

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Mgr. Ondřej Lenz
Doktorská disertační práce

České Budějovice, 2007

Paralelní detekce vybraných virů ovocných stromů
pomocí oligonukleotidového mikročipu

Školitel: Doc. RNDr. Karel Petržík, CSc.
Ústav molekulární biologie rostlin, AVČR

Doktorská disertační práce

Mgr. Ondřej Lenz (2007): Paralelní detekce virů ovocných stromů pomocí oligonukleotidového mikročipu [Parallel detection of fruit-tree viruses by an oligonucleotide microarray, Ph.D. thesis, in Czech] – 55p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: An oligonucleotide microarray for the detection of some of fruit-tree viruses was designed and its applicability was tested. The sensitivity of the microarray was compared for different kinds of fluorescently labelled targets: a) cDNA and PCR amplified targets, b) PCR amplified targets labelled using three different labelling methods. The optimal method was chosen for testing of parallel detection of selected viruses.

Tato práce je součástí řešení projektů financovaných z grantů **GA AV** číslo **AV0Z50510513** a **MŠMT** číslo **OC 853.001** jejichž řešitelem je Prof. Ing. Josef Špak, DrSc. (ÚMBR AV ČR České Budějovice).

Prohlašuji, že svoji disertační práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedené v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 22.11.2007

.....

Ondřej Lenz

Vyjádření spoluautorů k podílu autorství Ondřeje Lenze na publikaci:

Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses - Lenz O., Petrzik K., Spak J.

přijaté do tisku v mezinárodním časopise “**Journal of Virological Methods**”
(IF2006 = 2, 097).

Podíl autorů na výše uvedené publikaci, přiložené k této disertační práci, činí:

80% - 10% - 10% (Lenz O. - Petrzik K. - Špak J.)

V Českých Budějovicích, dne 21.11.2007

Doc. RNDr. Karel Petrzik, CSc.

Prof. Ing. Josef Špak, DrSc.

Poděkování

Chtěl bych touto cestou vyjádřit své poděkování mému školiteli **Doc. RNDr. Karlu Petrzikovi CSc.**, a to především:

- za probuzení mého zájmu o rostlinnou virologii
- za zasvěcení do jejích tajů a vedení při mých prvních krocích na poli vědy
- za podporu v dobách „temna“
- za diskuze o světě virů i lidí
- a konečně i za podnětné připomínky k této práci

Také bych chtěl poděkovat všem lidem, kteří více či méně pozitivně ovlivnili průběh mojí cesty vědou. Jmenovitě pak **Mgr. Dagmar Bystřické PhD.** a **Ing. Ivanu Mrázovi CSc.**

Děkuji i svému bývalému spolužákovi a kamarádu **Bc. Janu Němcovi**, neboť nebýt jeho nápadu: „ať to jdu zkusit do laboratoře rostlinné virologie“, možná byste toto moje poděkování nyní nečetli.

DĚKUJI

Ondřej Lenz

Obsah

Motto

1. Úvod – literární přehled.....	1
1.1 Mikročipy.....	1
<u>1.1.1 Princip mikročipu.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1.2 Povrch mikročipu a jeho úpravy.....</u>	<u>2</u>
<u>1.1.3 Typy prób.....</u>	<u>2</u>
1.1.3.1 PCR próby	
1.1.3.2 Syntetické próby	
1.1.3.3 PNA próby	
<u>1.1.4 Příprava mikročipu.....</u>	<u>3</u>
1.1.4.1 Syntéza prób in situ	
1.1.4.2 Tisk připravených prób	
1.1.4.3 Jiné techniky ukotvení prób	
<u>1.1.5 Příprava zkoumaných sekvencí (targets).....</u>	<u>4</u>
<u>1.1.6 Značení zkoumaných sekvencí (targets).....</u>	<u>5</u>
1.1.6.1 Fluorescenční značení	
1.1.6.2 Radioaktivní značení	
1.1.6.3 Značení biotinem nebo digoxigeninem	
1.1.6.4 Jiné typy značení	
1.1.6.5 Použití neznačených sekvencí	
<u>1.1.7 Detekce hybridizovaných sekvencí.....</u>	<u>7</u>
1.1.7.1 Detekce fluorescenčně značených sekvencí	
1.1.7.2 Detekce radioaktivně značených sekvencí	
1.1.7.3 Detekce sekvencí značených biotinem nebo digoxigeninem	
1.1.7.4 Detekce neznačených sekvencí	
1.1.7.5 Techniky zesílení signálu	
1.2 Viry.....	10
<u>1.2.1 Stručná molekulární charakteristika virů použitých v této práci.....</u>	<u>10</u>
<u>1.2.2 Současné metody detekce rostlinných virů.....</u>	<u>11</u>
1.2.2.1 ELISA	
1.2.2.2 PCR (RT-PCR)	
1.2.2.3 Real-time PCR	
1.2.2.4 NASBA	
1.2.2.5 Další metody	

1.3	<i>Současný stav využití mikročipů k detekci virů</i>	13
2.	Zaměření práce	15
3.	Souhrn výsledků	16
	<i>3.1 Návrh prób a příprava mikročipu</i>	
	<i>3.2 Detekční limit mikročipu</i>	
	<i>3.3 Srovnání citlivosti detekce – virová cDNA vs. sekvence amplifikované RT-PCR</i>	
	<i>3.4 Srovnání citlivosti detekce – tři metody fluorescenčního značení</i>	
	<i>3.5 Vliv místa hybridizace próby na citlivost detekce</i>	
	<i>3.6 Paralelní detekce virů</i>	
4.	Závěr	19
5.	Seznam použitých zkratk	20
6.	Použitá literatura	21
7.	Přílohy	38
	A. Potvrzení o přijetí článku do časopisu Journal of Virological Methods	
	B. Rukopis článku přijatý do časopisu Journal of Virological Methods	

Motto:

Teprve na počátku 20. století si svět uvědomil existenci „infekčních agens“ procházejících bakteriálními filtry. Tyto „agens“ byly nazvány viry. První z nich – shodou okolností virus rostlinný – byl izolován v roce 1935 a o čtyři roky později byl též poprvé pozorován elektronovým mikroskopem. Od té doby se naše poznatky o virech dramaticky rozšířily a výzkum virů vyústil v samostatný vědní obor – virologii. V jeho rámci se zkoumají nejen viry samotné, ale i jejich interakce s hostitelskou buňkou, jejich ekologie či evoluce. Díky tomu už dnes víme, že viry nejsou jen nemoc-způsobující patogeny. Jsou to entity stojící „na prahu života“, které mohou změnit náš pohled na podstatu, vznik a vývoj všeho živého na Zemi.

Hledání vhodných technik pro detekci virů patří k těm praktičtějším stránkám virologie, vždyť v dnešní době je známo již přes 1500 různých virů rostlinných a živočišných virů je ještě asi třikrát více. Přesto i toto snažení – byť nepřímé – může pomoci zasadit cenné střípky vědění do nekonečné mozaiky našeho poznávání...

1. Úvod – Literární přehled

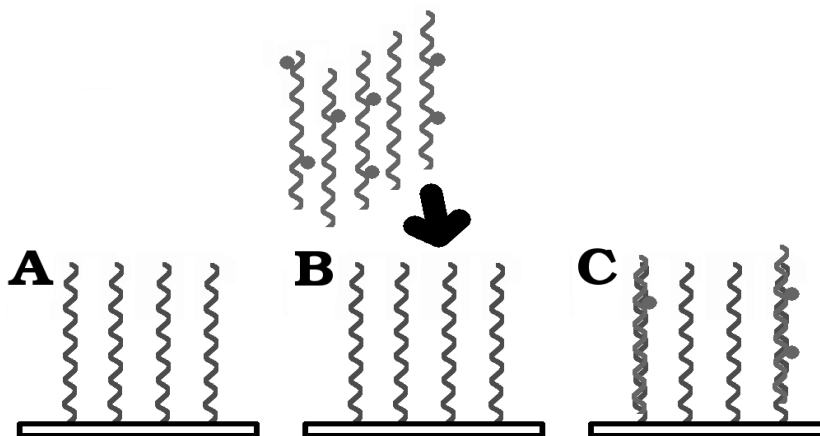
Následující stránky mají širěji seznámit s zpracovávanou problematikou. Nejprve (kapitola **1.1 Mikročipy**) jsou vysvětleny principy metody, jednotlivé rysy mikročipů jsou pak podrobněji rozebrány z hlediska jejich funkce. Tato kapitola nemá být vyčerpávajícím přehledem, nicméně má ilustrovat široký kombinační potenciál metody a popsat nejen její současný stav, ale i nově se objevující možnosti. Druhá část (kapitola **1.2 Viry**) je věnována virům použitým v této práci a současným metodám jejich detekce. Třetí a poslední část úvodu (kapitola **1.3 Současný stav využití mikročipů k detekci virů**) má pak představit mikročipy jako jednu z dalších detekčních metod ve virologii a poskytnout nezbytný úvod k vlastní práci.

1.1 Mikročipy

1.1.1 Princip mikročipu

Mikročipy (DNA-mikročipy, anglicky „microarrays“) představují molekulární metodu pro detekci nebo analýzu sekvencí nukleových kyselin. Princip metody (obrázek 1) spočívá v hybridizaci zkoumaných sekvencí (anglicky „targets“) ke známým jednořetězcovým sekvencím (próbám) imobilizovaným na vhodném povrchu (mikročip). Celý mikročip je tvořen uspořádanou maticí desítek až několika stovek tisíc různých prób; pozice každé próby v matici je předem definována. V jednom kroku je tak možno vyhodnotit až tisíce individuálních hybridizací. Vlastní hybridizace (tj. vznik páru: zkoumaná sekvence – próba) je detekovatelná díky označení zkoumaných sekvencí nějakým molekulárním markerem, nebo je vzniklý pár detekován fyzikálně-chemickými metodami.

Obrázek 1: Princip mikročipu. A) mikročip s próbami; B) hybridizace zkoumaných sekvencí označených markerem (šedá kolečka); C) ve dvou případech došlo k hybridizaci, která je detekovatelná díky přítomnosti markeru.



V současnosti existují i tzv. proteinové mikročipy, kde jako próby slouží specifické protilátky (nebo obecně proteiny) a analyzovány jsou proteiny izolované ze vzorku. Zaměření této práce a rozsáhlost problematiky mikročipů však omezují následující výklad na detekční mikročipy založené na hybridizaci nukleových kyselin.

1.1.2 Povrch mikročipu a jeho úpravy

Z hlediska stavby mikročipu rozlišujeme vlastní nosný materiál mikročipu (nosič, sklíčko, anglicky „slide“) a povrchovou vrstvu (někdy též substrát), na kterou jsou imobilizovány próby. Povrchová vrstva může být s nosičem totožná nebo může mít odlišné chemické složení.

Nejčastějším nosným materiálem je sklo, hojně se využívají také plastové nosiče. Další možnosti představují nylonové, nitrocelulóзовé nebo celulóзовé membrány, kovy, silikon, atp. Použití konkrétních materiálů závisí na předpokládaném použití mikročipu. Skleněné povrchy mají slabou vlastní fluorescenci a jsou tedy vhodné pro práci s fluorescenčně značeným materiálem. Jejich neporézní, hladký povrch umožňuje použít menší objemy analyzovaných vzorků, zrychluje také reakční kinetiku. Dobře snáší vysoké teploty a silné roztoky, umožňuje kovalentní vazbu prób a použití více různých fluorescenčních barviček [1]. Nylonové nebo nitrocelulóзовé membrány se využívají při práci s radioaktivně značenými sekvencemi, i když jejich rozlišovací schopnosti jsou oproti upraveným skleněným povrchům slabší [2]. Byly zkoušeny i speciální porézní povrchy tvořené systémem kanálků, uvnitř kterých jsou próby [např. 3, 4].

Na většinu nosných materiálů (zvláště membrány) lze próby imobilizovat přímo [např. 5], častěji jsou však jejich povrchy upraveny nanesením tenké vrstvy substrátu o odlišném chemickém složení. Nejpoužívanější jsou aminové, aldehydové či epoxidové substráty umožňující kovalentní vazbu prób. K vazbě biotinylovaných prób lze použít avidinové či streptavidinové substráty [6], dobré výsledky poskytují též substráty tvořené tenkou vrstvou nitrocelulóзовé membrány, i když se zatím využívají spíše u proteinových mikročipů [např. 7]. Povrchovou vrstvu může tvořit i tenká vrstva zlata [např. 8, 9] či jiného kovu (nikl, stříbro, měď, platina) [např. 10], jako substráty lze využít i gely. Ty představují lehce připravitelné a levné řešení pro nenáročné mikročipové aplikace [11]. U hydrogelových mikročipů na bázi polypropylen glykolu jsou próby imobilizovány v určitém objemu (a ne jenom na určité ploše jako u ostatních typů mikročipů), což umožňuje větší vazebnou kapacitu, větší rozestupy imobilizovaných prób mezi sebou a homogenní vodní obal prób [12, 13]. Vrstvu světlocitlivé látky bránící vazbě nukleotidů mají pak mikročipy, které umožňují syntézu prób přímo na povrchu mikročipu (viz kapitola 1.1.4.1).

1.1.3 Typy prób

1.1.3.1 PCR próby

Jedná se o 200 – 1000 párů bází (bp) dlouhé molekuly DNA, získané amplifikací (namnožením) ze zkoumaného genomu pomocí specifické PCR (polymerázová řetězová reakce, anglicky „polymerase chain reaction“). V případě, že je zkoumaný genom tvořen molekulami RNA, předchází vlastní amplifikaci ještě reverzní transkripce. Připravenou próbu je nutno přečistit, sekvenovat a většinou i klonovat do plazmidu pro pozdější použití. Před imobilizací prób na povrch mikročipu a před vlastní hybridizací se musí próby denaturovat.

PCR próby se používaly hlavně v počátcích vývoje mikročipů [14]. V současnosti se od jejich použití ustupuje, neboť jejich příprava je zdlouhavá, pracná a dražší než u komerčně syntetizovaných prób. Navíc PCR může vnést do sekvence próby řadu nepřesností, které jsou způsobeny nerovnoměrnou amplifikací, vznikem chimérických či nepřírodních sekvencí [15], nebo

kontaminací jinou sekvencí [16]. PCR próby také nejsou schopny – díky své délce – rozlišit drobné změny v sekvenci [17]. PCR próby se stále ještě používají v některých pracích k přípravě cDNA mikročipů, i zde je však možno připravenou PCR próbu sekvenovat a navrhnout vhodné próby syntetické [18].

1.1.3.2 Syntetické próby

Vhodnější, levnější a v současnosti nejvíce používanou variantou jsou 30 – 70 bp dlouhé jedno-řetězcové DNA próby. Jsou komerčně syntetizovány v dostatečné kvalitě a kvantitě, a odpadá tak celá řada procedur nutná pro přípravu PCR prób [19]. Syntetické próby není nutné před imobilizací na povrch mikročipu denaturovat, mají vyšší specifitu než dlouhé PCR próby [20, 21], mohou být syntetizovány podle libovolného úseku z genomu, mohou být připraveny i próby o náhodné nebo libovolné chimérické sekvenci. Próby mohou být také syntetizovány přímo *in situ* – na povrchu mikročipu – pomocí speciálních technologií (viz kapitola 1.1.4.1 – Syntéza prób *in situ*).

K usnadnění vazby próba – povrch (substrát) mikročipu může být 5' nebo 3'-konec próby modifikován (aminoskupinou, biotinem, apod.).

1.1.3.3 PNA próby

PNA (peptidové nukleové kyseliny, anglicky „peptide nucleic acid“) próby představují relativně nový typ prób používaný při vývoji mikročipů [např. 22]. Jedná se o syntetické analogy DNA, ve kterých je chemická kostra DNA (tvořená deoxyribózou a fosfátovými skupinami) nahrazena polypeptidem. Schopnost hybridizace s DNA je přitom zachována [23]. Výhodou PNA oproti klasickým DNA próbám je přítomnost neutrální polypeptidové kostry, která zvyšuje specifitu párování DNA/PNA, zlepšuje hybridizační vlastnosti [22] i chemickou a enzymatickou stabilitu páru DNA/PNA [24]. Její odlišná struktura pak umožňuje principiálně nové způsoby detekce hybridizovaných molekul (viz kapitola 1.1.7.4).

1.1.4 Příprava mikročipu

1.1.4.1 Syntéza prób *in situ*

Při syntéze prób *in situ* se používají nukleotidy vybavené fotocitlivou skupinou bránící vazbě dalšího nukleotidu. Také povrch mikročipu je chráněn speciální fotocitlivou vrstvou. Próby se syntetizují postupně, po jednom nukleotidu, střídáním 1.) ozařování příslušných míst a 2.) přidání jednoho z nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP nebo dTTP). Ozáření se umožní vazbu nukleotidu na příslušné místo, navázáním nukleotidu na toto místo je vazbě dalších nukleotidů opět zabráněno. Celý proces je řízen počítačem tak, aby bylo možno v co nejméně krocích syntetizovat všechny požadované próby.

V současné době (2007) se přípravou mikročipů *in situ* komerčně zabývají firmy Affymetrix (www.affymetrix.com) a Nimblegen (www.nimblegen.com). Affymetrix používá ozařování přes speciální masky, které je nutné před každým dalším krokem vyměnit, Nimblegen používá soustavu mikro-zrcadel, která jsou nastavitelná a odráží paprsky na příslušné místo. Obě technologie jsou schopny připravit mikročipy s 1 – 2 milióny různých prób (dle firemních webových stránek, říjen 2007).

Nevýhodou celé technologie je zatím její cena [25].

1.1.4.2 Tisk připravených prób

Jednodušší a levnější variantou než syntéza prób *in situ* je imobilizace předem připravených prób k povrchu mikročipu. Celý proces se anglicky nazývá „spotting“ nebo „printing“, odtud český ekvivalent „tisk“. Příklad tisknoucí próby obsahuje sadu dutých mikrojuh, které se nejprve ponoří do roztoku próby, část nasají a přenesou na předem určené místo na povrchu mikročipu. Nasátí roztoku probíhá většinou díky kapilárnímu jevu, vyprázdnění mikrojuhly je možné díky povrchovému napětí mezi roztokem próby a povrchem (substrátem) mikročipu [16]. Popsaný proces se často označuje jako *kontaktní tisk*, neboť při něm dochází ke kontaktu mikrojuhly s povrchem (substrátem) mikročipu. Próby lze na povrch mikročipu dopravit také bezkontaktně (*bezkontaktní tisk*) – rozprašováním kapiček roztoku próby z trysky nad povrchem mikročipu. K tomuto účelu lze dokonce použít i běžně dostupných bublinkových tiskáren [26, 27].

Podle typu povrchu (substrátu) mikročipu a modifikace próby pak dochází buď ke kovalentní vazbě próby k povrchu nebo se próba váže jen na základě afinity k substrátu (např. streptavidinový substrát a biotinylovaná próba) a je nutná fixace próby pomocí tepla, UV záření, nebo elektrostaticky [28].

1.1.4.3 Jiné techniky ukotvení prób

K imobilizaci prób na povrch mikročipu lze použít i elektrické pole. Mikročip je tvořen elektrodami, próba je na čip přidána v roztoku. Po krátkém elektrickém pulzu dochází k vazbě próby buď na příslušnou elektrodu nebo na specifický substrát, kterým je elektroda potažena [29, 30]. Teoreticky je možné postupně obsadit každou elektrodu jinou proubou, tento způsob imobilizace prób je však zatím ve vývoji.

1.1.5 Příprava zkoumaných sekvencí (*targets*)

Sekvence analyzované na mikročipu (zkoumané sekvence, *targets*) jsou ve většině případů kopie RNA nebo DNA izolované ze vzorku (popř. genomové knihovny). Lze je získat přepisem (transkripcí) DNA, reverzní transkripcí z RNA, nebo transkripcí z DNA do RNA. Zmíněné procesy slouží jednak k získání požadovaných fragmentů zkoumaných sekvencí, a jednak ke zvýšení jejich počtu (amplifikaci). Amplifikace může být selektivní – pomocí specifických primerů – nebo náhodná za použití degenerovaných či náhodných primerů. Získané molekuly mohou být dále upravovány – spektrum možností je poměrně široké a volně kombinovatelné, konkrétní příklady jsou rozebírány v kapitole 1.3.

Zároveň s přípravou zkoumaných sekvencí (*targets*) probíhá většinou i jejich značení nějakým molekulárním markerem, umožňujícím jejich následnou detekci na mikročipu (viz dále).

1.1.6 Značení zkoumaných sekvencí (targets)

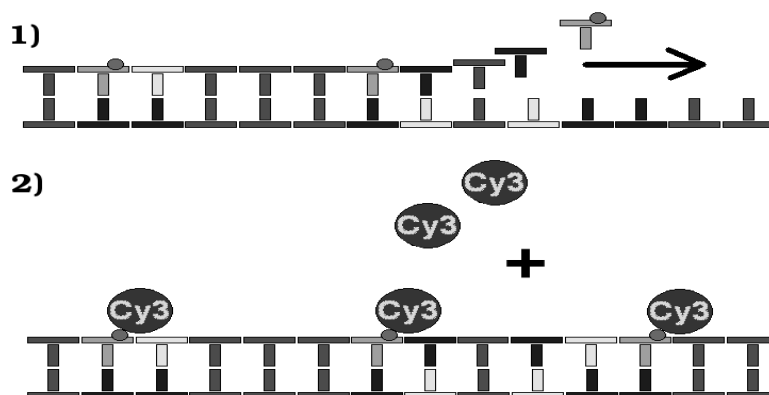
1.1.6.1 Fluorescenční značení

Převládající způsob značení zkoumaných sekvencí spoleshá na fluorescenční barvičky [31]. Fluorescenčně označené molekuly lze detekovat přímo vhodným fluorescenčním scannerem (viz kapitola 1.1.7.1), výhodou je i možnost odlišit od sebe v jednom experimentu vzorky značené různými fluorescenčními barvičkami. Nevýhodou představuje vzájemné pohlcování fluorescence (zhášení) pokud jsou molekuly barvičky příliš blízko sebe [např. 32]. Existuje celá řada různých fluorescenčních barviček (např.: TexasRed, Bodipy, TAMRA, AMCA, Atto, atd.), nově se vyvíjí i barvičky schopné fluorescence na dvou odlišných vlnových délkách [33]. Ve většině současných studií se však používají jen 2 typy: deriváty rhodaminu – barvičky Alexa Fluor (Alexa Fluor 555, 647) – či deriváty cyaninu – barvičky Cy3 nebo Cy5.

Dříve používaným způsobem [34] bylo značení pomocí nukleotidů s navázanou fluorescenční barvičkou (dále jen fluorescenční nukleotid). Pro přípravu zkoumaných sekvencí (targets) se použije jeden typ fluorescenčního nukleotidu a směs neznačených nukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Ve vzniklých zkoumaných sekvencích (targets) je pak část nukleotidů (od jednoho typu) nahrazena nukleotidem fluorescenčním. Tento způsob značení (tzv. přímé značení, anglicky „direct labelling“) vykazuje ale řadu problémů: fluorescenční nukleotidy jsou pro běžné typy polymeráz příliš velké, takže efektivita jejich začleňování do vznikajícího řetězce je malá a závisí i na použité fluorescenční barvičce [31].

Zmíněné nevýhody se snaží obcházet nově vyvinuté metody fluorescenčního značení. Jednou z nich je značení nepřímé (tzv. „indirect labelling“). Je založeno na obdobném principu – použití modifikovaných nukleotidů (viz obrázek 2). Modifikace ale spočívá pouze v přidání aminoskupiny k jedné z bází. Tyto amino-modifikované nukleotidy (amino-allyl dNTP, aa-dNTP) jsou do vznikajícího řetězce začleňovány polymerázami lépe než fluorescenční nukleotidy a jsou podstatně levnější [35]. Fluorescenční barvička se pak váže do již hotového řetězce zkoumané sekvence (target) přes aminoskupinu příslušného aa-dNTP. Oproti metodě přímého barvení pomocí fluorescenčních nukleotidů je množství templátu použitého při nepřímém značení menší [35], prodlužuje se ale čas a počet kroků nutných pro značení.

Obrázek 2. Ilustrace nepřímého značení. Nejprve se použijí amino-modifikované nukleotidy (označené kolečkem), které jsou polymerázou snadno začleňovány do vznikajícího řetězce. Poté následuje barvení připravených sekvencí molekulami fluorescenční barvičky.



Další možností je použití fluorescenčně značených primerů. Primery jsou značeny na 5'-konci jednou nebo více molekulami fluorescenční barvičky a v reakci se používají neznačené, standardní nukleotidy. Výhodou opět je, že polymerázy nemusí pracovat s modifikovanými nukleotidy. Značení touto metodou je lepší a levnější než použití přímého značení fluorescenčními nukleotidy [36].

Nový typ fluorescenčních látek představují tzv. kvantové tečky („Quantum dots“, QD). Jedná se o nanokrystaly připravené z polovodičových materiálů, sférického tvaru, většinou 2 – 10 nm v průměru, pokryté biokompatibilním materiálem. Při těchto rozměrech už nabývají na významu kvantové jevy (odtud název), emisní spektrum QD závisí na velikosti použitého materiálu. Detekce laserovým konfokálním scannerem. [37, 38, 39]. Ačkoliv teoreticky by měly být lepší než fluorescenční barvičky, zatím nebylo dosaženo stejné intenzity značení [40]. Nevýhodou je jejich nespecifická adsorpce k různým povrchům a fakt, že současné fluorescenční scannery neoperují na vlnových délkách nutných pro excitaci QD (vlnové délky menší než 530 nm) [41].

1.1.6.2 Radioaktivní značení

Přímou detekci značených molekul na mikročipu umožňuje i radioaktivní značení [např. 42, 43, 44], i když patří v oblasti mikročipů spíše k okrajově používaným. Provádí se opět prostřednictvím vkládání modifikovaných nukleotidů do syntetizovaných řetězců při přípravě zkoumaných sekvencí. Modifikace v tomto případě spočívá v nahrazení jednoho nebo více atomů v nukleotidu jejich radioaktivními protějšky. Používají se izotopy síry, fosforu nebo vodíku. Výhodnou taktou značených nukleotidů je chemická totožnost značeného a neznačeného nukleotidu – není tedy ovlivněna efektivita jejich použití polymerázami. Množství vzorku potřebné pro radioaktivní značení je menší než v případě značení fluorescenčního [45]. Nevýhodou byla dlouho malá prostorová rozlišovací schopnost detekčních zařízení a nemožnost použít různé značení pro více vzorků. Obě tyto nevýhody však mohou být v budoucnosti překonány (viz kapitola 1.1.7.2).

1.1.6.3 Značení biotinem nebo digoxigeninem

Podobně jako fluorescenční nukleotidy lze k označení zkoumaných sekvencí (targets) použít i nukleotidy či primery nesoucí jiný marker. Většinou se používají nukleotidy značené biotinem [např. 46] či digoxigeninem [např. 47, 48]. Oproti fluorescenčním nukleotidům jsou navíc levnější a snáze se polymerázám do vznikajícího řetězce začleňují [31]. Biotin lze připojit na 3'-konec zkoumaných sekvencí i chemickou reakcí [např. 37]. Nevýhodou představuje nemožnost přímé detekce takto značených molekul – po hybridizaci je nutno použít se látky s afinitou k biotinu, popř. digoxigeninu, které teprve nesou marker umožňující vlastní detekci (podrobněji v kapitole 1.1.7.3).

1.1.6.4 Jiné typy značení

Ke značení zkoumaných sekvencí (targets) byly zkoušeny příklad i chemiluminiscentní látky, které ale nedosahovaly potřebného rozlišení a citlivosti [např. 3].

1.1.6.5 Použití neznačených sekvencí

K hybridizaci lze použít i neznačených zkoumaných sekvencí (targets). Zkoumané sekvence

se připraví pomocí standardních, neznačených nukleotidů nebo může být použita přímo RNA či DNA extrahovaná ze vzorku. Způsoby jejich detekce po vlastní hybridizaci na mikročipu závisí na vlastnostech a typu mikročipu a jsou podrobněji uvedeny v kapitole 1.1.7.4.

1.1.7 Detekce hybridizovaných sekvencí

1.1.7.1 Detekce fluorescenčně značených sekvencí

Fluorescenčně značené molekuly lze na mikročipu detekovat přímo – změřením fluorescence pomocí fluorescenčního scanneru. Vyhodnocení jednoho mikročipu trvá obvykle několik minut a je možno měřit fluorescenci několika fluorescenčních barviček najednou. Nepříjemným, nově zjištěným faktem je, že intenzita fluorescence – zvláště cyaninových fluorescenčních barviček Cy3 a Cy5 – závisí na typu použitého scanneru [49].

1.1.7.2 Detekce radioaktivně značených sekvencí

Také radioaktivně značené sekvence lze detekovat přímo speciálním zobrazovacím přístrojem (tzv. „phosphoimager“), doba detekce se pohybuje obvykle v řádu několika hodin. Možnost rozlišovat jednotlivé izotopy podle emitované energie a také lepší rozlišovací schopnosti nabízí nově vyvinuté scannery [50, 51]. Ty zároveň umožňují i detekci radioaktivity v reálném čase.

1.1.7.3 Detekce sekvencí značených biotinem nebo digoxigeninem

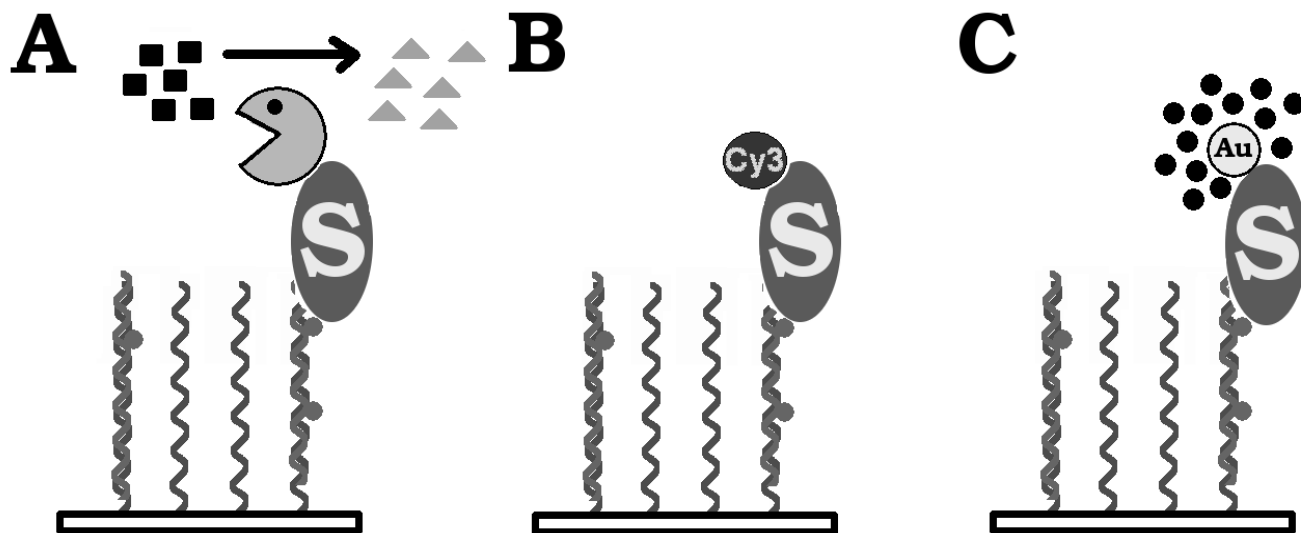
Princip detekce biotinem nebo digoxigeninem značených sekvencí je založen na existenci párů se vzájemnou afinitou: biotinu – streptavidinu (avidinu) nebo digoxigeninu – anti-digoxigeninu (fragmentů specifických protilátek proti digoxigeninu). Ke značeným sekvencím se přidá příslušný vazebný partner značící molekuly (streptavidin nebo anti-digoxigenin), který zároveň nese marker umožňující detekci (viz obrázek 3).

Markerem může být třeba enzym, který způsobuje barevnou změnu vhodného detekčního substrátu (obrázek 3.A). Tento způsob detekce je používán hlavně u jiných molekulárních metod (typicky Dot-Blot, viz kapitola 1.2.2.5), v technice mikročipů je ojedinělý [např. 52, 53]. Více se využívá jeho obměny – techniky TSA (z anglického „tyramide signal amplification“), která v okolí enzymu může ukládat přímo fluorescenčně značený substrát [např. 54, 55]. Touto technikou zároveň dochází k zesílení intenzity signálu (podrobněji v kapitole 1.1.7.5).

Dalším možným markerem může být přímo molekula fluorescenční barvičky (obrázek 3.B). Oproti TSA technice odpadá reakce substrátu s enzymem a je možno použít přímou detekci fluorescenčním scannerem [např. 56, 57].

Ke zviditelnění biotinem značených sekvencí lze použít i konjugáty streptavidinu a zlata, s následným vysrážením stříbra na zlatých nanočásticích (obrázek 3.C) [např. 58, 59, 60].

Obrázek 3. Detekce biotinem značených sekvencí. Ve všech případech je detekce založena na afinitě streptavidinu (ovál označený písmenem S) k biotinu (kolečka na hybridizovaných sekvencích). A) připojený enzym způsobuje změnu barvy detekčního substrátu nebo jeho ukládání v místě reakce; B) fluorescenční barvička vázaná na streptavidin; C) detekce a zesílení signálu vysrážením stříbra (černé kroužky) na atomech zlata vázaných k molekule streptavidinu.

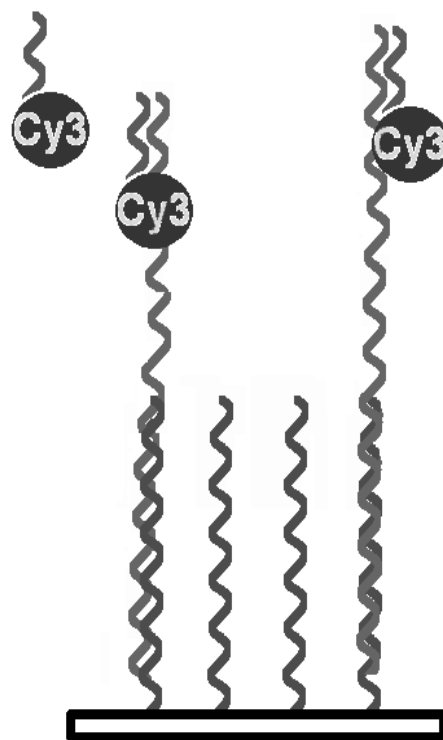


1.1.7.4 Detekce neznačených sekvencí

Detekce neznačených sekvencí využívá kombinaci celé řady nejrůznějších přístupů. Neznačené sekvence je možné hybridizovat na mikročipu zároveň s krátkými jednořetězcovými DNA próbami, hybridizujícími v jiném místě než vlastní detekční próba (tzv. sekundárně hybridizující próby, viz obrázek 4). Tyto sekundárně hybridizující próby mohou být označeny fluorescenčně [např. 4], biotinem či digoxigeninem [např. 61] nebo zlatem [např. 62, 63] a detekovány podobně, jako výše uvedené značené sekvence. Jako sekundárně hybridizující próby mohou být použity i rozvětvené oligonukleotidy (tzv. dendrimery), nesoucí molekuly fluorescenční barvičky [např. 64].

Celou řadu variant zahrnuje i detekce elektrická [např. 65, 66, 67, 68, 69], elektrochemická [např. 70, 71, 72, 73, 74, 75], techniky povrchové plasmonové rezonance (anglicky „surface plasmon resonance“) [9, 76, 77, 78, 79], detekce pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM, anglicky „atomic force microscopy“) [8, 80].

Možnost detekovat neznačené sekvence nabízí i PNA mikročipy v kombinaci s hmotnostní spektrometrií



Obrázek 4. Sekundárně hybridizující fluorescenční próby

detekující fosfátové skupiny v DNA, které chybí u PNA-prób (viz kapitola 1.1.3.3) [22, 24, 81, 82].

Jsou vyvíjeny i další nové techniky [83, 84, 85] nebo speciální mikročipy [86, 87, 88, 89], které využívají neznačené zkoumané sekvence.

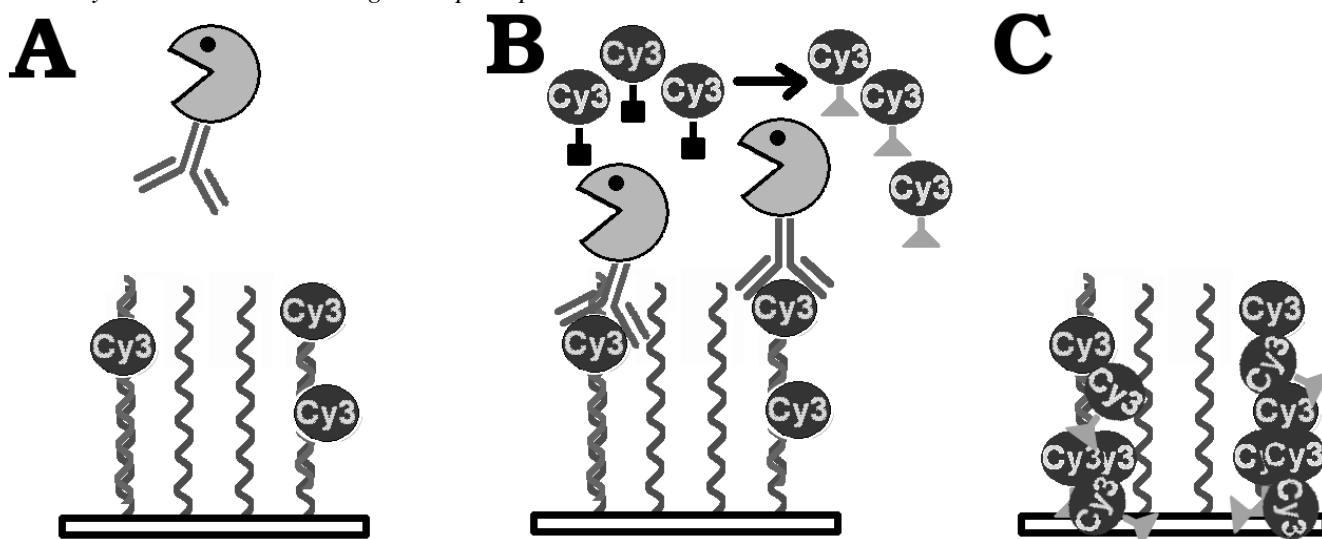
1.1.7.5 Techniky zesílení signálu

Mikročipy často vyžadují k citlivé detekci hybridizaci dostatečného množství zkoumaných sekvencí. Rutinně se tedy materiál ze vzorku amplifikuje pomocí PCR nebo RT-PCR. I takto připravený materiál může být ale mikročipem detekován velmi slabě nebo vůbec. Proto byly vyvinuty techniky, které mohou slabý signál dodatečně zesílit nebo rovnou zesilují značení zkoumaných sekvencí. Zesílení signálu probíhá většinou na mikročipu po hybridizaci zkoumaných sekvencí.

Zesílení signálu poskytují některé techniky uvedené v kapitolách 1.1.7.4 a 1.1.7.5, například technika vysrážení stříbra na zlatem značených sekvencích nebo použití fluorescenčně značených dendrimerů. K zesílení signálu byl použit i kapsidový protein viru Cowpea mosaic virus (CPMV) nesoucí na svém povrchu několik molekul fluorescenční barvičky [90].

Dodatečné zesílení slabého signálu nabízí metoda TSA, použitelná pro zesílení fluorescenčně nebo biotinem či digoxigeninem značených sekvencí. Využívá specifické protilátky proti příslušné značící molekule (tj. fluorescenční barvičce, biotinu nebo digoxigeninu) spojené s enzymem křenovou peroxidázou. Ta mění tyramidový substrát na aktivní, oxidovanou formu, která se snadno váže na molekuly v blízkém okolí. Jelikož k molekulám tyramidu je zároveň kovalentně připojena i příslušná značící molekula (fluorescenční barvička, biotin nebo digoxigenin), dochází k lokálnímu zvýšení koncentrace značících molekul a tím i k zesílení signálu (viz obrázek 5).

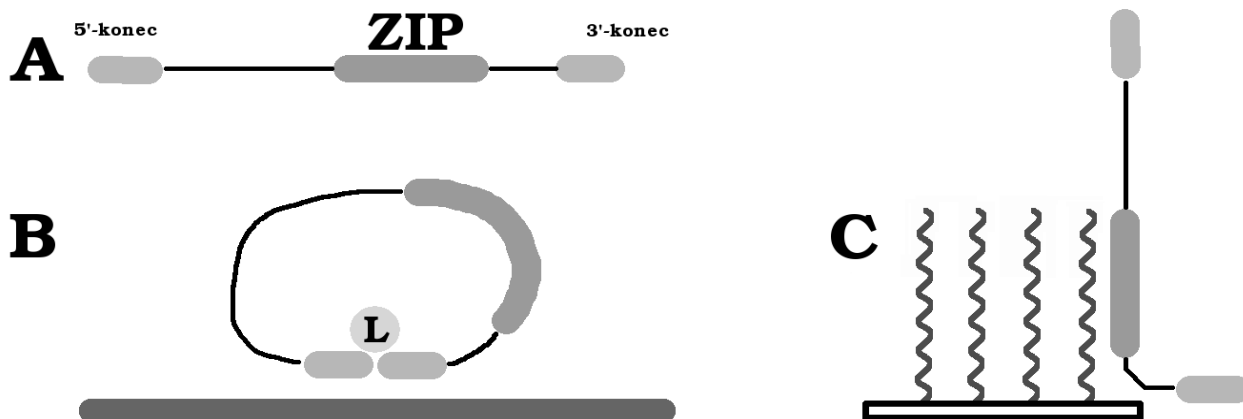
Obrázek 5. Zesílení signálu metodou TSA. A) K fluorescenčně značeným sekvencím se přidá protilátka proti fluorescenční barvičce s navázanou křenovou peroxidázou; B) enzym produkuje aktivní formu tyramidu (trojúhelníčky); C) aktivovaný substrát se ukládá v blízkém okolí spolu s navázanou molekulou fluorescenční barvičky – dochází k zesílení signálu oproti původnímu stavu.



Mechanismus valivé kružnice a přídatné, cirkularizovatelné próby v roztoku (C-próby, Padlock próby) používají pro zesílení signálu některé mikročipy. Próby na mikročipu nejsou v tomto

případě komplementární k sekvencím ze vzorku ale k sekvencím na C-próbě (padlock próbě) – tzv. ZIP sekvence (viz obrázek 6). Na obou koncích C-próby (v lineárním stavu) jsou zároveň sekvence, komplementární k těsně sousedícím oblastem ve vzorku, a sekvence univerzálních primerů.

Obrázek 6. Princip amplifikace C-prób. A) próba v lineárním stavu; B) v případě, že sekvence vzorku odpovídá sekvencím obou koncových oblastí C-próby, dojde k její cirkularizaci a ligaci ligázou (L). Mechanismem valivé kružnice se pak celá C-próba amplifikuje a hybridizuje na mikročip C).



C-próba hybridizuje k sekvencím ze vzorku v lineárním stavu a v případě, že najde odpovídající sekvenci, je cirkularizována pomocí ligázy. Lineární C-próby se zničí exonukleázou, cirkularizované C-próby se amplifikují mechanismem valivé kružnice a hybridizují na mikročip [91, 92].

Existují i další varianty, které používají próby lineární a k amplifikaci dochází až po hybridizaci na mikročip [93].

1.2 Viry

1.2.1 Stručná molekulární charakteristika virů použitých v této práci

Sedm vybraných virů ovocných stromů patří do početně největší skupiny rostlinných virů, jejichž genom je tvořen jednořetězcovou lineární RNA, která je přímo použitelná jako templát k syntéze proteinů. Taxonomicky patří zmiňované viry do tří velkých čeledí: Bromoviridae - *Apple mosaic virus (ApMV)*, *Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)*, *Prune dwarf virus (PDV)*; Flexiviridae - *Apple stem grooving virus (ASGV)*, *Apple stem pitting virus (ASPV)*, *Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)*; Potyviridae - *Plum pox virus (PPV)*. V České republice představují tyto viry nejrozšířenější virové patogeny ovocných stromů. Následující charakteristiky byly sepsány podle záznamů v databázi virů ICTVdB [94].

Zástupci čeledi Bromoviridae (ApMV, PNRSV a PDV) patří všichni k rodu Ilarvirus a mají genom rozdělen do tří různých segmentů (2- 3,5 kb dlouhých), z nichž každý je zabalen v samostatné kapsidě – tvoří tedy viriony o třech různých sedimentačních konstantách. K 5'-konci genomu je připojen speciální 5-5' vazbou 7-methylguanoin trifosfát (tzv. čepička, z anglického „cap“), chrání RNA před exonukleolytickou degradací. 3'-konec genomu je tvořen větším či menším počtem náhodně se opakujících motivů, které se mohou skládat do vlásenkovitých struktur. V jejich genomu nalezneme

celkem 4 čtecí rámce (geny), kódující protein s methyltransferázovou a helikázovou doménou (segment RNA1), RNA polymerázu (segment RNA2), protein umožňující šíření z buňky do buňky (movement protein) a kapsidový protein (segment RNA3). Součástí virionů bývá i subgenomová RNA (RNA4), která obsahuje čtecí rámec pro kapsidový protein.

Zástupci čeledi Flexiviridae (ASGV, ASPV a ACLSV) a Potyviridae (PPV) mají nesegmentovaný genom, na jehož 3'-konci je poly(A)-sekvence. 5'-konec genomu PPV je chráněn proteinem VPg (z anglického „viral protein genome-linked“), viry z čeledi Flexiviridae mají na 5'-konci čepičku (cap).

Genom ACLSV (rod Trichovirus) obsahuje 3 čtecí rámce, kódující pořadě (od 5'-konce) protein s methyltransferázovou, helikázovou a RNA polymerázovou doménou, movement protein a kapsidový protein. Struktura genomu ASGV (rod Capillovirus) je obdobná, první čtecí rámec obsahuje navíc proteázovou doménu. Virus ASPV (rod Foveavirus) má 5 čtecích rámců. Podle prvního z nich se tvoří protein s methyltransferázovou, helikázovou a RNA polymerázovou doménou, poslední slouží jako templát pro kapsidový protein. Zbylé 3 čtecí rámce kódují tři proteiny, zajišťující šíření viru z buňky do buňky (tzv. „triple gene block“ - analogie movement proteinu).

Genom PPV (rod Potyvirus) je tvořen jediným čtecím rámcem, který je překládán do dlouhého polyproteinu. Ten se štěpí ve spolupráci s proteázami hostitelské buňky na deset proteinů zahrnujících 3 proteázy, kapsidový protein, RNA polymerázu, helikázu, a další 4 proteiny s funkcí při replikaci viru.

1.2.2 Současné metody detekce rostlinných virů

1.2.2.1 ELISA

ELISA (z anglického „**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay“) je metoda založená na detekci proteinů pomocí specifických protilátek. Virové proteiny ze vzorku jsou imobilizovány ke stěnám testovací jamky buď přímo nebo pomocí specifických protilátek, jiné specifické protilátky s navázaným enzymem jsou pak použity ke zviditelnění navázaných proteinů – po přidání enzymového substrátu dochází k barevné změně (podrobněji viz [95, 96]).

Výhodou metody je komerční dostupnost řady standardizovaných protilátek a možnost automatizace procesu pro větší množství vzorků. Nevýhodou je závislost citlivosti metody na stupni virové exprese a kvalitě protilátek [97]. V některých případech také určení jednotlivých izolátů pomocí ELISA testů neodpovídá jejich zařazení jinými molekulárními metodami (např. PCR) [98].

1.2.2.2 PCR (RT-PCR)

PCR (z anglického „**P**olymerase **C**hain **R**eaction“) je založena na exponenciální amplifikaci vybraného úseku genomu, ohraničeného dvěma krátkými sekvencemi – primery (podrobněji viz [99]). Výsledky amplifikace se vyhodnocují pomocí gelové elektroforézy. V případě RNA virů se provádí v kombinaci s reverzní transkripcí (RT-PCR) [např. 100]. Citlivost metody je vyšší než u ELISA testů [např. 101, 102], také umožňuje lepší rozlišení jednotlivých izolátů [103, 104].

Vylepšením RT-PCR je multiplex RT-PCR, kdy v jedné reakci probíhá zároveň několik různých PCR s několika různými páry primerů. Výhodou je úspora času a reagensií, nevýhodou je

komplikovaná optimalizace metody a často snížená citlivost oproti klasické RT-PCR. Lze také detekovat jen několik málo virů současně – např. multiplex RT-PCR detekující ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV [105, 106]. Citlivost RT-PCR lze zvýšit kombinací s technikami ELISA: RT-PCR-ELISA [např. 107] nebo tzv. „immunocapture“ RT-PCR [např. 104, 108, 109].

1.2.2.3 Real-time PCR

Real-time PCR je metoda vycházející z běžné PCR, dovoluje však detekci a měření koncentrace produktů PCR v reálném čase – přímo v průběhu PCR. Detekce je založena buď na fluorescenčních molekulách vázajících DNA nebo na fluorescenčně značených primerech nebo próbách. Fluorescence vzorku roste se vzrůstající koncentrací syntetizované DNA a je zaznamenávána přístrojem, ve kterém celá PCR reakce probíhá – podrobněji viz [110, 111]. Hlavní výhodou oproti běžné PCR je možnost přesného stanovení počáteční koncentrace templátu a vyhodnocení celé reakce bez nutnosti použít gelovou elektroforézu. Pro RNA vzorky lze použít jedнокrokovou real-time RT-PCR, kdy reverzní transkripce i následná real-time PCR probíhají v jedné zkumavce.

Real-time RT-PCR je minimálně 100x citlivější než RT-PCR [112, 113]. V živočišné virologii nahrazuje běžnou PCR (popř. RT-PCR) – poměr počtu článků využívajících běžnou PCR a real-time PCR detekci živočišných virů je za poslední dva roky přibližně 1 : 2. V poslední době se začíná více využívat i pro detekci a kvantifikaci rostlinných virů [např. 112, 114, 115, 116]. Rozlišit několik virů najednou je možné v multiplex real-time RT-PCR, která je citlivější než multiplex RT-PCR [např. 114]. Z virů použitých v této práci byla real-time PCR využita zatím pouze pro detekci PPV [např. 117, 118, 119, 120], PNRSV [121] a ACLSV [122].

1.2.2.4 NASBA

NASBA (z anglického „**N**ucleic **A**cid **S**equences **B**ased **A**mplification“) je metoda pro detekci RNA sekvencí; svým provedením a exponenciální amplifikací připomíná RT-PCR, amplifikována je však RNA – podrobněji viz [123, 124]. Celá reakce probíhá díky použitým enzymům (reverzní transkriptáza viru AMV („avian myeloblasty virus“), RNáza-H, RNA polymeráza T7) při konstantní teplotě.

Amplifikovanou RNA lze detekovat například pomocí gelové elektroforézy [125], většinou se ale NASBA používá ve spojení s fluorescenčním značením [např. 126, 127, 128, 129], které umožňuje sledovat průběh reakce v reálném čase – obdobně jako při použití real-time PCR. NASBA je citlivější než běžná RT-PCR [130, 131], umožňuje i multiplex detekci několika virů [128] nebo jejich izolátů [129, 132].

Z virů použitých v této práci byla metodou NASBA detekovány pouze ASPV [133] a PPV [134].

1.2.2.5 Další metody

K detekci rostlinných virů se dá využít i dříve hojně používaná metoda Dot-Blot [např. 135, 136, 137, 138]. Jejím principem je hybridizace značené (radioaktivně, digoxigeninem nebo biotinem) próby o známé sekvenci k DNA nebo RNA ze vzorků ukotvené na nylonové nebo nitrocelulókové

membráně. Výhodou je možnost pomocí jedné próby testovat několik desítek různých vzorků zároveň.

K rozlišení jednotlivých virových izolátů je možno použít metodu RFLP (z anglického „Restriction Fragment Length Polymorphism“), která porovnává délky fragmentů po restrikcím štěpením PCR produktů [107, 139, 140, 141].

Dalšími možnostmi nabízí modifikace nebo kombinace výše uváděných metod [např. 142, 143, 144], samostatné použití tzv. „molecular beacons“ [např. 145, 146] – prób, používaných k fluorescenčnímu značení v některých real-time PCR – nebo nově vyvíjené metody [např. 147]. Více konkrétních příkladů i nově vyvíjené techniky lze nalézt například v [148, 149, 150]. Nově se uplatňující metodu pak představují vlastní mikročipy (viz následující kapitola).

1.3 Současný stav využití mikročipů k detekci virů

Původním účelem mikročipů bylo vyhodnocování genové exprese [1, 151, 152], postupně se ale jejich schopnost rozlišit obrovské množství různých sekvencí v jednom kroku začala používat i pro detekci organismů [153]. První mikročipy detekující viry se objevily v roce 2002 [56, 154, 155, 156] a do současné doby (říjen 2007) bylo na dané téma publikováno či do tisku přijato 80 článků. Většina z nich se zabývá detekcí živočišných virů, osm z nich je věnováno virům rostlinným [17, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163].

Nejvíce mikročipů bylo vyvinuto pro detekci virových původců chorob člověka: virů infekční žloutenky [164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174], virů způsobujících onemocnění dýchacích cest [156, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188] a papillomavirů [6, 57, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196]. Na další lidské patogeny se zaměřovaly mikročipy pro detekci viru HIV („Human immunodeficiency virus“) [53, 197] a jiných retrovirů [198, 199], orthopoxvirů [155, 200, 201, 202], enterovirů [46, 52, 203, 204, 205], herpesvirů [206, 207, 208, 209, 210, 211], rotavirů [154, 212], virů způsobujících onemocnění zažívacího traktu [213], viru SARS („Severe acute respiratory syndrome“) [214, 215, 216], a jiných patogeních lidských virů [56, 199, 204, 217, 218, 219, 220]. Byly také vyvinuty mikročipy pro identifikaci viru kulhavky a slintavky [221, 222, 223] a myších virů [71].

Z rostlinných virů byly úspěšně detekovány viry napadající brambor: *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus A* (PVA), *Potato virus S* (PVS) [17, 157, 158], *Potato leaf-roll virus* (PLRV), *Potato virus M* (PVM) [157], *Andean potato latent virus* (APLV), *Andean potato mottle virus* (APMV) [160], viry napadající okurkovité: *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV), *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV), *Zucchini green mottle mosaic virus* (ZGMMV) [159], *Cucumber mosaic virus* (CMV) [161] a viry napadající ovocné stromy: PPV [práce přijaté do tisku: 162, 163], ApMV, ASPV, PNRSV, PDV [práce přijaté do tisku: 163]. Poslední z citovaných prací je zároveň prezentována v této disertaci.

Ve většině studií převažují fluorescenční metody. Zkoumané sekvence jsou většinou značeny pomocí fluorescenčních nukleotidů, některé studie používají nepřímé fluorescenční značení [např. 157, 179, 224] nebo fluorescenčně značené primery [např. 161, 171, 172]. Bylo popsáno i fluorescenční značení sekvencí přímo na mikročipu [194, 209, 212] nebo detekce neznačených zkoumaných sekvencí pomocí sekundárně hybridizujících fluorescenčních prób [183, 184].

V několika případech byly zkoumané sekvence značeny biotinem nebo digoxigeninem a

detekovány pomocí enzymatické reakce [např. **180**, **222**] nebo fluorescenčně značeným streptavidinem [**167**, **211**]. K detekci neznačených zkoumaných sekvencí byly použity i sekundárně hybridizující próby značené zlatem [**173**] nebo elektrochemický mikročip [**71**].

Problémem zatím zůstává citlivost vyvinutých mikročipů vzhledem k malým koncentracím virů v rostlinách – jen v sedmi pracích bylo detekovány zkoumané sekvence připravené reverzní transkripcí [**17**, **156**, **157**, **159**, **164**, **206**, **162**]. V ostatních případech bylo nutno hybridizovat materiál připravený amplifikací v PCR. Jelikož viry nemají žádný univerzálně amplifikovatelný úsek, používá se většinou specifická RT-PCR, která ovšem může do celého procesu vnést řadu nepřesností [**15**]. Částečně také degraduje výhody mikročipu – pro každý virus je nutno připravit samostatnou reakci a odlišení jednotlivých fragmentů je možno provést i gelovou elektroforézou. Možné řešení představuje náhodná amplifikace virové cDNA pomocí PCR: restriction-display PCR nebo random-primed PCR. V první případě je dvouřetězcová virová cDNA štěpena restriční enzymem a vzniklé fragmenty jsou amplifikovány pomocí univerzálního primeru spojeného s adaptérem k restričnímu místu [např. **36**, **172**]. V druhé metodě je cDNA připravena přímo pomocí primeru sestávajícího ze dvou částí: jedinečné univerzální sekvence a náhodného oktameru. Připravená cDNA se pak amplifikuje primerem komplementárním k univerzální části původního primeru [**176**, **182**, **204**, **219**]. Nevýhodou obou metod oproti specifické PCR je časová náročnost a dodatečné reagenty. Lze použít i signál zesilující metody [**90**, **220**].

Neprozkoumaná je doposud i oblast různých značících metod, které mohou mít podstatný vliv na citlivost detekce [**225**].

2. Zaměření práce

Ačkoliv v současné době se k detekci rostlinných virů používá celá řada metod, žádná z nich neumožňuje detekci většího počtu virů najednou při zachování dostatečné citlivosti a rozlišovací schopnosti. Alespoň principiálně takové možnosti nabízejí mikročipy. Metoda, která se již úspěšně rozvíjí v diagnostice živočišných virů – zvláště pak virů patogenních člověku, ale v rostlinné virologii se zatím příliš neuplatňuje. Cílem výzkumu, představovaného v této práci, bylo prozkoumat možnosti této metody v detekci rostlinných virů. Konkrétní cíl – vyvinout mikročip vhodný pro paralelní detekci vybraných virů ovocných stromů – byl definován následujícími body:

1.) Na základě počítačové analýzy dostupných sekvencí sedmi vybraných virů ovocných stromů (ApMV, ASPV, ASGV, ACLSV, PNRSV, PDV, PPV) navrhnout próby použitelné pro paralelní detekci zmíněných virů pomocí mikročipu.

2.) Otestovat detekční limit mikročipu.

3.) Porovnat citlivost detekce cDNA a PCR amplifikovaných vybraných úseků genomu zmiňovaných virů.

4.) Porovnat tři různé metody značení s ohledem na citlivost detekce: přímé značení pomocí fluorescenčních nukleotidů, nepřímé značení pomocí amino-modifikovaných nukleotidů, a značení fluorescenčním primerem.

5.) Otestovat paralelní detekci virů pomocí mikročipu.

3. Souhrn výsledků

Pokud není uvedeno jinak, byly výsledky prezentované v této kapitole přijaty k publikaci v časopise „Journal of Virological Methods“ (IF₂₀₀₆ = 2,097), kde jsou také podrobněji rozebrány (viz příloha B).

3.1 Návrh prób a příprava mikročipu

Na základě počítačové analýzy databázových sekvencí použitých virů byly vytipovány konzervativní úseky virových genomů a do těchto oblastí bylo navrženo 31 prób o délce 30 až 40 nukleotidů, které splňovaly předem definovaný limit: a) alespoň 80% homologii k sekvenci viru a zároveň b) identický úsek s virovou sekvencí o délce minimálně 15 nukleotidů. Próby musely mít zároveň co nejmenší podobnost (negace podmínek a,b) k sekvencím jiných virů a rostlin. Teoretická specifita prób je podrobněji dokumentována v příloženém článku. Sekvence kontrolní próby byla laskavě poskytnuta dr. Boonhamem (CSL, York, UK).

Navržené próby byly syntetizovány (fy Generi-Biotech) a imobilizovány na aldehydový povrch plastového mikročipu (fy Lambda, Freistadt, Rakousko).

3.2 Detekční limit mikročipu

Detekční limit mikročipu byl stanoven pomocí ředící řady syntetických fluorescenčně značených oligonukleotidů (40nt) komplementárních k próbám na mikročipu. Nejnižší detekovaná koncentrace odpovídala 10^7 molekul, z nichž každá byla označena jednou molekulou fluorescenční barvičky. Tento detekční limit byl potvrzen i následnými hybridizacemi (viz 3.3) intenzivněji značených sekvencí (targets). Ke spolehlivé detekci virů tímto mikročipem je tedy nutné připravit buď dostatečné množství virových zkoumaných molekul (targets) nebo použít některou z metod zesílení signálu.

3.3 Srovnání citlivosti detekce – virová cDNA vs. sekvence amplifikované RT-PCR

Ve všech následujících testech byly pro přípravu zkoumaných sekvencí (targets) použity přírodní izoláty virů ApMV, ASPV, PNRSV, PDV a PPV, které byly nejprve otestovány specifickou RT-PCR na přítomnost všech použitých virů. Byla porovnávána citlivost detekce dvou typů zkoumaných sekvencí (targets: a) virové cDNA připravená pouze reverzní transkripcí, b) úseků z virového genomu amplifikovaných specifickou RT-PCR. V obou případech bylo použito nepřímé fluorescenční značení využívající amino-modifikované nukleotidy (aa-dUTP).

Zatímco RT-PCR produkty byly detekovány všemi próbami, navrženými pro detekci amplifikované oblasti (s výjimkou próby PDV6, viz dále), zkoumané sekvence sestávající z virové cDNA nebyly detekovány ani v jednom případě. To souhlasilo se zjištěným detekčním limitem mikročipu, neboť množství virové cDNA v hybridizovaných vzorcích (zjištěné pomocí real-time PCR) se pohybovalo od 10^3 do 10^5 molekul.

Sekvenování hybridizovaných RT-PCR produktů potvrdilo specifitu hybridizace (dle podmínek a,b v kapitole 3.1) s výjimkou próby PDV6. Ta nedetekovala zkoumané sekvence ani v opakovaných hybridizacích, ačkoliv její podobnost se zkoumanými sekvencemi splňovala definovaný

limit. Pozdější experimenty ukázaly, že hybridizační chování této próby bylo ovlivněno její pozicí na hybridizovaném fragmentu (viz kapitola 3.5).

3.4 Srovnání citlivosti detekce – tři metody fluorescenčního značení

Jelikož použitá metoda značení zkoumaných sekvencí může mít vliv na výslednou citlivost mikročipu, byly porovnány tři různé metody: metoda přímého značení pomocí fluorescenčních nukleotidů, nepřímé značení pomocí amino-modifikovaných nukleotidů, a značení Cy3-primerem. K testování byly použity viry ApMV, PNRSV a PDV; zkoumané sekvence byly ve všech případech připraveny specifickou RT-PCR.

Připravené sekvence (tj. „targets“) značené hybridizovaly ke všem relevantním próbám nezávisle na zvolené značící metodě. Výjimku tvořila próba PDV6, ke které zkoumané sekvence viru PDV nehybridizovaly (obdobně jako v 3.3). Občasná slabá nespecifická hybridizace byla zaznamenána u sekvencí značených Cy3-primerem a metodou přímého značení.

Nejsilnější signál poskytovaly metody nepřímého značení a značení Cy3-primerem. Přímou metodou značené sekvence dávaly ve srovnání se zbylými dvěma metodami vždy slabý, ale dobře rozlišitelný signál. Kvalita signálu (tj. intenzita signálu ve vztahu k fluorescenci pozadí) byla u přímého značení nejvyšší, nejsilnější fluorescence pozadí byla naměřena při detekci sekvencí značených Cy3-primerem.

Jako optimální se jeví metoda značení Cy3-primerem, která byla zároveň metodou nejrychlejší a nejlevnější. Vhodnou optimalizací promývání by bylo možno zlepšit kvalitu signálu u této metody.

3.5 Vliv místa hybridizace próby na citlivost detekce

U prób, které hybridizovaly se zkoumanými sekvencemi blízko jejich 3-konce (próby PNRSV4 a ApMV4) bylo pozorováno statisticky signifikantní zeslabení intenzity signálu oproti ostatním hybridizujícím próbám. V případě próby PDV6, která ležela pouze 42 nukleotidů od 3'-konce zkoumaných sekvencí nebyla hybridizace detekována vůbec, ačkoliv teoreticky (na základě sekvencí podobnosti) zkoumané sekvence k této próbě hybridizovat měly. Zeslabení signálu byl nejlépe patrné u zkoumaných sekvencí značených Cy3-primerem.

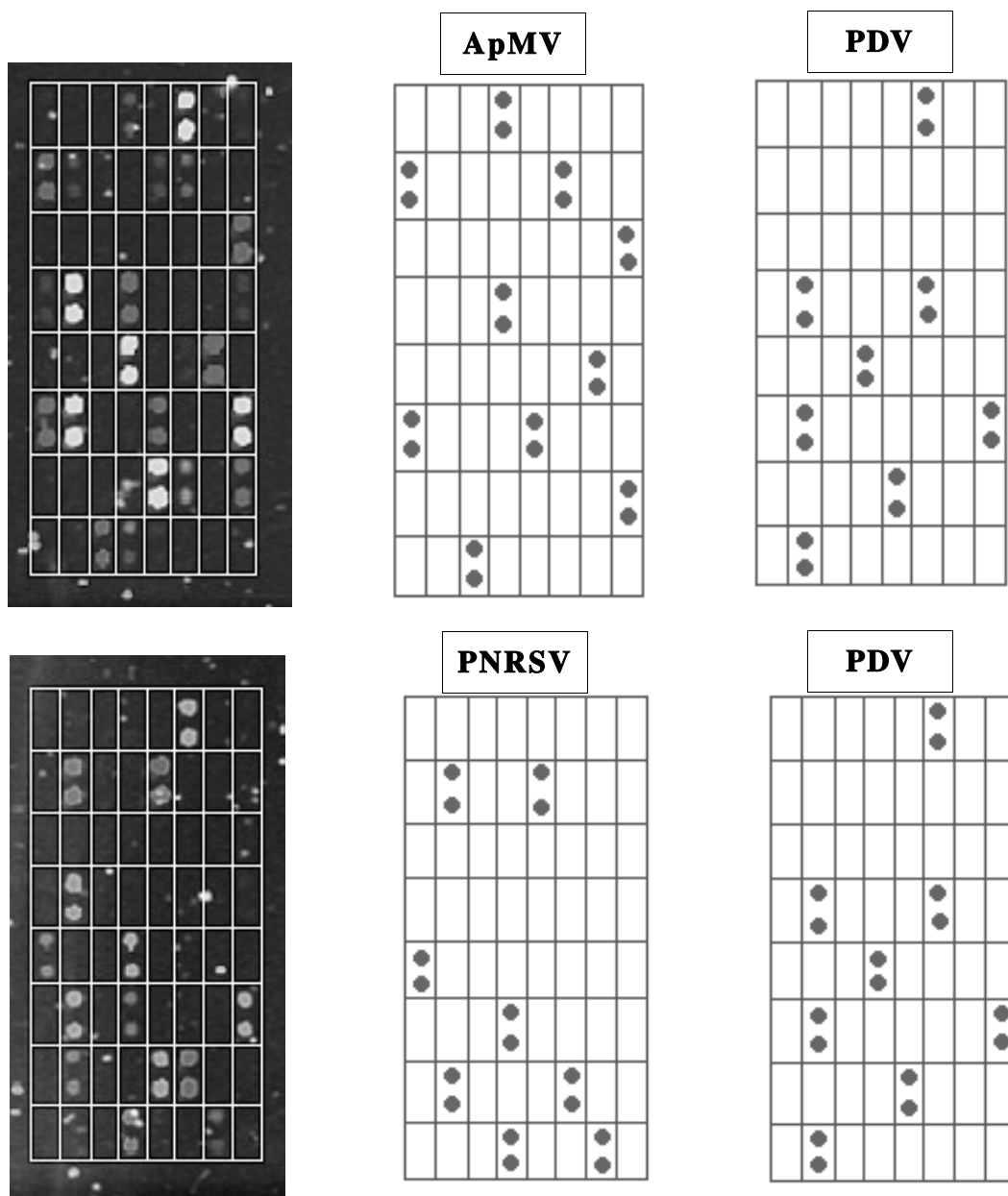
Závislost intenzity signálu na sekvenci hybridizovaných molekul (targets) nebyla pozorována. Próby, které byly obdobně blízko 5'-konce zkoumaných sekvencí zeslabení signálu nevykazovaly.

Obdobné výsledky byly pozorovány i v práci Zhanga a kol. [226]. Jako možné vysvětlení se nabízí vliv molekul fluorescenční barvičky. Pár: próba – zkoumaná sekvence je více nestabilní, když se zkoumaná sekvence váže k próbě jedním ze svých konců. Pokud by molekula fluorescenční barvičky v blízkosti próby dokázala takový pár stabilizovat, pevnější spojení páru: próba – zkoumaná sekvence by se tvořilo v případě 5'-konce zkoumané sekvence kde lze předpokládat vyšší efektivitu značení sekvence. Tento jev by byl nejmarkantnější u sekvencí značených pouze na 5'-konce (např. Cy3-primerem), což odpovídá pozorované skutečnosti. Další roli může hrát i orientace nebo prostorové uspořádání volného konce zkoumaných sekvencí vzhledem k povrchu mikročipu a příslušné próbě.

3.6 Paralelní detekce virů

Předběžné testy paralelní detekce (dosud nepublikováno) byly provedeny s viry ApMV, PNRSV, PDV a ASPV. Zkoumané sekvence byly připraveny dle protokolů použitých v příložené publikaci, ke značení byly použity příslušné Cy3-primery. Každá zkoumaná sekvence byla značena v oddělené RT-PCR, poté byly připravené sekvence smíchány a hybridizovány na mikročip. Všechny umělé směsi zkoumaných sekvencí hybridizovaly k relevantním průbám (s výjimkou próby PDV6, na které k hybridizaci nedošlo) – viz obrázek 7.

Obrázek 7. Předběžné testy paralelní hybridizace – 2 viry současně Tabulky vpravo ukazují předpokládaná místa hybridizace. U viru PDV nehybridizuje próba PDV6 – důvody rozebrány v textu.



4. Závěr

1.) Předkládaná práce popisuje vývoj mikročipu pro paralelní detekci vybraných virů ovocných stromů – ApMV, ASPV, ASGV, ACLSV, PNRSV, PDV a PPV. Plastový mikročip sestává z 31 virových prób (30-40 nt) a 1 kontrolní próby detekci rostlinné rRNA. Celý mikročip byl připraven se záměrem využít při jeho testování fluorescenčních metod, které jsou v současné době nejrozšířenější platformou pro mikročipy.

2.) Detekční limit mikročipu je 10^7 molekul, lze jej však pravděpodobně zvýšit některou z metod amplifikace signálu.

3.) K testování detekce virů z přírodních vzorků byla použita amplifikace pomocí RT-PCR. Koncentrace virové cDNA, připravené reverzní transkripcí, byla příliš nízká pro použití v testech i pro detekci virů.

4.) Jako optimální značící metoda ze tří zkoušených se jeví značení Cy3-primerem: dosahuje dostatečné citlivosti, je levná a rychlá. Pro další použití bude vhodné optimalizovat promývací krok.

5.) Citlivost detekce je ovlivněna místem hybridizace próby na zkoumané sekvenci.

6.) Připravený mikročip je schopen detekce ApMV, PNRSV, PDV a ASPV v jednoduchých i směsných infekcích, schopnost paralelní detekce dalších použitých virů je nutno dále otestovat. Pro zjednodušení celého procesu bude dobré použít metodu, umožňující amplifikaci všech zmíněných virů současně. Pro tyto účely není vhodná multiplex RT-PCR, neboť její optimalizace je příliš zdlouhavá a nákladná. Vhodnější variantou se jeví použít některou z metod náhodné amplifikace (RD-PCR nebo random-primed PCR).

7.) Výsledky testování citlivosti připraveného mikročipu byly přijaty k publikaci v mezinárodním impaktovaném časopise „Journal of Virological Methods“ (IF₂₀₀₆ = 2,097).

8.) Část dosud nepublikovaných výsledků bude doplněna o další testy a použita v připravované publikaci.

5. Seznam použitých zkratk

Tento seznam uvádí jen ty zkratky, které jsou v textu použity vícekrát a jsou vysvětleny jen při prvním použití, nebo se jejich obecná znalost předpokládá. Pokud neexistuje český ekvivalent, je uváděn pouze význam zkratky v anglickém jazyce.

DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
PNA	peptidová nukleová kyselina
cDNA	z anglického „copy DNA“
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dTTP	deoxythymidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
aa-dNTP	aminoallyl-deoxynukleotidtrifosfát
QD	kvantové tečky (z anglického „quantum dots“)
TSA	z anglického „tyramide signal amplification“
AFM	mikroskopie atomárních sil (z anglického „atomic force microscopy“)
RFLP	z anglického „restriction fragment length polymorphism“
PCR	polymerázová řetězová reakce (z anglického „polymerase chain reaction“)
RT	reverzní transkripce (z anglického „reverse transcription“)
ELISA	z anglického „enzyme-linked immunosorbent assay“
NASBA	z anglického „nucleic acid sequence based amplification“
ApMV	virus mozaiky jabloně (z anglického „apple mosaic virus“)
PNRSV	virus nekrotické kroužkovitosti třešně (z anglického „prunus necrotic ringspot virus“)
PDV	virus zakrslosti švestky (z anglického „prune dwarf virus“)
ASPV	virus vrásčitosti kmene jabloně (z anglického „apple stem pitting virus“)
ASGV	virus žlábkovitosti kmene jabloně (z anglického „Apple stem grooving virus“)
ACLSV	virus chlorotické skvrnitosti jabloně (z anglického „Apple chlorotic leafspot virus“)
PPV	virus šarky švestek (z anglického „Plum pox virus“)

6 .Použitá literatura:

- [1] Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (20), 467-470.
- [2] Bailly X., Béna G., Lenief V., de Lajudie P., Avarre J.Ch., 2006. Development of a lab-made microarray for analyzing the genetic diversity of nitrogen fixing symbionts *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae*. *J. Microbiol. Meth.* 67 (1), 114-124.
- [3] Cheek B.J., Steel A.B., Torres M.P., Yu Y.Y., Yang H., 2001. Chemiluminescence detection for hybridization assays on the Flow-Thru chip, a three-dimensional microchannel biochip. *Anal. Chem.* 73 (24), 5777 -5783.
- [4] Schuitema A.R.J., Oskam L., Klatser P.R., Anthony R.M., 2005. Direct detection of *Staphylococcus aureus* mRNA using a flow through microarray. *J. Microbiol. Meth.* 60 (1), 47-54.
- [5] Kimura N., 2006. One-step immobilization of poly(dT)-modified DNA onto non-modified plastic substrates by UV irradiation for microarrays. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 347 (2), 477-484.
- [6] Klaassen C.H.W., Prinsen C.F.M., de Valk H.A., Horrevorts A.M., Jeunink M.A.F., Thunnissen F.B.J.M., 2004. DNA microarray format for detection and subtyping of human Papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 42(5), 2152–2160.
- [7] Thirumalapura N.R., Morton R.J., Ramachandran A., Malayer J.R., 2005. Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies. *J. Immunol. Methods* 298 (1-2), 73-81.
- [8] Thompson M., Cheran L.E., Zhang M., Chacko M., Huo H., Sadeghi S., 2005. Label-free detection of nucleic acid and protein microarrays by scanning Kelvin nanoprobe. *Biosens. Bioelectron.* 20 (8), 1471-1481.
- [9] Garcia II B.H., Goodman R.M., 2007. Use of surface plasmon resonance imaging to study viral RNA:protein interactions. *J. Virol. Methods.*, doi:10.1016/j.jviromet.2007.08.002.
- [10] Anderson J.P., Griffiths M., Boveia V.R., 2006. Near-Infrared Fluorescence Enhancement Using Silver Island Films. *Plasmonics* 1, 103-110.
- [11] Koch C.A., Li P.C.H., Utkhede R.S., 2005. Evaluation of thin films of agarose on glass for hybridization of DNA to identify plant pathogens with microarray technology. *Anal. Biochem.* 342 (1), 93-102.
- [12] Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D., 2004. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* 325 (1), 92-106.
- [13] Gurevitch D., Dong X.F., Pircher T.J., Matsumoto S.S., Roycroft P., Tsinberg P., Falcovitz Y.H., Hahn S., 2001. A Novel Three-Dimensional Hydrogel-Based Microarray Platform. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 6 (4), 87-9.
- [14] Schena M., Shalon D., Heller R., Chai A., Brown P.O., Davis R.W., 1996. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (20), 10614-10619.

- [15] Kanagawa T., 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions. *J. Biosci. Bioeng.* 96 (4), 317-323.
- [16] Hegde P., Qi R., Abernathy K., Gay C., Dharap S., Gaspard R., Hughes J.E., Snesrud E., Lee N., Quackenbush J., 2000. A concise guide to cDNA microarrays analysis. *Biotechniques* 29, 548-556.
- [17] Boonham N., Walsh K., Smith P., Madagan K., Graham I., Barker I., 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J. Virol. Methods* 108 (2), 181-187.
- [18] Relógio A., Schwagerl Ch., Richter I.A., Ansorge I.W., Valcárcel J., 2002. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 30 (11), e51.
- [19] Avarre J.Ch., de Lajudie P., Béna G., 2006. Hybridization of genomic DNA to microarrays: A challenge for the analysis of environmental samples. *J. Microbiol. Meth.* 69 (2), 242-248.
- [20] Kane M.D., Jatkoa T.A., Stumpf C.R., Lu J., Thomas J.D., Madore S.J., 2000. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.* 28 (22), 4552-4557.
- [21] Schröder S., Weber J., Paul H., 2001. 50 nucleotide long probes on microarrays enable high signal intensity and high specificity. *Genomic Discovery, MWG AG Biotech.* Application note 014, 1-4.
- [22] Arlinghaus H.F., Schröder M., Feldner J.C., Brandt O., Hoheisel J.D., Lipinsky D., 2004. Development of PNA microarrays for gene diagnostics with TOF-SIMS. *Appl. Surf. Sci.* 231-232, 392-396.
- [23] Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens Ch., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E., 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365, 566-568.
- [24] Brandt O., Hoheisel D., 2004. Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends Biotechnol.* 22 (12), 617-622.
- [25] Loy A., Bodrossy L., 2006. Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin. Chim. Acta* 363, 106–119.
- [26] Allain L.R., Askari M., Stokes D.L., Vo-Dinh T., 2001. Microarray sampling-platform fabrication using bubble-jet technology for a biochip system. *Fresenius' Journal of Anal. Chem.* 371 (2), 146-150.
- [27] Okamoto T., Suzuki T., Yamamoto N., 2000. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using Bubble Jet technology. *Nat. Biotechnol.* 18 (4), 438-441.
- [28] Barrett J.C., Kawasaki E.S., 2003. Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov. Today* 8 (3), 134-141.
- [29] Fixe F., Branz H.M., Louro N., Chu V., Prazeres D.M.F., Conde J.P., 2004. Immobilization and hybridization by single sub-millisecond electric field pulses, for pixel-addressed DNA microarrays. *Biosens. Bioelectron.* 19 (12), 1591-1597.

- [30] Fixe F., Cabeça R., Chu V., Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M., Conde J.P., 2003. Electric-field-pulse-assisted covalent immobilization of DNA in the nanosecond time scale. *Appl. Phys. Lett.* 83 (7), 1465-1467.
- [31] Park H.G., Song J.Y., Park K.H., Kim M.H., 2006. Fluorescence-based assay formats and signal amplification strategies for DNA microarray analysis. *Chem. Eng. Sci.* 61 (3), 954-965.
- [32] Cox W.G., Beaudet M.P., Agnew J.Y., Ruth J.L., 2004. Possible sources of dye-related signal correlation bias in two-color DNA microarray assays. *Anal. Biochem.* 331 (2), 243-254.
- [33] Demchenko A.P., 2006. Visualization and sensing of intermolecular interactions with two-color fluorescent probes. *FEBS Lett.* 580 (12), 2951-2957.
- [34] Baggerly K., Mitra R., Grier R., Medhane D., Lozano G., Kapoor M., 2004. Comparison of sample-labeling techniques in DNA microarray experiments. *Anal. Chim. Acta* 506 (2), 117-125.
- [35] Xiang C.C., Kozhich O.A., Chen M.M., Inman J.M., Phan Q.N., Chen Y., Brownstein M.J., 2002. Amine-modified random primers to label probes for DNA microarrays. *Nat. Biotechnol.* 20, 738-742.
- [36] Li L., Ma W.L., Zhu J., Shi R., Liu C.H., Chen J.K., Zheng W.L., 2003. A modified restriction display PCR method in sample-labelling of DNA microarray. *J. Virol. Methods* 114 (1), 71-75.
- [37] Liang R.Q., Li W., Li Y., Tan C.Y., Li J.X., Jin J.X., Ruan K.Ch., 2005. An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucleic Acids Res.* 33(2), e17.
- [38] Gerion D., Chen F., Kannan B., Fu A., Parak W.J., Chen D.J., Majumdar A., Alivisatos A.P., 2003. Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multiallele DNA detection using fluorescent nanocrystals and microarrays. *Anal. Chem.* 75 (18), 4766-4772.
- [39] Tholouli E., Hoyland J.A., Vizio D.D., O'Connell F., MacDermott S.A., Twomey D., Levenson R., Yin J.A.L., Golub T.R., Loda M., Byers R., 2006. Imaging of multiple mRNA targets using quantum dot based in situ hybridization and spectral deconvolution in clinical biopsies. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 348 (2), 628-636.
- [40] Nagl S., Schaeferling M., Wolfbeis O.S., 2005. Fluorescence analysis in microarray technology. *Microchim. Acta* 151(1-2), 1-21.
- [41] Schäferling M., Nagl S., 2006. Optical technologies for the read out and quality control of DNA and protein microarrays. *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (3), 500-517.
- [42] Adamczyk J., Hesselsoe M., Iversen N., Horn M., Lehner A., Nielsen P.H., Schloter M., Roslev P., Wagner M., 2003. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl. Environ. Microb.* 69 (11), 6875-6887.
- [43] Bontemps C., Golfier G., Gris-Liebe C., Carrere S., Talini L., Boivin-Masson C., 2005. Microarray-based detection and typing of the *Rhizobium* nodulation gene *nodC*: potential of DNA arrays to diagnose biological functions of interest. *Appl. Environ. Microb.* 71 (2), 8042-8048.

- [44] Whitney L.W., Becker K.G., 2001. Radioactive ³³P probes in hybridization to glass cDNA microarrays using neural tissues. *J. Neurosci. Meth.* 106 (1), 9-13.
- [45] Bertucci F., Bernard K., Loriord B., Chang Y.C., Granjeaud S., Birnbaum D., Nguyen C., Peck K., Jordan B.R., 1999. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1715–1722.
- [46] Chen T.C., Chen G.W., Hsiung C.A., Yang J.Y., Shih S.R., Lai Y.K., Juang J.L., 2006. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *J. Clin. Microbiol.* 44 (6), 2212-2219.
- [47] Matsunaga T., Nakayama H., Okochi M., Takeyama H., 2001. Fluorescent detection of cyanobacterial DNA using bacterial magnetic particles on a MAG-microarray. *Biotechnol. Bioeng.* 73 (5), 400-405.
- [48] Fessehaie A., De Boer S.H., Levesque C.A., 2003. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology* 93 (3), 262-269.
- [49] Sunkara V., Hong B.J., Park J.W., 2007. Sensitivity enhancement of DNA microarray on nano-scale controlled surface by using a streptavidin–fluorophore conjugate. *Biosens. Bioelectron.* 22 (7), 1532-1537.
- [50] Cekaite L., Hovig E., Hauge H.H., 2004. Double-sided silicon strip detectors: new applications within genomics and proteomics. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 527 (1-2), 68-72.
- [51] Salin H., Vujasinovic T., Mazurie A., Maitrejean S., Menini C., Mallet J., Dumas S., 2002. A novel sensitive microarray approach for differential screening using probes labelled with two different radioelements. *Nucleic Acids Res.* 30 (4), e17.
- [52] Shih S.R., Wang Y.W., Chen G.W., Chang L.Y., Lin T.Y., Tseng M.C., Chiang C., Tsao K.C., Huang C.G., Shio M.R., Tai J.H., Wang S.H., Kuo R.L., Liu W.T., 2003. Serotype-specific detection of enterovirus 71 in clinical specimens by DNA microchip array. *J. Virol. Methods* 111 (1), 55-60.
- [53] Perrin A., Duracher D., Perret M., Cleuziat P., Mandrand B., 2003. A combined oligonucleotide and protein microarray for the codetection of nucleic acids and antibodies associated with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections. *Anal. Biochem.* 322 (2), 148-155.
- [54] Karsten S.L., Van Deerlin V.M.D., Sabatti Ch., Gill L.H., Geschwind D.H., 2002. An evaluation of tyramide signal amplification and archived fixed and frozen tissue in microarray gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 30(2), e4.
- [55] Denev V.J., Park J., Rodrigues J.L., Tsoi T.V., Hashsham S.A., Tiedje J.M., 2003. Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 5, 933–943.
- [56] Wilson W.J., Strout C.L., DeSantis T.Z., Stilwell J.L., Carrano A.V., Andersen G.L., 2002. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol. Cell Probes* 16(2), 119-27.

- [57] Gharizadeh B., Kaller M., Nyren P., Andersson A., Uhlen M., Lundeberg J., Ahmadian A., 2003. Viral and microbial genotyping by a combination of multiplex competitive hybridization and specific extension followed by hybridization to generic tag arrays. *Nucleic Acids Res.* 31(22), e146.
- [58] Cao X., Wang Y.F., Zhang Ch.F., Gao W.J., 2006. Visual DNA microarrays for simultaneous detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* coupled with multiplex asymmetrical PCR. *Biosens. Bioelectron.* 22 (3), 393-398.
- [59] Liang R.Q., Tan C.Y., Ruan K.Ch., 2004. Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement. *J. Immunol. Methods* 285 (2), 157-163.
- [60] Wang J., Song F.Y., Zhou F.M., 2002. Silver-enhanced imaging of DNA hybridization at DNA microarrays with scanning electrochemical microscopy. *LANGMUIR* 18 (17), 6653-6658.
- [61] Elsholz B., Worl R., Blohm L., Albers J., Feucht H., Grunwald T., Jurgen B., Schweder T., Hintsche R., 2006. Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal. Chem.* 78 (14), 4794-4802.
- [62] Sun Y., Fan W.H., McCann M.P., Golovlev V., 2005. Microarray gene expression analysis free of reverse transcription and dye labeling. *Anal. Biochem.* 345 (2), 312-319.
- [63] Storhoff J.J., Marla S.S., Bao P., Hagenow S., Mehta H., Lucas A., Garimella V., Patno T., Buckingham W., Cork W., Muller U.R., 2004. Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosens. Bioelectron.* 19, 875–883.
- [64] Stears R.L., Getts R.C., Gullans S.R., 2000. A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology. *Physiol. Genomics* 3, 93-99.
- [65] Dharuman V., Nebling E., Grunwald T., Albers J., Blohm L., Elsholz B., Wörl R., Hintsche R., 2006. DNA hybridization detection on electrical microarrays using coulstatic pulse technique. *Biosens. Bioelectron.* 22 (5), 744-751.
- [66] Liepold P., Wieder H., Hillebrandt H., Friebel A., Hartwich G., 2005. DNA-arrays with electrical detection: A label-free low cost technology for routine use in life sciences and diagnostics. *Bioelectrochemistry* 67 (2), 143-150.
- [67] Gheorghe M., Guiseppi-Elie A., 2003. Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. *Biosens. Bioelectron.* 19 (2), 95-102.
- [68] Gabig-Ciminska M., Los M., Holmgren A., Albers J., Czyz A., Hintsche R., Wegrzyn G., Enfors S.O., 2004. Detection of bacteriophage infection and prophage induction in bacterial cultures by means of electric DNA chips. *Anal. Biochem.* 324, 84–91.
- [69] Liu Y.L., Elsholz B., Enfors S.O., Gabig-Ciminska M., 2007. Confirmative electric DNA array-based test for food poisoning *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Meth.* 70 (1), 55-64.
- [70] Choi Y.S., Lee K.S., Park D.H., 2005. Hybridization by an electrical force and electrochemical genome detection using an indicator-free DNA on a microelectrode-array DNA chip. *Bulletin of the Korean chemical*

society 26 (3), 379-383.

[71] Goto K., Horiuchi H., Shinohara H., Motegi K., Hashimoto K., Hongo S., Gemma N., Hayashimoto N., Itoh T., Takakura A., 2007. Specific and quantitative detection of PCR products from *Clostridium piliforme*, *Helicobacter bilis*, *H. hepaticus*, and mouse hepatitis virus infected mouse samples using a newly developed electrochemical DNA chip. *J. Microbiol. Meth.* 69 (1), 93-99.

[72] Pan J., 2007. Voltammetric detection of DNA hybridization using a non-competitive enzyme linked assay. *Biochem. Eng. J.* 35 (2), 183-190.

[73] Gao Z.Q., Yu Y.H., 2007. A microRNA biosensor based on direct chemical ligation and electrochemically amplified detection. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 121 (2), 552-559.

[74] Roth K.M., Peyvan K., Schwarzkopf K.R., Ghindilis A., 2006. Electrochemical detection of short DNA oligomer hybridization using the CombiMatrix ElectraSense Microarray reader. *Electroanalysis* 18 (19-20), 1982-1988.

[75] Thorp H.H., 2003. Reagentless detection of DNA sequences on chemically modified electrodes.. *Trends Biotechnol.* 21 (12), 522-524.

[76] Nelson B.P., Liles M.R., Frederick K.B., Corn R.M., Goodman R.M., 2002. Label-free detection of 16S ribosomal RNA hybridization on reusable DNA arrays using surface plasmon resonance imaging. *Environ. Microbiol.* 4, 735-743.

[77] Wong C.L., Ho H.P., Yu T.T., Suen Y.K., Chow W.W.Y., Wu S.Y., Law W.C., Yuan W., Li W.J., Kong S.K., Lin C., 2007. Two-dimensional biosensor arrays based on surface plasmon resonance phase imaging. *Appl. Optics* 46 (12), 2325-2332.

[78] Chen S.J., Su Y.D., Hsiu F.M., Tsou C.Y., Chen Y.K., 2005. Surface plasmon resonance phase-shift interferometry: Real-time DNA microarray hybridization analysis. *J. Biomed. Opt.* 10 (3), 034005.

[79] Lee H.J., Li Y., Wark A.W., Corn R.M., 2005. Enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging detection of DNA by exonuclease III digestion of DNA microarrays. *Anal. Chem.* 77 (16), 5096-5100.

[80] Sawant P.D., Watson G.S., Nicolau D., Myhra S., Nicolau D.V., 2005. Hierarchy of DNA immobilization and hybridization on poly-L-lysine using an atomic force microscopy study. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (6), 951-957.

[81] Brandt O., Feldner J., Stephan A., Schröder M., Schnölzer M., Arlinghaus H.F., Hoheisel J.D., Jacob A., 2003. PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res.* 31(19), e119.

[82] Brandt O., Feldner J., Hellweg S., Schroder M., Stephan A., Arlinghaus H.F., Hoheisel J.D., Jacob A., 2006. Development towards label- and amplification-free genotyping of genomic DNA. *Appl. Surf. Sci.* 252 (19), 6935-6940.

[83] Yamaguchi R., Miyamoto K., Ishibashi K., Hirano A., Said S.M., Kimura Y., Niwano M., 2007. DNA hybridization detection by porous silicon-based DNA microarray in conjugation with infrared microspectroscopy. *J. Appl. Phys.* 102 (1), 014303.

- [84] Zhu X.D., Landry J.P., Sun Y.S., Gregg J.P., Lam K.S., Guo X.W., 2007. Oblique-incidence reflectivity difference microscope for label-free high-throughput detection of biochemical reactions in a microarray format. *Appl. Optics* 46 (10), 1890-1895.
- [85] Sun Y., Jacobson K.B., Golovlev V., 2007. Label-free detection of biomolecules on microarrays using surface-colloid interaction. *Anal. Biochem.* 361 (2), 244-252.
- [86] Huber F., Hegner M., Gerber Ch., Güntherodt H.J., Lang H.P., 2006. Label free analysis of transcription factors using microcantilever arrays. *Biosens. Bioelectron.* 21 (8), 1599-1605.
- [87] McKendry R., Zhang J., Arntz Y., Strunz T., Hegner M., Lang H.P., Baller M.K., Certa U., Meyer E., Güntherodt H.J., Gerber Ch., 2002. Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 9783–9788.
- [88] Ingebrandt S., Offenhausser A., 2006. Label-free detection of DNA using field-effect transistors. *Phys. Status Solidi A* 203 (14), 3399-3411.
- [89] Koehne J.E., Chen H., Cassell A.M., Yi Q., Han J., Meyyappan M., Li J., 2004. Miniaturized multiplex label-free electronic chip for rapid nucleic acid analysis based on carbon nanotube nanoelectrode arrays. *Clin. Chem.* 50 (10), 1886-1893.
- [90] Soto C.M., Blum A.S., Vora G.J., Lebedev N., Meador C.E., Won A.P. Chatterji A., Johnson J.E., Ratna B.R., 2006. Fluorescent signal amplification of carbocyanine dyes using engineered viral nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5184-5189.
- [91] Nallur G., Luo C., Fang L., Cooley S., Dave V., Lambert J., Kukanskis K., Kingsmore S., Lasken R., Schweitzer B., 2001. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 29, e118.
- [92] Szemes M., Bonants P., de Weerd M., Baner J., Landegren U., Schoen C.D., 2005. Diagnostic application of padlock probes-multiplex detection of pathogens using universal microarrays. *Nucleic Acids Res.* 33 (8), e70.
- [93] Ladner D.P., Leamon J.H., Hamann S., Tarafa G., Strugnell T., Dillon D., Lizardi P., Costa J., 2001. Multiplex detection of hotspot mutations by rolling circle-enabled universal microarrays. *Laboratory Investigation* 81, 1079–1086.
- [94] ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4, April 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>
- [95] Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34 (3), 475-483.
- [96] Vann W.F., Sutton A., Schneerson R., 1990. Enzyme-linked-immunosorbent-assay. *Method. Enzymol.* 184, 537-541.
- [97] Cambra M., Boscia D., Myrta A., Palkovics M., Navratil M., Barba M., Gorris M.T., Capote N., 2006. Detection and characterization of Plum pox virus: serological methods. *EPP0 Bull.* 36, 254–261.

- [98] Candresse T., Cambra M., Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorris M.T., Reverse F., Macquaire G., Olmos A., Boscia D., Quiot J.B., Dunez J., 1998. Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology* 88, 198–204.
- [99] Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J., 1991. Recent advances in the polymerase chain-reaction. *Science* 252 (5013), 1643-1651.
- [100] Olmos A., Capote N., Candresse T., 2006. Detection and characterization of Plum pox virus: molecular methods. *EPPO Bull.* 36, 262–266.
- [101] Kirby M.J., Guise C.M., Adams A.N., 2001. Comparison of bioassays and laboratory assays for apple stem grooving virus. *J. Virol. Methods* 93 (1-2), 167-173.
- [102] Mekuria G., Ramesh S.A., Alberts E., Bertozzi T., Wirthensohn M., Collins G., Sedgley M., 2003. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *J. Virol. Methods* 114 (1), 65-69.
- [103] Hammond R.W., Crosslin J.M., Pasini R., Howell W.E., Mink G.I., 1999. Differentiation of closely related but biologically distinct cherry isolates of Prunus necrotic ringspot virus by polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 80 (2), 203-212.
- [104] Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asenio M., 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *J. Virol. Methods* 68 (2), 127-137.
- [105] Hassan M., Myrta A., Polak J., 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 133 (2), 124-129.
- [106] Menzel W., Jelkmann W., Maiss E., 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 99 (1-2), 81-92.
- [107] Menzel W., Zahn V., Maiss E., 2003. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. *J. Virol. Methods* 110 (2), 153-157.
- [108] James D., 1999. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods* 83(1-2), 1-9.
- [109] Helguera P.R., Taborda R., Docampo D.M., Ducasse D.A., 2001. Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of Prunus necrotic ring spot virus in the peach. *J. Virol. Methods* 95 (1-2), 93-100.
- [110] Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30 (6), 1292-1305.
- [111] Gunson R.N., Collins T.C., Carman W.F., 2006. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J. Clin. Virol.* 35 (4), 355-367.

- [112] Beuvea M., Sempéa L., Lemaire O., 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. *J. Virol. Methods* 141 (2), 117-124
- [113] Mankoč S., Hostnik P., Grom J., Toplak I., Klobučar I., Kosec M., Barlič-Maganja D., 2007. Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: A novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR-ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. *J. Virol. Methods* 146 (1-2), 341-354.
- [114] Agindotan B.O., Shiel P.J., Berger P.H., 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan® real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 142 (1-2), 1-9.
- [115] Ruiz-Ruiz S., Moreno P., Guerri Ch., Ambrós S., 2007. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues. *J. Virol. Methods* 145 (2), 96-105.
- [116] Mason G., Caciagli P., Accotto G.P., Noris E., 2007. Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *J. Virol. Methods*, doi:10.1016/j.jviromet.2007.09.015.
- [117] Varga A., James D., 2005. Detection and differentiation of plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *J. Virol. Methods* 123, 213–220.
- [118] Schneider W.L., Sherman D.J., Stone A.L., Damsteegt V.D., Frederick R.D., 2004. Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *J. Virol. Methods* 120 (1), 97-105.
- [119] Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M., 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *J. Virol. Methods* 128 (1-2), 151-155.
- [120] Varga A., James D., 2006. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *J. Virol. Methods* 123 (1-2), 146-153.
- [121] Marbot S., Salmon M., Vendrame M., Huwaert A., Kummert J., Dutrecq O., Lepoivre P., 2003. Development of real-time RT-PCR assay for detection of *Prunus* necrotic ringspot virus in fruit trees. *Plant Dis.* 87 (11), 1344-1348.
- [122] Salmon M.A., Vendrame M., Kummert J., Lepoivre P., 2002. Detection of apple chlorotic leaf spot virus using a 5' nuclease assay with a fluorescent 3' minor groove binder-DNA probe. *J. Virol. Methods* 104 (1), 99-106.
- [123] Compton J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91–92.
- [124] Weusten J.J.A.M., Carpay W.M., Oosterlaken T.A.M., van Zuijlen M.C.A, van de Wiel P.A., 2002. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* 30 (6), e26.
- [125] Leone G., vanSchijndel H.B., vanGemen B., Schoen C.D., 1997. Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. *J. Virol. Methods* 66 (1), 19-27 JUN 1997.

- [126] Vaskova D., Spak J., Klerks M.M., Schoen C.D., Thompson J.R., Jelkmann W., 2004. Real-time NASBA for detection of Strawberry vein banding virus. *Eur. J. Plant Pathol.* 110 (2), 213-221.
- [127] Goncalves M.C., Klerks M.M., Verbeek M., Vega J., van den Heuvel J.F.J.M., 2002. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of Sugarcane yellow leaf virus. *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (5), 401-407.
- [128] Klerks M.M., Leone G.O.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Schoen C.D., 2001. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of Potato leafroll virus and Potato virus Y in potato tubers. *J. Virol. Methods* 93 (1-2), 115-125.
- [129] Klerks M.M., Lindner J.L., Vaskova D., Spak J., Thompson J.R., Jelkmann W., Schoen C.D., 2004. Detection and tentative grouping of Strawberry crinkle virus isolates. *Eur. J. Plant Pathol.* 110 (1), 45-52.
- [130] Goossens V.J., Blok M.J., Christiaans M.H., Sillekens P., Middeldorp J.M., Bruggeman C.A., 2000. Early detection of cytomegalovirus in renal transplant recipients: comparison of PCR, NASBA, pp65 antigenemia, and viral culture. *Transplant. Proc.* 32, 155-158.
- [131] Lunel F., Cresta P., Vitour D., Paya C., Dumont B., Frangeul L., Reboul D., Brault C., Piette J.C., Huraux J.M., 1999. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and monitor assays. *Hepatology* 29, 528-535.
- [132] Szemes M., Klerks M.M., van den Heuvel J.F.J.M., Schoen C.D., 2002. Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of potato virus Y isolates. *J. Virol. Methods* 100 (1-2), 83-96.
- [133] Klerks M.M., Leone G., Lindner J.L., Schoen C.D., van den Heuvel J.F.J.M., 2001. Rapid and sensitive detection of Apple stem pitting virus in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons. *Phytopathology* 91 (11), 1085-1091.
- [134] Olmos A., Bertolinia E., Cambra M., 2007. Isothermal amplification coupled with rapid flow-through hybridisation for sensitive diagnosis of Plum pox virus. *J. Virol. Methods* 139 (1), 111-115.
- [135] Barbarossa L., Savino V., 2006. Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of Citrus tristeza virus by dot-blot hybridization. *J. Phytopathol.* 154 (6), 329-335.
- [136] Hsu Y.C., Yeh T.J., Chang Y.C., 2005. A new combination of RT-PCR and reverse dot blot hybridization for rapid detection and identification of potyviruses. *J. Virol. Methods* 128 (1-2), 54-60.
- [137] Ivars P., Alonso M., Borja M., Hernandez C., 2004. Development of a non-radioactive dot-blot hybridisation assay for the detection of Pelargonium flower break virus and Pelargonium line pattern virus. *Eur. J. Plant Pathol.* 110 (3), 275-283.
- [138] Galipienso L., Vives M.C., Navarro L., Moreno P., Guerri J., 2004. Detection of citrus leaf blotch virus using digoxigenin-labeled cDNA probes and RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 110 (2), 175-181.
- [139] Kominek P., Glasa M., Bryxiova M., 2005. Analysis of the molecular variability of Grapevine leafroll-associated virus 1 reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. *Virus Genes* 31 (3), 247-255.

- [140] Demangeat G., Komar V., Cornuet P., Esmenjaud D., Fuchs M., 2004. Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single *Xiphinema index* nematode vector. *J. Virol. Methods* 122 (1), 79-86.
- [141] Letscher B., Adam G., Lesemann D.E., Willingham P., Heinze C., 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J. Virol. Methods* 106 (1), 1-10.
- [142] Boltovets P.M., Boyko V.R., Kostikov I.Y., Dyachenko N.S., Snopok B.A., Shirshov Y.M., 2002. Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique. *J. Virol. Methods* 105 (1), 141-146.
- [143] Jiao K., Sun W., Zhang S.S., 2000. Sensitive detection of a plant virus by electrochemical enzyme-linked immunoassay. *Fresenius Journal of Anal. Chem.* 367 (7), 667-671.
- [144] Olmos A., Dasi M.A., Candresse T., Cambra M., 1996. Print-capture PCR: A simple and highly sensitive method for the detection of Plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 24 (11), 2192-2193.
- [145] Eun A.J.C., Wong S.M., 2000. Molecular beacons: A new approach to plant virus detection. *Phytopathology* 90 (3), 269-275.
- [146] Liu L.F., Wang K., Tan W.H., Li J., Meng X.X., Guo Q.P., Tang Z.W., Li X.M., Li D., 2003. A novel convenient and fast method for detection of tobacco mosaic virus-ribonucleic acid based on molecular beacon. *Chinese Journal of Anal. Chem.* 31 (9), 1030-1035.
- [147] Dickert F.L., Hayden O., Bindeus R., Mann K.J., Blaas D., Waigmann E., 2004. Bioimprinted QCM sensors for virus detection - screening of plant sap. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (8), 1929-1934.
- [148] Webster C.G., Wylie S.J., Jones M.G.K., 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Curr. Sci. India* 86 (12), 1604-1607.
- [149] Mumford R., Boonham N., Tomlinson J., Barker I., 2006. Advances in molecular phytodiagnostics - new solutions for old problems. *Eur. J. Plant Pathol.* 116 (1), 1-19.
- [150] Varga J.D., Pallas A., Candresse V., 2006. Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Can. J. Plant Pathol.* 28 (1), 16-29.
- [151] Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Folletie M.T., Gallo M.V., Chee M.S., 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14, 1675-1680.
- [152] Desprez T., Amsellem J., Caboche M., Hofte H., 1998. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.* 14, 643-652.
- [153] Guschin D.Y., Mobarry B.K., Proudnikov D., Stahl D.A., Rittmann B.E., Mirzabekov A.D., 1997. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (6), 2397-2402.
- [154] Chizhikov V., Wagner M., Ivshina A., Hoshino Y., Kapikian A.Z., Chumakov K., 2002. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 40 (7), 2398-2407.

- [155] Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S., Mikhailovich V., Sobolev A., Blinov V., Babkin I., Guskov A., Sokunova E., Zasedatelev A., Sandakhchiev L., Mirzabekov A., 2002. Species-level identification of orthopoxviruses with an oligonucleotide microchip. *J. Clin. Microbiol.* 40 (3), 753-757.
- [156] Wang D., Coscoy L., Zylberberg M., Avila P.C., Boushey H.A., Ganem D., DeRisi J.L., 2002. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (24), 15687-15692.
- [157] Bystricka D., Lenz O., Mraz I., Piherova L., Kmoch S., Sip M., 2005. Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *J. Virol. Methods* 128 (1-2), 176-182.
- [158] Bystricka D., Lenz O., Mraz I., Dedic P., Sip M., 2003. DNA microarray: parallel detection of potato viruses. *Acta Virol.* 47 (1), 41-44.
- [159] Lee G.P., Min B.E., Kim Ch.S., Choi S.H., Harn Ch.H., Kim S.U., Ryu K.H., 2003. Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamoviruses. *J. Virol. Methods* 110 (1), 19-24.
- [160] Abdullahi I., Koerbler M., Stachewicz H., Winter S., 2005. The 18S rDNA sequence of *Synchytrium endobioticum* and its utility in microarrays for the simultaneous detection of fungal and viral pathogens of potato. *Appl. Microbiol. Biot.* 68 (3), 368-375.
- [161] Deyong Z., Willingmann P., Heinze C., Adam G., Pfunder M., Frey B., Frey J.E., 2005. Differentiation of Cucumber mosaic virus isolates by hybridization to oligonucleotides in a microarray format. *J. Virol. Methods* 123 (1), 101-108.
- [162] Pasquini G., Barba M., Hadidi A., Faggioli F., Negri R., Sobol I., Tiberini A., Caglayan K., Mazyad H., Anfoka G., Ghanim M., Zeidan M., Czosnek H., 2007. Oligonucleotide microarray-based detection and genotyping of Plum pox virus. *J. Virol. Methods*, doi:10.1016/j.jviromet.2007.08.019.
- [163] Lenz O., Petrzik K., Spak J., 2007. Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses. *J. Virol. Methods*, Article in Press, UnCorrected Proof.
- [164] Kawaguchi K., Kaneko S., Honda M., Kawai H.F., Shiota Y., Kobayashi K., 2001. Detection of hepatitis B virus DNA in serum from patients with chronic hepatitis B using DNA microarray. *Hepatology* 34 (4), 554.
- [165] Zhao W., Wan J.M., Liu W., Liu Q.J., Zhang L., Zhou Z.X., Liu X.J., Zhang H.R., 2003. Hepatitis gene chip in detecting HBV DNA, HCV RNA in serum and liver tissue samples of hepatitis patients. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2 (2), 234-41.
- [166] Sun Z.H., Zheng W.L., Zhang B., Shi R., Ma W., 2004. Microarrays for the detection of HBV and HDV. *Biochem. Mol. Biol.* 37 (5), 546-551.
- [167] Jang H., Cho M., Heo J., Kim H., Jun H., Shin W., Cho B., Park H., Kim C., 2004. Oligonucleotide chip for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J. Clin. Microbiol.* 42 (9), 4181-4188.
- [168] Sun Z.H., Zheng W.L., Zhang B., Lu L., Mao X.D., Shi R., Ma W.L., 2004. Detection of hepatitis D virus by cDNA microarray method. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 3 (3), 423-7.

- [169] Sun Z.H., Zheng W.L., Zhang B., Shi R., Ma W.L., 2004. Preparation of the microarray for detecting hepatitis D virus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 24 (1), 44-46.
- [170] Chen L.Y., Huang J., Zhang X.P., Qiao P., Zhang W., Yang N.M., Liu H.J., Geng Y.Y., Qiu J.M., Wang S.Q., 2005. Clinical evaluation of oligonucleotide microarrays for the detection of HBV mutants associated with lamivudine resistance. *Pharmacogenomics* 6 (7), 721-30.
- [171] Li Z.G., Chen L.Y., Huang J., Qiao P., Qiu J.M., Wang S.Q., 2005. Quantification of the relative levels of wild-type and lamivudine-resistant mutant virus in serum of HBV-infected patients using microarray. *J. Viral Hepat.* 12 (2), 168-75.
- [172] Sun Z.H., Ma W.L., Zhang B., Peng Y.F., Zheng W.L. Application of restriction display PCR technique in the preparation of cDNA microarray probes. *World J. Gastroenterol.* 11 (48), 7579-84.
- [173] Liu H.H., Cao X., Yang Y., Liu M.G., Wang Y.F., 2006. Array-based nano-amplification technique was applied in detection of Hepatitis E virus. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39 (3), 247-52.
- [174] Sun Z.H., Ma W.L., Wei M., Wang S.Y., Zheng W.L., 2007. Identification of HCV-1b by low-density cDNA microarray-based assay. *Curr. Microbiol.* 55 (3), 211-216.
- [175] Liu Q.J., Qin Z., Bai Y.F., Ge Q.Y., Lu Z.H., 2005. Detection and analysis system for hybridization images of lab-in-a-tube microarray. *Chinese Sci. Bull.* 50 (24), 2896-2900.
- [176] Chiu C.Y., Rouskin S., Koshy A., Urisman A., Fischer K., Yagi S., Schnurr D., Eckburg P.B., Tompkins L.S., Blackburn B.G., Merker J.D., Patterson B.K., Ganem D., DeRisi J.L., Joseph L., 2006. Microarray detection of human parainfluenzavirus 4 infection associated with respiratory failure in an immunocompetent adult. *Clin. Infect. Dis.* 43 (8), E71-E76.
- [177] Lin B.C., Wang Z., Vora G.J., Thornton J.A., Schnur J.M., Thach D.C., Blaney K.M., Ligler A.G., Malanoski A.P., Santiago J., Walter E.A., Agan B.K., Metzgar D., Seto D., Daum L.T., Kruzelock R., Rowley R.K., Hanson E.H., Tibbetts C., Stenger D.A., 2006. Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Res.* 16 (4), 527-535.
- [178] Liu R.H., Lodes M.J., Nguyen T., Siuda T., Slota M., Fuji H.S., McShea A., 2006. Validation of a fully integrated microfluidic array device for influenza a subtype identification and sequencing. *Anal. Chem.* 78 (12), 4184-93.
- [179] Sengupta S., Onodera K., Lai A., Melcher U., 2003. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10), 4542-50.
- [180] Ghindilis A.L., Smith M.W., Schwarzkopf K.R., Roth K.M., Peyvan K., Munro S.B., Lodes M.J., Stover A.G., Bernards K., Dill K., McShea A., 2006. CombiMatrix oligonucleotide arrays: Genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection. *Biosens. Bioelectron.* 22 (9-10), 1853-1860.
- [181] Townsend M.B., Dawson E.D., Mehlmann M., Smagala J.A., Dankbar D.M., Moore C.L., Smith C.B., Cox N.J., Kuchta R.D., Rowlen K.L., 2006. Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 44 (8), 2863-71.

- [182] Wang Z., Daum L.T., Vora G.J., Metzgar D., Walter E.A., Canas L.C., Malanoski A.P., Lin B., 2006. Identifying influenza viruses with resequencing microarrays. *Emerg. Infect. Dis.* 12 (4) ,638-646.
- [183] Dankbar D.M., Dawson E.D., Mehlmann M., Moore C.L., Smagala J.A., Shaw M.W., Cox N.J., Kuchta R.D., Rowlen K.L., 2007. Diagnostic microarray for influenza B viruses. *Anal. Chem.* 79 (5), 2084-2090.
- [184] Dawson E.D., Moore C.L., Dankbar D.M., Mehlmann M., Townsend M.B., Smagala J.A., Smith C.B., Cox N.J., Kuchta R.D., Rowlen K.L., 2007. Identification of A/H5N1 influenza viruses using a single gene diagnostic microarray. *Anal. Chem.* 79 (1), 378-384.
- [185] Lin B., Vora G.J., Thach D., Walter E., Metzgar D., Tibbetts C., Stenger D.A., 2004. Use of oligonucleotide microarrays for rapid detection and serotyping of acute respiratory disease-associated adenoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42 (7), 3232-3239.
- [186] Quan P.L., Palacios G., Jabado O.J., Conlan S., Hirschberg D.L., Pozo F., Jack P.J.M., Cisterna D., Renwick N., Hui J., Drysdale A., Amos-Ritchie R., Baumeister E., Savy V., Lager K.M., Richt J.A., Boyle D.B., Garcia-Sastre A., Casas I., Perez-Brena P., Briese T., Lipkin W.I., 2007. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. *J. Clin. Microbiol.* 45 (8), 2359-2364.
- [187] Li H., McCormac M.A., Estes R.W., Sefers S.E., Dare R.K., Chappell J.D., Erdman D.D., Wright P.F., Tang Y.W., 2007. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 45 (7), 2105-2109.
- [188] Wong C.W., Heng C.L.W., Yee L.W., Soh S.W.L., Kartasasmita C.B., Simoes E.A.F., Hibberd M.L., Sung W.K., Miller L.D., 2007. Optimization and clinical validation of a pathogen detection microarray. *Genome Biol.* 8 (5), R93.
- [189] Cho N.H., An H.J., Jeong J.K., Kang S., Kim J.W., Kim Y.T., Park T.K., 2003. Genotyping of 22 human papillomavirus types by DNA chip in Korean women: comparison with cytologic diagnosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188 (1), 56-62.
- [190] Kim C.J., Jeong J.K., Park M., Park T.S., Park T.C., Namkoong S.E., Park J.S., 2003. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. *Gynecol. Oncol.* 89 (2), 210-7.
- [191] Liu C.H., Ma W.L., Shi R., Ou Y.Q., Zhang B., Zheng W.L., 2003. Possibility of using DNA chip technology for diagnosis of human papillomavirus. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36 (4), 349-53.
- [192] Delrio-Lafreniere S.A., Browning M.K., McGlennen R.C., 2004. Low-density addressable array for the detection and typing of the human papillomavirus. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48 (1), 23-31.
- [193] Oh T.J., Kim C.J., Woo S.K., Kim T.S., Jeong D.J., Kim M.S., Lee S., Cho H.S., An S., 2004. Development and clinical evaluation of a highly sensitive DNA microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42 (7), 3272-80.
- [194] Gheit T., Landi S., Gemignani F., Snijders P.J., Vaccarella S., Franceschi S., Canzian F., Tommasino M., 2006. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J. Clin. Microbiol.* 44 (6), 2025-2031.

- [195] Min W., Wen-Li M., Bao Z., Ling L., Zhao-Hui S., Wen-Ling Z., 2006. Oligonucleotide microarray with RD-PCR labeling technique for detection and typing of human papillomavirus. *Curr. Microbiol.* 52 (3), 204-209.
- [196] Lin B.C., Blaney K.M., Malanoski A.P., Ligler A.G., Schnur J.M., Metzgar D., Russell K.L., Stenger D.A., 2007. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J. Clin. Microbiol.* 45 (2), 443-452.
- [197] Hsia Ch.Ch., Chizhikov V.E., Yang A.X., Selvapandiyan A., Hewlett I., Duncan R., Puri R.K., Nakhasi H.L., Kaplan G.G., 2007. Microarray multiplex assay for the simultaneous detection and discrimination of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency type-1 viruses in human blood samples. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 356 (4), 1017-1023.
- [198] Seifarth W., Spiess B., Zeilfelder U., Speth C., Hehlmann R., Leib-Mösch Ch., 2003. Assessment of retroviral activity using a universal retrovirus chip. *J. Virol. Methods* 112 (1-2), 79-91.
- [199] Nordstrom H., Falk K.I., Lindegren G., Mouzavi-Jazi M., Walden A., Elgh F., Nilsson P., Lundkvist A., 2005. DNA microarray technique for detection and identification of seven flaviviruses pathogenic for man. *J. Med. Virol.* 77 (4), 528-40.
- [200] Laassri M., Chizhikov V., Mikheev M., Shchelkunov S., Chumakov K., 2003. Detection and discrimination of orthopoxviruses using microarrays of immobilized oligonucleotides. *J. Virol. Methods* 112 (1-2), 67-78.
- [201] Wang Y., Ma W.L., Mao X.M., Wu Q.H., Li L., Wang H.M., Xiao W.W., Zheng W.L., 2004. Design and preparation of oligonucleotide microarray for vaccinia virus detection. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 24 (2), 180-183.
- [202] Wenli M., Yan W., Hongmin W., Wenling Z., 2004. An oligonucleotide microarray for the detection of vaccinia virus. *Br. J. Biomed. Sci.* 61 (3), 142-145.
- [203] Boriskin Y.S., Rice P.S., Stabler R.A., Hinds J., Al-Ghusein H., Vass K., Butcher P.D., 2004. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5811–5818.
- [204] Chou C.C., Lee T.T., Chen C.H., Hsiao H.Y., Lin Y.L., Ho M.S., Yang P.C., Peck K., 2006. Design of microarray probes for virus identification and detection of emerging viruses at the genus level. *BMC Bioinformatics* 7, 232.
- [205] Tsao L.Y., Lin C.Y., Yu Y.Y., Wang B.T., 2006. Microchip, reverse transcription-polymerase chain reaction and culture methods to detect enterovirus infection in pediatric patients. *Pediatr. Intr.* 48 (1), 5-10.
- [206] Li Ch., Chen R.S., Hung S.K., Lee Y.T., Yen Ch.Y., Lai Y.W., Teng R.H., Huang J.Y., Tang J.Ch., Tung Ch.P., Wei T.T., Shieh B., Liu S.T., 2006. Detection of Epstein-Barr virus infection and gene expression in human tumors by microarray analysis. *J. Virol. Methods* 133 (2), 158-166.
- [207] Foldes-Papp Z., Egerer R., Birch-Hirschfeld E., Striebel H.M., Demel U., Tilz G.P., Wutzler P., 2004. Detection of multiple human herpes viruses by DNA microarray technology. *Mol. Diagn.* 8, 1–9.
- [208] Striebel H.M., Birch-Hirschfeld E., Egerer R., Földes-Papp Z., Tilz G.P., Stelzner A., 2004. Enhancing sensitivity of human herpes virus diagnosis with DNA microarrays using dendrimers. *Exp. Mol. Pathol.* 77 (2), 89-97.

- [209] Jaaskelainen A.J., Piiparinen H., Lappalainen M., Koskiniemi M., Vaheri A., 2006. Multiplex-PCR and oligonucleotide microarray for detection of eight different herpesviruses from clinical specimens. *J. Clin. Virol.* 37 (2), 83-90.
- [210] Sergeev N., Rubtcova E., Chizikov V., Schmid D.S., Loparev V.N., 2006. New mosaic subgenotype of varicella-zoster virus in the USA: VZV detection and genotyping by oligonucleotide-microarray. *J. Virol. Methods.* 136 (1-2), 8-16.
- [211] Korimbocus J., Scaramozzino N., Lacroix B., Crance J.M., Garin D., Vernet G., 2005. DNA probe array for the simultaneous identification of herpesviruses, enteroviruses, and flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* 43 (8), 3779-3787.
- [212] Lovmar L., Fock C., Espinoza F., Bucardo F., Syvanen A.C., Bondeson K., 2003. Microarrays for genotyping human group A rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension. *J. Clin. Microbiol.* 41 (11), 5153-5158.
- [213] Jaaskelainen A.J., Maunula L., 2006. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astroviruses. *J. Virol. Methods* 136 (1-2), 210-216.
- [214] Shi R., Ma W.L., Wu Q.H., Zhang B., Song Y.B., Guo Q.Y., Xiao W.W., Wang Y., Zheng W.L., 2003. Design and application of 60mer oligonucleotide microarray in SARS coronavirus detection. *Chinese Sci. Bull.* 48 (12), 1165-1169.
- [215] Long W.H., Xiao H.S., Gu X.M., Zhang Q.H., Yang H.J., Zhao G.P., Liu J.H., 2004. A universal microarray for detection of SARS coronavirus, *J. Virol. Methods* 121, 57-63.
- [216] Zhang Z.W., Zhou Y.M., Zhang Y., Guo Y., Tao S.C., Li Z., Zhang Q., Cheng J., 2005. Sensitive detection of SARS coronavirus RNA by a novel asymmetric multiplex nested RT-PCR amplification coupled with oligonucleotide microarray hybridization. *Methods Mol. Med.* 114, 59-78.
- [217] Conejero-Goldberg C., Wang E., Yi C., Goldberg T.E., Jones-Brando L., Marincola F.M., Webster M.J., Torrey E.F., 2005. Infectious pathogen detection arrays: viral detection in cell lines and postmortem brain tissue. *Biotechniques* 39 (5), 741-51.
- [218] Liu Q.J., Bai Y.F., Ge Q.Y., Zhou S.X., Wen T., Lu Z.H., 2007. Microarray-in-a-tube for detection of multiple viruses. *Clin. Chem.* 53 (2), 188-194.
- [219] Liu L.N., Liu Z.F., Ruan L., Wang Z.X., Li R.F., Zhang S.L., Chen H.Ch., He Q.G., 2007. Microarray-Based Detection and Differentiation of Virulent and Attenuated Pseudorabies Virus. *Agricultural Sciences in China* 6 (2), 234-243.
- [220] Palacios G., Quan P.L., Jabado O.J., Conlan S., Hirschberg D.L., Liu Y., Zhai J., Renwick N., Hui J., Hegyi H., Grolla A., Strong J.E., Towner J.S., Geisbert T.W., Jahrling P.B., Buechen-Osmond C., Ellerbrok H., Sanchez-Seco M.P., Lussier Y., Formenty P., Nichol S.T., Feldmann H., Briese T., Lipkin W.I., 2007. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 13 (1), 73-81.
- [221] Baxi M.K., Baxi S., Clavijo A., Burton K.M., Deregts D., 2006. Microarray-based detection and typing of foot-and-mouth disease virus. *The Veterinary Journal* 172 (3), 473-481.

- [222] Liu Y.C., Huang G.S., Wu M.C., Hong M.Y., Hsiung K.P., 2006. Detection of foot and mouth disease and porcine reproductive and respiratory syndrome viral genes using microarray chip. *Vet. Res. Commun.* 30 (2), 191-204.
- [223] Baner J., Gyarmati P., Yacoub A., Hakhverdyan M., Stenberg J., Ericsson O., Nilsson M., Landegren U., Belak S., 2007. Microarray-based molecular detection of foot-and-mouth disease, vesicular stomatitis and swine vesicular disease viruses, using padlock probes. *J. Virol. Methods* 143 (2), 200-206.
- [224] Urisman A., Molinaro R.J., Fischer N., Plummer S.J., Casey G., Klein E.A., Malathi K., Magi-Galluzzi C., Tubbs R.R., Ganem D., Silverman R.H., Derisi J.L., 2006. Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q RNASEL Variant. *PLoS Pathog.* 2 (3), e25.
- [225] Franke-Whittle I., Klammer S.H., Mayrhofer S., Insam H., 2006. Comparison of different labelling methods for the production of labelled target DNA for microarrays hybridization. *J. Microbiol. Meth.* 65, 117-126.
- [226] Zhang L., Hurek T., Reinhold-Hurek B., 2005. Position of the fluorescent label is a crucial factor determining signal intensity in microarray hybridizations. *Nucleic Acids Res.* 34 (1), 395-395.

7. Přílohy

A. Potvrzení o přijetí článku do časopisu *Journal of Virological Methods*

Ms. Ref. No.: VIRMET-D-07-00127R2

Title: Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses
Journal of Virological Methods

Dear Ondrej Lenz,

I am pleased to confirm that your paper "Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses" has been accepted for publication in *Journal of Virological Methods*.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

A. Zuckerman
Editor-in-Chief
Journal of Virological Methods

B. Rukopis článku přijatý k publikaci v časopise *Journal of Virological Methods* (viz následující strana)

V této elektronické verzi disertace, přístupné prostřednictvím databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, jsou z důvodů copyrightu časopisu *Journal of Virological Methods* uvedeny pouze základní bibliografické údaje o výše zmiňovaném článku a údaje vyžadované podle nařízení rektora R 83 ze dne 20. dubna 2007.

Kompletní znění článku lze najít v tištěné formě disertace (na stranách 38 – 55) archivované Přírodovědeckou fakultou Jihočeské Univerzity.

Lenz O., Petrzik K., Spak J. Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses. J.Virol. Methods (2007), doi: 101016/j.jviromet.2007.10.018

Abstract

An oligonucleotide microarray for the detection of some fruit-tree viruses was designed and its theoretical detection limit was assessed using Cy3-labelled oligonucleotides. The real sensitivity of the microarray was compared for different kinds of fluorescently labelled targets: a) cDNA and PCR amplified targets, b) PCR amplified targets labelled using three different labelling methods. In the first case (a), the number of viral cDNA molecules was below the assessed detection limit of the microarray and only PCR amplified targets were detected. A second comparison (b), done on 3 selected viruses, included indirect labelling, the direct incorporation of labelled-dUTPs, and the use of Cy3-labelled primer. The most intensively labelled targets were produced by the Cy3-primer labelling (2 of 3 viruses) or by the indirect labelling method (1 of 3 viruses), the weakest signal showed directly labelled targets (all 3 viruses). The use of Cy3-primer labelling involved the simplest preparation and the lowest cost, however occasional weak cross-hybridization appeared. The indirect labelling method was of the highest specificity. The probes hybridizing near the 3-end of the targets showed the lowest intensities of fluorescent signal.

Překlad abstraktu:

Byl navržen oligonukleotidový mikročip pro detekci vybraných virů ovocných stromů jeho detekční limit byl stanoven pomocí Cy3-značených oligonukleotidů. Citlivost mikročipu v praxi byla porovnána pro různé typy fluorescenčně značených zkoumaných sekvencí: a) cDNA a sekvence amplifikované pomocí PCR, b) sekvence amplifikované pomocí PCR značené třemi různými metodami. V prvním případě (a), bylo množství virové cDNA pod stanoveným limitem mikročipu a detekovány byly pouze sekvence amplifikované pomocí PCR. Druhé srovnání (b), bylo provedeno se třemi vybranými viry a zahrnovalo nepřímé značení, přímé značení pomocí fluorescenčních nukleotidů (dUTP) a použití primeru značeného Cy3 molekulou (Cy3-primer). Nejintenzivněji značené zkoumané sekvence byly připraveny značením pomocí Cy3-primeru (u dvou ze tří virů) nebo pomocí nepřímého značení (u jednoho ze tří virů), nejslabší signál vykazovaly přímo značené zkoumané sekvence (u všech tří virů). Značení Cy3-primerem bylo nejjednodušší a nejlevnější, ačkoliv se při něm příležitostně objevovaly nespecifické hybridizace (cross-hybridizace). Nejvíce specifickou byla metoda nepřímého značení. Nejméně intenzivní fluorescenční signál měly próby hybridizující blízko 3'-konce zkoumaných sekvencí .

Podíl O.Lenze na publikaci: 80% (viz prohlášení spoluautorů na začátku této disertační práce).

Stav publikace ke dni tisku disertační práce: přijato do tisku (viz příloha A)