

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**PURIFIKACE VIRU MOZAIKY JETELE BÍLÉHO  
(WHITE CLOVER MOSAIC VIRUS) S NÁSLEDNOU  
PŘÍPRAVOU ANTISÉRA A IZOLACÍ IgG PRO  
SÉROLOGICKOU DETEKCI VIRU POMOCÍ ELISA**

**Bc. KLÁRA KOLÁŘOVÁ**

**ČESKÉ BUDĚJOVICE  
2011**

**VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Jana Fránová, Dr.  
ÚMR, BC AV ČR, v.v.i.**

Kolářová, K., 2011: Purifikace viru mozaiky jetele bílého (white clover mosaic virus) s následnou přípravou antiséra a izolací IgG pro sérologickou detekci viru pomocí ELISA [Purification of white clover mosaic virus, antiserum production and IgG isolation for serological detection of virus by ELISA. Mgr. Thesis, in Czech.] – 49 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

White clover mosaic virus (WCIMV) virions were purified using a modified method of Wetter (1960). Antisera were produced by rabbit immunisation and virus-specific polyclonal antibodies were obtained. Suitable conditions were optimised for serological detection of virus by DAS-ELISA and compared with a commercial kit.

Tato práce byla financována z grantu NAZV QH71145 Diagnostika virů a fytoplazem ve šlechtitelském materiálu jetele lučního a částečně katedrou genetiky Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 26. 4. 2011

.....  
Klára Kolářová

## **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Ing. Janě Fránové, Dr. za ochotnou pomoc a radu, kdykoli jsem o ni požádala. Dále bych ráda poděkovala paní Lence Štifterové za odbornou pomoc při imunizaci laboratorního králíka a také RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za vypůjčení aparatury pro dělení frakcí. V neposlední řadě také nesmím zapomenout poděkovat laborantce Aleně Matyášové za vytvoření velice příjemné pracovní atmosféry a vždy ochotnou pomoc. Nakonec bych chtěla poděkovat svým rodičům za umožnění studia a obrovskou podporu při celém jeho průběhu.

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>3. TEORIE</b> .....	<b>- 3 -</b>
3.1 ČELEĎ <i>ALPHAFLEXIVIRIDAE</i> .....	- 3 -
3.2 ROD <i>POTEXVIRUS</i> .....	- 5 -
3.3 VIRUS MOZAIKY JETELE BÍLÉHO (WHITE CLOVER MOSAIC VIRUS) .....	- 10 -
3.4 PROTILÁTKY.....	- 11 -
3.5 ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA S ENZYMEM VÁZANÝM NA IMUNOSORBENT (ELISA, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) .....	- 14 -
<b>4. MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>- 15 -</b>
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	- 15 -
4.2 PURIFIKACE .....	- 16 -
4.2.1 Purifikace s použitím bentonitu.....	- 16 -
4.2.2 Purifikace s použitím chloroformu a <i>n</i> -butanolu.....	- 16 -
4.2.3 Purifikace s použitím bentonitu a polyethylenglykolu (PEG 6000).....	- 17 -
4.2.4 Purifikace s použitím diethyletheru a tetrachlormethanu .....	- 18 -
4.2.5 Hustotní gradientová centrifugace .....	- 19 -
4.3 IMUNIZACE KRÁLÍKA.....	- 20 -
4.4 IMUNODIFÚZNÍ TEST .....	- 21 -
4.5 IZOLACE IgG.....	- 21 -
4.6 KONJUGACE IgG S ALKALICKOU FOSFATÁZOU .....	- 22 -
4.7 DAS-ELISA.....	- 22 -
4.7.1 Určení vhodných koncentrací IgG a konjugátů.....	- 22 -
4.7.2 Určení vhodných podmínek inkubace enzymové reakce.....	- 24 -
4.7.3 Určení citlivosti testu při ředění rostlinné šťávy a porovnání s komerčně dostupným kitem firmy DSMZ (Německo).....	- 24 -
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>- 26 -</b>
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>- 27 -</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>- 30 -</b>
<b>8. LITERATURA</b> .....	<b>- 31 -</b>
<b>9. PŘÍLOHA</b> .....	<b>- 35 -</b>



# 1. ÚVOD

Termín vir pochází z latinského slova „virus“, které v překladu znamená jed nebo západ. Pojmenování virů, jak je známe dnes, se postupem času značně měnilo od názvů jako *contagium vivum fluidum* nebo „filtrovatelné viry“ až po definici virů jako patogenů malých rozměrů neschopných kultivace na umělých médiích (van der Want and Dijkstra, 2006). Dnes je rostlinný virus definován jako řetězec jedné nebo více molekul nukleové kyseliny, obvykle uzavřený v ochranném plášti nebo pláštích z proteinu nebo lipoproteinu, který je schopen organizovat svoji vlastní replikaci pouze uvnitř vhodných hostitelských buněk (Hull, 2009).

Dříve než byly samotné viry objeveny, byly popisovány pouze jejich projevy na hostitelích neboli symptomy. Jako první záznam symptomu rostlinného viru bývá uváděna báseň japonské císařovny Koken, která žila kolem roku 750 n. l. Ta ve své básni přirovnala své pocity k žloutnutí listů keře sadce Lindleyova (*Eupatorium lindleyanum*) evokující blížící se zimu, i přestože bylo léto. Tento keř byl později označen za hostitele viru TLCV (tobacco leaf curl virus), jehož projevem je u tohoto keře právě žloutnutí listů (Hull, 2009).

Rostlinné viry jsou také spojeny s důležitými milníky obecné virologie. Například vůbec první důkaz o existenci těchto nových infekčních mikroorganismů byl proveden na viru TMV (tobacco mosaic virus, vir mozaiky tabáku). Na konci 19. století Ivanovskij a Beijerinck nezávisle na sobě dokázali, že původce choroby tabáku je schopný procházet přes porcelánový filtr a tudíž musí být odlišný od dosud známých patogenů (van der Want and Dijkstra, 2006). Dalším obrovským krokem vřed spojeným s tímto virem byl v 50. letech 20. století objev, že nositelkou genetických vlastností viru je nukleová kyselina (van der Want and Dijkstra, 2006).

Rostlinné viry patří mezi široce rozšířené a ekonomicky významné rostlinné patogeny. Na člověka mají veliký dopad především v podobě devastace kulturních plodin. Prakticky všechny plodiny pěstované člověkem jsou hostitelem nejméně jednoho druhu rostlinného viru (Hull, 2009), jejichž vysoká infekčnost může vést až k vývoji epidemie. Druhým důležitým aspektem studia rostlinných virů je možnost porozumění struktuře a chování virů všeobecně. Ve své práci jsem se zabývala virem mozaiky jetele bílého (WCIMV, white clover mosaic virus), který je díky své vysoké odolnosti a velice snadnému mechanickému přenosu široce celosvětově rozšířen. Vyskytuje se i na území České republiky, kde napadá především druhy jetel luční (*Trifolium pratense*) a jetel plazivý (*Trifolium repens*). V bývalé Československé republice byl objeven na více jak 30 místech s výskytem hlavně na území dnešní České republiky (Musil *et al.*, 1981). V České republice má tento vir hlavně agronomický dopad vzhledem ke skutečnosti, že jetel luční patří k našim nejvýznamnějším pícninám a také je významnou součástí šlechtěných travních směsí. Dále také díky přítomnosti hlízkových bakterií na svých kořenech obohacuje půdu o dusík fixovaný z atmosféry. Navíc se velice snadno šíří, což například dokazuje studie z Nového Zélandu, kde byl zkoumán agronomický dopad tohoto viru na pastvinách a okrajích silnic Severního ostrova. Tento vir byl prokázán u 69 % rostlin jetele plazivého na zkoumaných pastvinách a 52 % rostlin na okrajích silnic (Dudas *et al.*, 1998).

S nástupem molekulárních metod se začal pohled na viry posouvat od virů jako původců chorob k samostatným molekulárním entitám. Ale i přes významné pokroky v detailním popisu genomu různých virů díky těmto metodám, zůstává stále spousta otázek ohledně rostlinných virů nevyjasněna.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem mé práce bylo purifikovat vir mozaiky jetele bílého (white clover mosaic virus) izolát 12/13 z indikátorových rostlin. Poté ověřit čistotu purifikátu pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a získaným čistým purifikátem imunizovat králíka. Dále z připraveného antiséra izolovat imunoglobuliny G (IgG), připravit jejich konjugáty s alkalickou fosfatázou a nakonec optimalizovat podmínky pro sérologickou detekci tohoto viru pomocí přímé metody DAS-ELISA (double-antibody sandwich ELISA).

### 3. TEORIE

#### 3.1 ČELEDĚ ALPHAFLEXIVIRIDAE

Název této čeledi odráží morfologii virionů jejích zástupců, které se vyznačují flexibilním vláknitým tvarem s délkou 470–800 nm a průměrem 12–13 nm (DVPweb, 2008). Tato čeleď spolu se 3 dalšími patří do řádu *Tymovirales* a zahrnuje 6 rodů (tabulka 1), které se od sebe liší především typem hostitele, počtem otevřených čtecích rámců (ORF) a také velikostí virionu, replikázy a obalového proteinu (tabulka 2). Zástupci této čeledi jsou celosvětově rozšířeni a u svých hostitelů způsobují převážně symptomy jako je systémová mozaika a skvrnitost. Jejich genom je tvořen lineární molekulou jednořetězcové RNA s pozitivní polaritou [ssRNA(+)] o velikosti 5,4 - 9 kb kódující 1 - 6 ORF s polyadenylovaným 3' koncem (DVPweb, 2008).

Tato čeleď byla vytvořena spolu se vznikem nového řádu *Tymovirales* na návrh podaný odborné vědecké komisi ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) v roce 2007, který vycházel především z fylogenetických analýz provedených v práci Martelli *et al.*, 2007 (ICTV, 2010 a). V této práci byl stanoven společný evoluční předek čeledi *Tymoviridae* a rodů *Potexvirus* a *Carlavirus* jako rostlinný vir s polyadenylovaným genomem, vláknitými viriony a transportními proteiny typu proteinového bloku nazývaného „triple gen block“ (TGB). Dále byla také zjištěna větší míra příbuznosti v sekvenci replikázy u potexvirů a tymovirů než carlavirů, které původně patřily spolu s potexviry do společné čeledi *Flexiviridae*. Toto zjištění bylo jedním z důvodů nutnosti rozdělení této čeledi do dvou samostatných čeledí *Alphaflexiviridae* a *Betaflexiviridae*, které odrážejí hlavně odlišné linie replikázy dvou hlavních rodů označované jako „potex-like“ a „carla-like“ (DVPweb, 2008).



**Tabulka 1:** Rozdělení řádu *Tymovirales* na čeledi a rody s uvedením jejich typických zástupců (ICTV, 2010 b).

řád	čeleď	rod	typický druh
<i>Tymovirales</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	Shallot virus X
		<i>Botrexvirus</i>	Botrytis virus X
		<i>Lolavirus</i>	Lolium latent virus
		<i>Mandariovirus</i>	Indian citrus ringspot virus
		<i>Potexvirus</i>	Potato virus X
		<i>Sclerodarnavirus</i>	Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus
	<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Capillovirus</i>	Apple stem grooving virus
		<i>Carlavirus</i>	Carnation latent virus
		<i>Citriovirus</i>	Citrus leaf blotch virus
		<i>Foveavirus</i>	Apple stem pitting virus
		<i>Trichovirus</i>	Apple chlorotic leaf spot virus
		<i>Vitivirus</i>	Grapevine virus A
		nezařazené	Potato virus T *
	<i>Gammaflexiviridae</i>	<i>Mycoflexivirus</i>	Botrytis virus F
	<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	Grapevine fleck virus
		<i>Marafivirus</i>	Maize rayado fino virus
		<i>Tymovirus</i>	Turnip yellow mosaic virus

\* tento virus není typickým představitelem, ale pouze příkladem druhu nezařazeného do samostatného rodu

**Tabulka 2:** Rody řazené do čeledi *Alphaflexiviridae* s uvedenými základními rozlišovacími vlastnostmi (DVPweb, 2008).

rod	hostitel	délka virionu [nm]	počet ORF	replikáza [kDa]	obalový protein [kDa]
<i>Allexivirus</i>	rostlina	800	6	170-195	26-29
<i>Botrexvirus</i>	houba	720	5	158	43
<i>Lolavirus</i>	rostlina	640	6	196	32
<i>Mandarivirus</i>	rostlina	650	6	187	34
<i>Potexvirus</i>	rostlina	470-580	5	150-195	22-27
<i>Sclerodarnavirus</i> *	houba	—	1	193	—

\* zástupce tohoto rodu nemá proteinový obal

### 3.2 ROD POTEXVIRUS

Tento rod rostlinných virů byl pojmenován podle názvu svého typického zástupce, kterým je virus X bramboru (PVX, potato virus X). Zahnuje 35 virových druhů (tabulka 3), což ho činí nejpočetnějším rodem čeledi *Alphaflexiviridae*. Podobně jako ostatní rody čeledi *Alphaflexiviridae* mají jeho zástupci flexibilní vláknité viriony bez přítomnosti vnějšího obalu, které jsou ale na rozdíl od ostatních rodů poměrně krátké. Měří přibližně 470-580 nm s průměrem 13 nm (ICTVdb Management, 2006 a). Jejich povrch je hluboce rýhovaný s navázanými molekulami vody, které udržují povrchovou strukturu (Baratova *et al.*, 2004). Jejich proteinový plášť (kapsid) je tvořen podjednotkami jediného druhu obalového proteinu uspořádanými ve spirále podél vlákna virové nukleové kyseliny (obrázek 1). Virové částice obsahují 6 % nukleové kyseliny a 94 % proteinu (ICTVdb Management, 2006 a). Genom je tvořen ssRNA (+) o velikosti 5,9 - 7 kb a molekulové váze  $2 \cdot 10^6$  Da (Francki *et al.*, 1985).

Virionová RNA je sama o sobě infekční a slouží zároveň jako genomická virová mRNA (messenger RNA). Její 3'konec je polyadenylovaný a 5'konec je krytý čepičkou z methylguanosinu ( $m^7GpppA$ , Huang *et al.*, 2004). Genomová organizace (obrázek 2) je částečně podobná jako u rodů *Allexivirus* a *Mandarivirus* i některých rodů čeledi *Betaflexiviridae* (DVPweb, 2008). Obsahuje 5 ORF, z nichž ORF1 kóduje virovou replikázu s metyltransferázovou, helikázovou a polymerázovou doménou (Koonin and Dolja, 1993). V centrální oblasti se nacházejí 3 překrývající se ORF známé jako „triple gene block“ (TGB), které kódují 3 transportní proteiny (TGBp1,2 a 3) důležité pro transport viru z buňky do buňky (Verchot-Lubicz, 2005). Poslední ORF kóduje virový obalový protein (CP, coat protein), který je nezbytný pro sestavení virionu a také pohyb viru z buňky do buňky (Santa Cruz *et al.*, 1998).



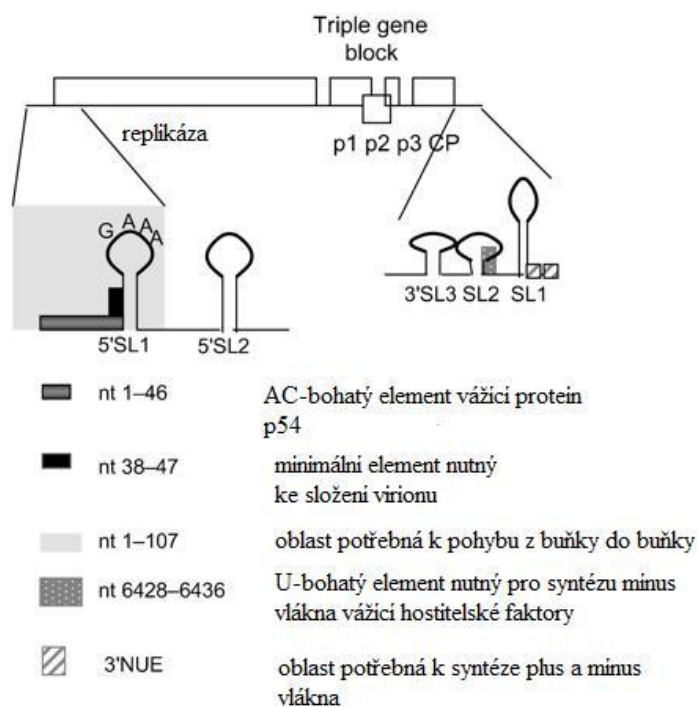
**Obrázek 1:** Struktura a složení virionu rodu *Potexvirus*, CP – obalový protein (ViralZone, 2008).

Záhy po vstupu virové RNA do buňky se začne translatovat virová replikáza nezbytná pro replikaci virového genomu. K tomuto procesu dochází na hostitelských ribozomech za využití přímo genomové RNA jako mRNA. Poté nastává samotná replikace genomu, která zahrnuje syntézu (-) řetězce RNA a následnou tvorbu (+) řetězců genomické (g) a subgenomických (sg) RNA katalyzovanou virovou replikázou a hostitelskými faktory. Syntéza (-) řetězce i (+) řetězců je řízena pomocí sekvencí a struktur, které se nacházejí v 3' a 5' netranslatované oblasti (NTR) genomové RNA.

Nejprve dochází k přepisu (-) řetězce RNA podle genomové (+) RNA jako templátu. Tento proces je iniciován z 3' konce, kde byli objeveny sekvence a struktury zodpovědné za rozpoznání templátu virovým replikačním komplexem a samotnou iniciací RNA syntézy (Batten *et al.*, 2003). K nim patří celá 3'SL3 smyčka, hexanukleotidový element na jejím vrcholu, U-bohaté sekvence na vrcholu a 3' straně 3'SL2 smyčky nacházející se v 3'NTR oblasti a také poly (A) konec (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).

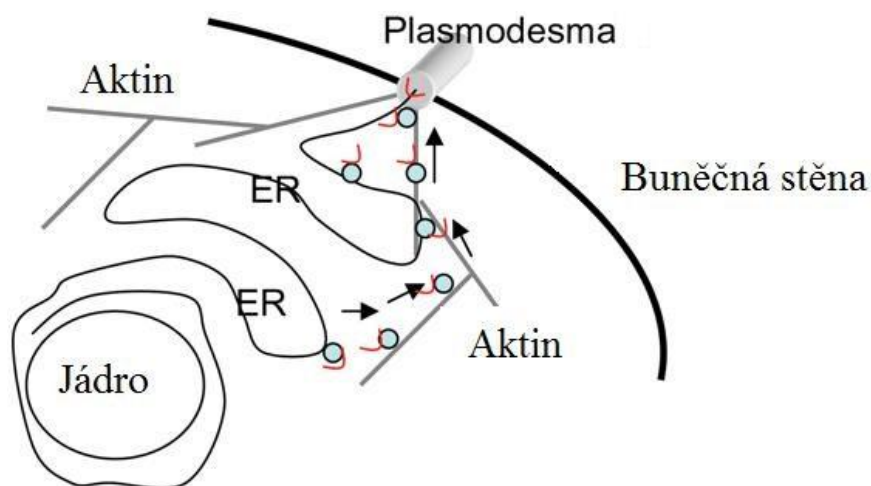
Dále se podle tohoto (-) řetězce RNA přepíše (+) řetězec gRNA a řetězce sgRNA. Pro tento proces je důležitá 5'SL1 smyčka a GAAA sekvence na jejím vrcholu. Smyčka 5'SL1 je multifunkční struktura, která přispívá k virové replikaci, pohybu z buňky do buňky a sestavení virionu (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Kromě 5'SL1 smyčky je pro virovou replikaci také důležitá AC-bohatá oblast nacházející se v 5'NTR oblasti, na kterou se váže buněčný protein účastnící se regulace virové replikace (Batten *et al.*, 2003). K regulaci syntézy (-) i (+) řetězce jsou také důležité RNA – RNA interakce mezi koncovými a vnitřními elementy genomové RNA (Hu *et al.*, 2007).

Nakonec dochází k translaci virových proteinů, aby mohlo dojít k sestavení virionu. Virová replikáza je tedy translatována přímo z genomové RNA, kdežto zbylé proteiny jsou translovány pomocí subgenomových RNA (Batten *et al.*, 2003). U potexvirů byly objeveny celkem 3 sgRNA. První z nich je monocistronická o velikosti zhruba 2,1 kb, která exprimuje protein TGBp1, zatímco proteiny TGBp2 a TGBp3 jsou exprimovány z kratší bicistronické sgRNA o velikosti 1,4 kb (Morozov *et al.*, 1991). Poslední sgRNA o velikosti 0,9 kb exprimuje obalový protein (Hefferon *et al.*, 1997), ze kterého je sestaven proteinový plášť.



**Obrázek 2:** Schematické znázornění genomu viru PVX (potato virus X), typického zástupce rodu *Potexvirus*. Přímka znázorňuje sekvenci RNA a rámečky představují ORF kódující replikázu, „triple gene block“ (p1-TGBp1, p2-TGBp2, p3-TGBp3) a obalový protein (CP). Detailně znázorněny jsou 3' a 5' NTR elementy (především smyčky 5'SL1, 5'SL2, 3'SL1, 3'SL2 a 3'SL3). Barevné a šrafované rámečky označují důležité elementy v 5' a 3' NTR oblastech, které regulují syntézu RNA, kapsidaci a transport (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).

Jejich transport z buňky do buňky přes plasmodesmata (obrázek 3) a na velké vzdálenosti floemem zajišťují 3 TGB proteiny a také obalový protein. TGBp1 je multifunkční protein, který má RNA helikázovou aktivitu, napomáhá translaci virových RNA, zvětšuje velikost plasmodesmat a potlačuje tzv. „RNA silencing“ (Verchot-Lubicz, 2005). TGBp2 a TGBp3 jsou proteiny vázané na membrány endoplazmatického retikula (ER; Ju *et al.*, 2005). TGBp2 se pojí s vezikuly odvozenými od ER, které se pohybují podél aktinových vláken (Ju *et al.*, 2005). Obalový protein je důležitý pro kapsidaci genomu a formování ribonukleoproteinového komplexu (RNP) s TGBp1 a virovou RNA (Lough *et al.*, 2000). Tento komplex interaguje s buněčnými proteiny v ústí plasmodesmat, čímž způsobuje roztažení těchto pórů, které poté dovoluje selektivní průchod větším molekulám. Podle nového modelu transportu potexvirů z buňky do buňky se tento proces skládá ze 3 fází. Podle tohoto modelu nejdříve TGBp1 zvýší permeabilitu plasmodesmat, poté některé molekuly TGBp1 projdou do sousedních buněk a potlačí tzv. „RNA silencing“ a některé vytvoří komplexy s TGBp2 nebo TGBp3. Tyto komplexy projdou plasmodesmaty a vytvoří tzv. „dokovací komplex“, což je komplex vázaný na membrány sousedních buněk. Ve střední fázi procesu projde ribonukleoproteinový komplex přes plasmodesmata za pomoci TGBp1 jako řídicí síly průchodu. Nakonec se RNP komplex naváže na „dokovací komplex“ pomocí interakce mezi TGBp1 proteiny. Volné obalové proteiny se poté váží na plasmodesmata, vytlačí molekuly TGBp1 a umožní tak pórům vrátit se do svého původního stavu (Verchot-Lubicz, 2005).



**Obrázek 3:** Schematické znázornění současného modelu transportu virů rodu *Potexvirus* z buňky do buňky přes plasmodesmata. ER – endoplasmatické retikulum, modré body – vezikuly, červené křivky – ribonukleoproteinové komplexy, aktin – aktinová vlákna, šipky znázorňují směr transportu (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).

Zástupci tohoto rodu jsou celosvětově rozšířeni, ale jednotlivě mají většinou úzké hostitelské spektrum. Jako většina rodů čeledi *Alphaflexiviridae* způsobují u rostlin hlavně mozaiku a skvrnitost, ale můžeme se setkat i s druhy způsobujícími chlorózy, žilkování, nekrózy anebo mírnou zakrslost (Khan and Dijkstra, 2006). Celkově jsou tyto viry výrazně imunogenní a ne všechny jsou si sérologicky příbuzné (ICTVdb Management, 2006 a).

Viry rodu *Potexvirus* se v přírodě přenáší mechanicky kontaktem mezi hostiteli, ale byla zjištěna i možnost přenosu vektory u některých druhů, např. potato aucuba mosaic (PAMV) virus je neperzistentně přenosný mšicí broskvoňovou (*Myzus persicae*), ale pouze za předpokladu, že tyto mšice nejprve sály na rostlinách infikovaných virem potato virus Y nebo A (PVY, PVA; Kassanis and Govier, 1971). U dalších 3 druhů byla experimentálně potvrzena možnost přenosu semeny. Patří mezi ně white clover mosaic virus (WCIMV) a clover yellow mosaic virus (CIYMV), u kterých byl prokázán přenos semeny od 5 do 10 % u jetele lučního (*Trifolium pratense*; Hampton, 1963), a také foxtail mosaic virus (FoMV) s prokázáním přenosem semeny u 2 % testovaných rostlin třeslice větší (*Briza maxima*) a 1 % ovsa setého (*Avena sativa*; Paulsen and Niblett, 1977).

Virové částice zástupců tohoto rodu jsou poměrně stabilní, např. PVX si v syrové rostlinné šťávě uchovává svojí infekčnost při 20 °C po několik týdnů. Inaktivovat ho lze zahřátím infikované rostlinné šťávy na 68 - 74 °C po dobu 10 minut (Khan and Dijkstra, 2006).

Pro tento rod je typická tvorba cytoplazmatických inkluzí v různých tkáních hostitelské rostliny, které jsou viditelné pod optickým mikroskopem. Můžou to být kompaktní tělíska, parakrystaly, vláknité struktury nebo tělíska ve tvaru větrníku tvořené seskupenými virovými částicemi. Speciálním případem inkluzí jsou tzv. vrstvené inkluzní komponenty (laminar compact inclusion, LCI), které jsou tvořeny vrstvami proteinů spojenými s virovými částicemi a ribozomům podobnými strukturami (Khan and Dijkstra, 2006).

**Tabulka 3:** Druhy řazené do rodu *Potexvirus* (ICTV, 2010 b).

rod	druh	druh	druh
<i>Potexvirus</i>	Alstroemeria virus X	Hosta virus X	Plantago asiatica mosaic virus
	Alternanthera mosaic virus	Hydrangea ringspot virus	Plantago severe mottle virus
	Asparagus virus 3	Lettuce virus X	Plantain virus X
	Bamboo mosaic virus	Lily virus X	Potato aucuba mosaic virus
	Cactus virus X	Malva mosaic virus	Potato virus X
	Cassava common mosaic virus	Mint virus X	Schlumbergera virus X
	Cassava virus X	Narcissus mosaic virus	Strawberry mild yellow edge virus
	Clover yellow mosaic virus	Nerine virus X	Tamus red mosaic virus
	Commelina virus X	Opuntia virus X	Tulip virus X
	Cymbidium mosaic virus	Papaya mosaic virus	White clover mosaic virus
	Daphne virus X	Pepino mosaic virus	Zygocactus virus X
	Foxtail mosaic virus	Phaius virus X	—

### 3.3 VIRUS MOZAIKY JETELE BÍLÉHO (WHITE CLOVER MOSAIC VIRUS)

Virus mozaiky jetele bílého (white clover mosaic virus, WCIMV) je zástupce rodu *Potexvirus*, který má flexibilní vláknité viriony typické pro tento rod. Poprvé byl popsán W. H. Piercem v roce 1935, který tento virus objevil v rostlinách jetele plazivého (*Trifolium repens*) v USA (ICTVdB Management, 2006 b). Je celosvětově rozšířen, jeho izoláty pocházejí ze Severní Ameriky, Evropy, Nového Zélandu (Bercks, 1971) a Japonska (Nakabayashi *et al.*, 2002). K jeho přírodním hostitelům patří zástupci rodu jetel (*Trifolium*), u kterých způsobuje chlorotické žilkování, pruhování a systémovou mozaiku (ICTVdB Management, 2006 b).

Viriony mají typickou morfologii potexvirů s délkou 480 nm a průměrem 13 nm. Jsou spirálně symetrické o výšce helixu 3,4 nm s 8,7 proteinovými podjednotkami na otáčku (Wilson *et al.*, 1978). Jejich axiální kanál s průměrem 3,5 nm není zřetelný (ICTVdB Management, 2006 b). Z fyzikálních vlastností je známý sedimentační koeficient o hodnotě 119 S a isoelektrický bod, který je roven pH 4,5 (Fry *et al.*, 1960). Virus zůstává stabilní v rostlinné šťávě za pokojové teploty 10-99 dní a lze ho inaktivovat při 60 °C. Jeho konečný bod ředění (DEP, dilution end-point) ve šťávě infikovaných rostlin činí obvykle  $10^5$ - $10^6$  (Bercks, 1971).

Jeho nukleovou kyselinu tvoří stejně jako u všech virů rodu *Potexvirus* ssRNA (+) o molekulové váze  $2,4 \cdot 10^6$  Da (Koenig, 1971), která je na 3'konci polyadenylována a její 5'konec je kryt nukleotidovou čepičkou pravděpodobně typu m<sup>7</sup>GpppG (ICTVdB Management, 2006 b). Genomová RNA je složena z 15,5 % guaninem, 31,8 % adeninem, 46,9 % cytosinem a 25,7 % uracilem (ICTVdB Management, 2006 b). Genomová organizace složená z 5 ORF je typická pro rod *Potexvirus* (obrázek 4). Genomická RNA (6,2 kb) kóduje virovou replikázu, subgenomická RNA (0,9 kb) kóduje obalový protein (Forster *et al.*, 1987) a další subgenomická RNA (2,1 kb) kóduje „triple gene block“ (Beck *et al.*, 1991). Kompletní genomová RNA byla osekvenována u 3 kmenů viru WCIMV. Sekvence kmene M a O ze Severního a Jižního ostrova Nového Zélandu jsou tvořeny 5845 nukleotidy (Forster *et al.*, 1988) a 5846 nukleotidy a liší se o 12 % na úrovni nukleotidů a 3 % na úrovni aminokyselin (Beck *et al.*, 1990). Jako poslední byl osekvenován kmen RC z Japonska o délce 5843 nt, který se z 96 % shoduje s kmenem O a pouze z 88 % s kmenem M na úrovni nukleotidů (Nakabayashi *et al.*, 2002).

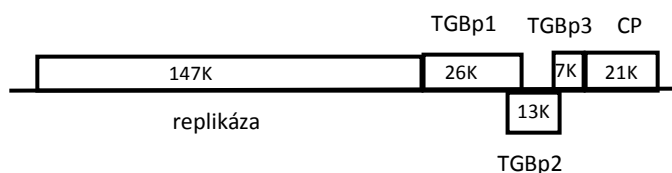
Viriony se nacházejí v cytoplasmě infikovaných buněk, kde mohou tvořit inkluzní tělíčka (ICTVdB Management, 2006 b). Virus je vzdáleně sérologicky příbuzný s potato virus X, casus virus X, hydrangea ringspot a clover yellow mosaic virus (Bercks, 1971).

Tento virus je přenosný mechanickou inokulací, kontaktem mezi hostiteli a z 6 % úspěšností semeny u jetele lučního (*Trifolium pratense*; Bercks, 1971). K hostitelům, u kterých byla experimentálně dokázána citlivost k tomuto viru, patří rostliny čeledi tykvovitě (*Cucurbitaceae*), bobovité (*Fabaceae*), krtičníkovité (*Scrophulariaceae*), lilkovité (*Solanaceae*) a lichořeřišnicovité (*Tropaeolaceae*; ICTVdB Management, 2006 b). Naopak necitlivost k tomuto viru byla experimentálně dokázána u některých zástupců čeledí laskavcovité (*Amaranthaceae*), merlíkovité (*Chenopodiaceae*), hvězdicovité (*Asteraceae*), brukvovité (*Brassicaceae*), pryšcovité (*Euphorbiaceae*), lilkovité (*Solanaceae*), čtyřbočovitě (*Tetragoniaceae*) a miříkovité (*Apiaceae*; ICTVdB Management, 2006 b). Jako diagnostické druhy se používají okurka setá (*Cucumis sativus*, lokální nekrotické léze), fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*, lokální nekrotické a chlorotické léze, systémové žloutnutí), hrách setý (*Pisum sativum*, lokální nekrotické léze, malformace listů), rod jetel (*Trifolium* ssp., systémová mozaika), bob setý

(*Vicia faba*, lokální nekrotické léze, systémová mozaika) a vigna čínská (*Vigna unguiculata*, lokální nekrotické a chlorotické léze). Pro udržování a propagaci viru se nejčastěji využívají rostlinné druhy fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*) a hrách setý (*Pisum sativum*).

U tohoto viru byl také zkoumán vliv hormonů na virovou replikaci. Ještě před zvýšením titru viru způsobuje virová infekce pokles aktivních cytokininů a nárůst jejich inaktivních konjugátů (Clarke *et al.*, 1999). Bylo prokázáno, že hormony dihydrozeatin, salicylová kyselina, jasmonová kyselina a 1-amino-cyklopropan karboxylová kyselina (ACC) inhibují akumulaci viru v listech fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) *in vivo* (Clarke *et al.*, 1999). Děje se tak díky změně produkce dvouřetězcových RNA (dsRNA) produkovaných během virové replikace (Clarke *et al.*, 2000). Přítomnost dsRNA pouze pro gRNA dokazuje, že inhibice virové replikace vytvořená účinkem těchto hormonů je způsobena neschopností virové replikázy syntetizovat sgRNA. Pravděpodobně zde dochází k zablokování konzervovaných oktanukleotidových sekvencí v promotorech pro sgRNA (Clarke *et al.*, 2000).

Dále se v roce 2009 ve výzkumném středisku Victorian AgriBiosciences Centre v Austrálii podařilo vypěstovat transgenní rostliny jetele plazivého (*Trifolium repens*) rezistentní k viru WCIMV. Transgenní rostliny byly vytvořeny transformací pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, kdy byly do rostlin vneseny 3 rozdílné binární vektory kódující sense, antisense a hairpin RNA (hpRNA) traskripty odpovídající genu pro replikázu WCIMV. Expres trans genu hpRNA a antisense RNA způsobila kompletní rezistenci k WCIMV, zatímco transgen sense RNA pouze částečnou rezistenci. Dále bylo v této práci zjištěno, že detekce tzv. malých interferujících RNA (small interfering RNA, siRNA) v transgenních rostlinách ještě před vystavením rostlin viru naznačuje přítomnost preaktivovaného mechanismu „RNA silencingu“ a dobře predikuje stupeň rezistence transgenních rostlin jetele k viru WCIMV (Ludlow *et al.*, 2009).



**Obrázek 4:** Schematické znázornění genomu viru WCIMV. Přímka znázorňuje sekvenci RNA a rámečky ORF, TGBp1-3 – transportní proteiny bloku TGB (triple gene block), CP – obalový protein, 147 K – 21 K – molekulová hmotnost jednotlivých proteinů kódovaných danými ORF (1K = 1000 Da).

### 3.4 PROTILÁTKY

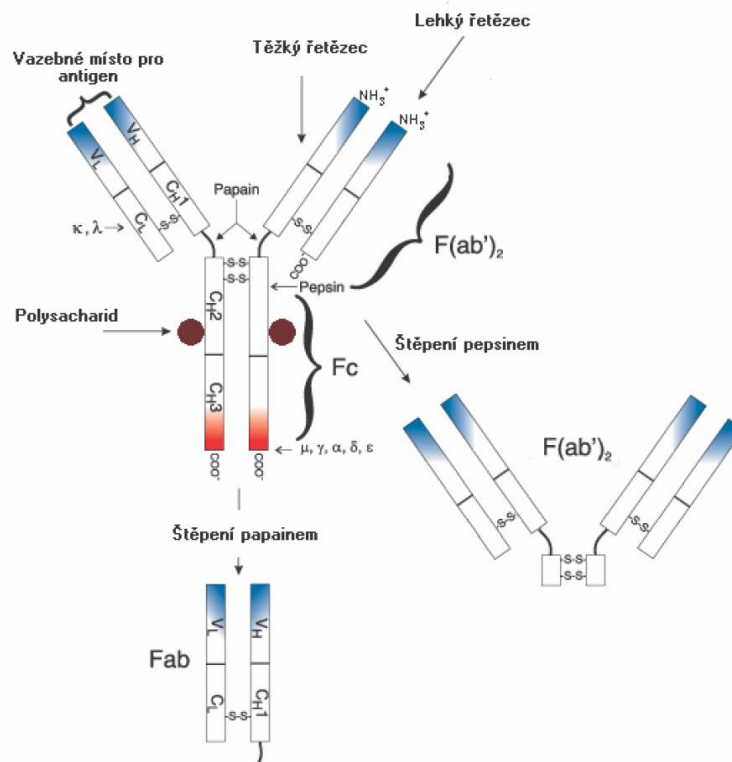
Protilátky jsou glykoproteiny s globulární terciární strukturou, které jsou součástí globulinové frakce krevní plazmy a nazývají se imunoglobuliny. Jsou produkovány plazmatickými buňkami diferencovanými z B-lymfocytů během imunitní odpovědi organismu v reakci na cizorodé látky neboli antigeny (Harlow and Lane, 1988). B-lymfocyty jsou buňky specifické imunity, které se aktivují po navázání antigenu na membránový receptor, kterým je také protilátka, nebo pomocí příslušných T-lymfocytů, které jsou druhým typem buněk specifické imunity (Ferenčík *et al.*, 2004). Po aktivaci se většina z nich diferencuje na krátkodobě žijící plazmatické buňky produkující velké množství protilátek, ale malá část se mění na tzv. paměťové buňky, které mají dlouhou životaschopnost a urychlují protilátkovou imunitní odpověď při dalším setkání s příslušným antigenem (Harlow and Lane, 1988).



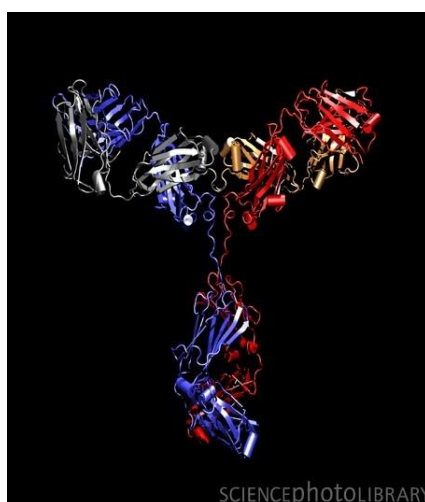
Jejich základní strukturu tvoří 4 polypeptidové řetězce, 2 identické lehké a 2 identické těžké, spojené disulfidickými můstky do molekuly ve tvaru písmene Y (obrázek 6; Hull, 2009). Tyto řetězce jsou uspořádány do domén a modulů (obrázek 5). První doména, vyskytující se na amino konci všech řetězců, je nazývána jako variabilní oblast. V této oblasti se mění sekvence aminokyselin polypeptidického řetězce, což je podstatou velké variability protilátek a jejich schopnosti vázat rozdílné antigeny. Tato doména navíc obsahuje tzv. hypervariabilní úseky, kde se aminokyseliny mění velice intenzivně. Při konečném prostorovém uspořádání molekuly imunoglobulinu se tyto úseky dostávají do vzájemné blízkosti a tvoří vazebné místo protilátky neboli paratop (Ferenčík *et al.*, 2004). Toto označení je ekvivalentem k pojmenování antigenní determinanty jako epitop. Tato část molekuly antigenu je rozpoznávána jako cizorodá a specificky se váže k paratopu protilátky (Khan and Dijkstra, 2006). Ostatní domény polypeptidických řetězců jsou označovány jako konstantní, protože v jejich sekvenci nedochází ke změnám v aminokyselinovém uspořádání (Ferenčík *et al.*, 2004).

Molekulu imunoglobulinu lze také rozštěpit na fragmenty pomocí proteáz pepsinu a papainu v tzv. pantové oblasti (obrázek 5), což je flexibilní část molekuly nacházející se mezi první a druhou konstantní doménou těžkého řetězce, kde se nacházejí meziřetězcové disulfidické vazby (Ferenčík *et al.*, 2004). Po štěpení enzymem papainem se molekula rozdělí na 2 fragmenty Fab (fragment vázající antigen) a fragment Fc (krystalizovatelný fragment), který je tvořen z C-koncových částí obou těžkých řetězců a je spojen disulfidickou vazbou (Bos, 1999). Po štěpení druhým z enzymů pepsinem dochází k rozdělení pouze na 2 fragmenty. Vzniká tak fragment F(ab)<sub>2</sub>, který na rozdíl od Fab obsahuje 2 vazebná místa a pantovou oblast spojenou disulfidickou vazbou, a neúplný fragment Fc (Ferenčík *et al.*, 2004). Všechny tyto fragmenty lze využít v různých variantách především nepřímé metody ELISA (Koenig and Paul, 1982). Fragmenty Fab a F(ab)<sub>2</sub> jsou sérologicky aktivní a tudíž váží určitý antigen. Kdežto fragment Fc tuto schopnost postrádá, ale díky svým konstantním doménám je specifický pro živočišný druh, ve kterém byla protilátka připravena (Bos, 1999). Těto vlastnosti se využívá při přípravě sekundárních protilátek, potřebných pro nepřímou metodu ELISA (Koenig and Paul, 1982). Tyto protilátky se vždy připravují v jiném zvířecím druhu, než ze kterého pocházejí primární protilátky. Sekundární protilátky jsou poté specifické pro jiné protilátky než pro daný virus, jako je tomu u protilátek primárních (Bos, 1999). Kromě toho je fragment Fc také schopný vázat protein A, který se běžně vyskytuje v buněčné stěně bakterie *Staphylococcus aureus* a je využitelný v různých sérologických metodách (Hull, 2009).

Podle typu těžkého řetězce se imunoglobuliny dělí do 5 tříd, z nichž jsou pro rostlinnou virologii důležité imunoglobuliny M (IgM) a G (IgG). Jako první jsou během imunitní odpovědi produkovány IgM, což jsou největší imunoglobuliny vyskytující se v podobě pentameru, které většinou z krve za pár týdnů vymizí. Sérologicky významné jsou hlavně IgG, které se vyskytují nejčastěji ze všech tříd imunoglobulinů (Bos, 1999). Cirkulují v krvi a tkáňovém moku a jsou jedinou třídou imunoglobulinů, která je schopná přecházet přes placentu, čímž chrání plod před choroboplodnými zárodky, dříve než si vytvoří vlastní imunitní systém. Jsou produkovány při imunitní odpovědi na opakovaný kontakt s určitým antigenem a při vazbě s ním aktivují komplement, soubor proteinů krevní plazmy, který zajišťuje zničení antigenu a je aktivován především komplexem antigen-protilátka (Ferenčík *et al.*, 2004). Jsou tvořeny monomery o molekulové hmotnosti 150 kDa a sedimentačním koeficientu 6,5 S (Bos, 1999). Jejich těžké řetězce typu  $\gamma$  mají molekulovou hmotnost 50-70 kDa a jsou rozděleny na 1 variabilní a 3 konstantní domény každá zhruba o délce 110 aminokyselin. Lehké řetězce o velikosti 23 kDa obsahují po jedné variabilní a jedné konstantní doméně (Harlow and Lane, 1988).



**Obrázek 5:** Schéma protilátky s příslušným enzymatickým štěpením molekuly.  $V_H$  – variabilní doména těžkého řetězce,  $V_L$  – variabilní doména lehkého řetězce,  $C_L$  – konstantní doména lehkého řetězce,  $C_{H1-3}$  – konstantní domény těžkého řetězce, řecké písmena  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$  – typy těžkých řetězců vyskytujících se u imunoglobulinů, řecká písmena  $\kappa$  a  $\lambda$  – typy lehkých řetězců vyskytujících se u imunoglobulinů, S-S – disulfidické můstky,  $NH_3^+$  – aminokonec,  $COO^-$  – karboxylový konec (Invitrogen, 2008).



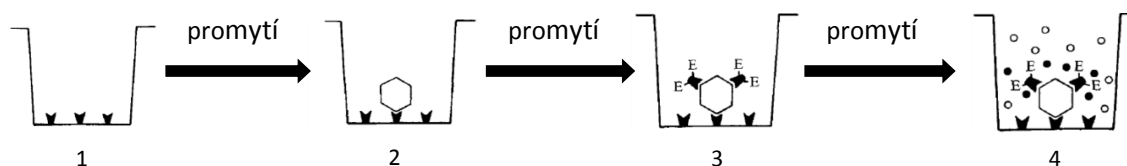
**Obrázek 6:** Molekulární model imunoglobulinu G (IgG). Barevná vlákna představují proteinové řetězce, šípky a válce jejich specifickou 3D strukturou. Modře a červeně jsou znázorněny těžké řetězce, které tvoří strukturální kostru ve tvaru písmene Y. Šedivou a oranžovou barvou jsou označeny lehké řetězce interagující s těžkými řetězci v horní části molekuly imunoglobulinu (SPL, 2011).

### 3.5 ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA S ENZYMEM VÁZANÝM NA IMUNOSORBENT (ELISA, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Enzymové imunoanalýzy patří k důležitým technikám stanovení řady makromolekul (proteiny), jejich komplexů (viry, buňky) a nízkomolekulárních látek (hormony, růstové regulátory). Enzymová imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent neboli ELISA je základní metodou klinické imunologie, která je založena na principu specifické interakce mezi protilátkou a antigenem. V rostlinné virologii byla poprvé úspěšně použita v roce 1976 pro detekci dvou morfologicky odlišných virů arabis mosaic virus (AMV) a plum pox virus (PPV; Voller *et al.*, 1976) a velice rychle nahradila většinu dříve používaných sérologických metod. Je to velice citlivá metoda, která umožňuje detekovat i viry o koncentraci pouze 1-10 ng/ml (Bos, 1999). K detekci zde dochází díky virově specifickým protilátkám s kovalentně navázaným enzymem, který degraduje chromogenní substrát za tvorby viditelného zbarvení. To lze poté změřit pomocí spektrofotometru jako absorbance při vlnové délce odpovídající použitému substrátu. Ačkoli je u některých virů méně citlivá než metody založené na hybridizaci nukleových kyselin nebo biologické analýzy na indikátorových rostlinách, je vhodnější pro rutinní, rozsáhlé testování polních vzorků (Khan and Dijkstra, 2006).

Existuje mnoho variant této metody odlišující se od sebe podle specifických účelů, pro které je daná metoda určena. Obecně se dělí na přímé a nepřímé metody podle vazby enzymu na detekující protilátku. U přímých metod je enzym navázán přímo na detekující protilátku, kdežto u nepřímých metod je tato vazba zprostředkována nespecificky použitím další protilátky (z jiného zvířecího druhu), na kterou je enzym navázán (Koenig and Paul, 1982).

Pro rychlou a snadnou detekci virů o různé morfologii obsažených v syrové rostlinné šťávě nebo v podobě purifikátu je nejvhodnější přímá metoda nazvaná jako DAS – ELISA (dvojitá sendvičová ELISA, double-antibody sandwich ELISA), kde nevadí kmenová specifita a velmi nízká koncentrace viru ve vzorku (Koenig and Paul, 1982). Při této metodě se nejprve pomocí nekovalentní vazby adsorbují na povrch jamky polystyrénové mikrotitrační destičky specifické protilátky, které poté zachytí a imobilizují odpovídající vir přítomný v testovaném vzorku. Následně se ke komplexu vir-protilátka přidají další specifické protilátky, které mají navázaný určitý enzym (obrázek 7; Clark and Adams, 1977). Pro tuto metodu se nejčastěji jako enzym používá alkalická fosfatáza, která hydrolyzuje přidávaný bezbarvý substrát (4-nitrofenyl fosfát) za vzniku žlutého produktu (4-nitrofenol) a volného fosfátu. Přítomnost zkoumaného viru ve vzorku se následně stanovuje spektrofotometricky jako intenzita žlutého zbarvení při 405 nm (Clark and Adams, 1977). Před každým novým krokem jsou volné reaktanty z jamek vymyty, aby nedocházelo k nespecifickým reakcím (Clark and Adams, 1977).

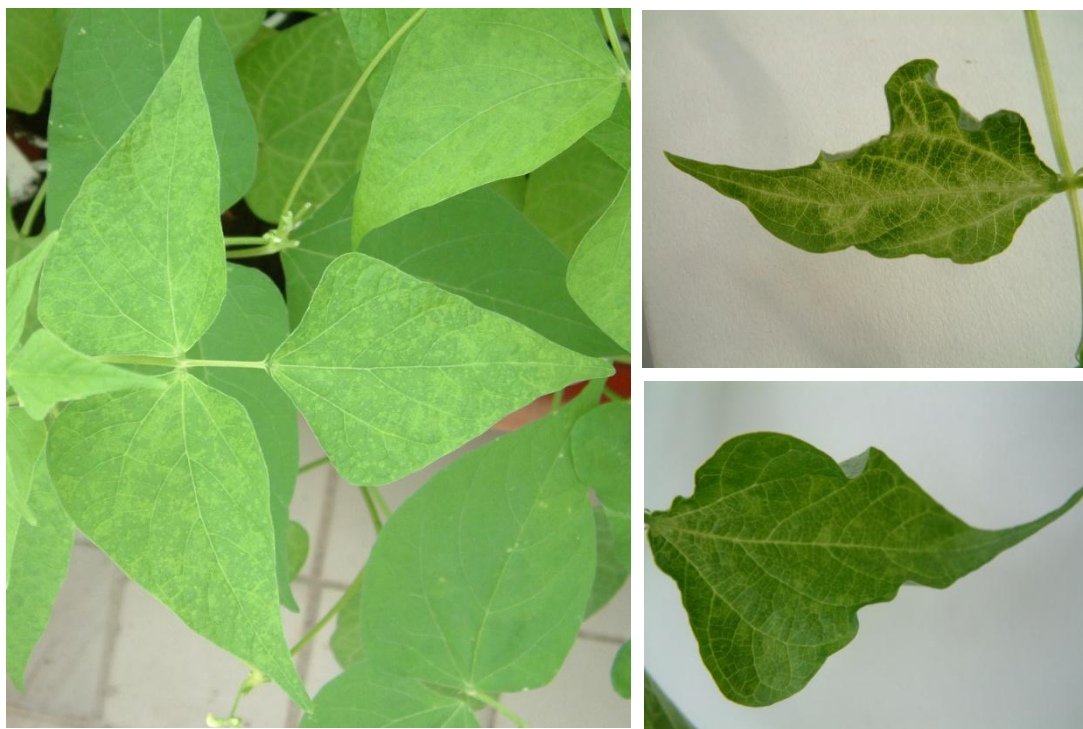


**Obrázek 7:** Princip přímé metody DAS-ELISA. 1 – adsorpce specifických protilátek na dno jamky, 2 – přidání testovaného vzorku obsahujícího vir, 3 – přidání specifické protilátky konjugované s enzymem, 4 – přidání chromogenního substrátu, ▾ protilátka, ◻ vir, ▴-E protilátka konjugovaná s enzymem, ● substrát, ○ produkt štěpení substrátu (modifikace Clark and Adams, 1977).

## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Ve své práci jsem používala virus mosaiky jetele bílého (WCIMV), izolát 12/13 získaný z jetele lučního (*Trifolium pratense*) pocházející ze Šlechtitelské stanice Ing. Hana Jakešová, Csc. v Hladkých Životicích. V předchozí práci byl tento izolát WCIMV identifikován jako kmen O (Bečková, 2007). Pro purifikace jsem zpočátku zpracovávala zamražený rostlinný materiál (*Nicotiana occidentalis* 37B, *Phaseolus vulgaris*), který byl izolátem 12/13 WCIMV infikován pomocí mechanické inokulace. Tento materiál jsem získala od vedoucí své práce Ing. Jany Fránové, Dr. Vzhledem k potřebě velkého množství rostlinného materiálu, jsem si zkoumaný virus následně namnožila mechanickou inokulací dalších rostlin fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*). Tyto rostliny byly vypěstovány v laboratorním skleníku oddělení Rostlinné virologie. Pro inokulum jsem nejprve použila již zmíněný zamražený rostlinný materiál a poté tímto způsobem získané čerstvé listy fazolu infikované virem WCIMV, které jeví výrazné symptomy v podobě systémové mozaiky (obrázek 8). Inokulum jsem připravila homogenizací rostlinného materiálu pomocí třecí misky a tloučku v inokulačním 0,1M fosfátovém pufru pH 7,00 s přidáním karburundového prášku (karbid křemíku, SiC) jako abraziva.



**Obrázek 8:** Ukázka systémových příznaků virové infekce WCIMV (white clover mosaic virus) na listech fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*).

## 4.2 PURIFIKACE

### 4.2.1 Purifikace s použitím bentonitu

Pro částečnou purifikaci jsem použila postupně 4 metody purifikačních postupů. První z nich byl založen na separaci hostitelských proteinů adsorpcí na bentonit, což je jílovitá hornina s velkou sorpční schopností. Poté následovala koncentrace virionů pomocí diferenciální centrifugace o 2 cyklech nízkootáčkové a vysokootáčkové centrifugace, která vede k separaci virionů od rozpustných nízkomolekulárních částic. Pro nízkootáčkovou centrifugaci jsem u všech purifikačních postupů používala stolní centrifugu 3-18 K firmy Sigma a pro vysokootáčkovou centrifugaci ultracentrifugu Optima™ L-90 K (rotor Ti 50.2) firmy Beckman Coulter. Touto metodou jsem provedla celkem 3 purifikace za použití infikovaných listů tabáku *Nicotiana occidentalis* 37B a fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) jako rostlinného materiálu.

#### Postup purifikace:

- 1) 50 g rostlinného materiálu homogenizováno ve 100 ml PBS pufru pH 7,4 (s přísadkou 1 % PVP, 1 % BSA, 2,5 % Triton-X-100 a 1M močoviny) a kyseliny thioglykolové jako antioxidantu
- 2) homogenát filtrován přes silon pro odstranění hrubých rostlinných zbytků
- 3) do rostlinné šťávy přidáno 6 % bentonitu a hodinu mícháno v ledu
- 4) suspenze centrifugována 10 min při 7000 ot/min a 4 °C pro odstranění bentonitu s navázanými hostitelskými proteiny
- 5) supernatant centrifugován 2 hodiny při 29000 ot/min a 4 °C
- 6) sedimenty resuspendovány v 0,02 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 a centrifugovány 10 min při 12000 ot/min a 4 °C
- 7) supernatant doplněn 0,02 M sodno-draselným fosfátovým puforem pH 7,2 na objem centrifugační kyvety a centrifugován hodinu při 50000 ot/min a 4 °C
- 8) sediment resuspendován v 0,02 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 a centrifugován 10 min při 6000 ot/min a 4 °C
- 9) odebrán supernatant (koncentrovaná virová suspenze) a uchován při – 20 °C

### 4.2.2 Purifikace s použitím chloroformu a *n*-butanolu

Postup je založen na čištění viru pomocí kombinace organických rozpouštědel chloroformu a *n*-butanolu, které koagulují hostitelské komponenty, jako jsou ribozomy, phytoferritin a membránové organely. Virové částice jsem následně koncentrovala srážením polyethylenglykolem (PEG 6000), které jsem při druhém pokusu ještě podpořila následnou diferenciální centrifugací. Tuto metodu purifikace jsem provedla pouze 2 krát. Při prvním pokusu jsem jako rostlinný materiál použila infikované listy fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) a při druhém listy tabáku *Nicotiana occidentalis* 37B.

### Postup purifikace:

- 1) 60 g rostlinného materiálu homogenizováno ve 120 ml 0,5 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 a Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> jako antioxidantu
- 2) homogenát filtrován přes sílon pro odstranění hrubých rostlinných zbytků
- 3) rostlinná šťáva hodinu míchána v ledu a poté centrifugována 10 min při 7000 ot/min a 4 °C pro další přečištění
- 4) do supernatantu přidáno 6 % *n*-butanolu, 8 % chloroformu a 30 min intenzivně mícháno při pokojové teplotě
- 5) suspenze centrifugována 10 min při 7000 ot/min a 4 °C pro odstranění koagulovaných hostitelských komponent a organických rozpouštědel
- 6) k vodné fázi přidán PEG 6000 a NaCl v koncentraci 4 g / 100 ml a hodinu mícháno při pokojové teplotě
- 7) suspenze centrifugována 15 min při 16000 ot/min a 4 °C
- 8) sedimenty resuspendovány v 0,01 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 a centrifugovány 15 min při 16000 ot/min (3000 ot/min při druhém pokusu) a 4 °C

### Pokračování u druhého pokusu:

- 9) supernatant doplněn 0,01 M sodno-draselným fosfátovým pufrům pH 7,2 na objem centrifugační kyvety a centrifugován 150 min při 25000 ot/min a 4 °C
- 10) sediment resuspendován v 0,01 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 a centrifugován 10 min při 7000 ot/min a 4 °C
- 11) odebrán supernatant (koncentrovaná virová suspenze) a uchován při – 20 °C

#### **4.2.3 Purifikace s použitím bentonitu a polyethylenglykolu (PEG 6000)**

V dalším postupu purifikace jsem zkombinovala adsorpci hostitelských proteinů bentonitem a koncentraci viru srážením polyethylenglykolem v kombinaci s následnou diferenciální centrifugací. Touto metodou jsem provedla celkem 8 purifikací za použití infikovaných listů tabáku *Nicotiana occidentalis* 37B a fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) jako rostlinného materiálu.

### Postup purifikace:

- 1) 50 g rostlinného materiálu homogenizováno ve 100 ml PBS pufru pH 7,4 (s přísadkou 1 % PVP, 1 % BSA, 2,5 % Triton-X-100 a 1M močoviny) a kyseliny thioglykolové jako antioxidantu
- 2) homogenát filtrován přes sílon pro odstranění hrubých rostlinných zbytků
- 3) do rostlinné šťávy přidáno 6 % bentonitu a hodinu mícháno v ledu
- 4) suspenze centrifugována 10 min při 7000 ot/min a 4 °C pro odstranění bentonitu s navázanými hostitelskými proteiny

- 5) k supernatantu přidán PEG 6000 a NaCl v koncentraci 4 g / 100 ml a hodinu mícháno při pokojové teplotě
- 6) supernatant centrifugován 2 hodiny při 29000 ot/min a 4 °C
- 7) sedimenty resuspendovány v 0,02 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 a centrifugovány 10 min při 12000 ot/min a 4 °C
- 8) supernatant doplněn 0,02 M sodno-draselným fosfátovým pufrům pH 7,2 na objem centrifugační kyvety a centrifugován hodinu při 50000 ot/min a 4 °C
- 9) sediment resuspendován v 0,02 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 a centrifugován 10 min při 6000 ot/min a 4 °C
- 10) odebrán supernatant (koncentrovaná virová suspenze) a uchován při – 20 °C

#### 4.2.4 Purifikace s použitím diethyletheru a tetrachlormethanu

Jako poslední metodu jsem využila modifikaci purifikace dle Wettera z roku 1960. Základem této metody je koagulace hostitelských komponent organickým rozpouštědlem diethyletherem. Vodná fáze obsahující viriony se poté vyčistí od jeho zbytků extrakcí druhým organickým rozpouštědlem tetrachlormethanem. Následně se viriony koncentrují diferenciální centrifugací. Touto metodou jsem provedla celkem 19 purifikací z infikovaných listů fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*).

##### Postup purifikace:

- 1) 50 g rostlinného materiálu homogenizováno v 0,5 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,2 v poměru 1:2 (w/v) a 0,2 % Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0,2 % kyseliny askorbové jako antioxidantů
- 2) homogenát filtrován přes sílon pro odstranění hrubých rostlinných zbytků
- 3) k rostlinné šťávě přidáno ekvivalentní množství diethyletheru a 20 min mícháno při pokojové teplotě kvůli koagulaci hostitelských komponent
- 4) suspenze centrifugována 10 min při 6000 ot/min a 4 °C
- 5) k vodné fázi přidáno ekvivalentní množství tetrachlormethanu a 10 min mícháno při pokojové teplotě k odstranění zbytků diethyletheru
- 6) suspenze centrifugována 10 min při 6000 ot/min a 4 °C
- 7) zopakován krok 5 a 6
- 8) vodná fáze míchána přes noc při 4 °C
- 9) suspenze centrifugována 2 hodiny při 29000 ot/min a 4 °C
- 10) sedimenty resuspendovány v 0,01 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,00 a centrifugovány 10 min při 12000 ot/min a 4 °C
- 11) supernatant doplněn 0,01 M sodno-draselným fosfátovým pufrům pH 7,00 na objem centrifugační kyvety a centrifugován 90 min při 50000 ot/min a 4 °C
- 12) sediment resuspendován v 0,01 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,00 a centrifugován 10 min při 6000 ot/min a 4 °C

13) odebrán supernatant (koncentrovaná virová suspenze) a uchován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Částečné purifikáty připravené všemi použitými metodami jsem zkontrolovala pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) pro ověření přítomnosti virových částic. Purifikáty jsem vždy nanesla smáčecí metodou na pouhlikované měděné sítky potažené formvarovou membránou a obarvila 2 % roztokem uranyl acetátu. U purifikátů jsem též změřila absorbanci při 260 a 280 nm.

#### 4.2.5 Hustotní gradientová centrifugace

Z důvodu následné přípravy antiséra jsem částečné purifikáty, které obsahovaly velké množství virových částic, ještě přečistila pomocí hustotní gradientové centrifugace. Během této metody dochází k oddělení virů od nečistot na základě rychlosti sedimentace jednotlivých částic obsažených ve vzorku. Použila jsem gradient založený na zvyšující se koncentraci a tím i hustotě roztoku sacharózy směrem ke dnu centrifugační kyvety. Obsah kyvet jsem následně analyzovala průtokovým spektrofotometrem. Frakce vykazující vysoké hodnoty absorbance jsem oddělila, rozředila a poté zakoncentrovala viriony pomocí ultracentrifugace.

##### Postup:

- 1) připraveny roztoky sacharózy v 0,01 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,00 o koncentraci 10 %, 20 %, 30 % a 40 %
- 2) po 9 ml navrstveny do tenkostěnných centrifugačních kyvet tak, aby se koncentrace sacharózy směrem ke dnu centrifugační kyvety zvyšovala
- 3) navrch opatrně nanesen 1 ml předem připraveného částečného purifikátu
- 4) centrifugace 3 hodiny při 28000 ot/min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (výkyvný rotor SW 28, ultracentrifuga Optima™ L-90 K od firmy Beckman Coulter)
- 5) odděleny frakce obsahující virové částice pomocí aparatury složené z průtokového spektrofotometru (UVis-920, APCzech, UV filtr pro 260 nm), peristaltické pumpy (Peristaltic Pump P-3, Pharmacia Fine Chemicals), sběrače frakcí (RediFrac, Pharmacia Biotech) a zapisovače (Line Recorder TZ 4200, Laboratorní přístroje Praha)
- 6) frakce 3 krát naředěny 0,01 M sodno-draselným fosfátovým pufrům pH 7,00
- 7) centrifugace 90 min při 50000 ot/min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 8) sediment resuspendován v 0,01 M sodno-draselném fosfátovém pufru pH 7,00

U takto získaného čistého purifikátu jsem změřila absorbanci při 260 a 280 nm a zkontrolovala přítomnost virových částic pomocí transmisní elektronové mikroskopie stejným způsobem jako u částečných purifikátů.



### 4.3 IMUNIZACE KRÁLÍKA

Laboratorní králík (plemeno Činčila) byl imunizován paní Lenkou Štifterovou na Parazitologickém ústavu, AVČR. Imunizační schéma sestávalo z 2 cyklů aplikací antigenu. K subkutánním a intramuskulárním injekcím bylo přidáno ekvivalentní množství nekompletního Freundova adjuvans (Sigma-Aldrich). Tato emulze oleje a vody se používá pro zvýšení imunogenity a retence antigenu, což vyvolává silnou a prodlouženou imunitní odpověď.

V prvním cyklu byly všechny imunizační dávky tvořeny částečnými purifikáty dále přečištěnými přes sacharózový gradient. Nejprve byla aplikována subkutánní injekce, po které následovala za zhruba 10 dní intramuskulární aplikace. Poté byl králík imunizován ještě 2 intravenózními injekcemi vždy s týdenním rozestupem. První zkusmý odběr pro kontrolu titru antiséra následoval týden od poslední intravenózní injekce, po kterém byla aplikována ještě další subkutánní injekce zhruba 3 týdny od poslední intravenózní aplikace. Poté byl proveden ještě druhý zkusmý odběr zhruba týden od této subkutánní injekce.

Druhý cyklus proběhl zhruba za další 2 měsíce po odpočinku imunizovaného zvířete. V tomto cyklu byly dávky 1 a 3 tvořeny purifikáty přečištěnými přes sacharózový gradient a dávky 2 a 4 přímo částečnými purifikáty, které i samy o sobě vykazovaly vysokou čistotu. Nejprve byla aplikována intramuskulární injekce, po které ještě následovaly 3 intravenózní aplikace po 6, 3 a 4 dnech vždy od poslední imunizační dávky.

#### Imunizační schéma:

1. **subkutánní (pod kůží) injekce** - 0,85 mg virových částic
2. **intramuskulární (do svalu) injekce** – 0,85 mg virových částic
3. **intravenózní (do žíly) injekce** – 0,85 mg virových částic
4. **intravenózní (do žíly) injekce** – 0,85 mg virových částic

zkusmý odběr

5. **subkutánní injekce** – 20 µg virových částic

zkusmý odběr

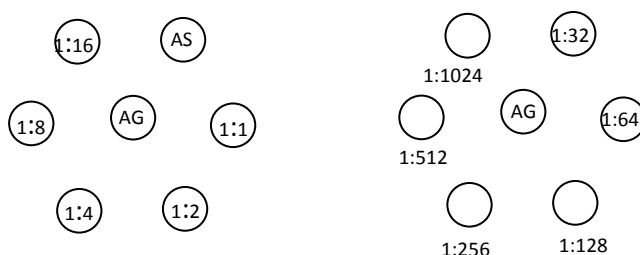
#### po odpočinku:

1. **intramuskulární injekce** – 7 µg virových částic
2. **intravenózní injekce** – 15,4 mg virových částic
3. **intravenózní injekce** – přesně neurčené množství (přítomnost částic potvrzena pomocí TEM, viz kapitola 5.1.4)
4. **intravenózní injekce** – 3,4 mg virových částic

#### 4.4 IMUNODIFÚZNÍ TEST

Pro určení titru antiséra jsem použila metodu dvojité imunodifúze v agaru (tzv. metoda podle Ouchterlonyho), při které agarózovým gelem difundují protilátky a antigeny proti sobě. Vzájemně sérologicky reagují a v místě jejich reakční rovnováhy vzniká bílá precipitační linie, kterou lze vizuálně pozorovat.

Pro tuto metodu jsem používala 0,8 % bacto-agar (Difco) rozpuštěný v McIlvaine pufru pH 7,00. Jeho tenkou vrstvu jsem nanasla do Petriho misek a po ztuhnutí jsem do agaru vykrojila jamky pro nakapání antiséra, pozitivní a negativní kontroly. Jako negativní kontrolu jsem zvolila neinfikované listy jetele plazivého (*Trifolium repens*) a fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) vypěstované ve skleníku oddělení Rostlinné virologie a jako pozitivní kontrolu listy fazolu infikované virem WCIMV. Jak zdravé, tak i infikované listy jsem homogenizovala pomocí třecí misky a tloučku v inokulačním 0,1M fosfátovém pufru pH 7,00 a poté centrifugovala 10 min při 8000 ot/min (3-18 K, Sigma) pro odstranění hrubých nečistot. Obě negativní kontroly jsem použila ke kontrole protilátek přítomných v antiséru a pozitivní kontrolu pro určení titru antiséra. Do prostřední jamky jsem vždy nakapala buď negativní, nebo pozitivní kontrolu. Kolem této jamky bylo vždy rozmístěno 6 jamek, do kterých jsem nakapala neředěné antisérum a jeho ředící řadu (obrázek 9). Výsledek jsem hodnotila postupně v průběhu 21 dní.



**Obrázek 9:** Schéma rozložení jamek během imunodifúze. AS – antisérum, AG – antigen (WCIMV), 1:1 – 1:1024 – ředící řada antiséra.

#### 4.5 IZOLACE IgG

Pro izolaci IgG byla odebrána krev 3. a 7. den po poslední imunizační dávce druhého cyklu. Zároveň jsem také izolovala IgG z antisér připravených po zkusmých odběrech. Pro získání antiséra jsem nejprve odebranou krev srážela cca 24 hodin za pokojové teploty a poté centrifugovala 15 minut při 3000 ot/min v nechlazené centrifuze. Z takto připravených antisér jsem izolovala IgG celkem třikrát. Nejprve jsem jednotlivá antiséra naředila v poměru 1:10 (v/v) destilovanou vodou a poté k nim přidala ekvivalentní množství nasyceného roztoku síranu amonného. K získání proteinů v nativním stavu jsem celou směs hodinu srážela za pokojové teploty. Po desetiminutové centrifugaci při 8000 ot/min (3-18 K, Sigma) jsem vzniklý precipitát rozpustila PBS pufrům pH 7,4 zředěným destilovanou vodou v poměru 1:1. Z takto připravené suspenze jsem pro další práci odstranila síran amonný trojnásobnou dialýzou pokaždé proti 1250 ml PBS pufru opět zředěným destilovanou vodou v poměru 1:1. Čisté IgG jsem poté získala ionexovou chromatografií na sloupci DEAE-celulózy (Sigma). Pro oddělení frakcí obsahujících IgG jsem použila aparaturu složenou z průtokového spektrofotometru (UVis-920, APCzech, UV filtr pro 280 nm), peristaltické pumpy (Peristaltic Pump P-3, Pharmacia Fine Chemicals), sběrače frakcí (RediFrac, Pharmacia Biotech) a zapisovače (Line Recorder TZ 4200, Laboratorní přístroje Praha). Takto získané čisté IgG jsem lyofilizovala a uchovávala v zatavených ampulích

po 2 mg. Pro následnou optimalizaci metody DAS-ELISA jsem si ponechala 1 mg IgG, který jsem naředila na výslednou koncentraci 1 mg/ml.

#### 4.6 KONJUGACE IgG S ALKALICKOU FOSFATÁZOU

Pro značení IgG alkalickou fosfatázou jsem použila 1 mg IgG, který jsem doplnila do 1 ml pufrů PBS pH 7,4. K takto připravenému roztoku IgG o koncentraci 1 mg/ml jsem přidala 3000 U alkalické fosfatázy (100 µl, Roche) a 12,5 µl 5 % roztoku glutaraldehydu pro udržení imunologické a enzymatické aktivity konjugátů (Avrameas, 1969). Tuto směs jsem poté inkubovala 3 hodiny při pokojové teplotě za občasných promíchání. Následně jsem ze směsi odstranila glutaraldehyd trojnásobnou dialýzou při 4 °C pokaždé proti 1500 ml pufru PBS pH 7,4. Takto získané IgG s navázanou alkalickou fosfatázou jsem uchovala při 4 °C za přidání BSA (bovinní sérový albumin) pro jejich stabilizaci a azidu sodného (NaN<sub>3</sub>) pro konzervaci.

#### 4.7 DAS-ELISA

Pro optimalizaci podmínek sérologické detekce WCIMV metodou DAS-ELISA jsem provedla několik samostatných pokusů, při kterých jsem používala získané IgG a připravený konjugát s alkalickou fosfatázou (dále IgG-AP). Test jsem vždy prováděla na polystyrenových mikrotitračních destičkách s 96 jamkami (MicroWell™ Plates, Nunc A/S). Jako negativní kontrolu jsem používala zdravé listy rostlin fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) a tabáku *Nicotiana occidentalis* 37B, které byly vypěstovány ve skleníku oddělení Rostlinné virologie. Pro pozitivní kontrolu jsem vždy odebrala listy fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*) s příznaky systémové mozaiky po mechanické inokulaci izolátem WCIMV 12/13. Veškerý rostlinný materiál jsem následně vložila do homogenizačních sáčků (Bioreba AG), přidala extrakční pufr a homogenizovala pomocí speciálního mechanického homogenizátoru (Homex 6, Bioreba AG). Po každém kroku jsem volné reagencie vymývala promývacím pufrů pH 7,4 pomocí automatické promývačky Atlantis (Chemos). Nakonec jsem vždy výsledek testu kvantifikovala měřením absorbance při vlnové délce 405 nm na spektrofotometru (SpectraFluor Plus, Tecan) a destičku vyfotografovala.

##### 4.7.1 Určení vhodných koncentrací IgG a konjugátů

Při tomto pokusu jsem zjišťovala nejvhodnější koncentraci IgG a zároveň ředění připraveného IgG-AP, aby test probíhal bez vzniku falešných pozitivit a zároveň se vytvářely dostatečně zřetelné barevné signály u pozitivních kontrol. Nejprve jsem si vytvořila ředící řady získaných IgG a IgG-AP, poté provedla níže popsání postup a nakonec výsledky vyhodnotila.

##### Pracovní postup:

##### 1) Potážení stěn jamek mikrotitrační destičky protilátkami

- IgG naředěny potahovacím pufrů o pH 9,6 na koncentrace 1,5 µg/ml, 2,5 µg/ml a 5 µg/ml
- IgG nanoseny do příslušných jamek mikrotitrační destičky po 200 µl
- inkubace 3 hodiny při 37 °C v termostatu
- 3x promytí promývacím pufrů pomocí automatické promývačky

## 2) Nanesení vzorků rostlinného materiálu

- vzorky homogenizovány v extrakčním pufru v poměru 1:10 (0,1 g listu/ 1 ml pufru)
- rostlinná šťáva nanese na příslušných jamek mikrotitrační destičky po 200  $\mu$ l
- nanese blank (extrakční pufr) do příslušných jamek mikrotitrační destičky po 200  $\mu$ l
- inkubace v lednici při 4 °C přes noc
- 5x promytí promývacím pufrům pomocí automatické promývačky

## 3) Navázání IgG –AP na antigeny

- IgG – AP naředěn konjugátovým pufrům v poměru 1:100, 1:500 a 1:1000
- IgG – AP nanese na příslušných jamek mikrotitrační destičky po 200  $\mu$ l
- inkubace 3 hodiny při 37 °C v termostatu
- 3x promytí promývacím pufrům pomocí automatické promývačky

## 4) Přidání specifického substrátu

- 5 mg tablety substrátu (4-nitrofenyl fosfát; Sigma) rozpuštěny v substrátovém pufru o pH 9,8 na výslednou koncentraci 1 mg/ml za temna
- roztok substrátu nanese na příslušných jamek mikrotitrační destičky po 200  $\mu$ l za temna
- inkubace 45 minut v termostatu při 37 °C za temna

## 5) Vyhodnocení na spektrofotometru

- celá mikrotitrační destička změřena na spektrofotometru při 405 nm

### Složení použitých pufrů:

- **0,01 M potahovací karbonátový pufr pH 9,6**  
NaHCO<sub>3</sub> ... 0,168 g  
voda ... 200 ml  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ... 0,106 g  
voda ... 100 ml  
roztoky slévány na výsledné pH 9,6  
přidáno několik zrněk azidu sodného pro konzervaci
- **10x PBS pufr pH 7,4**  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O ... 4,68 g  
NaCl ... 24,63 g  
voda ... 300 ml  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O ... 25,06 g  
NaCl ... 57,47 g  
voda ... 700 ml

roztoky slévány na výsledné pH 7,4  
pro další použití ředěno 1:10 destilovanou vodou a upraveno na pH 7,4

- **promývací pufr**  
PBS pufr pH 7,4 + 0,05 % Tween 20  
přidáno několik zrněk azidu sodného pro konzervaci
- **extrakční pufr**  
promývací pufr + 1 % PVP  
přidáno několik zrněk azidu sodného pro konzervaci
- **konjugátový pufr**  
shodný s promývacím pufrem
- **substrátový pufr pH 9,8**  
diethanolamin ... 9,7 ml  
voda ... 80 ml  
pH upraveno pomocí HCl na 9,8  
doplněno na 100 ml dest. vodou  
přidáno několik zrněk azidu sodného pro konzervaci

#### 4.7.2 Určení vhodných podmínek inkubace enzymové reakce

Během tohoto pokusu jsem zjišťovala nejvhodnější délku a teplotu inkubace, za které probíhá hydrolýza substrátu alkalickou fosfatázou. Test jsem provedla stejným způsobem jako v kapitole 4.7.1 pouze s rozdílem v použitých koncentracích IgG a IgG - AP, u kterých jsem vycházela z předchozího zjištění jejich nejvhodnějších hodnot. Závěrečnou reakci substrátu s enzymem jsem inkubovala zároveň na jedné mikrotitrační destičce za pokojové teploty a na druhé v termostatu při 37 °C. U obou destiček jsem poté změřila absorbanci při 405 nm po 15, 20 a 30 minutách inkubace a porovnávala výsledky.

#### 4.7.3 Určení citlivosti testu při ředění rostlinné šťávy a porovnání s komerčně dostupným kitem firmy DSMZ (Německo)

Při tomto pokusu jsem určovala nejnižší možné ředění rostlinné šťávy, za kterého ještě dochází k pozitivní reakci. Opět jsem postupovala stejným způsobem jako v bodě 4.7.1 pouze s rozdílem v použitých koncentracích IgG (1,5 µl/ml) a IgG - AP (1:1000). Nejprve jsem si připravila ředící řady rostlinné šťávy jak z listů použitých pro pozitivní, tak i negativní kontrolu (obrázek 10). Ředící řadu jsem si vytvořila homogenizací rostlinného materiálu v extrakčním pufru stejně jako v bodě 4.7.1 v poměru 1:10 a takto získanou rostlinnou šťávu jsem poté naředila extrakčním pufrem tak, abych získala ředění 1:20, 1:40, 1:50, 1:100, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup> a 1:10<sup>6</sup>. Výsledné absorbance jsem u první destičky s nižšími hodnotami ředění změřila po 30 minutách inkubace při pokojové teplotě, u druhé destičky s vyššími hodnotami ředění po 75 minutách.

Stejným způsobem ředěnou rostlinnou šťávu jsem poté ještě otestovala pomocí komerčně dostupného kitu firmy DSMZ (Německo). Test jsem provedla přesně podle pokynů výrobce pouze s použitím vlastních pozitivních a negativních kontrol. Jako pozitivní kontrolu jsem stejně jako ve všech provedených testech použila listy fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*)

infikované virem WCIMV a jako negativní kontrolu zdravé listy fazolu a tabáku (*Nicotiana occidentalis* 37B). Výsledky obou použitých postupů jsem nakonec vzájemně porovnála.



**Obrázek 10:** Ukázka ředící řady rostlinné šťávy.

## 5. VÝSLEDKY

Následující pasáž o rozsahu 13 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě.

## 6. DISKUZE

Ve své práci jsem se zabývala studiem viru mozaiky jetele bílého (white clover mosaic virus, WCIMV), izolátem 12/13. Cílem mé práce bylo získat purifikát vhodný pro imunizaci laboratorních zvířat, poté izolovat virově – specifické polyklonální protilátky a následně optimalizovat podmínky sérologické detekce tohoto viru pomocí metody DAS-ELISA.

Pro purifikaci virů z infekčního rostlinného materiálu neexistuje universální metoda, která by byla vhodná pro všechny rostlinné viry. Proto jsem během své práce postupně otestovala celkem 4 metodické postupy.

Jako první jsem zvolila metodu purifikace s použitím bentonitu, který se vzhledem ke své vysoké adsorpční schopnosti využívá pro filtraci hostitelských proteinů především u rostlinných virů citlivých na běžně používaná organická rozpouštědla (Dunn and Hitchborn, 1964). Z mých výsledků lze tuto metodu purifikace také vyhodnotit jako vhodnou pro získání relativně velkého množství virionů WCIMV, ale ne v čistotě potřebné pro následnou imunizaci laboratorních zvířat. Přes veškerou snahu se nikdy nepodařilo zcela oddělit zbytky chlorofylu od vlastních virových částic, ani během přečištění přes sacharózový gradient.

Jako další jsem vybrala klasickou metodu využívající kombinaci organických rozpouštědel chloroformu a butanolu, které vedou k rychlému a účinnému odstranění hostitelských buněčných komponent. Tato metoda naopak nebyla vůbec vhodná pro částečnou purifikaci tohoto viru, což je v souladu s výsledky práce podle Wettera (1960). Zde byla tato metoda purifikace porovnána s metodou využívající jiná organická rozpouštědla a vyhodnocena jako metoda vedoucí k velkým ztrátám virových částic.

Při třetí metodě purifikace jsem se pokusila vylepšit první uvedený postup přidáním kroku koncentrace virionů srážením polyethylenglykolem (PEG 6000). Tato látka by měla převést viriony do vytvořené sráženiny a tím je spolehlivě oddělit od rostlinných zbytků (Khan and Dijkstra, 2006). Tento purifikační postup však vedl k velice různorodým výsledkům, což je možné vysvětlit délkou srážení virionů. Vliv délky srážení na výsledný zisk virionů byl popsán v práci Lin *et al* (1977), kde byl s úspěchem purifikován jiný zástupce rodu *Potexvirus* a to bamboo mosaic virus (BoMV).

Jako vhodný postup pro purifikaci WCIMV jsem nakonec vybrala modifikovanou metodu podle Wettera (1960), kde byla nahrazena již dříve používaná organická rozpouštědla chloroform a butanol kombinací rozpouštědel diethylether a tetrachlormethan. Tímto způsobem bylo ve výše zmíněné práci s úspěchem purifikováno celkem 11 vláknitých virů, z nichž 2 patří do rodu *Potexvirus* (potato virus X a white clover mosaic virus). V souladu s výsledky této práce jsem získala purifikáty o vysoké čistotě dostatečné k následné přípravě antiséra. Bohužel zde nebyly uvedeny jednotlivé výtěžky virionů na množství rostlinné hmoty a proto je nelze porovnat s mými výsledky.

Celkem se mi podařilo získat 22,2 mg virionů z celkového množství 807 g infikovaných listů fazolu obecného. Tento výtěžek ovšem neodpovídá obrovskému množství virionů prokázanému pomocí elektronové transmisní mikroskopie (viz obrázek 11). Možným vysvětlením tohoto rozporu jsou ztráty virionů během gradientové centrifugace (viz kapitola 5.1.4) a také nestabilita měření UV spektrofotometru používaného pro ověření absorbance purifikátů při 260/280 nm. Tyto hodnoty se poté používají k přepočtu výsledného zisku virionů a určení přítomnosti bílkovin.



Pro získání antisér rostlinných virů se dnes již klasicky využívá laboratorních králíků. Tvorba protilátek je ovšem velice závislá na organismu daného jedince použitého pro imunizaci. Jako první cyklus imunizace jsem zvolila klasické imunizační schéma, které ovšem nevedlo k získání příliš vysokého titru antiséra. Proto jsem přistoupila k variantě opakované imunizace po několikaměsíčním odpočinku imunizovaného zvířete. Tato metoda byla s úspěchem použita pro zvýšení titru antiséra například u potato virus S (PVS), potato virus X (PVX) nebo potato virus Y (PVY; Jermoljev a Pozděna, 1972), což je ale v rozporu s mými výsledky. To může souviset s použitím jiného imunizačního postupu u druhého cyklu imunizace, kde jsem se pokusila ještě podpořit vyšší tvorbu protilátek kratšími rozestupy mezi jednotlivými aplikacemi antigenu, aby nedocházelo k poklesu koncentrace organismem produkováných protilátek.

Titry získaných antisér se pohybovaly od hodnoty 1:1 do 1:16, což je v rozporu s prací podle Wettera (1960). Zde byl naopak u WCIMV dosažen nejvyšší titr antiséra ze všech ostatních testovaných virů. V této práci byla ovšem použita tzv. kapková metoda, která se pro svou nepřesnost již dnes nevyužívá. Mnou použitá metoda podle Ouchterlonyho je dnes klasickou metodou pro určení titru antiséra, která ovšem skýtá limitaci v podobě morfologie některých virů. Vlákňité viriony rodu *Potexvirus* totiž velice pomalu a těžko procházejí agarem (Francki *et al.*, 1985). Proto jsou dosažené hodnoty titru antisér pravděpodobně nižší, než odpovídalo skutečnosti. Toto tvrzení dokazuje relativně vysoký zisk IgG izolovaných ze všech získaných antisér (viz kapitola 5.3). Jako možné řešení obtížné neprůchodnosti vláknitých částic agarem je v literatuře uváděna fragmentace virionů ultrazvukovými vibracemi či jejich úprava různými chemikáliemi (Bos, 1999). Proto jsem se ještě pokusila získat skutečnou hodnotu titru antiséra alkalickou degradací za použití ethanolaminového pufru. Tato metoda byla popsána v práci Purcifull and Shepherd (1964), kde byly tetovány různé metody degradace virionů za vzniku proteinových fragmentů o nižší molekulové váze. Použití alkalické degradace zde bylo vyhodnoceno jako nejvhodnější a s úspěchem použito například u sérologicky příbuzného potexviru clover yellow mosaic virus. Ani touto úpravou virionů jsem nezískala přesnější výsledky, proto jsem tento postup neuváděla v použitých metodách.

Po izolaci protilátek a přípravě konjugátu jsem optimalizovala podmínky pro sérologickou detekci WCIMV metodou DAS-ELISA. Tato metoda je dnes velice využívána imunologickou technikou používanou hlavně při rutinní detekci přítomnosti viru v polních vzorcích. Je však nutné optimalizovat její podmínky pro každý virus zvlášť (Hull, 2009). Pro získání co nejlepších podmínek, za kterých lze velice snadno a rychle detekovat přítomnost WCIMV v rostlinných vzorcích, jsem provedla několik samostatných pokusů. Jako nejvhodnější podmínky pro sérologickou detekci WCIMV pomocí metody DAS-ELISA za využití získaných protilátek jsem určila použití IgG v koncentraci 1,5 µg/ml a IgG-AP ředěné v poměru 1:1000 za inkubace substrátu 30 minut při pokojové teplotě.

Na závěr své práce jsem testovala kvalitu detekce tohoto postupu a výsledky porovnávala s komerčně dostupným kitem firmy DSMZ (Německo). Během obou testů jsem určovala, nakolik lze ředit pozitivní kontroly, aby test ještě vyhodnotil vzorky jako pozitivní. U obou postupů se objevily barevné signály do ředění vzorku 1:1000. Za použití komerčně dostupného kitu byli ovšem hodnoty absorbance mnohem nižší, i přestože byl substrát dle pokynů výrobce inkubován hodinu v termostatu při 37 °C. Proto byly destičky vyfotografovány až za další 2 hodiny, aby byly barevné signály na fotografiích vůbec zřetelné. Také absorbance pozitivních kontrol naměřené po hodinové inkubaci substrátu dosahovali velice nízkých hodnot většinou až 4 krát nižších než za použití v této práci získaných protilátek a optimalizovaných podmínek. Takto nízké hodnoty by při běžném

testu ani nebyly vyhodnoceny jako pozitivní. Zároveň se u komerčně dostupného kitu vyskytovali falešné pozitivita jak u blanku, tak u negativních kontrol. Tento jev může být způsoben nevhodností některé z látek, které jsou součástí doporučených pufrů či pouze reakcí substrátu na dlouhou inkubaci při 37 °C.

## 7. ZÁVĚR

Podářilo se mi purifikovat viriony viru mozaiky jetele bieleho (WCIMV, white clover mosaic virus) pomocí modifikované metody purifikace dle Wettera (1960) a čistotu purifikátů ověřit pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a proměřením na UV spektrofotometru. Celkem jsem touto metodou purifikace získala 22,2 mg virionů z 807 g rostlinné hmoty. Poté jsem připravila antisérum imunizací laboratorního králíka, ze kterého se mi podařilo izolovat 179 mg imunoglobulinů G (IgG) specifických k tomuto rostlinnému viru. Dále jsem část těchto IgG úspěšně konjugovala s alkalickou fosfatázou (IgG-AP) a nakonec optimalizovala podmínky sérologické detekce tohoto viru pomocí metody DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA). Jako vhodné podmínky detekce touto metodou jsem určila použití IgG o koncentraci 1,5 µg/ml a IgG-AP ředěné v poměru 1:1000 za inkubace substrátu 30 minut při pokojové teplotě. Poté jsem ověřila citlivost testu při ředění rostlinné šťávy. Závěrem tohoto testu bylo zjištění možnosti ředění pozitivní kontroly v poměru 1:1000. Nakonec jsem optimalizovaný postup DAS-ELISA testu porovnala s komerčně dostupným kitem firmy DSMZ (Německo). Výsledky této práce budou zahrnuty ve dvou příspěvcích prezentovaných na 4th Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV), která proběhne 17. – 20. května 2011 ve městě Antequera, provincie Málaga, Španělsko.

## 8. LITERATURA

Avrameas, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* 6 (1): 43-48.

Baratova, L.A., Fedorova, N.V., Dobrov, E.N., Lukashina, E.V., Kharlanov, A.N., Nasonov, V.V., Serebryakova, M.V., Kozlovsky, S.V., Zayakina, O.V. and Rodionova, N.P. (2004). N-terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *Eur. J. Biochem.* 271: 3136-3145.

Batten, J.S., Yoshinari, S. and Hemenway, C. (2003). Potato virus X: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Mol. Plant Pathol.* 4 (2): 125-131.

Beck, D.L., Forster R.L.S., Bevan M.W., Boxen K.A. and Lowe S.C. (1990). Infectious transcripts and nucleotide sequence of cloned cDNA of the potyvirus white clover mosaic virus. *Virology* 177: 152-158.

Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Andersen, M.T. and Forster R.L.S. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potyvirus are required for transport. *Virology* 183: 695-702.

Bečková, Martina. Identifikace vláknitého viru infikující jetel luční (*Trifolium pratense*): bakalářská práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta Biologická, 2007, 32 s., 1 příl. Vedoucí bakalářské práce Doc.RNDr. Karel Petrzik, Csc.

Bercks, R. (1971). White clover mosaic virus. *CMI/AAB Descript. Plant Vir.*, No. 41.

Bos, L. *Plant viruses, unique and intriguing pathogens: a textbook of plant virology*. Leiden: Backhuys Publishers, 1999. 358 p. ISBN 90-5782-012-9.

Clark, M.F. and Adams, N.A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.Gen.Virol.* 34: 475-483.

Clarke, S.F., Burritt, D.J., Jameson, P.E. and Guy, P.L. (2000). Effects of plant hormones on white clover mosaic potyvirus double-stranded RNA. *Plant Pathol.* 49 (4): 428-434.

Clarke, S.F., McKenzie, M.J., Burritt, D.J., Guy, P.L. and Jameson, P.A. (1999). Influence of white clover mosaic potyvirus infection on the endogenous cytokinin content of bean. *Plant Physiol.* 120: 547-552.

Dudas, B., Woodfield, D.R., Tong, P.M., Nicholls, M.F., Cousins, G.R., White, D.W.R., Beck, D.L., Lough, T.J. and Forster, R.L.S. (1998). Estimating the agronomic impact of white clover mosaic virus on white clover performance in the North Island of New Zealand. *New Zealand J. Agric. Res.* 41: 171-178.

Dunn, D. B. and Hitchborn, J. H. (1965) The use of bentonite in the purification of plant viruses. *Virology* 25, 2: 171-192.

Ferenčík, M., Rovenský, J. a Mattha, V. *Ilustrovaný imunologický slovník*. Překlad Markéta Haschová. Praha: Galén, 2004. 288 s. ISBN 80-7262-243-9.

Forster, R.L.S., Guilford P.J. and Faulds, D.V. (1987). Characterization of the coat protein subgenomic RNA of white clover mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 68: 181-190.

Forster, R.L.S., Bevan, M.W., Harbison, S.A. and Gardner R.C. (1988). The complete nucleotide sequence of the potyvirus white clover mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* 16: 291-303.

- Francki, R.I.B., Milne, R.G. and Hatta, T. Atlas of plant viruses: Volume II. 1<sup>st</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 1985. 284 p. ISBN 0-8493-6502-3.
- Fry, P. R., Grogan, R. G. and Lyttleton, J. W. (1960). Physical and chemical properties of clover mosaic virus. *Phytopathology* 50: 175-177.
- Hampton, R. (1963). Seed transmission of white clover mosaic and clover yellow mosaic viruses in red clover. *Phytopathology* 53: 1139.
- Harlow, E. and Lane, D.A. Antibodies: a laboratory manual. 1<sup>st</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p. ISBN 0-87969-374-6.
- Hefferon, K.L., Khalilian, H., Xu, H. and AbouHaidar, M. (1997) Expression of the coat protein of potato virus X from a dicistronic mRNA in transgenic potato plants. *J. Gen. Virol.* 78, 3051–3059.
- Hu, B., Pillai-Nair, N. and Hemenway, C. (2007). Long-distance RNA–RNA interactions between terminal elements and the same subset of internal elements on the potato virus X genome mediate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* 13: 267-280.
- Huang, Y.L., Han, Y.T., Chang, Y.T., Hsu, Y.H. and Meng, M. (2004). Critical residues for GTP methylation and formation of the covalent m<sup>7</sup>GMP-enzyme intermediate in the capping enzyme domain of bamboo mosaic virus. *J. Virol.* 78: 1271-1280.
- Hull, R. Comparative Plant Virology. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, 2009. 367 p. ISBN 978-0-12-374154-7
- Jermoljev, E. a Pozděna, J. Sérologie rostlinných patogenů. 1. vyd. Praha: ACADEMIA, nakladatelství Československé akademie věd, 1972. 264 s. ISBN 21-021-72.
- Ju, H.J., Samuels, T.D., Wang, Y.S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R.S. and Verchot-Lubicz, J. (2005). The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant. Physiol.* 138: 1877-1895.
- Kassanis, B and Govier, D.A. (1971). New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* 10: 99-101.
- Khan, J.A. and Dijkstra, J. Handbook of Plant Virology. New York: Food Products Press, 2006. 452 p. ISBN 1-56022-979-9.
- Koenig, R. (1971). Nucleic acids in the potato virus X group and in some other plant viruses: comparison of the molecular weights by elektrophoresis in akrylamide-agarose composite gels. *J. Gen. Virol.* 10: 111-114.
- Koenig, R. and Paul, H.L. (1982). Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *J. Virol. Meth.* 5: 113-125.
- Koonin, E.V. and Dolja, V.V. (1993) Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 375–430.
- Lin, M.T., Kitajima, E.W., Cupertino, F.P. and Costa, C.L. (1977) Partial purification and some properties of bamboo mosaic virus. *Phytopath.* 67: 1439-1443.
- Lough, T.J., Netzler, N.E., Emerson, S.J., Southerland, P., Carr, F., Beck, D.L., Lucas, W.J. and Forster, R.L.S. (2000). Cell-to cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 13, No. 9: 962-974.

Ludlow, E.J, Mouradov, A. and Spangenberg, G.C. (2009). Post-transcriptional gene silencing as an efficient tool for engineering resistance to white clover mosaic virus in white clover (*Trifolium repens*). J. Plant Physiol. 166: 1557-1567.

Martelli, G., Adams, M.J., Kreuze, J.F. and Dolja, V.V. (2007) Family flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. Ann. Rev. Phytop. 45:37-100.

Morozov, S., Miroshnichenko, N.A., Solovyev, A.G., Fedorkin, O.N., Zelenina, D.A., Lukasheva, L.I., Karasev, A.V., Dolja, V.V. and Atabekov, J.G. (1991) Expression strategy of the potato virus X triple gene block. J. Gen. Virol. 72, 2039–2042.

Musil, M., Kvičala, A. a Lešková, O. Diagnostika vírusov strukovín a d'atelinovín. Bratislava: Veda, Vydavateľstvo Slovenskej akademie vied, 1981. 175 s. ISBN 71-029-81.

Nakabayashi, H., Yamaji Y., Kagiwada S., Masashi, U. and Namba, S. (2002). The complete nucleotide sequence of a Japanese isolate of white clover mosaic virus strain RC. J. Gen. Plant Pathol. 68: 173-176.

Paulsen, A.Q. and Niblett, C.L. (1977). Purification and properties of foxtail mosaic virus. Phytopathology 67: 1346-1351.

Purcifull, D.E. and Shepherd, R.J. (1964) Preparation of protein fragments of several rod-shaped plant viruses and their use in agar gel diffusion tests. Phytoph. 54: 1102-1108.

Santa Cruz, S., Roberts, A.G., Prior, D.A., Chapman, S. and Oparka, K.J. (1998). Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. The role of virions. Plant Cell 10: 495-510.

van der Want, J.P.H. and Dijkstra, J. (2006). A history of plant virology. Arch. Virol. 151:1467-1498.

Verchot-Lubicz, J. (2005). A new cell-to-cell transport model for potexviruses. Mol. Plant-Microbe Inter. 18, No 4: 283-290.

Verchot-Lubicz, J., Ye, Ch-M. and Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. J. Gen. Virol. 88: 1643-1655.

Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D.E., Clark, M.F. and Adams, A.N. (1976). The Detection of Viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). J. Gen. Virol. 33: 165-167.

Wetter, C. (1960). Partielle Reinigung einiger gestreckter Pflanzenviren und ihre Verwendung als Antigene bei der Immunisierung mittels Freundschem Adjuvans. Arch. Microb. 37: 278-292.

Wilson, H.R., Mukhtar, J.A. and Tollin, P. (1978). Observations on the structure of particles of white clover mosaic virus. J. gen. Virol. 39: 361-364.

## Internetové zdroje

Descriptions of Plant Viruses (2008), Notes on Family: *Alphaflexiviridae*. DVPweb. Adams, M. and Antoniw J., Rothamsted Research, Harperden, Hertfordshire, UK. Dostupné z <<http://www.dpvweb.net>>

International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV (2010a). Taxonomy Proposals-General, 2007.027 a-f.P.v2.Tymovirales.pdf. Adams,M. and Kreuze,J. Dostupné z <[http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy\\_proposals\\_general1/m/default.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy_proposals_general1/m/default.aspx)>

International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV (2010b). Virus Taxonomy: 2009 Release. Dostupné z <<http://www.ictvonline.org>>

ICTVdB Management (2006 a). 00.056.0.01. Potexvirus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>>

ICTVdB Management (2006 b). 00.056.0.01.021. White clover mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>>

Science Photo Library (2011). Immunoglobulin G antibody. Science Photo Library (SPL), London, UK. Dostupné z <<http://www.sciencephoto.com>>

The Molecular Probes Handbook (2008). Antibodies. Invitrogen™, Life Technologies™, Dostupné z <<http://probes.invitrogen.com/handbook/images/g001247.gif>>

ViralZone (2008). Potexvirus. ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics. Dostupné z <<http://www.expasy.org/viralzone>>

## 9. PŘÍLOHA

Abstrakty příspěvků, které budou prezentovány na 4th Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV), 17.-20.5. 2011, Antequera, Málaga, Španělsko:

Jana Franova<sup>1P</sup>, Klara Kolarova<sup>1, 2</sup>, Martina Beckova<sup>1</sup>, Karel Petrzik<sup>1</sup>, Darina Kubelkova<sup>1</sup>, Hana Jakesova<sup>3</sup>, Marie Orsagova<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>BC ASCR, v.v.i. IPMB, Dept. Plant Virology, Branisovská 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic; e-mails: jana@umbr.cas.cz, KolarovaKlara@seznam.cz, martina.beckova@gmail.com, petrzik@umbr.cas.cz, darina@umbr.cas.cz

<sup>2</sup>The University of South Bohemia, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

<sup>3</sup>Red clover, grass breeding, Ing. Hana Jakesova, CSc., Fulnecka100, 742 47 Hladke Zivotice, Czech Republic; e-mail: hana.jakesova@tiscali.cz

<sup>4</sup>Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy, Zemedelska1, 613 00 Brno, Czech Republic; e-mail: Orsagova.M@seznam.cz

### **Identification, isolation, characterization and screening of white clover mosaic virus in the Czech Republic.**

*Trifolium pratense* plant with mild dwarf, diverse leaf drawing and curl originated from breeding nursery was thoroughly examined by transmission electron microscopy (TEM), mechanical inoculation of crude sap to the range of differential host plants and in vitro amplification and sequencing have been used for identification of pathogens. Observation of negatively stained preparations and ultrathin sections in TEM showed the presence of mixed virus infection. Bacilliform particles (213-533 × 44-58nm; 30 × 220-330nm) resembling members of Cytorhabdovirus and of Badnavirus genus, respectively; filamentous virions of different lengths (short particles of the length ranging from 100-360 nm; particles of about 480-500nm × 13nm and some particles with the length about 589 nm) and aggregates resembling those generated by members of genus Potexvirus were present. After serial mechanical inoculation we obtained (with the exception of mixed virus infection) *N. occidentalis* 37B plants with mild mosaic symptoms, *N. clevelandii* plants with mild vein clearing and *Phaseolus vulgaris* with mosaic symptoms containing large quantity of filamentous particles solely.

For the identification of the filamentous virus partially purified preparations from *N. occidentalis* 37B were used. Nucleic acid was isolated, transcribed and amplified using PCR with potexvirus-specific primers. Sequencing and comparison with Genbank sequences revealed the presence of white clover mosaic potexvirus (WCIMV). The nucleotide sequence of complete coat protein gene is deposited in the GenBank under AC number DQ784572. O-strain of WCIMV was identified.

The identity of WCIMV was further confirmed by DAS-ELISA and mechanical inoculation to differential host plants, which revealed symptoms typical for this virus. Czech WCIMV isolate was purified from *Phaseolus vulgaris* leaves. The only method with ether



and carbon tetrachloride with subsequent sucrose gradient centrifugation was satisfactory. The purified virus showed numerous flexuous particles and was used for rabbit immunisation. 1.3mg of IgG was purified per ml of the crude antiserum. After IgG conjugation with alkaline phosphatase, DAS-ELISA was optimised. The best reaction was obtained via coating with 1.5ug/ml IgG and the conjugate dilution 1:1000(v/v). Sensitivity of our DAS-ELISA is comparable with commercially available kit.

The presence of WCIMV was detected by ELISA in cca 13% of clover samples tested originated from breeding stations (198 plants tested/24 positive) as well as wild growing clover plants (181 tested/25 positive) and in 6 lucerne plants out of 8 plants examined (i.e.75% positive) from all over the country.

Moreover, Czech WCIMV isolate was mechanically inoculated to red clover seedlings. To our knowledge, the symptoms correspond with those described in the literature.

This work was supported with the project of Ministry of Agriculture No. QH71145 and GA ASCR No. AV0Z50510513.

Jana Franova<sup>1P</sup>, Hana Jakesova<sup>2</sup>, Darina Kubelkova<sup>1</sup>, Klara Kolarova<sup>1,3</sup>, Marie Orsagova<sup>2,4</sup>, Karel Petrzik<sup>1</sup>, Pavel Lauterer<sup>5</sup>

<sup>1</sup>BC ASCR, v.v.i. IPMB, Dept. Plant Virology, Branisovská 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic; e-mails: jana@umbr.cas.cz, darina@umbr.cas.cz, KolarovaKlara@seznam.cz, petrzik@umbr.cas.cz

<sup>2</sup>Red clover, grass breeding, Ing. Hana Jakesova, CSc., Fulnecka100, 742 47 Hladke Zivotice, Czech Republic; e-mail: hana.jakesova@tiscali.cz

<sup>3</sup>The University of South Bohemia, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

<sup>4</sup>Mendel University in Brno, Faculty of Agronomy, Zemedelska1, 613 00 Brno, Czech Republic; e-mail: Orsagova.M@seznam.cz

<sup>5</sup>Department of Entomology, Moravian Museum, Brno, Czech Republic; ento.laut@volny.cz

## **Research on viruses and phytoplasmas infecting clover plants in the Czech Republic**

The project 'Diagnostics of viruses and phytoplasmas in the breeding material of red clover' has been started in 2007. Several symptoms of mosaic, yellowing/reddening, phyllody, necrosis and dwarf have been observed in cultivated and/or wild growing forage crops. To detect and identify the pathogens, plants were subjected to biological assays, electron microscopy, DAS-ELISA, PCR/RFLP DNA analysis, RT-PCR, cloning and sequencing. There were examined about 400 plants till this time. Viruses of different species as well as phytoplasmas in single or mixed infection were detected in many samples examined. Using at least two methods, the following viruses were identified: new virus(es) of genus Cytorhabdovirus (bacilliform particles ca 213 – 533 nm by 44 – 58 nm), and genus Badnavirus (ca 35 by 220 – 330 nm), white clover mosaic virus (WCIMV, Potexvirus), red clover mottle virus (RCMV, Comovirus), bean yellow mosaic virus (BYMV, Potyvirus),

alfalfa mosaic virus (AMV, Alfamovirus), clover yellow vein virus (CIYVV, Potyvirus), and, unexpectedly, clover yellow mosaic virus (CIYMV, Potexvirus).

While the presence of phytoplasmas belonging to 16SrI-C ribosomal subgroups (clover phyllody, CPh) seems to be the most frequent in wild growing clovers, phytoplasmas were detected in breeding nurseries in the Czech Republic only sporadically.

Moreover, potential vectors of virus and phytoplasma diseases were determined in breeding nurseries as well as in the nature.

This work was supported with the project of Ministry of Agriculture No. QH71145 and GA ASCR No. AV0Z50510513.