvádí se, že se ztráty na výnosech mohou pohybovat od 30 % u infekcí způsobených jedním virem až do 80 %, kdy se jedná o mnohočetné infekce výše uvedenými viry (Thompson JR, 2003).

Vzhledem k tomu, že neexistuje pro virové choroby žádná účinná léčba, je jediným možným způsobem ochrany rostlin jahodníků preventivní ochrana, která spočívá v používání bezvirózního rozmnožovacího materiálu, potlačení výskytu přenašečů a včasná a přesná diagnostika, pokud již dojde k infekci.

V současnosti se k detekci příslušných virů používají metody PCR, a to jak v klasickém uspořádání s detekcí amplikonů pomocí gelové elektroforézy, tak i real-time PCR. Nevýhodou těchto přístupů je nutnost provádět separátní detekce pro jednotlivé viry, což analýzu prodlužuje a prodražuje. Řešením může být návrh multiplexního PCR systému. Multiplexní PCR detekci virů SMYEV, SCV, SVBV a SMoV navrhl Thompson JR (2003). Metoda však není založena na principu real-time PCR a pro odlišení jednotlivých virů využívá rozdílné délky příslušných PCR amplikonů od 219 bp pro SMoV po 422 bp pro SVBV. Z tohoto přístupu též plynou limity detekce, která není kvantitativní, vzhledem k odlišným délkám jednotlivých fragmentů se liší účinnosti detekce jednotlivých virů a je méně senzitivní (uváděný detekční limit maximálně do ředění 1/200, pro virus SMYEV až 1/500). Navíc tato metoda neřeší současnou detekci viru SPV-1.

45

Nevýhodou všech uvedených přístupů je tedy nemožnost provádět současnou kvalitativní nebo kvantitativní detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v jedné reakci a nutnost provádět separátní PCR reakce pro každý virus zvlášť, což analýzu prodlužuje a prodražuje.

50

### Podstata technického řešení

Nedostatky dle současného stavu techniky – nemožnost provádět současnou kvalitativní nebo kvantitativní detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 a nutnost provádět individuální PCR reakce pro detekci jednotlivých virů – odstraňuje sada primerů a sond pro PCR detekci virů

55

SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

- SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)
- 5 SEQ ID NO. 2: TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC (Sonda 1)
- SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1)
- SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)
- SEQ ID NO. 5: TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT (Sonda 2)
- 10 SEQ ID NO. 6: TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT (Sonda 3)
- SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCAT (Reverse primer 2)
- SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3)
- SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)
- SEQ ID NO. 10: AGTTACAGGTAAGTGTAGCAAAGARATGA (Sonda 4)
- 15 SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)
- SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5)
- SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)
- SEQ ID NO. 14: ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTCC (Sonda 5)
- SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6)
- 20 SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTCTCGC (Forward primer 5)
- SEQ ID NO. 17: ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA (Sonda 6)
- SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7),

25 kde hybridizační sondy jsou vhodně označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce,

příčemž pro PCR detekci viru SMYEV obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

- 30 SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)
- SEQ ID NO. 2: TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC (Sonda 1)
- SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1),

35 pro PCR detekci viru SCV obsahuje sada primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

- SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)
- SEQ ID NO. 5: TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT (Sonda 2)
- SEQ ID NO. 6: TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT (Sonda 3)
- 40 SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCAT (Reverse primer 2)
- SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3),

pro PCR detekci viru SVBV obsahuje sada primerů a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)

5 SEQ ID NO. 10: AGTTACAGGTAAGTGTAGCAAAAAGARATGA (Sonda 4)

SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)

SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5),

10 pro PCR detekci viru SMOV obsahuje sada primerů a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)

SEQ ID NO. 14: ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTC (Sonda 5)

15 SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6),

a pro PCR detekci viru SPV-1 obsahuje sada primerů a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTCGC (Forward primer 5)

20 SEQ ID NO. 17: ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA (Sonda 6)

SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7).

25 Výše uvedené sady primerů a sond jsou vhodné pro současnou nebo individuální kvalitativní nebo kvantitativní detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 v biologickém materiálu s vysokou specificitou metodou založenou na metodě PCR. Metodou PCR se rozumí klasické uspořádání PCR reakce s detekcí amplikonů pomocí gelové elektroforézy nebo digitální PCR nebo real-time PCR využívající k detekci interkalační barviva nebo různě značené hybridizační sondy podle technického řešení a další varianty metody PCR známé odborníkovi v oboru. Ve výhodném provedení technického řešení je PCR produkt detekován v reálném čase pomocí real-time PCR, a ještě výhodněji pomocí značených hybridizačních sond. V jedné PCR reakci je tak

30 možné stanovit konkrétní virus z výše uvedených virů, který je zodpovědný za vznik onemocnění.

35 Hybridizační sondy mohou být pro účely jejich detekce značeny fluorescenčně, radioaktivně, neradioaktivně nebo dalšími způsoby známými odborníkovi v oboru. Ve výhodném provedení technického řešení jsou hybridizační sondy pro detekci jednotlivých virů značeny fluorescenčně, a ještě výhodněji pomocí odlišných fluoroforů pro jednotlivé viry, což umožňuje jejich současnou detekci v jedné PCR reakci.

40 Návrh sad primerů a hybridizačních sond podle technického řešení pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 byl proveden v několika krocích: 1) Analýza sekvencí dostupných izolátů těchto virů; 2) Porovnání specificity detekce těchto izolátů s primerů z dosavadního stavu techniky; 3) Návrh sad primerů a hybridizačních sond pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1.

45 Detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 může být dle provedení technického řešení provedena v jakémkoliv rostlinném materiálu, s výhodou je rostlinným materiálem list.

50 Prvním krokem detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMOV a SPV-1 v rostlinném materiálu je izolace celkové RNA a její přepis na cDNA pomocí RNA-dependentní DNA polymerázy a sady náhodných primerů metodami známými v oboru.

Vytvořená cDNA je následně analyzována na přítomnost nukleové kyseliny virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 metodou PCR sadami primerů a hybridizačních sond podle technického řešení.

5

Příklady provedení technického řešení jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezuji rozsah této přihlášky, která je vymezena připojeným nárokem a podrobně popsána v popisu technického řešení. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého způsobu PCR a uvedených primerů tak, aby nedošlo ke snížení specifity PCR detekce. Modifikací primerů se rozumí zejména zkrácení nebo prodloužení na 3' a/nebo 5' konci nebo záměna nukleotidů nebo kombinace těchto modifikací, které zachovávají alespoň 80% identitu k uvedeným sekvencím.

#### 15 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů a sond

20 Sekvence různých izolátů virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 byly získány z databáze sekvencí GenBank. Pro analýzu variability sekvencí byla použita metoda multiple alignment v programu ClustalW. Specifita primerů byla stanovena jejich namapováním na uspořádané sekvence a zhodnocením konzervovanosti cílových úseků. Pro návržení sad primerů a hybridizačních sond byly použity konzervované oblasti genomu virů vykazující nejvyšší sekvencí homologii napříč všemi izoláty.

25

Primery a hybridizační sondy byly navrženy pomocí programu Vector NTI Advance (Tabulka 1).

Tabulka 1. Přehled primerů a sond pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV1.

SEQ ID NO.	Popis	Virus	Referenční sekvence GenBank: pozice	Sekvence (Dle IUPAC: Y zastupuje C nebo T; R zastupuje A nebo G; S zastupuje G nebo C; W zastupuje A nebo T)
SEQ ID NO. 1	Forward primer 1	SMYEV	NC_003794: 27-50	CCCTCCTGACGTACACAACAAG
SEQ ID NO. 2	Sonda 1	SMYEV	NC_003794: Y=T 62-89 KR350471: Y=C 67-94	TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC
SEQ ID NO. 3	Reverse primer 1	SMYEV	NC_003794: 94-114	CCGTGAGGGAGGAGAATACGC
SEQ ID NO. 4	Forward primer 2	SCV	MH129615: R=A 9850-9873 MH129616: R=G 9861-9884	ACAGTRTGCCTTTAGAGGTTGT T
SEQ ID NO. 5	Sonda 2	SCV	MH129615: Y=T 9877-9902 AY331387: Y=C 1408-1433	TCTCAATAYGATTGTACATACCGC AT

SEQ ID NO. 6	Sonda 3	SCV	MH129616: 9888-9913	TCTCAATACGATTGCACATATCGC AT
SEQ ID NO. 7	Reverse primer 2	SCV	MH129615: Y=T 9903-9926 MH129616: Y=C 9914-9937	ACCTGATTATCTCCCATYCCCATT
SEQ ID NO. 8	Reverse primer 3	SCV	AY331387: 1436-1457	ACTTGATTATCCCCCATCCCCA
SEQ ID NO. 9	Forward primer 3	SVBV	NC_001725: S=C 1960-1989 KX950840: S=G 163-192	AATATCTGTCTTTACTTGATSATG AACTTG
SEQ ID NO. 10	Sonda 4	SVBV	NC_001725: R=G 2008-2037 KX950840: R=A 211-240	AGTTACAGGTACTIONTGTAGCAAAA GARATGA
SEQ ID NO. 11	Reverse primer 4	SVBV	NC_001725: 2040-2061	CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC
SEQ ID NO. 12	Reverse primer 5	SVBV	KX950840: 245-267	CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG
SEQ ID NO. 13	Forward primer 4	SMoV	NC_003445: Y=T 6264-6286 KU200457: Y=C 5553-5575	GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT
SEQ ID NO. 14	Sonda 5	SMoV	NC_003445: W=A 6328-6353 KU200457: W=T 5617-5642	ACAGGWGGCACTGTTTACAGTG TTCC
SEQ ID NO. 15	Reverse primer 6	SMoV	NC_003445: R=A, Y=T 6357-6377 KU200457: R=G, Y=C 5646-5666	TTGGRTCCTCACCTGAYCTCG
SEQ ID NO. 16	Forward primer 5	SPV-1	NC_025435: 2255-2275	CAACTGGGGTTCGTACTACTCGC
SEQ ID NO. 17	Sonda 6	SPV-1	NC_025435: 2280-2302	ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA
SEQ ID NO. 18	Reverse primer 7	SPV-1	NC_025435: 2304-2323	GGCCAGCCGAATCCTTTGAC

Nasedání primerů a sond na referenční sekvence ukazuje Tabulka 2.

5

**Tabulka 2: Nasedání primerů a sond použitých pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1.** Místa pro nasedání primerů a sond jsou vyznačena tučně. Podtržením je vyznačeno nasedání primerů a sond v reverzní orientaci.

- Místa pro nasedání primerů a sond použitých pro detekci viru SMYEV

NC\_003794 1 ATTTATCCAAACACACTCTAGACCAGGCCCTCCTGACGTACACACACACTGCTCCGCGCAGTGCACCTGATCGGATAGCGAGCGGTATTCCTCCCTCACGGACCTTGGAAAT SEQ ID NO. 1 SEQ ID NO. 2 SEQ ID NO. 3  
 KR3504711 1 GGAAAAACATAAACCACCACTCTAGACCAGGCCCTCCTGACGTACACACACACTGCTCCGCGCAGTGCACCTGATCGGATAGCGAGCGGTATTCCTCCCTCACGGATCTTGGAAAT

- Místa pro nasedání primerů a sond použitých pro detekci viru SCV

MH129615 9840 GACCATATTCCACACTCTAGACCGCCCTTACGAGGTTGTTCTATCTCAATATGATGTACATACCGCATATGGGATGGGAGATATATCAGGTGTTACAAAATA SEQ ID NO. 4 SEQ ID NO. 5 SEQ ID NO. 7  
 AY331387 1371 GACGGTATTTACAGTATGCGCTTTAGAGGTTGTTTTAFCTCAATACGATTTACATACCCGATTAATGGGGTGGGGATATATCARGTCTTACAAAATA SEQ ID NO. 4 SEQ ID NO. 6 SEQ ID NO. 8  
 MH129616 9815 GACAATATTTACAGTATGCGCTTTAGAGGTTGTTCTTCTCAATACGATTTGACATATCGCATATGGGATGGGAGATATATCAGGTACTACAAAATA SEQ ID NO. 4 SEQ ID NO. 7 SEQ ID NO. 8

- Místa pro nasedání primerů a sond použitých pro detekci viru SVBV

NC\_0011725 1951 TTATTATACAAATATCTGTTACTTGTATCATGACTTGTATGATGATGTTGTACAGGAAGAGATTTACAGGTACTTGTAGCMAAAGAGATGATTTGACTACAGCAGCAGCGAAGACGACGA SEQ ID NO. 9 SEQ ID NO. 10 SEQ ID NO. 11  
 KX950840 154 CAATAAATACAAATATCTGTTACTTGTATGATGATGATAATTTGTACAGGAAGAAAGTTACAGGTACTTGTAGCMAAAGAAATGATTAGCTACGCGCAGCAGTGAAGATGA SEQ ID NO. 9 SEQ ID NO. 10 SEQ ID NO. 12

- Místa pro nasedání primerů a sond použitých pro detekci viru SMoV

NC\_003445 6259 TCTATGTAGGCACACCGGCTCTTGGTAGTAGGTTACAGCCCTTCTTTGGCCCTAAGTGGGATACCAAGGANCACCTGTATACAGTGCCTCTGTTAGCGATCAGGTACGATCCRAAGCCCA SEQ ID NO. 13 SEQ ID NO. 14 SEQ ID NO. 15  
 KU200457 5548 TCTATGTAGGCACACCGGCTCTTGGCAGTTGGCGTTATAACCCCTTCTTTGGCCCTAAGTGGGATGCCAAGGACACTGTATACAGTGCCTCTGTACGCGGTCTAGTACGCGCCRAAGCCCA SEQ ID NO. 13 SEQ ID NO. 14 SEQ ID NO. 15

- Místa pro nasedání primerů a sond použitých pro detekci viru SPV-1

NC\_025435 2245 AAGTGGATAGCAACTGGGGTGGTACACTCGCGGCCACTACCTACCTGAGTCCGCGCAACATGTCRAAGGATTCGGCTGGAAGCAGGG SEQ ID NO. 16 SEQ ID NO. 17 SEQ ID NO. 18

Příklad 2: Simplexová kvalitativní detekce viru SMYEV v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

5 Pro detekci viru SMYEV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

10 SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)

SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1).

15 PCR amplifikace probíhala v PCR cykleru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu. U pozitivních vzorků na přítomnost viru SMYEV byl identifikován proužek o velikosti 88 bp.

20 Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SMYEV.

25 Příklad 3: Simplexová kvalitativní detekce viru SCV v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

30 Pro detekci viru SCV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

35 SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)

SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCAT (Reverse primer 2)

SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3).

40 PCR amplifikace probíhala v PCR cykleru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

45 Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu. U pozitivních vzorků na přítomnost viru SCV byl identifikován proužek o velikosti 77 bp.

Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SCV.

50



Příklad 4: Simplexová kvalitativní detekce viru SVBV v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

5 Pro detekci viru SVBV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

10 SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)

SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)

SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5).

15 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

20 Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu. U pozitivních vzorků na přítomnost viru SVBV byl identifikován proužek o velikosti 102 bp.

25 Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SVBV.

Příklad 5: Simplexová kvalitativní detekce viru SMoV v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

30 Pro detekci viru SMoV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

35 SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)

SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6).

40 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

45 Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu. U pozitivních vzorků na přítomnost viru SMoV byl identifikován proužek o velikosti 114 bp.

50 Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SMoV.

Příklad 6: Simplexová kvalitativní detekce viru SPV-1 v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

5 Pro detekci viru SPV-1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

10 SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTCGC (Forward primer 5)

SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7).

15 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklieru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu. U pozitivních vzorků na přítomnost viru SPV-1 byl identifikován proužek o velikosti 69 bp.

20 Pozitivní nálezy získané pomocí PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SPV-1.

25 Příklad 7: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru SMYEV v biologickém materiálu metodou real-time PCR

30 Pro detekci viru SMYEV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

35 Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SMYEV použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

40 SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)

SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1).

45 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SMYEV.

50 V ještě výhodnějším provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SMYEV použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi

Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM sonda. V reakci byly použity tyto primery a sonda:

SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)

SEQ ID NO. 2: TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC (Sonda 1)

5 SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1).

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

10

Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SMYEV.

15

Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost viru SMYEV stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy SMYEV o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru SMYEV ve vzorku.

20

Příklad 8: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru SCV v biologickém materiálu metodou real-time PCR

25

Pro detekci viru SCV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

30

Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SCV použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)

35

SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCATT (Reverse primer 2)

SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCA (Reverse primer 3).

40

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

45

Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SCV.

50

V ještě výhodnějším provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SCV použito stejně fluorescenčně značených hybridizačních sond s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM každá sonda. V reakci byly použity tyto primery a sondy:

SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)

SEQ ID NO. 5: TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT (Sonda 2)

SEQ ID NO. 6: TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT (Sonda 3)

SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCAT (Reverse primer 2)

SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3).

5

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sond.

10 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SCV.

15 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost viru SCV stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy SCV o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru SCV ve vzorku.

20 Příklad 9: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru SVBV v biologickém materiálu metodou real-time PCR

25 Pro detekci viru SVBV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

30 Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SVBV použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)

SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)

SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5).

35

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

40 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SVBV.

45 V ještě výhodnějším provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SVBV použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM sonda. V reakci byly použity tyto primery a sonda:

50

SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)

SEQ ID NO. 10: AGTTACAGGTAAGTGTAGCAAAAAGARATGA (Sonda 4)

SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)

SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5).

5 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

10 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SVBV.

15 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost viru SVBV stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy SVBV o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru SVBV ve vzorku.

20 Příklad 10: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru SMOV v biologickém materiálu metodou real-time PCR

25 Pro detekci viru SMOV byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

30 Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SMOV použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)

SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6).

35 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

40 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SMOV.

45 V ještě výhodnějším provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SMOV použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM sonda. V reakci byly použity tyto primery a sonda:

SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)

50 SEQ ID NO. 14: ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTCC (Sonda 5)

SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6).

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

- 5 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SMOV.

- 10 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost viru SMOV stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy SMOV o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru SMOV ve vzorku.

- 15 Příklad 11: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru SPV-1 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

- 20 Pro detekci viru SPV-1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

- 25 Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SPV-1 použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTACTCGC (Forward primer 5)

30 SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7).

- Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

- 35 Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů a přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním jejich sekvence s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SPV-1.

- 40 V ještě výhodnějším provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru SPV-1 použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM sonda. V reakci byly použity tyto primery a sonda:

- 45 SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTACTCGC (Forward primer 5)

SEQ ID NO. 17: ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA (Sonda 6)

SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7).

- 50 Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny přímým sekvenováním PCR amplikonů a porovnáním s databází sekvencí. Ve všech případech byl potvrzen výskyt viru SPV-1.

- 5 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost viru SPV-1 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy SPV-1 o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru SPV-1 ve vzorku.

10

Příklad 12: Současná multiplexová kvalitativní detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

- 15 Pro současnou detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

- 20 SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)  
 SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1)  
 SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)  
 25 SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCAT (Reverse primer 2)  
 SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3)  
 SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)  
 SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)  
 SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5)  
 30 SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)  
 SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6)  
 SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTACTCGC (Forward primer 5)  
 SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7).

- 35 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s.

Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu.

- 40 U vzorků pozitivních na přítomnost viru SMYEV byl identifikován proužek o velikosti 88 bp;  
 u vzorků pozitivních na přítomnost viru SCV byl identifikován proužek o velikosti 77 bp;  
 u vzorků pozitivních na přítomnost viru SVBV byl identifikován proužek o velikosti 102 bp;  
 u vzorků pozitivních na přítomnost viru SMoV byl identifikován proužek o velikosti 114 bp;  
 u vzorků pozitivních na přítomnost viru SPV-1 byl identifikován proužek o velikosti 69 bp.  
 45 U vícenásobně pozitivních vzorků na přítomnost virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 byly identifikovány příslušné proužky.

Pozitivní nálezy získané pomocí PCR v tomto uspořádání byly porovnány s výsledky ze simplexových detekcí virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1, které již byly sekvenačně

ověřeny. Ve všech případech nálezy ze současné detekce všech pěti virů v jedné PCR reakci souhlasily s výsledky ze simplexových reakcí.

5

Příklad 13: Současná multiplexová kvalitativní a kvantitativní detekce virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

10 Pro detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

15 Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 použito odlišně fluorescenčně značených hybridizačních sond specifických pro příslušný virus s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM každá sonda. V reakci byly použity tyto primery a sondy:

20

SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)

SEQ ID NO. 2: TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC (Sonda 1)

SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1)

SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)

25

SEQ ID NO. 5: TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT (Sonda 2)

SEQ ID NO. 6: TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT (Sonda 3)

SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCATT (Reverse primer 2)

SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3)

SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)

30

SEQ ID NO. 10: AGTTACAGGTAAGTGTAGCAAAAGARATGA (Sonda 4)

SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)

SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5)

SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)

SEQ ID NO. 14: ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTC (Sonda 5)

35

SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6)

SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTCTCGC (Forward primer 5)

SEQ ID NO. 17: ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA (Sonda 6)

SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7).

40

Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

45

Pozitivní nálezy získané pomocí PCR v tomto uspořádání byly porovnány s výsledky ze simplexových detekcí virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1, které již byly sekvenčně



ověřeny. Ve všech případech nálezy ze současné detekce všech pěti virů v jedné PCR reakci souhlasily s výsledky ze simplexových reakcí.

5 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři standardy SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Koncentrace virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 u pozitivních vzorků byla stanovena podle příslušné kalibrační křivky.

10

### Průmyslová využitelnost

Nově navržené primery a hybridizační sondy byly optimalizovány pro použití v sadě pro současnou kvalitativní a kvantitativní detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v jedné PCR reakci. Nové sady primerů a hybridizačních sond tedy oproti dosavadnímu stavu techniky zrychlují, zpřesňují a zlevňují diagnostiku onemocnění jahodníku, které je způsobeno viry SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1.

### Seznam použité literatury

20

Thompson JR, Wetzel S, Klerks MM, Vasková D, Schoen CD, Spak J, Jelkmann W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. J Virol Methods. (2003) 111(2):85-93.

25

Xiang Y, Bernardy M, Bhagwat B, Wiersma PA, DeYoung R, Bouthillier M. The complete genome sequence of a new polerovirus in strawberry plants from eastern Canada showing strawberry decline symptoms. Arch Virol. (2015) 160(2):553-6.

30

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada primerů a sond pro současnou PCR detekci virů SMYEV, SCV, SVBV, SMoV a SPV-1 v biologickém materiálu, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

35

SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)  
 SEQ ID NO. 2: TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC (Sonda 1)  
 SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1)  
 40 SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)  
 SEQ ID NO. 5: TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT (Sonda 2)  
 SEQ ID NO. 6: TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT (Sonda 3)  
 SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCAT (Reverse primer 2)  
 SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3)  
 45 SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)  
 SEQ ID NO. 10: AGTTACAGGTAAGTGTAGCAAAGARATGA (Sonda 4)  
 SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)  
 SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5)  
 SEQ ID NO. 13: GTAGGACACGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)  
 50 SEQ ID NO. 14: ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTCC (Sonda 5)  
 SEQ ID NO. 15: TTGGRTCGTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6)  
 SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTCGC (Forward primer 5)  
 SEQ ID NO. 17: ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA (Sonda 6)  
 SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7),

55

kde hybridizační sondy jsou označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce,

příčemž pro PCR detekci viru SMYEV obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

5

SEQ ID NO. 1: CCCTCCTGACGTACACAACAACACTG (Forward primer 1)

SEQ ID NO. 2: TACTCTAGTYGCCATCGAGGTACAGTGC (Sonda 1)

SEQ ID NO. 3: CCGTGAGGGAGGAGAATACGC (Reverse primer 1),

10 pro PCR detekci viru SCV obsahuje sada primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 4: ACAGTRTGCGCTTTAGAGGTTGTT (Forward primer 2)

SEQ ID NO. 5: TCTCAATAYGATTGTACATACCGCAT (Sonda 2)

15 SEQ ID NO. 6: TCTCAATACGATTGCACATATCGCAT (Sonda 3)

SEQ ID NO. 7: ACCTGATTATCTCCCATYCCCAT (Reverse primer 2)

SEQ ID NO. 8: ACTTGATTATCCCCATCCCCA (Reverse primer 3),

20 pro PCR detekci viru SVBV obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 9: AATATCTGTCTTTACTTGATSATGAACTTG (Forward primer 3)

SEQ ID NO. 10: AGTTACAGGTAAGTTGTAGCAAAAGARATGA (Sonda 4)

SEQ ID NO. 11: CGTCTTCGCTGCTGCTGTAGTC (Reverse primer 4)

25 SEQ ID NO. 12: CATCTTCACTGCTGCTGCTGTAG (Reverse primer 5),

pro PCR detekci viru SMoV obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

30 SEQ ID NO. 13: GTAGGACACCGGCTCTTGGYAGT (Forward primer 4)

SEQ ID NO. 14: ACAGGWGGCACTGTTTACAGTGTTC (Sonda 5)

SEQ ID NO. 15: TTGGRTCCTCACCTGAYCTCG (Reverse primer 6)

35 a pro PCR detekci viru SPV-1 obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 16: CAACTGGGGTCGTACTCTCGC (Forward primer 5)

SEQ ID NO. 17: ACCTACCCTGAACTCGCCGAACA (Sonda 6)

40 SEQ ID NO. 18: GGCCAGCCGAATCCTTTGAC (Reverse primer 7).