

**Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty
University Karlovy**

**Příprava protilátek proti rekombinantnímu
proteinu TGBp1 mop-top viru bramboru**

Diplomová práce

Martina Huranová

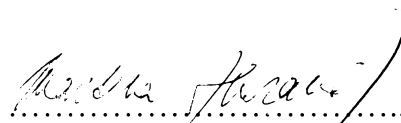
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.

Vypracováno v Laboratoři virologie ÚEB AV ČR

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Noemi Čerovské, CSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze dne 5. 5. 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martina Huranová', written over a horizontal dotted line.

Martina Huranová

Chtěla bych poděkovat Dr. Noemi Čerovské za poskytnutí dobrého pracovního zázemí a mnoha cenných rad. Také děkuji všem spolupracovníkům z její laboratoře za ochotu kdykoli poradit a pomoci.

Vypracování diplomové práce bylo podporováno grantem uděleným Grantovou agenturou ČR číslo 522/04/1329.

Obsah:

Obsah.....	1
Seznam použitých zkratek.....	4
Předmluva.....	6
1. Teoretický úvod.....	7
1.1 Rostlinné viry.....	7
1.2 Mop top virus bramboru.....	8
1.2.1 Původ.....	8
1.2.2 Šíření a symptomy.....	8
1.2.3 Morfologie virionu.....	10
1.2.4 Genom.....	10
1.3 Detekce virových antigenů v rostlinách.....	11
1.4 TGB proteiny.....	12
1.4.1 TGBp1 a jeho funkce.....	13
1.4.2 Funkce TGBp2 a TGBp3 a jejich subcelulární distribuce.....	14
1.4.3 Interakce TGBp1 a komplexu TGBp2/TGBp3.....	16
1.5 Šíření virového onemocnění způsobeného PMTV.....	16
2. Cíl práce.....	19
3. Použité přístroje, materiál a metody.....	20
3.1 Přístroje.....	20
3.2 Materiál.....	21
3.2.1 Chemikálie.....	21
3.2.2 Roztoky a pufry.....	22
3.2.3 Média.....	24
3.2.4 Primery.....	24

3.2.5	Vektory.....	25
3.2.6	Enzymy.....	25
3.2.7	Bakteriální kmeny.....	25
3.2.8	Virový materiál.....	25
3.2.9	Rostlinný materiál.....	25
3.2.10	Protilátky.....	26
3.3	Metody práce s DNA.....	26
3.3.1	Příprava kompetentních bakterií.....	26
3.3.2	Transformace kompetentních buněk.....	27
3.3.3	Minipreparativní izolace DNA.....	27
3.3.4	Restrikční štěpení.....	27
3.3.5	Elektroforéza na agarosovém gelu.....	28
3.3.6	Polymerasová řetězová reakce – PCR.....	28
3.3.7	IC RT PCR.....	29
3.4	Metody práce s proteiny.....	29
3.4.1	Příprava rekombinantního proteinu.....	29
3.4.1.1	Exprese proteinů – vektor PQE32.....	29
3.4.1.2	Produkce proteinů	31
3.4.1.3	Příprava nerozpustné frakce.....	31
3.4.1.4	Ni ²⁺ chelatační chromatografie.....	31
3.4.2	Elektroforetické metody.....	32
3.4.2.1	SDS-PAGE.....	32
3.4.2.2	Elektroforéza za nativních podmínek.....	33
3.4.2.3	Elektropřenos proteinů na membránu.....	33
3.4.3	Imunochemické metody.....	33
3.4.3.1	Imunodetekce proteinů.....	33
3.4.3.2	ELISA.....	34
3.4.4	Far western blot – overlay.....	34
3.4.5	Stanovení množství proteinů	36
3.4.6	Barvení proteinů v gelu.....	36

3.4.7 Izolace IgG frakce kyselinou kaprylovou.....	37
4. Výsledky.....	38
4.1 Příprava expresního vektoru.....	38
4.2 Exprese studovaného proteinu.....	39
4.3 Ni ²⁺ chelatační chromatografie	40
4.4 Příprava polyklonální protilátky.....	43
4.5 Další způsoby detekce PMTV.....	44
4.5.1 IC RT PCR.....	44
4.5.2 ELISA.....	45
4.6 Studium protein-proteinových interakcí.....	47
5. Diskuse.....	49
6. Souhrn.....	54
7. Seznam použité literatury.....	55

Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová
Amp	ampicilin
ATP	adenosintrifosfát
BCIP+NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate NitroBlue Tetrazolium Tablets
bp	pár bazí
BSA	hovězí sérový albumin
CBB R-250	Coomasie Brilliant Blue R-250
CP	kapsidový protein
cDNA	komplementární DNA
dH ₂ O	destilovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNasa	deoxyribonukleasa
dNTP	deoxyribonukleotidfosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELFA	enzyme-linked fluorescent assay
EtBr	ethidium bromid
EtOH	ethanol
ER	endoplazmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
HEPES	N-[2-hydroxymethyl]piperazin-N`-[2-ethansulfonová kyselina]
IC RT PCR	Immuno-capture reverse transcription polymerase chain reaction
IgG	immunoglobulin G
IPTG	isopropylthio-β-D-galaktosid
LB medium	Luria-Bertani medium
ME	merkptoethanol
MeOH	methanol

NC	nitrocelulosa
NTP	nukleotidtrifosfát
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerasová řetězová reakce
PD	plasmodesmata
PTA ELISA	plate-trapped antigen ELISA
PVDF	polyvinylidenfluorid
redH ₂ O	redestilovaná voda
RNA	ribonukleová kyselina
RNasa	ribonukleasa
RNP	ribonukleoproteinový komplex
ssRNA	jednovláknová RNA
SDS	dodecylsulfát sodný
TBIA	tissue blot immunoassay
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
Tris	tris[hydroxymethyl]aminoethan
U	jednotka (Unit)
UV	ultrafialové záření

Předmluva

Předchozí studie prokázaly, že viry využívají k přenosu nukleových kyselin a proteinů jak transportní mechanismy hostitelské buňky, tak své vlastní. Jedním z nich je transportní systém založený na spolupráci proteinů kódovaných tzv. „triple gene blockem“ - TGB-transportní systém, založený na spolupráci tří polypeptidů. Detailní mechanismus tohoto přenosu není na molekulární úrovni ještě plně objasněn, avšak je zřejmé, že pochopení molekulárních základů koordinované spolupráce proteinů TGB systému při přenosu virového genomu z buňky do buňky i na dlouhé vzdálenosti poskytne nový pohled na dosud známé principy činnosti transportních proteinů.

1. Teoretický úvod

1.1 Rostlinné viry^{1,2}

Jako rostlinné viry označujeme viry, které jsou schopny infikovat rostlinné buňky a v nich se reprodukovat. Některé rostlinné viry se mohou reprodukovat i v jiných typech buněk, ale nepůsobí na tyto hostitele na rozdíl od rostlinných hostitelů patologicky. Z hlediska velikosti virionu, genomu a jeho organizace patří mezi nejjednodušší viry vůbec. Mají viriony sférického, tyčkovitého nebo vláknitého tvaru, kapsida je složená z 1-4 druhů proteinů a většinou nemají obal.

Viry nemají žádný mechanismus, který by jim umožňoval aktivně proniknout do rostlinné buňky. Z tohoto důvodu mohou rostlinné viry proniknout do buňky pouze v místech poškození buněčné stěny. Poškození může vzniknout mechanickým způsobem nebo působením jiného organismu. Organismus, pomocí kterého virus infikuje nové hostitele, se nazývá vektor. Nejčastějším vektorem je hmyz, především mšice, molice, červci, brouci a háďátka. Některé viry se přenášejí zoosporami hub, pylem nebo povrchem semene. Viry se mohou též přenášet vegetativním množением infikovaných rostlin a roubováním.

Z původní infikované buňky se virus šíří mezibuněčnými spoji do sousedních buněk. Pro toto šíření je obvykle nutná přítomnost specifických, virem kódovaných transportních proteinů nebo alespoň kapsidových proteinů. Virus se většinou šíří ve formě nukleové kyseliny, jen v ojedinělých případech ve formě kompletních virionů. Na větší vzdálenosti se v rostlině viry šíří vodivými pletivými. Viry se obvykle nevyskytují v intenzivně rostoucích meristémech.

1.2 Mop-top virus bramboru

1.2.1 Původ

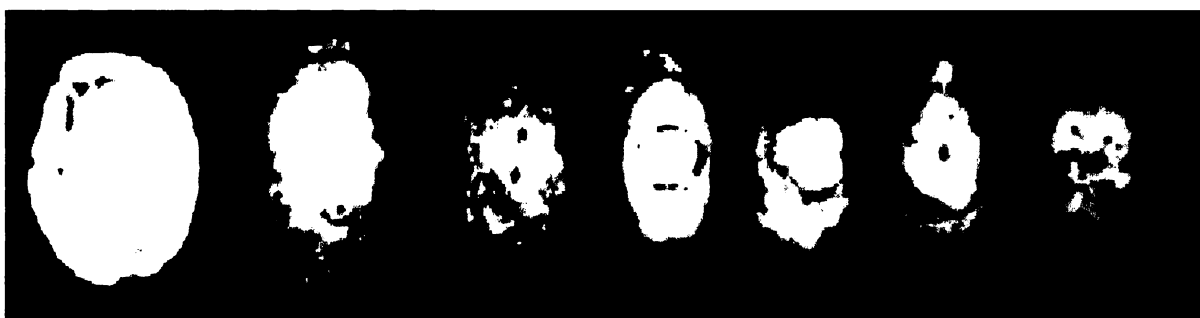
Mop-top virus bramboru (potato mop-top virus-PMTV) je houbou přenosný rostlinný virus. Patří k rodu *Pomovirus*.

Prvně byl PMTV nalezen v *Solanum tuberosum* ze severního Irsku v roce 1966 v Británii. Následně byl objeven v chladnějších oblastech Evropy, v Jižní Americe a v Asii. Za posledních 10 let ohrozil úrody brambor i v Kanadě, Skandinávii a posledně i v USA. V České republice byl prvně popsán v roce 1983.³

1.2.2 Šíření a symptomy

PMTV je přenášen patogenní houbou *Spongospora subterranea*, která způsobuje práškovitou strupovitost brambor. PMTV může být do hostitele uměle vpraven roubováním. *S. subterranea* je patogenní ve vlhkých a chladných půdách s pH 4,7 až 7,6; hlavně v zavlažovaných oblastech. Od infikování hostitele přežívá PMTV v jejích výtrusech v půdě 10-18 let.⁴

Virus se v rostlině šíří xylémem a to lokálně nebo systémově. Ke svému šíření vyžaduje faktory potřebné k přenosu z buňky do buňky, tzv. transportní proteiny. Viriony byly nalezeny v cytoplazmě ve formě viroplazmy (inkluzie různých velikostí). Pro infikované hlízy jsou typické nekrotické léze, které se vyskytují buď jednotlivě nebo koncentricky, kdy se rozšiřují až k povrchu hlízy (obr. 1.1).



Obr. 1.1: Nekrotické léze u hlízy bramboru infikované PMTV – léze mají tvary oblouků, nebo kruhů rezavé barvy, které se na povrchu hlízy často projevují ve formě teček. Po čase může nekrotická část z hlízy vypadnout⁵.

V případě vysázení infikovaných hlíz je nadzemní část zakrslá a má chlorotické léze (obr. 1.2 a 1.3, str. 3). Když jsou do půdy, která je infikovaná PMTV, vysázené zdravé hlízy, symptomy se na listech nemusí vůbec projevit. U některých odrůd jsou listy deformované. Intenzita lézí taky závisí na vnějších podmínkách, oblasti pěstování, ročním období či počasí. Míra onemocnění se může zredukovat protrháváním částí rostlin s příznaky.⁴



Obr. 1.2: Srovnání zdravé rostliny bramboru se zakrslou, která je infikovaná PMTV⁶.



Obr. 1.3: Chlorotické léze na listech rostliny bramboru infikované PMTV⁷.

Symptomy se neobjevují v závislosti na rozšíření infekce, někdy se opozdí nebo se vůbec neobjeví. Symptomy závisí na vnějších podmínkách a geografickém umístění. Jejich variabilita tak znemožňuje identifikaci patogenu.

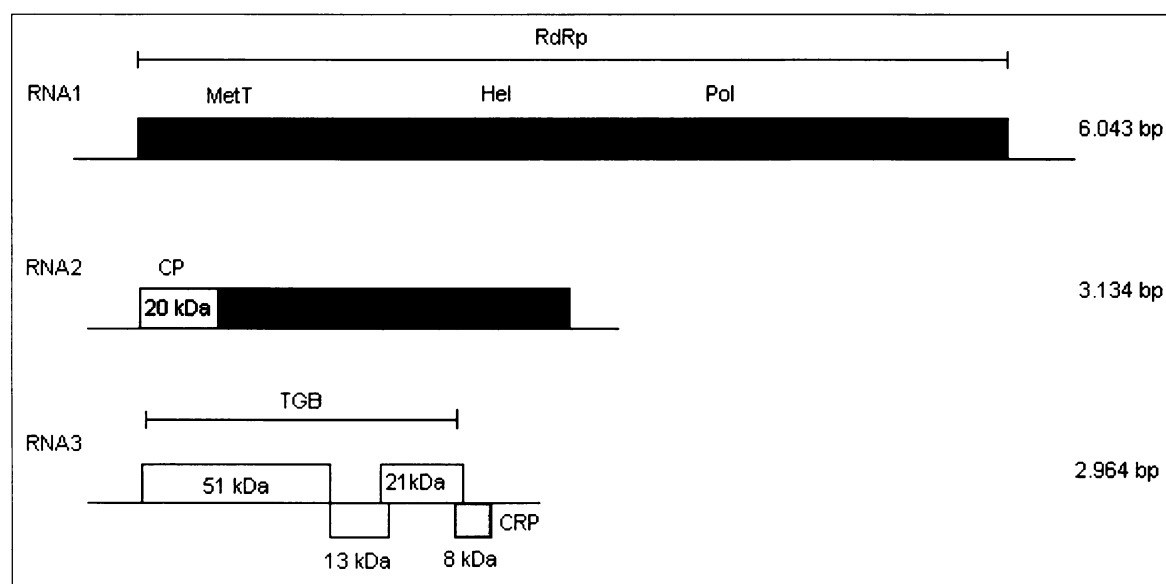
Proti tomuto onemocnění neexistuje žádná prevence. Monitorování výskytu PMTV je obecně zaměřené na jeho vektor *Spongosporu subterraneau*. Rozšiřování PMTV vektoru se může zamezit vysázením certifikovaných odrůd, nepřenášením kontaminované půdy a hlíz. Aplikace ZnO nebo S na zamořené půdy způsobí snížení pH půdy a tím znemožní rozšiřování vektoru PMTV.⁴

1.2.3 Morfologie virionu

PMTV je neobalený virus s helikálně symetrickou kapsidou, má tyčkovitý tvar. Kapsida je vystavěna ze stejných podjednotek kapsidového proteinu. Virové partikule měří 18-22 nm v průměru a 100-150 nm až 250-300 nm do délky. Rozdíly v délce jsou dané nestabilitou a degradací virových partikulí. Majoritně se vyskytující délky jsou 125 nm, 137 nm a 283 nm. Virové partikule sedimentují ve třech komponentách a jejich sedimentační koeficienty jsou 126S, 171S a 236S. ⁸

1.2.4 Genom ⁹

PMTV má tripartitní genom, který je tvořen třemi lineárními pozitivními ssRNA ¹⁰; RNA1, 2 a 3 s příslušnými délkami 6,1 kb, 2,3 – 3,1 kb a 3 kb. (obr. 1.4).



Obr. 1.4: Genom PMTV: RNA1: RdRp (RNA - dependentní RNA polymerasa), domény: MetT - methyltransferasová, Hel - helikasová, Pol - polymerasová; RNA2: CP - kapsidový protein; RNA3: TGB - „triple gene block“, CRP - Cystein rich protein; RT - „read through“ domény. Převzato a modifikováno z disertační práce ²⁶.

RNA1 kóduje virovou RNA - dependentní RNA polymerasu (RdRp), která má methyltransferasovou, NTPasovou/helikasovou a polymerasovou doménu.

RNA2 kóduje úsek pro hlavní kapsidový protein CP (20 kDa), který je ukončený UAG stop kodonem a pokračuje dalším kódujícím úsekem s proměnlivou velikostí. Suprese UAG stop kodonu vede k produkci fúzního kapsidového proteinu o velikosti 54 až 104 kDa, přičemž dodatečná „read through“ část zůstává přichycena k jednomu konci virové partikule. „Read through“ doména obsahuje specifické determinanty důležité pro přenos viru jeho přirozeným vektorem.¹¹ RNA2 indukuje v rostlině tvorbu symptomů.¹²

RNA3 má čtyři otevřené čtecí rámce. První tři se částečně překrývají a tvoří tzv. triple-gene blok (TGB), který kóduje tři proteiny účastnící se přenosu virové RNA z buňky do buňky, TGBp1 (51 kDa), TGBp2 (13 kDa) a TGBp3 (21 kDa). Čtvrtý otevřený čtecí rámec kóduje protein bohatý na cystein, tzv. Cystein-rich protein (8 kDa), jehož funkce zatím není úplně objasněna.¹³

1.3 Detekce virových antigenů v rostlinách

Rostlinné viry mají některé jedinečné charakteristiky, které je odlišují od ostatních mikrobiálních patogenů jako jsou houby, bakterie a fytoplazmy. Jsou extrémně malé a jsou schopné pronikat filtry, které naopak zadrží houby a bakterie. Viry jsou intracelulární parazité a nenalézají se vně napadených rostlinných buněk.

Jelikož se rostlinné viry téměř neliší v morfologické charakterizaci, vzrostla potřeba vyvinout metody citlivější pro jejich detekci, identifikaci a kvantifikaci. Rostlinné viry jsou jak imunogenní, tak antigenní.

Imunoidentifikační techniky jsou založené na aglutinaci a precipitaci. V rostlinách lze virové antigeny obecně detekovat různými imunotechnikami s protilátkami značenými fluorescenčně, enzymem nebo radioaktivně např. ELISA, TBIA, ELFA. Kombinace imunometod s PCR zvyšuje citlivost a specifitu v porovnání s ostatními technikami. Pro provedení vhodné imunodiagnostické metody je nutná dostupnost monoklonálních nebo polyklonálních protilátek.¹⁴

Purifikace rostlinných virů je zdlouhavý proces a často je purifikát kontaminován rostlinnými proteiny, které mohou interferovat ze sérologickými reakcemi. Virové antigeny lze proto připravovat rekombinantně, což je výhodné pro možnost exprese žádaného proteinu ve velkém měřítku pomocí bakterií nebo kvasinek a jeho následné použití pro imunizaci. Pro

rekombinantní přípravu proteinů se nejvíce používají bakterie *E.coli*, jelikož jsou velmi dobře prozkoumané, rychle se množí a jsou snadno geneticky manipulovatelné.¹⁵ Samotné expresi předchází příprava cDNA klonu, což je v tomto případě buňka *E.coli* transformovaná vektorem obsahujícím fragment genomové cDNA žádaného virového proteinu. Velikost klonovaného fragmentu se volí tak, aby bakteriemi exprimovaný protein nebyl pro bakterie toxický a byl zároveň imunogenní.

Detekce přirozených antigenů PMTV zahrnuje mnoho obtížností. Virus infikuje hlízy a stonky různě¹⁶ a často se vyskytuje v koncentracích pod detekčním limitem téměř všech stanovení. Detekce PMTV založená na přítomnosti obalového proteinu v infikované rostlině je nespolehlivá, jelikož se zjistilo, že distribuce virových RNA se liší v různých částech infikované rostliny a že PMTV je infekční a může se šířit i bez RNA kódující CP.^{12,17} Výhodnější je proto imunochemická detekce strukturního proteinu (CP) nebo nestrukturních proteinů v kombinaci s PCR detekcí. Protilátky proti rekombinantně připraveným strukturním i nestrukturním proteinům také umožňují studovat vzájemné interakce jednotlivých proteinů v rámci životního cyklu PMTV.

Z faktu, že PMTV se může v rostlinách šířit i bez kapsidového proteinu, z čehož plyne nespolehlivost imunodetekčních metod založených na protilátkách proti tomuto strukturnímu proteinu, vyplývá možnost spolehlivé detekce pomocí protilátek generovaných proti nestrukturním proteinům, které jsou kódovány sekvencemi na RNA 1 a 3.

1.4 TGB proteiny

Rostlinné viry kódují proteiny, které jim umožňují transportovat se plasmodesmaty z buňky do buňky.¹⁸ Plasmodesmata jsou úzké otvory v buněčné stěně obsahující cytoplazmatickou membránu, endoplazmatické retikulum a bílkovinné partikule, které upravují jejich průchodnost pro různé látky. Propustnost plasmodesmat pro detekční barviva je kolem 1 kDa, avšak jejich schopnost transportovat proteiny a mRNA může dosahovat až 30 - 50 kDa. Hraniční mez velikosti plasmodesmat zvětšují buněčné nebo virové faktory, tzv. transportní proteiny, které tak pomáhají transportovat endogenní proteiny a virovou RNA. Plasmodesmata spojují cytoplasmu buněk v symplast.¹⁹

První nejlépe charakterizovaný transportní protein (TP) byl protein viru tabákové mozaiky (TMV). Jeho hlavní funkce je kooperativně vázat virovou RNA, interagovat s cytoskeletem a zvětšovat průměr plasmodesmat tak, aby byly RNA nebo RNA-TP komplex transportovány přes póry do sousední buňky.²⁰

Po prozkoumání genových produktů některých +ssRNA virů se nenašel protein podobný transportnímu proteinu TMV, ale byly u nich nalezeny sekvence s částečně se překrývajícími otevřenými čtecími rámci, které byly nazvané „triple gene block“ (TGB). TGB kódované proteiny byly označeny následovně TGBp1, TGBp2 a TGBp3 vzhledem k pozici jejich genů. Pozdější nahromadění sekvenčních dat genomů rostlinných virů potvrdilo přítomnost TGB u rodů *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Allexivirus*, *Foveavirus*, *Hordeivirus*, *Benyvirus*, *Pomovirus* a *Pecluvirus*. Ačkoliv je TGB evolučně konzervovaná genová jednotka, jeho pozice se v genomu u jednotlivých rodů liší. Mutační analýzy infekčních cDNA klonů virových genomů dokázaly, že všechny tři TGB proteiny jsou nutné pro transport virového genomu jak z buňky do buňky, tak i na větší vzdálenosti v rostlinných pletivech.²¹

1.4.1 TGBp1 a jeho funkce

TGBp1 protein je rozpustný, má NTPasovou, helikasovou aktivitu a váže RNA. Transientně individuálně exprimovaný GFP-TGBp1 v epidermálních buňkách rostliny *N.benthamiana* je shodně distribuován v cytoplazmě a v jádře hostitelské buňky.²²

NTPasová/helikasová doména má sedm typických motivů. Motiv I je charakteristický GKS/T tripeptidem a motiv II je odpovědný za vazbu ATP a Mg^{2+} . Fylogenetická analýza této domény umožnila rozdělení TGBp1 proteinů do dvou skupin, na vláknité viry tzv. **potexlike** (rody *Potexvirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus* a *Allexivirus*) a tyčkovité tzv. **hordeilike** (rody *Hordeivirus*, *Benyvirus*, *Pomovirus* a *Pecluvirus*).²¹

U **hordeilike** virů je TGBp1 delší (39 až 63 kDa) a obsahuje prodlouženou N-terminální doménu. Ta obsahuje oblasti bohaté na arginin/lysin, které se pravděpodobně zapojují do specifické vazby s nukleovými kyselinami a má dvě pozitivně nabitě aminokyselinové oblasti, které jsou důležité pro vazbu s RNA.^{21,23} Jejich přítomnost je nutná pro transport viru na větší vzdálenosti, ale postradatelná v případě mezibuněčného transportu (obr. 1.5).



Obr. 1.5: Molekulární uspořádání *hordeilike* TGBp1- tmavě šedé oblasti označují pozici helikasové domény se sedmi konzervovanými motivy I-VI. Šedé oblasti s červenými „+“ označují rozložení pozitivního náboje v N-terminální doméně. Převzato z publikace ²¹.

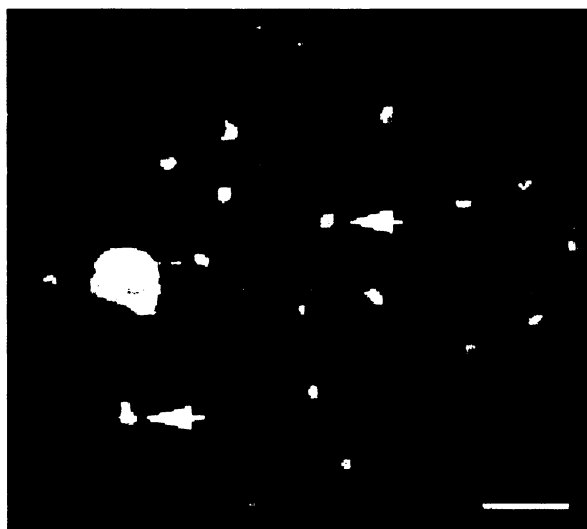
RNA-vazebná schopnost je v izolované C-terminální helikasové doméně kooperativní, zatímco u N-terminální prodloužené doméně je silně nekooperativní u *hordeilike* virů. RNA vazná schopnost TGBp1 proteinů umožňuje vznik transportu schopných genomových ribonukleoproteinových komplexů – RNP. Při replikaci virového genomu dochází ke vzniku RNP obalováním nově vzniklých molekul mRNA hostitelskými cytoplasmatickými proteiny, které umožňují jejich efektivní translaci a další úpravy. TGBp1 nahrazuje hostitelské proteiny v RNP za vzniku transportu schopných nepřekládaných RNP. Takovéto struktury pozůstávající z virové RNA a TGBp1 byly izolovány z rostlin infikovaných *hordeilike* viry. ²¹

Funkce dalších TGBp1 aktivit jako NTP vazebná, NTPasová a RNA helikasová aktivita zůstávají v rámci mezibuněčného transportu neobjasněné. Přenos zprostředkovaný transportními proteiny je ATP/NTP dependentní a pravděpodobně se skládá ze dvou dějů: 1/ intracelulární transport RNP a 2/ transport RNP k a přes plasmodesmata, který je spojený s RNP rozvinutím a mikrokanálovou dilatací.

1.4.2 Funkce TGBp2 a TGBp3 a jejich subcelulární distribuce

TGBp2 a TGBp3 obsahují hydrofobní sekvence, které jim umožňují interagovat s buněčnou membránou. TGBp2 má dva hydrofobní segmenty s konzervovanou centrální částí mezi nimi, která vykazuje nejvyšší sekvenční konzervovanost mezi TGB proteiny. TGBp3 má dva transmembránové úseky, konzervovanou sekvenci v N-terminální oblasti a centrální konzervovanou oblast. ²¹

TGBp2 značený monomerním červeným fluorescenčním proteinem (mRFP) a TGBp3 značený zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) byly exprimovány individuálně v epidermálních buňkách rostliny *Nicotiana benthamiana*. mRFP-TGBp2 byl nalezen ve vesikulech endomembránového buněčného systému a nepravidelně v tubulech kortikálního ER. GFP-TGBp3 byl nalezen v membránových tělískách různých velikostí lokalizovaných v buněčné periferii, vzniklých z kortikálního ER^{22,23,24,25} (obr. 1.6).

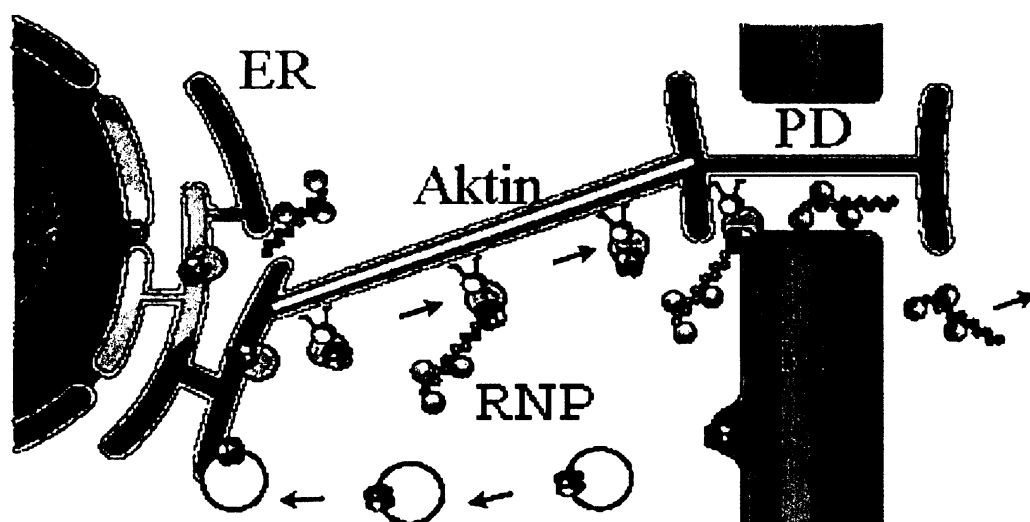


Obr.1.6: Ko – lokalizace mRFP-TGBp2 (červeně) a GFP-TGBp3 (zeleně) ve stejné epidermální buňce rostliny *N.benthamiana*: GFP-TGBp3 se nachází v ER a společně s mRFP-TGBp2 v membránách vesikulů (bílé šipky). V tomto bodu expresního cyklu není přítomnost mRFP-TGBp2 v ER zřetelná (ER, vlákna aktinu, mikrotubuly, PD a GA jsou značená GFP). Převzato z publikace²⁴.

V přítomnosti TGBp3 proteinu je TGBp2 nasměrován do periferních tělísek, která jsou podobná strukturám objevujících se v buňkách exprimujících jenom TGBp3.^{21,25} Studium protein-proteinových interakcí mezi TGBp2 a TGBp3 proteiny mezi *hordeilike* a *potexlike* viry prokázalo, že k efektivnímu transportu a ovlivnění membránových proteinů TGBp3 nedochází díky specifickým sekvencím, ale některým funkčním znakům, které by mohly zahrnout specifickou lokalizaci a dynamiku membránových proteinů v endomembránovém systému a jejich schopnost pohybovat se mezi ER a GA.²¹

1.4.3 Interakce TGBp1 a komplexu TGBp2/TGBp3

Individuálně exprimovaný TGBp1 není transportován ke specifickým místům na buněčné periférii.²¹ K plné funkci TGBp1, obzvláště k jeho aktivnímu transportu k plasmodesmatům je nutná přítomnost TGBp2/TGBp3 (obr. 1.7).^{21,22,23,24,25} Tento proces vyžaduje enzymatickou aktivitu TGBp1. Mutace v konzervované části v NTPasové/helikasové doméně u *hordeilike* TGBp1 blokuje mezibuněčný transport viru a také znemožňují zacílení TGBp1 k plasmodesmatům v přítomnosti komplexu TGBp2/TGBp3.^{21,22}



Obr. 1.7: Model funkce TGBp2 a TGBp3 v intracelulárním transportu PMTV RNP : žlutě - endomembránové vesikuly, oranžově – hostitelský proteinový linker, šedě – myosinový motor, červeně – mRFP-TGBp2, zeleně – GFP-TGBp3, modře – TGBp1. Převzato a modifikováno z publikace ²⁴.

1.5. Šíření virového onemocnění způsobeného PMTV

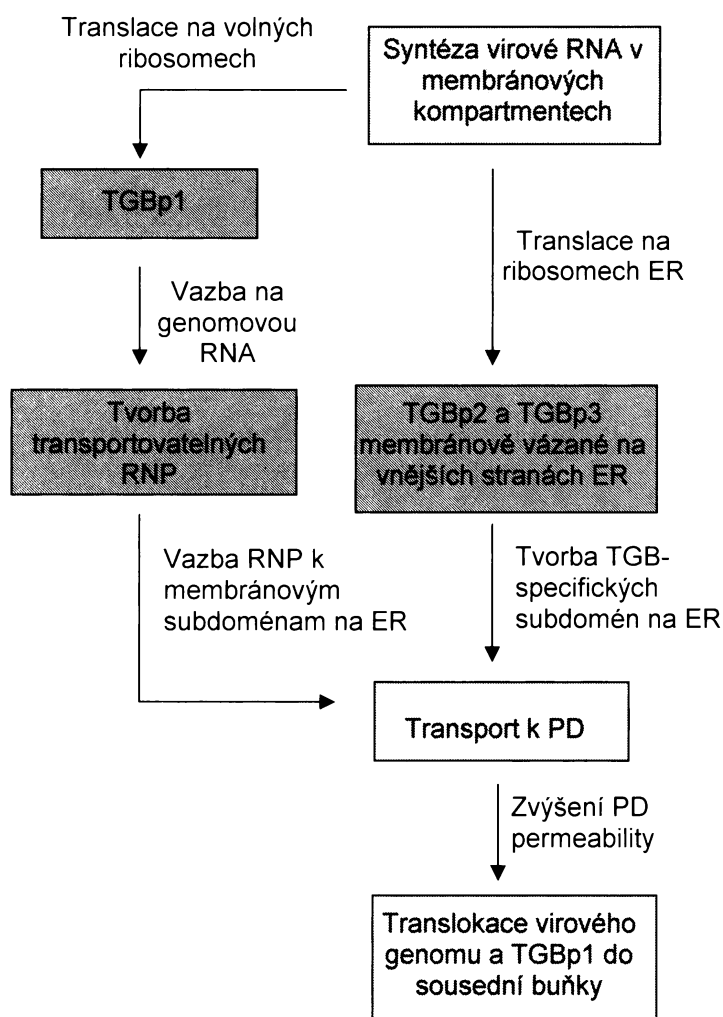
Viry nemají žádnou detekovatelnou metabolickou aktivitu a fyziologickou funkci, proto řídí syntetické procesy v hostitelské buňce tak, aby získali materiál potřebný ke své replikaci resp. multiplikaci.¹⁴ Úspěšná infekce vyžaduje kompatibilní interakce mezi virovými a hostitelskými faktory a potlačení obranných mechanismů hostitele.²⁶

PMTV infikuje rostliny čeledí *Solanaceae* a *Chenopodiaceae*.²⁶ Při systémovém transportu v rostlině není nutná přítomnost RNA2. Ačkoliv není kapsidový protein CP potřebný pro systémovou infekci, může mít význam v optimalizaci infekčního cyklu. Transport RNA1 a RNA3 mezi buňkami a na dlouhé vzdálenosti probíhá ve formě nevirionových částic složených z genomové RNA a TGBp1. Virové partikule se však mohou tvořit v sítkovicích, což může být důležité pro účinný transport a tedy i účinnou systémovou infekci.

Proces replikace je zahájen okamžitě po vstupu viru do buňky. Virus se rozbílí a +ssRNA projde do cytoplazmy. Poté dochází k translaci virové RNA na ribosomech a k produkci proteinů potřebných k replikaci a transkripci.

V současném modelu exprese TGB proteinů se TGBp1 exprimuje přímo z RNA3. TGBp2 a TGBp3 se překládají z jedné subgenomové RNA. K překladu TGBp3 dochází, když ribosom pro nevhodnou konformaci řetězce přeskočí startovní AUG kodon pro TGBp2.²⁷

Po replikaci je virová RNA (hlavně RNA1 a RNA3) v cytoplazmě obalována molekulami TGBp1 proteinů za tvorby RNP. Ve formě transportovatelných RNP a za účasti komplexu TGBp2/TGBp3 se pohybuje intracelulárně pomocí asociace s ER a cytoskeletárními elementy z místa replikace k plasmodesmatům (obr. 1.8). Virus musí projít přes různé druhy rostlinných buněk, než se dostane do systému sítkovic. Poté se může pohybovat na velké vzdálenosti do ostatních částí rostliny.



Obr. 1.8: Obecné schéma TGB zprostředkovaného mezibuněčného transportu a tvorba komplexů RNP. Mezibuněčný transport začíná syntézou virové genomové a subgenomové RNA v replikačních komplexech lokalizovaných v membránách ER nebo jiných organel. TGBp1 se syntetizuje na volných ribosomech. TGBp2 a TGBp3 se syntetizují na ribosomech ER a následně migrují do jeho membrány. K PD se pohybují v specifických endoplasmatických subdoménách, které vážou RNP. RNP vznikají v cytoplasmě obalováním nových genomových RNA molekulami TGBp1. Transportu napomáhají cytoskeletární elementy. Komplex TGBp2/TGBp3 umožňuje vazbu TGBp1 na vstupní receptor otvoru PD. Tato vazba vede ke zvětšení PD. Poté dochází k rozbalení RNP a translokaci TGBp1 a virové RNA přes mikrokanály PD do sousední buňky. Převzato a modifikováno z publikace ²¹.

2. Cíl práce

Naše laboratoř se již delší dobu zabývá studiem mop-top viru bramboru (PMTV). Součástí studia je také příprava protilátek proti rekombinantním proteinům, které jsou kódované PMTV. Ty se pak dají využít k detekci a k monitorování šíření PMTV. Byly připraveny protilátky proti RNA2 (CP) a části RNA1(RdRp).

Cílem této práce bylo vybrat rekombinantní antigen nestrukturního proteinu TGBp1 kódovaného RNA3 a najít vhodné podmínky pro jeho expresi.

Dále připravit polyklonální protilátku a zhodnotit možnosti jejího využití jednak pro detekci PMTV v rostlině, jednak pro mapování životního cyklu tohoto patogenu.

3. Použité přístroje, materiál a metody

3.1 Přístroje

Automatické pipety (0.5-2, 1-10, 10-100, 20-200, 300-1000, 1500-5000 µl)	ThermoLabsystems, Finsko
Centrifuga Universal 16R	HETTICH Zentrifugen, Německo
Centrifuga 3K30	Sigma, USA
Centrifuga Biofuge pico	Kendro, Německo
DRI- block DB 3D	Techne, UK
Inkubátor	Kendro, Německo
Kolona	Sigma, USA
Kláv	Chirana, ČR
Magnetická míchačka	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Mrazicí box (-20°C)	Calex, SR
Mrazicí box (-72°C)	Kendro, Německo
pH metr	Hanna instruments, USA
Souprava pro elektropřenos	OMNI-BIO, ČR
Souprava pro horizontální elektroforézu	BIO-RAD, USA
Souprava pro vertikální elektroforézu	Biometra, Německo
Spektrofotometr PU 8740 UV/VIS	Philips, Holandsko
Termální cyklátor	Techne, UK
Třepačka LT2	Kavalier, ČR
Třepačka termostatovaná	Gallenkamp Ltd., UK
UV lampa	Vilber-Lourmat, Francie
Váhy digitální	Denver Instruments, USA
Vortexový mixér	Heidolph, Německo
Zdroj napětí P25	Biometra, Německo

3.2 Materiál

3.2.1 Chemikálie

Agarosa pro analytické účely	Promega, USA
Akrylamid	Sigma, USA
Ampicilin	Serva, Německo
Azid sodný	Sigma, USA
Bacto-agar	Difco, USA
Bromfenolová modř	Fluka, Švýcarsko
BCIP + NBT	Sigma, USA
BSA	Fluka, Švýcarsko
CBB R-250	Fluka, Švýcarsko
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, ČR
dNTP směs	Sigma, USA
Dusičnan stříbrný	Sigma, USA
EDTA	Fluka, Švýcarsko
Ethidiumbromid	Sigma, USA
Formaldehyd	Lachema, ČR
Glukosa	Lachema, ČR
Glycin	Serva, Německo
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Hydrogenfosforečnan sodný	Lachema, ČR
Chlorid draselný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lachema, ČR
IMAC-Sepharosa Fast Flow	Amersham, UK
IPTG	Boehringer, Německo
Isopropanol	Lachema, ČR
Imidazol	Serva, Německo
Kyselina kapronová	Sigma, USA
Kyselina kaprylová	Sigma, USA
Kyselina sulfosalicylová	Serva, Německo
Kyselina trichloroctová	Lachema, ČR

Kvasničný extrakt	Fluka, Švýcarsko
Lambda marker	Promega, USA
Merkaptoethanol	Fluka, Švýcarsko
Močovina	Lachema, ČR
N,N'-metylen-bis-akrylamid	Serva, Německo
Nitroceluloseová membrána (0,45µm)	Schleicher & Schuell, USA
Paranitrofenylfosfát	Boehringer, Německo
Persíran amonný	Lachema, ČR
Ponceau S	Sigma, USA
PVP	Lachema, ČR
Rainbow marker	Amersham, UK
SDS	Sigma, USA
Síran nikelnatý	Lachema, ČR
Směs inhibitorů proteas	Sigma, USA
TEMED	Fluka, Švýcarsko
Tris	Duchefa, Holandsko
TWEEN-20	Fluka, Švýcarsko
Ostatní chemikálie	Lachema, ČR

3.2.2 Roztoky a pufr

Roztok I (GET) pro izolaci plazmidů

50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8

Roztok II (lyzovací) pro izolaci plazmidů

0,2 M NaOH, 1% SDS

Roztok III (neutralizační) pro izolaci plazmidů

3 mM AcONa, 10% AcOH, pH 4,8

TE pufr

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8

TAE pufr

40 mM Tris-HCl, 20 mM AcOH, 1 mM EDTA, pH 8

TB – transformační pufr

10 mM HEPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH upraveno pomocí KOH na 6,7, sterilizace filtrací

Promývací roztok pro izolaci inkluzních tělísek

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

RNasa/DNasa pro izolaci inkluzních tělísek

DNasa 2 mg/ml, RNasa 1 mg/ml, 50% glycin, 1 mM CaCl₂

Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu

50 mM EDTA, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, pH 8

Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu

250 mM glycin, 10 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,3

Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu

50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 5% ME, 10% glycerol (sacharosa),
0,01% bromfenolová modř

Fixační a odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu

35% EtOH, 10% AcOH

Barvicí roztok pro SDS elektroforézu

45% MeOH, 10% AcOH, 0,25% CBB R-250

Katodový pufr pro elektropřenos

25 mM Tris-HCl, 40 mM kys. kapronová, 20% MeOH, pH 9,4

Anodový pufr I pro elektropřenos

0,3 M Tris-HCl, 20% MeOH, pH 10,4

Anodový pufr II pro elektropřenos

25 mM Tris-HCl, 20% MeOH, pH 10,4

PBS pufr

0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 3 mM NaN₃, pH 7,4

PBS + T pufr

PBS pufr + 1% Tween-20

Vyvíjecí roztok pro gely barvené stříbrem:

0,02% formaldehyd, 0,001% Na₂S₂O₃, 3% K₂CO₃

Fyziologický roztok

0,15 M NaCl, 3,4 mM Na₂HPO₄, 1,3 mM NaH₂PO₄, 3 mM NaN₃, pH 7,2

Potahovací pufr (ELISA)

14,4 mM Na₂CO₃, 34,8 mM NaHCO₃, 3 mM NaN₃, pH 9,6

Substrátový pufr (ELISA)

9,7 % diethanolamin, pH 9,8 upravit s HCl

Konjugačný pufr

2% PVP, 0,02% OVO, rozpouští se v PBS+T pufru

Blokovací pufr

4% BSA, rozpouští se v konjugačním pufru

Barvicí roztok Ponceau S

30% kys. trichloroctová, 30% kys. sulfasalicylová, 2% barva Ponceau S

Směs inhibitorů proteas:

0,1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonylfluoride; 0,04 mM mikroM bestatin;
0,5 µg/ml pepstatin A; 0,01 mM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)
butane (E-64); 0,01 mM phosphoramidon

3.2.3 Média

LB medium:

1% pepton
0,5% kvasničný extrakt
1% NaCl
pH 7

SOB medium:

2% bacto-trypton
0,5% kvasničný extrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

Po sterilizaci se přidá 1 M roztok MgSO₄ a MgCl₂ na výslednou koncentraci 10 mM.

LB agar:

100 ml LB média
1,6 g bacto-agar
150 µl Amp

Koncentrace antibiotik: Amp: 100 mg/ml

3.2.4 Primery

Zpětný 370s: 5' - AAC CAT GGA AAG CGG ATT CAA CGG AAG T – 3'

Invitrogen Inc., USA

Primý 1758: 5' - ATA GAT CTT CCG GAC CAT ACC TGT CTG TTT - 3'

Invitrogen Inc., USA

3.2.5 Vektory

pQE-32

Qiagen, Německo

3.2.6 Enzymy

DNasa

Serva, Německo

Lysozym

Sigma, USA

RNasa

Serva, Německo

Taq polymerasa

Fermentas, Kanada

Restrikční endonukleasy: Pst I

Fermentas, Kanada

Reverzní transkriptasa

Promega, USA

3.2.7 Bakteriální kmeny

Escherichia coli TG1: F' *traD36 lacI^Δ(lacZ) M15 proA⁻B⁻/supE Δ(hsdM-mcrB)5 (r_k⁻ m_k⁻ McrB) thi Δ(lac-proAB)*

Zymo Research Corporation, USA

3.2.8 Virový materiál

PMTV dánský izolát 54-10

Dr. Steen Lykke Nielsen (Danish Institute of Agricultural Science), Dánsko

NF CP (nerozpustná frakce kapsidového proteinu PMTV značeného hexahistidinem)

ÚEB AVČR, Laboratoř virologie

3.2.9 Rostlinný materiál

Nicotiana benthamiana – zdravá rostlina

ÚEB AVČR, Laboratoř virologie

Nicotiana benthamiana – infikované listy – český izolát PMTV Korneta - Nemilkov

ÚEB AVČR, Laboratoř virologie

Nicotiana benthamiana – infikované listy – dánský izolát PMTV 54-10

ÚEB AVČR, Laboratoř virologie

Solanum tuberosum – infikované hlízy - český isolát PMTV Korneta – Nemilkov

Ing. P. Dědič, CSc., Výzkumný ústav
bramborářský Havlíčkův Brod, ČR

3.2.10 Protilátky

Anti - His

(primární protilátka proti hexahistidinu)

Amersham Pharmacia Biotech, Švédsko

Anti - Mouse IgG - Alkaline Phosphatase Conjugate

(sekundární protilátka proti Anti – His)

Sigma, USA

Anti - Rabbit IgG – Alkaline Phosphatase Conjugate

(sekundární protilátka proti PAP a Anti – TGBp1)

Sigma, USA

PMTV Coating Antibody (PAP)

(polyklonální protilátka proti kapsidovému proteinu PMTV)

Adgen, UK

3.3 Metody práce s DNA

3.3.1 Příprava kompetentních bakterií

Příslušný bakteriální kmen je vyset na agarovou misku s vhodnými antibiotiky a je kultivován přes noc při 37°C. Třemi vybranými koloniemi (1 ml noční kultury) se naočkuje po 250 ml SOB média a jsou kultivovány při intenzivním třepání (240 otáček za minutu) při teplotě 18-20°C až do okamžiku, kdy při 550 nm dosáhne optická hustota bakterií hodnotu 0.6. Poté jsou kultury inkubovány 10 minut na ledu a odstředěny při 2500g, 4°C asi 10 minut. Usazené bakterie se resuspendují v 80 ml ledového roztoku TB. Po 10 minutách na ledu jsou bakterie odstředěny za stejných podmínek. Pelet se resuspenduje ve 20 ml TB a ke směsi se pomalu (po kapkách) a za mírného třepání přidá DMSO až do výsledné koncentrace 7%. Přídavek DMSO je nutný pro správné zmrazení a zajišťuje vysokou kompetenci připravovaných bakterií. Výsledná suspenze se nechá 10 minut stát na ledu a pak se rozdělí po 200µl do mikrozkušavek. Po mírném protřepání jsou mikrozkušavky zmrazeny v kapalném dusíku. Takto zamražené alikvoty se uchovávají při -80°C. Na závěr je nutné ověřit kompetenci připravených bakterií pokusnou transformací některým komerčním plazmidem.

3.3.2 Transformace kompetentních buněk

Kompetentní buňky *E.coli* uchovávané při -72°C se nechají roztát na ledu. Pak se k nim přidá DNA (1-10 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ buněk) a směs se inkubuje 25-30 minut na ledu. Následuje tzv. tepelný šok, kdy se bakterie vystaví na 30-40 sekund teplotě 42°C a pak se ihned vyžíhanou a ochlazenou skleněnou tyčinkou vysejí na připravenou agarovou misku s příslušnými antibiotiky. Miska s bakteriemi se inkubuje při 37°C přes noc (cca 15-30 hodin), až do vytvoření viditelných kolonií.

3.3.3 Minipreparativní izolace DNA

Zkumavky s 5 ml LB media a 7,5 μl příslušného antibiotika (Amp) se naočkují kolonií vyrostlou po transformaci. Po noční kultivaci při 37°C se buňky odstředí při 9650g 1 minutu. Pelet je resuspendován ve 300 μl GET pufru a nechá se 5 minut stát při laboratorní teplotě. Následně je přidáno 300 μl lyzačního roztoku a směs se opatrně převrací po dobu 4-5 minut. Nakonec se přidá 300 μl neutralizačního roztoku a směs se opět opatrně převrací po dobu 5 minut. Po odstředění při 9650g po dobu 15 minut se supernatant odsaje, přenese do 600 μl isopropanolu a směs se nechá 5 minut stát při laboratorní teplotě. Vysrážená DNA se odstředí (9650g 15 minut), supernatant se odlije a sediment se promyje ve 150 μl 70% EtOH (9650g 15 minut), DNA se vysuší v inkubátoru při 37°C 15 minut a pak se rozpustí ve 20 μl TE pufru s RNasou (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TE pufru).

3.3.4 Restrikční štěpení

Restrikční štěpení závisí na kvantitě DNA a na účinnosti restrikčních enzymů, proto se může v každém jednotlivém případě lišit. Pro restrikci se použije 1 μl (250 ng) minipreparativně izolované plazmidové DNA, 0,2 μl restrikčního enzymu PstI (10 U/ μl) příslušného 10x koncentrovaného pufru. Pufry jsou zvoleny na základě tabulky účinnosti restrikčních enzymů v různých pufrech určených pro restrikci tak, aby účinnost enzymu byla v tomto pufru maximální. Směs se doplní do 20 μl sterilní redH₂O. Směs se nechá stát při optimální teplotě (většina restrikcí při 37°C) po dobu 1-3 hodin, nebo při laboratorní teplotě přes noc.

3.3.5 Elektroforéza v agarosovém gelu

Metoda se používá k rozdělení různě dlouhých fragmentů DNA. V závislosti na dělených fragmentech používáme 0,8-2% agarosový gel. Agarosa se rozpustí v 100 ml TAE pufru a po zchladnutí se přidají 2 μ l EtBr (1mg/ml). Do jamek se pak nanášejí připravené vzorky a vhodný marker. Elektroforéza probíhá při konstantním napětí 80 V po dobu 30-60 minut. Gel se pak vizualizuje v UV oblasti.

3.3.6 Polymerasová řetězová reakce - PCR

Tato metoda se používá k amplifikaci DNA. Opakují se tři teplotní kroky v každém cyklu. První je denaturace dvouvláknové DNA na dvě jednovláknové templátové molekuly – teplota 94°C. V druhém kroku komplementárně nasedají primery na vlákno DNA a tím vymezí úsek k namnožení - teplota 50–72°C v závislosti na sekvenci a délce množeného úseku, obecně asi o 5 stupňů nižší než je jejich teplota tání. Musí být známá alespoň sekvence krátkých úseků na obou koncích amplifikované DNA, které jsou použity k návrhu primerů (cca 20 bp). V třetím kroku nasedá vysoce termostabilní DNA polymerasa (například Taq z bakterie *Thermus aquaticus*) a katalyzuje syntézu nových vláken DNA – teplota 72°C.

Reakce probíhala v celkovém objemu 50 μ l (34 μ l redH₂O, 5 μ l 10x pufr Buff Taq-MgCl₂, 4 μ l MgCl₂ – 2 mM, 1 μ l dNTP, 1 μ l 20 μ M primer přímý a 1 μ l 20 μ M primer zpětný, 2 μ l templátová DNA, 2 μ l Taq polymerasa – 1 U/ μ l). Reakční komponenty se mísily za stálého chlazení ledem. Schéma reakce bylo:

1. 94°C – 2 minuty – 1 cyklus
2. 94°C – 30 sekund, 56°C – 30 sekund, 72°C – 1 minuta – 35 cyklů
3. 72°C – 10 minut – 1 cyklus
4. 6°C – 50 minut

Výsledky se analyzovaly elektroforézou v agarosovém gelu. Metodu lze využít jak k izolaci požadovaného fragmentu, tak k ověření přítomnosti inzertu ve vektoru.

3.3.7 IC RT PCR

IC (Immuno-capture) RT (reverse-transcription) PCR (polymerase chain reaction) se využívá ke stanovení virových antigenů v rostlinách. Studovaný antigen se vzhledem k jeho nízkým koncentracím v hostitelské rostlině nejdříve zachytí a nakoncentruje na vhodném povrchu pomocí imunochemické reakce s příslušnou protilátkou (IC).

V našem případě byl analyzován PMTV infekční materiál rostliny *N. benthamiana*. V mikrozkuvkách se imobilizuje 50 μ l králičí protilátky třídy IgG proti kapsidovému proteinu CP PMTV naředěné v potahovacím pufru na koncentraci 1 μ l/ml. Protilátka se inkubuje po dobu 3 hodin při 37°C. Obsah se pak odsaje a mikrozkuvky se 3x promyjí 100 μ l PBS+T a nechají vysušit. Rostlinný materiál se homogenizuje v třecí misce v desetinásobném množství konjugačního pufru a po 50 μ l nanese do mikrozkuvavek s adsorbovanou protilátkou proti PMTV. Mikrozkuvky se odstředí při 500g 2 minuty a pak inkubují přes noc při 4°C.

Pak následuje reverzní transkripce (RT) vybraného RNA fragmentu PMTV genomu. Do mikrozkuvavek se přidá 10 μ l redH₂O, 1 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l 20 mM příslušného zpětného primeru. Směs se inkubuje 5 minut při 65°C a pak vychladí v ledové lázni. Přidají se 4 μ l 5x koncentrovaného příslušného pufru, 1 μ l RNasy (40 U/ μ l), 2 μ l 0,1 M DTT a inkubuje se při 42°C 2 minuty. Nakonec se přidá 1 μ l reverzní transkriptasy (200 U/ μ l) a reakční směs se inkubuje 50 minut při 42°C. Enzym se inaktivuje inkubací při 70°C po dobu 15 minut.

Pomocí PCR (viz. 3.3.6 PCR) se nakonec syntetizují nové příslušné řetězce DNA, které se analyzují pomocí elektroforézy v agarosovém gelu.

3.4 Metody práce s proteiny

3.4.1 Příprava rekombinantního proteinu

3.4.1.1 Exprese proteinu – vektor pQE-32³³

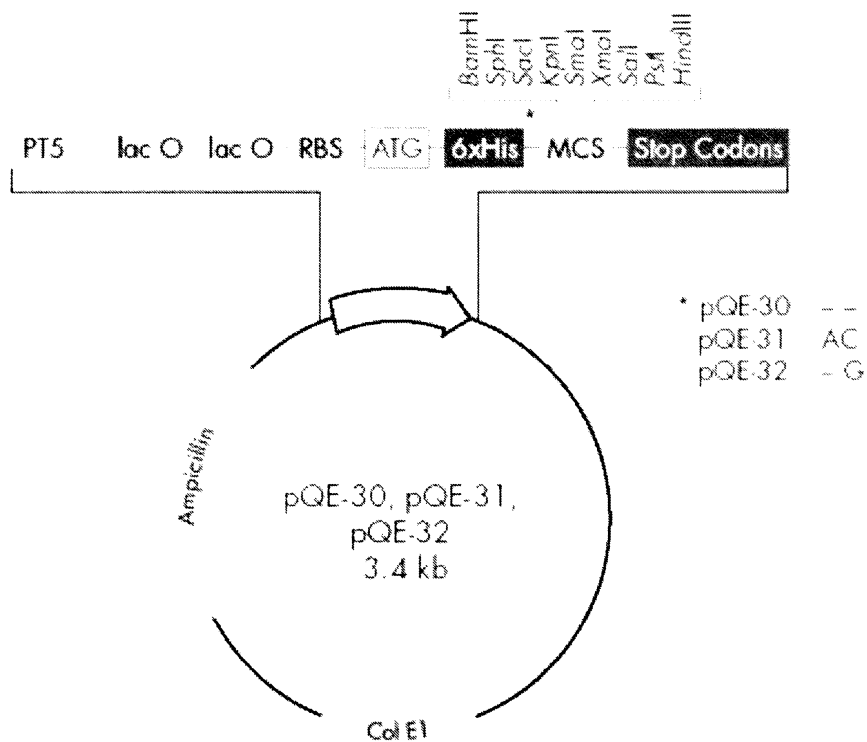
Pro produkci proteinů značených na N-konci hexahistidinovou kotvou se používají vektory komerčně dostupného systému pQE: pQE-9, pQE-30, pQE-31, pQE-32 a pQE-40. Vektory pQE-30, pQE-31, pQE-32 poskytují mnohonásobná klonovací místa ve všech třech

čtecích rámcích, zatímco pQE-9 má alternativní zkrácenou mnohonásobnou klonovací oblast. pQE-40 byl navržen pro expresi fúzních proteinů s dihydrofolátreduktasou a doporučuje se pro expresi obtížně exprimovatelných proteinů nebo krátkých peptidů, které často podléhají proteolyse. Dihydrofolátreduktasa podporuje jak jejich stabilitu, tak imunogenitu.

Pro produkci TGBp1 proteinu nejlépe vyhovoval vektor pQE-32 o velikosti 3462 bp.

Vektory pQE (obr. 3.1) mají genovou sekvenci kódující hexahistidin. Za touto sekvencí je vložena sekvence cílového proteinu, čímž vzniká tzv. fúzní protein. Fúzní protein lze izolovat díky vazebným vlastnostem hexahistidinu pomocí chelatační chromatografie.

Transkripci *6xHis* genu umožňuje silný promotor T5. Vektor dále obsahuje gen pro Lac represor (*lac O*), který blokuje transkripci fúzního proteinu, dokud není přidáno IPTG. Tento gen tak umožňuje hostitelským bakteriím narůst do optimální optické hustoty bez inhibice možnou toxicitou překládaného proteinu. Vektory pQE v sobě také nesou zabudovanou informaci pro ampicilinovou rezistenci.



Obr. 3.1: Struktura komerčně dostupných vektorů pQE-30, pQE-31, pQE-32

Převzato z ³³.

3.4.1.2 Produkce proteinů

Bakterie *Escherichia coli* jsou jedny z nejvíce užívaných hostitelů pro produkci heterologních proteinů. Je u nich mnohem lépe charakterizován genom a genetika než u jiných mikroorganismů. Pro produkci rekombinantního proteinu byl použit bakteriální kmen *E.coli* TG1. Pro indukci bakteriální exprese byla zvolena koncentrace induktoru IPTG 0,5 mM. Bakterie byly kultivovány s induktorem po dobu 4 hodin. Exprese rekombinantního proteinu byla provedena v 500 ml LB média.

3.4.1.3 Příprava nerozpustné frakce

Bakteriální kultura (500 ml) se odstředí (2800g 15 minut) a pelet se resuspenduje v 48 ml pufru 20 mM Tris-HCl pH 7,5. Přidá se 4,8 mg lysozymu, 100 μ l enzymů DNasa/RNasa (0,2 mg DNasy a 0,1 mg RNasy) a inkubuje se 10 minut při 37°C. Následuje centrifugace při 14900g 10 minut. Sediment se resuspenduje v 24 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,5 a odstředí (8800g 5 minut). Promytí se zopakuje. Sediment se solubilizuje v 40 ml 1% roztoku SDS nebo 20 mM fosfátovém pufru (pH 7,5). Nakonec se přidá směs inhibitorů proteas 1:10. Uchováva se při -20°C.

3.4.1.4 Ni²⁺ chelatační chromatografie^{35, 36, 37}

Metoda se řadí k purifikačním postupům, které využívají biospecifických interakcí fúzních domén proteinů se stacionární fází. V našem případě je užívanou interakcí koordinační vazba fúzního oligopeptidu hexahistidinu a iontu přechodného kovu Ni²⁺. Ni²⁺ je na chelatační matici vázán na kyselinu nitrilotrioctovou, která poskytuje do koordinační vazby 4 elektronové páry. Vazba je relativně silná a tudíž v průběhu purifikace nedochází k nežádoucímu uvolňování nikelnatého iontu z chelatační matrice.

Kolona byla naplněna 6 ml maticí IMAC-Sepharosa Fast Flow a byla promyta s 1,2 ml 0,2 M Ni₂SO₄. Pak byl sloupec ekvilibrován 24 ml chromatografického pufru A: 20 mM fosfátový pufr (pH 7,5), 0,5 M NaCl a 8 M močovina.

Nerozpustná frakce TGBp1 byla upravena 8 M močovinou a 0,5 M NaCl. Při této koncentraci močoviny dochází k denaturaci a solubilizaci proteinu a expozici vazebné domény a vysoká koncentrace NaCl snižuje nežádoucí elektrostatické interakce mezi

bakteriálními proteiny a maticí. Při přípravě NF TGBp1 byla přidána směs inhibitorů proteas pro purifikaci hexahistidinových proteinů.

Na ekvilibrovaný sloupec bylo naneseno celkem 17,1 mg proteinů v proteinové frakci. Průtok sloupce při zapouštění proteinů byl 1 ml za 10 minut. Po zapuštění byl na sloupec nanesen s průtokem 1 ml za 3 minuty chromatografický pufr A, který zajišťuje optimální interakci hexahistidinové domény s kovovým iontem. Celkový objem použitý při promývání sloupce od bakteriálních proteinů činil pětinašobek objemu sloupce.

Při nulové absorbanci proteinů při 280 nm byl na sloupec nanesen chromatografický pufr B: 20 mM fosfátový pufr (pH 7,5), 0,5 M NaCl, 8 M močovina a 50 mM imidazol, který sloužil jako kompetitivní činidlo. V této fázi promývání byly z matrice uvolňované kontaminující proteiny.

Pro eluci rekombinantního proteinu byl použit chromatografický pufr C: 20 mM fosfátový pufr (pH 7,5), 0,5 M NaCl, 8 M močovinou a 0,5 M imidazolem. Prvních 6 ml při daném průtoku se v matici sloupce ustavovala rovnováha mezi imidazolem jako kompetitivním činidlem a hexahistidinem žádaného proteinu. Frakce byly odebírány po 1 ml a byla měřena jejich absorbance při 280 nm.

3.4.2 Elektroforetické metody

3.4.2.1 SDS-PAGE

Metoda se používá k analýze proteinových vzorků. Jestliže aplikujeme elektrické pole na roztok obsahující molekuly proteinů, tyto molekuly se budou v poli pohybovat směrem a rychlostí určenými jejich nábojem a velikostí. Detergent dodecylsulfát sodný (SDS) se používá k udělení uniformního náboje, tzn. že proteiny obalené SDS mají stejný tvar a záporný náboj, a proto se dělí podle molekulové hmotnosti. Redukční činidlo, například merkaptoethanol se často přidává pro přerušování disulfidových vazeb uvnitř proteinu nebo mezi dvěma molekulami. Velkopórový gel slouží k zaostření proteinů. Koncentrace akrylamidu v separačním gelu je zvolena podle velikosti dělených proteinů. Gel se připravuje podle postupu popsaném v ^{28,29}. Po nanesení vzorků elektroforéza probíhá při konstantním proudu 25 mA na jeden gel a napětí 16-26 V na 1 cm délky gelu.³⁰

Po elektroforéze se pak gel obarví, viz. barvení proteinů nebo se dále použije k imunochemické detekci proteinů pomocí metody Western blot.

3.4.2.2 Elektroforéza za nativních podmínek

Metoda se používá k analýze nativních proteinů. Předpisy pro přípravu gelů, elektrodového roztoku a vzorkového pufru jsou stejné, jen SDS se nahrazuje 10% glycerolem.³¹ K rostlinným extraktům se přidává sacharosa do celkové koncentrace 20%. Aparatura se v průběhu elektroforézy chladí.

3.4.2.3 Elektropřenos proteinů na membránu

K elektropřenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na NC membránu dochází mezi dvěma grafitovými elektrodami. Nejprve se elektrody opláchnou destilovanou vodou. Na katodu se položí tři vrstvy filtračního papíru navlhčeného katodovým pufrem. Poté se na papír přenesou elektroforeticky rozdělené proteiny. Na gel se položí NC membrána navlhčená destilovanou vodou a pak se překryje jednou vrstvou filtračního papíru navlhčeného anodovým pufrem č. 1. Na něj se položí dvě vrstvy filtračního papíru navlhčeného anodovým pufrem č. 2. Nakonec se přiloží anoda.

Sestavená aparatura se připojí ke zdroji elektrického proudu. Vlastní přenos probíhá při proudu $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ gelu po dobu 90 minut. Membrána je následně použita k imunochemické detekci přenesených proteinů.

3.4.3 Imunochemické metody

3.4.3.1 Imunochemická detekce proteinů

Po přenosu se nechá NC membrána nejprve oschnout na vzduchu, čímž se zlepší fixace proteinů na membráně. Volná vazebná místa se asi 1 hodinu blokují blokovacím pufrem. Pak je membrána inkubována v konjugačním pufru s primární protilátkou přes noc při teplotě 4°C . Poté je membrána opakovaně promyta v PBS+T (4 x 5 minut). Následuje 2 hodinová inkubace v konjugačním pufru se sekundární protilátkou značenou alkalickou

fosfatasou. Po inkubaci se membrána opět promyje 4 x 5 minut v PBS+T. Takto ošetřenou membránu umístíme do roztoku substrátu (BCIP+NBT), dokud se neobarví produktem enzymové reakce.

3.4.3.2 ELISA

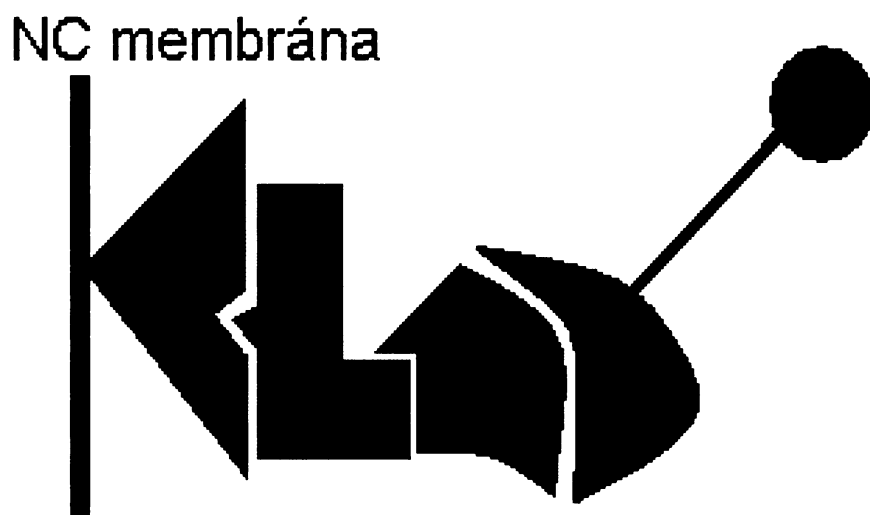
ELISA je imunochemická metoda, která ke stanovení komplexu antigen-protilátka používá jako značkovací molekuly enzymy. Značkovací molekula enzymu je obvykle konjugována s ligandem, což může být antigen, specifická protilátka proti antigenu, nebo protilátka proti primární specifické protilátce. Většina metod ELISA jsou stanovení na „pevné fázi“, kde buď antigen nebo protilátka jsou adsorbovány na povrch pevného nosiče (jamky mikrotitrační destičky). Množství vázaného enzymového konjugátu se stanoví po přidání substrátu měřením katalytické reakce enzym-substrát.³⁸

V našem stanovení se reakční komponenty nanášejí do jamek mikrotitrační destičky ve stejném objemu, např.: 100 μ l. Jamky se nejdříve potahují antigenem resp. vzorkem rozpuštěným v potahovacím pufru v různém poměru. Destička se inkubuje v lednici přes noc nebo při 37°C 2 až 4 hodiny. Po inkubaci se jamky vyprázdňují a naplní blokovacím pufrům (30 minut). Jamky se pak promývají 3 x 1 minutu s 200 μ l PBS+T a následuje hodinová inkubace při 37°C s primární protilátkou. Poté se jamky opět promývají 3 x 1 minutu s 200 μ l PBS+T a následuje hodinová inkubace při 37°C se sekundární protilátkou značenou enzymem alkalická fosfatasa. Po opětovném promytí se do jamek přidá p-nitrofenylfosfát rozpuštěný v substrátovém pufru (0,1 mg na 1 ml). Množství barevného produktu p-nitrofenolu se stanovuje spektrofotometricky měřením absorpance při vlnové délce 405nm.

3.4.4 Far Western blot – overlay^{39, 40}

Metoda Far Western blot se používá k detekování interakce mezi proteiny. V principu je podobná metodě Western blot (obr. 3.2). V případě interakce mezi studovanými proteiny je imunochemická nebo jiná detekce druhého proteinu (P2) pozitivní. Mnoho protein-proteinových interakcí vydrží i takové zacházení, kde je jeden z reakčních partnerů zcela redukován a denaturován. Negativní výsledek nemusí vypovídat o nepřítomnosti interakce mezi studovanými proteiny, jelikož je každá interakce mezi dvěma proteiny závislá

na jejich sekundární a terciární strukturu a ty mohou být během analýzy značně ovlivněny. Ačkoliv separace proteinů pomocí SDS-PAGE poskytuje více informací o molekulové hmotnosti, přítomnosti disulfidických můstků a podjednotkové strukturu studovaného proteinu, může způsobit, že protein nebude rozeznán interagujícím proteinem, a proto je pro separaci možné použít elektroforézu za nativních podmínek. Také podmínky elektropřenosu mohou v některých případech ovlivnit tvar proteinu a zničit nebo stéricky modifikovat místo interakce na molekule proteinu. Pro analýzu Far Western postačuje, že po přenosu zůstává zachována alespoň doména odpovědná za interakci, nebo se protein poskládá při přenosu tak, že vytvoří prostorovou strukturu obsahující neporušené místo interakce. Síla interakce závisí na pH, koncentraci solí, na přítomnosti dalších faktorů a u některých proteinů také na přítomnosti dalších proteinů.



Obr. 3.2: Uspořádání metody Far Western blot: P1 – protein přenesený na NC membránu, P2 – interagující protein, 1°Ab – primární protilátka reagující s P2, 2°Ab – sekundární protilátka značená enzymem

Vzorky (NF CP) se rozdělí pomocí SDS-PAGE a přenesou na nitrocelulosovou membránu. Dále byl použit postup, který byl optimalizován v naší laboratoři. Membrána se hodinu blokuje v blokovacím pufru a pak se přes noc inkubuje s interagujícím proteinem TGBp1. Membrána se mezi jednotlivými inkubacemi promývá 3 x 5 minut v blokovacím pufru. Pak se hodinu a půl inkubuje s primární protilátkou proti TGBp1 a nakonec se

sekundární protilátkou dvě hodiny. Membrána se před detekcí substrátem (BCIP+NTB) ještě promyje jednou 5 minut v PBS+T.

Jelikož některé proteiny vykazují mnoho nespecifických interakcí, je důležité připravit negativní a pozitivní kontroly.

3.4.5 Stanovení množství proteinů

Množství proteinů bylo stanoveno podle Bradfordové.³² Reakční směs obsahující 100 μ l stanovované směsi a 1 ml činidla podle Bradfordové se promíchá a 5-10 minut se inkubuje při laboratorní teplotě. Slepý vzorek vznikne smícháním 100 μ l dH₂O a 1 ml činidla podle Bradfordové. Množství proteinů se stanovuje spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 595 nm a následným odečtením z kalibrační křivky. Kalibrační křivka se sestaví pro 0,1 - 0,5 mg BSA jako standardu.

3.4.6 Barvení proteinů v gelu

Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250

Gel po SDS-PAGE elektroforézy se 1 hodinu barví v roztoku CBB R-250. Odbarvuje se v odbarvovacím roztoku až do odbarvení.

Barvení pomocí dusičnanu stříbrného

Po fixaci fixačním roztokem nebo obarvení a odbarvení CBB R-250 je gel 3x omyt vodou po dobu 10 minut. Následuje minutové promytí v 0,02% Na₂S₂O₃, vymytí vodou 3 x 20 sekund a inkubace v čerstvě připraveném 0,2% AgNO₃ po dobu 20 minut. Gel je pak omyt destilovanou vodou 3 x 30 sekund. Nakonec je gel ponořen do vyvíjecího roztoku. Vyvíjení se kontroluje vizuálně (2-10 minut).

Barvení Ponceau S

NC membrána se po elektropřenosu nechá 5 minut barvit v barvicím roztoku Ponceau S a odbarvuje se vymýváním pomocí destilované vody až do odbarvení.

3.4.7 Izolace IgG frakce kyselinou kaprylovou ³⁴

K 1 ml králičího antiséra jsou přidány 2 ml 0,06 M octanu sodného pH 4,0 a 0,074 ml kyseliny kaprylové. Směs se míchá 40 minut při laboratorní teplotě. Směs se odstředí při 5700g po dobu 10 minut. Supernatant se dialyzuje proti fyziologickému roztoku pH 7,2 při 4°C v celkovém objemu 1000 ml (mění se 4 x). Měřením absorbance při 280 nm se zjistí koncentrace proteinu podle vztahu $c = A/1,4$ mg/ml. Protilátka se uchovává v lednici při 4°C.

4. Výsledky

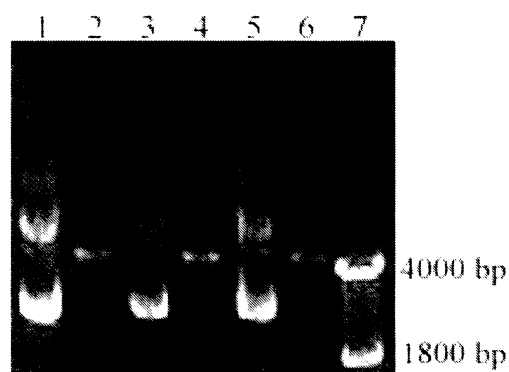
4.1 Příprava expresního vektoru

Výchozím materiálem byl komerční vektor pQE-32 (3462 bp) zahrnující sekvenci kódující část molekuly TGBp1 proteinu, který byl připraven Dr.Tamarou Pečenkovou. Sekvence RNA2 používaná v této práci byla z dánského PMTV izolátu 54-10.⁴¹

Záměrem bylo sestavit konstrukt, který nebude toxický pro bakterie a bude obsahovat strukturu vhodnou pro přípravu polyklonální protilátky, která by byla schopna tento protein detekovat v rostlinném materiálu. Konstrukt obsahuje kotvu pro zachycení exprimovaného proteinu na afinitní koloně.

Prvním cílem byla bakteriální produkce molekuly TGBp1. Základem byl vektor pQE-32 obsahující hexahistidin, který se chelatačně váže na nikelnaté ionty. Původní délka genu pro TGBp1 (1400 bp) nevyhovovala tomuto účelu pro svoji toxicitu v bakteriích, proto byl inzert na 3' konci zkrácen o 500 bp (konstrukt pQE-32-TGBp1). Tato velikost vyhovovala a bakteriální produkce vedla k expresi požadovaného proteinu TGBp1.

Pro kontrolu vektoru obsahujícího zkrácený produkt byla provedena následně transformace *E.coli*. Třemi koloniemi byla naočkována LB média a pak byla provedena minipreparativní izolace plasmidové DNA. Vzniklý produkt byl štěpen restriční endonukleasou Pst I a analyzován v 0.8% agarosovém gelu (obr. 4.1).



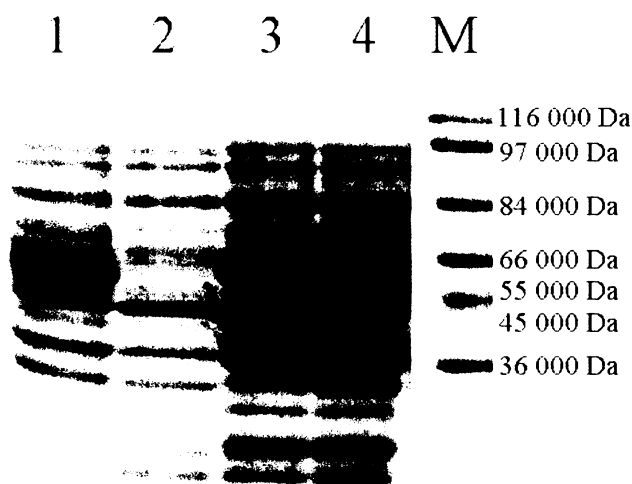
Obr. 4.1: Restriční analýza izolovaného konstrukt pQE-32-TGBp1 štěpeného restriktasou Pst I: 1,3,5 – neštěpený konstrukt pQE-32-TGBp1; 2,4,6 – štěpený konstrukt pQE-32-TGBp1 endonukleasou Pst I; 7 – marker 4000 a 1800 bp.

Správná velikost konstruktů byla 4362 bp a u všech třech kolonií byly nalezeny pruhy požadované velikosti. Pro další kontrolu vložené sekvence inzertu do vektoru byla provedena také jeho sekvenace, která potvrdila správnost otevřeného čtecího rámce exprimovaného proteinu a přítomnost hexahistidinu na jeho N-konci.

4.2 Exprese proteinu TGBp1

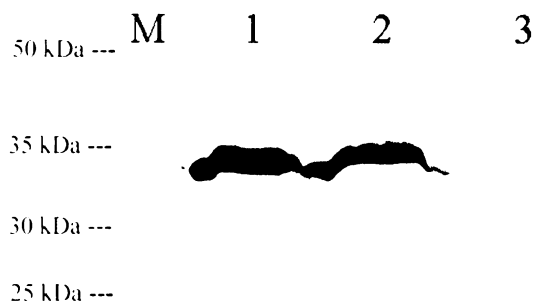
K expresi TGBp1 proteinu byl použit bakteriální kmen *Escherichia coli* TG1. Bakterie byly transformovány připraveným vektorem. Správnost vloženého konstruktů byla následně ověřena restrikční analýzou. Optimální podmínky byly stanoveny takto: indukce 0,5 mM IPTG při optické densitě 0,6 (absorbance při 600 nm), vlastní produkce po dobu 4 hodin při 37°C za stále aerace.

Nejdříve byla provedena produkce proteinu TGBp1 ve vybraných koloniích v 10 ml LB média. Přítomnost exprimovaného proteinu TGBp1 byla ověřena metodou SDS-PAGE v 12% polyakrylamidovém gelu (obr.4.2).



Obr.: 4.2: Ověření produkce TGBp1 v *E.coli* TG1 : 1 – bakterie *E.coli* s prázdným plazmidem pQE-32 po indukci IPTG, 2 – bakterie *E.coli* před indukci IPTG, 3 – bakterie *E.coli* po indukci IPTG, 4 - nerozpustná frakce TGBp1 získaná z bakterií *E.coli* po indukci IPTG, M - proteinový marker.

Po ověření produkce žádaného proteinu byla provedena exprese ve větším měřítku v 0,5 litru LB média a exprimovaný protein byl detekován imunochemicky pomocí komerční protilátky anti - His (obr. 4.3).



Obr. 4.3: Expresa TGBp1 v *E.coli* – imunochemická detekce hexahistidinu pomocí anti - His protilátky: M – Rainbow marker , 1 – bakterie *E.coli* po indukci IPTG, 2 – bakterie *E.coli* před indukci IPTG, 3 – bakterie *E.coli* s prázdným plazmidem pQE-32 po indukci IPTG.

Bylo získáno 40 ml nerozpustné frakce TGBp1 (NF TGBp1) o obsahu 5,7mg proteinů/ml.

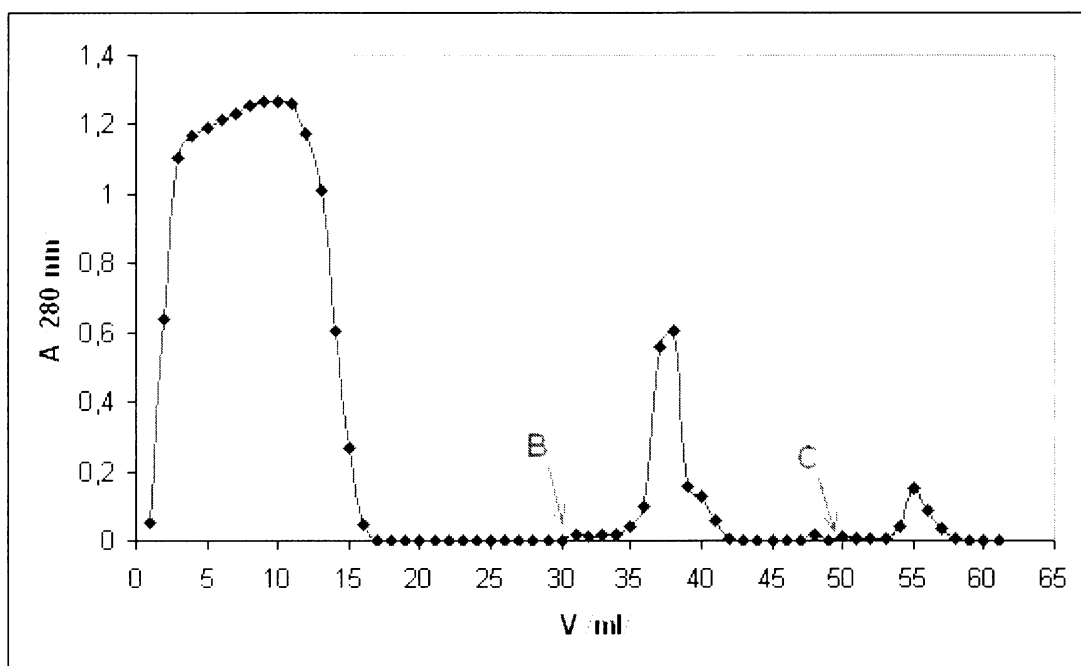
4.3 Ni²⁺ chelatační chromatografie

TGBp1 protein exprimovaný v *E.coli* TG1 je součástí nerozpustné frakce (obr. 4.5) bakteriálních proteinů. Po solubilizaci v 20 mM fosfátovém pufru pH 7,5 s obsahem 0,5 M NaCl a 8 M močoviny byla tato proteinová frakce aplikována na kolonu IMAC-Sepharosy s navázanými nikelnatými ionty. Průběh chromatografie dokumentuje obr. 4.4.

Bakteriální proteiny zachycené na koloně byly eluovány puftrem B s přídavkem 50 mM imidazolu (frakce B). Protein TGBp1, který obsahuje hexahistidin, byl eluován puftrem C s obsahem 0,5 M imidazolu (frakce C). Jednotlivé frakce byly analyzovány elektroforézou v prostředí SDS (obr. 4.5) a imunochemicky detekovány protilátkou anti – His (obr. 4.6). Protein o molekulové hmotnosti 33000 Da odpovídající TGBp1 proteinu chybí ve frakci, která na sloupci nebyla zachycena. Tento protein nebyl eluován 50 mM imidazolem.

Při vyšší koncentraci imidazolu (0,5 M) byl eluován TGBp1 protein (odpovídá molekulové hmotnosti 33000 Da), avšak zároveň jsou přítomny i proteiny o molekulové hmotnosti 84000 a 55000 Da.

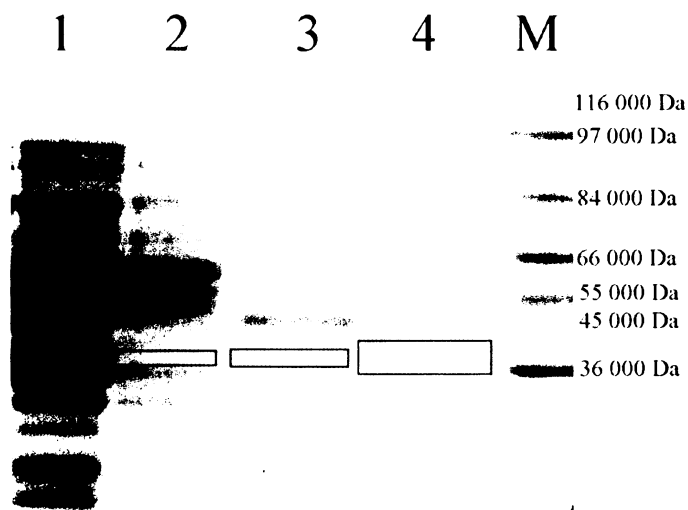
Množství proteinů separovaných do jednotlivých frakcí je uvedeno v tabulce 4.1. 76% proteinů se na IMAC koloně nezachytilo, 17,5% proteinů z frakce B je tvořeno rovněž bakteriálními proteiny. Frakce C obsahující rekombinantní protein TGBp1 odpovídá méně než 1% z původních proteinů.



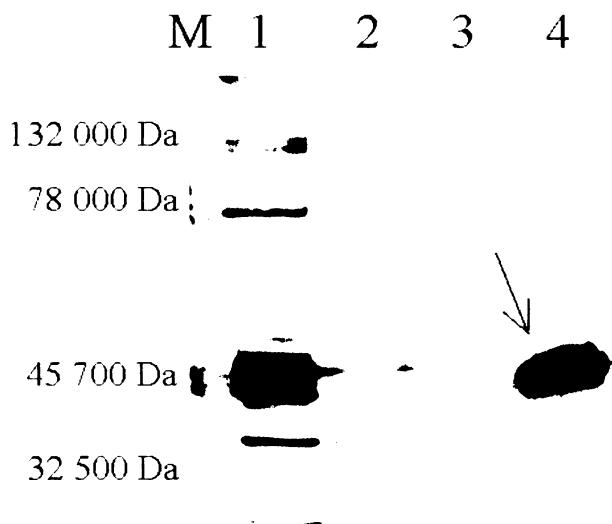
Obr. 4.4: Průběh chelatační chromatografie (šipka značí změnu pufru): Množství proteinů bylo sledováno měřením absorbance při 280 nm. Frakce A byla eluována chromatografickým pufrém A bez imidazolu, frakce B chromatografickým pufrém B s 50 mM imidazolem a frakce C byla eluovaná chromatografickým pufrém C s 0,5 M imidazolem.

Tab. 4.1: Množství proteinů ve frakcích eluovaných při chelatační chromatografii.

množství proteinů		V (ml)
nanášená NF TGBp1	17,1 mg	6 ml
frakce A	13,0 mg	30 ml
frakce B	3,0 mg	22 ml
frakce C	0,046 mg	4 ml



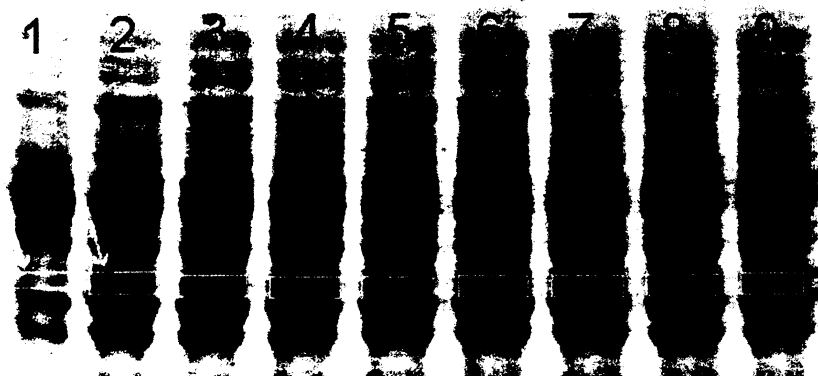
Obr. 4.5: Analýza jednotlivých frakcí po chelatační chromatografii: 1 - nanášená nerozpustná frakce TGBp1, 2 - nezachycená frakce A, 3 - frakce B, 4 – frakce C, M – proteinový marker.



Obr. 4.6: Imunochemická detekce anti – His protilátkou: M – proteinový marker, 1- nanášená nerozpustná frakce TGBp1, 2 - nezachycená frakce A, 3 - frakce B, 4 – frakce C – šipka značí eluovaný TGBp1.

4.4 Příprava polyklonální protilátky

K přípravě protilátek proti bakteriálně exprimovanému TGBp1 byly použity novozélandští bílí králíci. Antigen byl připraven pomocí preparativní SDS PAGE. Po obarvení 12% polyakrylamidového gelu CBB R-250 byly proužky odpovídající TGBp1 vyřezány (obr. 4.7) a rozdrceny v kapalném dusíku a nakonec resuspendovány v 3 ml PBS+T. Celkové množství TGBp1 získané z jednoho gelu bylo asi 360 μg . Koncentrace TGBp1 proteinu 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ byla určena z kalibrační křivky sestrojené pomocí BSA.



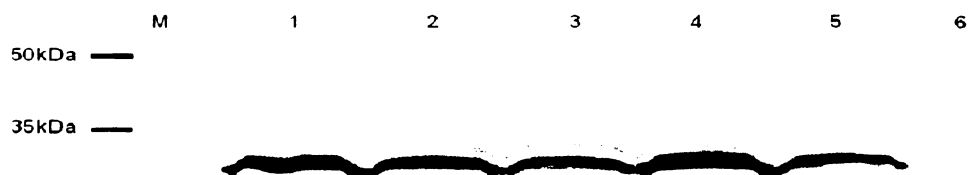
Obr. 4.7: Preparativní SDS-PAGE nerozpustné frakce TGBp1 pro izolaci TGBp1: 1- prázdný plazmid pQE-32 po indukci IPTG, 2-9 – NF TGBp1 – šipkou a zelenými rámečky jsou vyznačeny proužky TGBp1, které byly vyřezány.

První tři dávky byly podány subkutánně a poslední intramuskulárně. Imunizační schéma bylo následující:

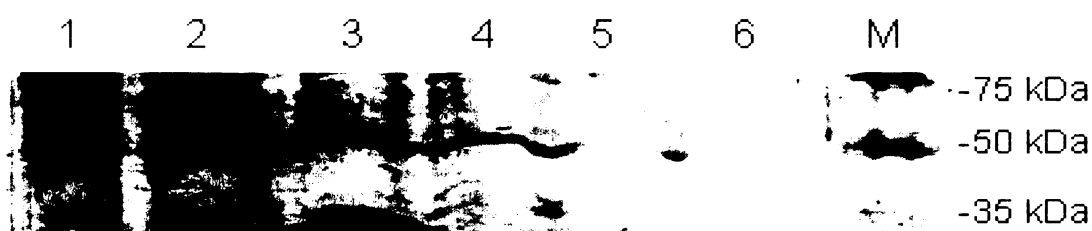
1. dávka (den 0) – protein byl emulgován 1:1 v úplném Freudovu adjuvans
- 2.dávka (den 21) a 3.dávka (den 42) – přidáno neúplné Freudovo adjuvans 1:1;
- 4.dávka (den 63) a 5.dávka (den 80) – antigen byl podán jen rozpuštěn v PBS+T.

Po čtvrté dávce byl proveden částečný odběr a po 14-ti dnech od poslední dávky došlo k úplnému vykrvení.

Z odebraného séra byly izolovány imunoglobulinové frakce o koncentraci 1,7 mg/ml (králík 1) a 1,6 mg/ml (králík 2). Při imunodetekci byla používaná koncentrace imunoglobulinů 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Aktivita připravené protilátky se zjišťovala reakcí s homologním antigenem a rostlinným materiálem (obr. 4.8 a obr. 4.9).



Obr. 4.8: Reakce anti – TGBp1 polyklonální protilátky třídy IgG s homologním antigenem TGBp1: 1, 2, 3 a 4 – bakterie *E.coli* po indukci IPTG; 5 – nerozpustná frakce TGBp1, 6 – bakterie *E.coli* s prázdným plazmidem pQE-32 po indukci IPTG; M - Rainbow marker.



Obr. 4.9: Reakce anti - TGBp1 polyklonální protilátky třídy IgG s rostlinným materiálem: 1,2- hlízy infikované českým izolátem PMTV Korneta-Nemilkov; 3,4 - listy stejných kultivarů jako u 1 a 2; 5 – listy infikované *N. benthamiana* PMTV českým izolátem Korneta - Nemilkov; 6 - zdravá *N. benthamiana*; M – Rainbow marker.

4.5 Další způsoby detekce PMTV

4.5.1 IC RT PCR

Detekce přítomnosti PMTV v hostitelských rostlinách *N. benthamiana* se prováděla IC RT PCR. Virové partikule PMTV byly zachyceny na stěnách zkumavky komerční králíčí protilátkou třídy IgG proti kapsidovému proteinu PMTV. Studovaný rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce v desetinasobném množství konjugačního pufru.

Při detekci TGBp1 byl pro reverzní transkripci použit zpětný primer se sekvencí 5' - AAC CAT GGA AAG CGG ATT CAA CGG AAG T - 3'. V reakční směsi

pro následnou PCR byl použit stejný zpětný primer a příslušný přímý primer: 5` - ATA GAT CTT CCG GAC CAT ACC TGT CTG TTT – 3`. Produkt PCR (1400 bp) byl analyzován v 1% agarosovém gelu (obr. 4.10).

Ze získaného výsledku je zřejmé, že v případě TGBp1 fragmentu z PMTV se IC RT PCR jeví jako účinná metoda pro detekci tohoto virového antigenu v rostlině.



Obr. 4.10: PCR produkt fragmentu TGBp1 PMTV z rostliny *N. benthamiana*:
1 – produkt PCR (1400bp), M - lambda marker.

4.5.2 ELISA

ELISA je další z metod používaných ke zjišťování přítomnosti virových antigenů v rostlinném materiálu. Pomocí uspořádání PTA ELISA byla zjišťována schopnost detekce TGBp1 jak připravenou polyklonální protilátkou třídy IgG, tak králíčím antisérem, ze kterého byla protilátka izolována. Rostlinné vzorky (*N.benthamiana*) byly homogenizovány v třecí misce v potahovacím pufru v poměru 1:10.

Nerozpustné frakce (NF) po indukci bakteriálních kultur exprimujících homologní antigen TGBp1 (pozitivní kontrola) a prázdný plazmid pQE-32 byly v potahovacím pufru naředěny stokrát. Jako negativní kontrola byl použit zdravý rostlinný materiál a nerozpustná frakce pQE-32.

Jako substrát pro alkalickou fosfatasa byl použit p-nitrofenylfosfát. Výsledky byly získané měřením absorbance při 405 nm po 18 hodinách inkubace při 4 °C, kdy bylo využito žlutého zabarvení produktu enzymové reakce p-nitrofenolu (tab. 4.2 a 4.3).

Tab. 4.2: Detekce přirozeného a homologního antigenu TGBp1 králičím antisérem

ředění séra	absorbance při 405 nm					
	antisérum (králik 1)			antisérum (králik 2)		
	1:100	1:500	1:1000	1:100	1:500	1:1000
slepý vzorek	0,30	0,30	0,19	0,18	0,19	0,17
zdravá <i>N.benthamiana</i>	0,48	0,42	0	0,66	0,60	0,11
PMTV infikovaná <i>N.benthamiana</i>	1,20	0,51	0	1,44	1,35	0,10
	1,42	0,62	0	1,60	1,48	0,19
NF pQE 32	0	0	0	0	0	0
NF TGBp1	∞	∞	2,22	2,61	3,30	0,60
	∞	∞	2,41	∞	3,24	0,74

Tab. 4.3: Detekce přirozeného a homologního antigenu TGBp1 IgG frakcí izolovanou z králičího antiséra

	absorbance při 405 nm			
	IgG (králik 1)		IgG (králik 2)	
slepý vzorek	0,17	0,19	0,24	0,20
zdravá <i>N.benthamiana</i>	0,07	0,05	0,07	0,09
PMTV infikovaná <i>N.benthamiana</i>	0,15	0,09	0,60	0,18
NF pQE 32	0	0,19	0	0
NF TGBp1	2,46	1,92	0,62	0,83

Z naměřených výsledků vyplývá, že izolovaná IgG frakce z antiTGBp1 antiséra sice neposkytuje žádný nespecifický signál, ale v tomto ředění a uspořádání ELISA není účinná pro detekci PMTV antigenů v rostlinném materiálu.

4.6 Studium protein-proteinových interakcí

Ke studiu protein-proteinových interakcí jsme si zvolili studium interakce mezi kapsidovým proteinem CP a proteinem TGBp1 metodou Far Western blot - overlay. (Podle obr. 3.2 byl protein CP označen jako P1 a protein TGBp1 jako P2.)

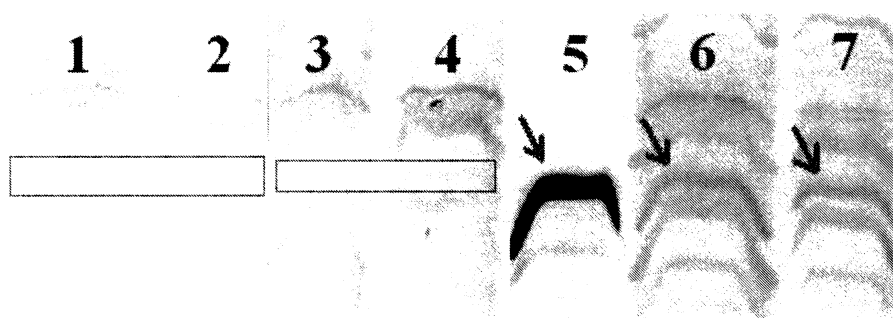
Nejdříve byla provedena optimalizace této metody použitím koncentračních řad obou proteinů v rámci studované interakce a optimalizace doby inkubace s proteinem P2. Důležité bylo získat nerušivé pozadí, jelikož oba proteiny byly použity ve formě solubilizované nerozpustné frakce.

Jako nejvhodnější se ukázala aplikace 20 μ l (57 μ g) nerozpustné frakce P1 na SDS-PAGE (naředěno 1:1 vzorkovým pufrům), ředění proteinu P2 v konjugačním pufru 1:250 a inkubace membrány s P2 přes noc.

Byla provedena SDS-PAGE nerozpustné frakce proteinu P1 v 12% gelu, kterou byly rozděleny všechny proteiny bakteriální exprese a ty pak byly přeneseny na NC membránu. Nerozpustná frakce P2 proteinu byla naředěna 1:250 v konjugačním pufru. Interakce s P2 probíhala přes noc. P2 protein byl detekován anti - TGBp1 polyklonální protilátkou. Jako sekundární protilátka sloužila anti - králičí protilátka třídy IgG konjugovaná s alkalickou fosfátasou.

Dále jsme provedli Western blot proteinu P1 a proteinu P2. Oba proteiny byly imunochemicky detekovány pomocí anti - His protilátky – pozitivní kontrola. Jako negativní kontrola byla použita imochemická detekce P1 anti - TGBp1 protilátkou, a zjistilo se, že P1 je touto protilátkou slabě detekován (obr. 4.11).

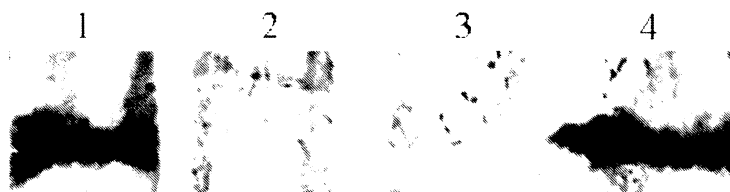
Získané výsledky o možnosti interakce mezi oběma proteiny vypovídaly, jelikož však byly u obou proteinů použity nerozpustné frakce z bakteriální exprese, bylo možné očekávat interakci mezi P1 a bakteriálními proteiny. Jako další negativní kontrola byl proveden Far Western blot proteinu P1 s nerozpustnou frakcí bakteriální exprese prázdného plazmidu pQE-32 (dále NF pQE-32), která byla detekovaná anti - TGBp1 protilátkou. Bylo zjištěno, že v uvažované oblasti dochází k minimální interakci P1 s bakteriálními proteiny (obr. 4.11).



Obr. 4.11: Detekce protein-proteinové interakce kapsidového proteinu CP (P1) a proteinu TGBp1 (P2) po SDS-PAGE nerozpustné frakce CP : 1,2 - interakce mezi P1 a NF pQE-32, detekce pomocí anti - TGBp1 protilátky – negativní kontrola, 3,4 - detekce P1 anti - TGBp1 protilátkou – negativní kontrola, 5 – detekce P1 anti – His protilátkou – pozitivní kontrola, 6,7 - interakce mezi P1 a P2, P2 je detekován anti - TGBp1 protilátkou

Pro potvrzení přítomnosti interakce mezi proteiny P1 a P2 byla provedena nativní elektroforéza proteinu P1. Jako pozitivní kontrola při Far Western analýze sloužila imunochemická detekce P1 polyklonální protilátkou proti PMTV. Jako negativní kontrola byla použita imunochemická detekce P1 anti - TGBp1 protilátkou a imunochemická detekce interakce P1 s NF pQE-32 anti – TGBp1 protilátkou.

Získaný výsledek prokázal přítomnost interakce mezi kapsidovým proteinem CP a proteinem TGBp1 (obr. 4.12).



Obr. 4.12: Detekce protein-proteinové interakce kapsidového proteinu CP (P1) a proteinu TGBp1 (P2) po nativní elektroforéze nerozpustné frakce CP: 1 - interakce mezi P1 a P2, P2 je detekován anti - TGBp1 protilátkou, 2 - detekce P1 anti - TGBp1 protilátkou – negativní kontrola, 3 - interakce mezi P1 a NF pQE-32, detekce pomocí anti - TGBp1 protilátky – negativní kontrola, 4 – detekce P1 polyklonální protilátkou proti PMTV – pozitivní kontrola

5. Diskuse

Tato práce navazovala na předchozí práce v naší laboratoři zabývajícími se studiem rostlinného viru mop-top viru bramboru. Většina z nich se týkala molekulárně biologické charakterizace a srovnání genetické variability různých izolátů PMTV. Dále byla studována možnost jeho detekce pomocí polyklonálních protilátek připravených proti rekombinantnímu kapsidovému proteinu CP a nestrukturním proteinům. Úkolem této práce bylo připravit polyklonální protilátku proti nestrukturním proteinu TGBp1 a zhodnotit možnosti jejího využití.

První částí mé práce bylo ověření správnosti konstruktu vloženého do vektoru pEQ-32 obsahujícího gen pro protein TGBp1 zkrácený na 3' konci a hexahistidinovou kotvu využitelnou při afinitní purifikaci produktu. Dále tímto vektorem transformovat bakteriální kmen vhodný pro produkci TGBp1 a provést expresi proteinu ve větším měřítku a tento produkt využít k produkci polyklonálních protilátek, které umožní další studium role tohoto proteinu v patogenesi.

Hlavním důvodem pro studium TGBp1 proteinu je jak příprava protilátek, které v kombinaci s PCR umožňují snadné monitorování a kontrolu šíření onemocnění způsobené PMTV, tak objasnění úlohy tohoto proteinu v jeho šíření. Je známo, že výskyt tohoto viru v jeho přirozeném hostiteli je špatně detekovatelný, namnožení viru pro jeho purifikaci velmi obtížné, proto je výhodnější připravit si vybraný antigen rekombinantně.⁴² TGBp1 protein je zároveň majoritně se vyskytující protein transportního systému „triple gen block“, který napomáhá transportu virové RNA z buňky do buňky a na dlouhé vzdálenosti. Protilátky proti tomuto nestrukturnímu proteinu poskytnou také možnost spolehlivější detekce PMTV viru v rostlinách, jelikož PMTV se může šířit i bez strukturního kapsidového proteinu¹², proti kterému jsou připraveny dosud dostupné komerční protilátky.

K přípravě molekuly TGBp1 byl zvolen jednoduchý prokaryotický expresní systém. Nejdříve bylo záměrem získat celou molekulu TGBp1 (1400 bp) ve vektoru pQE-32 s hexahistidinovou kotvou, aby byly zachovány všechny epitopy, proti kterým by byla polyklonální protilátka produkována. Připravený inzert byl pro bakterie toxický, proto se přistoupilo k jeho zkrácení na 3' konci o 500 bp, s tím, že jeho imunogenita zůstane

zachována. Výsledný produkt byl ověřen sekvenací. Inzert byl zkrácen také na 5` konci, ale s touto alternativou TGBp1 jsem dále nepracovala.

Pro kontrolu konstruktů obsahujícího zkrácený produkt byla provedena transformace *E.coli* TG1 a velikost konstruktů byla ověřena restrikční analýzou pomocí endonukleasy Pst I. Optimalizace exprese vedla k nalezení vhodných podmínek a tedy i k expresi požadovaného proteinu TGBp1 ve větším měřítku.

Bakteriální produkce vedla k získání rekombinantního TGBp1 ve formě nerozpustné frakce. Mnoho rekombinantních proteinů se pro svoji toxicitu a nebo špatné poskládání, či z důvodu absence eukaryotních chaperonů, nebo absence posttranslačně modifikačních systémů, produkuje hlavně do inkluzních tělísek.

Složitým úkolem byla pak purifikace TGBp1 z nerozpustné frakce. Využili jsme k tomu schopnost šesti histidinových zbytků vázat se na nikelnaté ionty. K aktivaci kotvy a jejímu navázání na Ni^{2+} - NTA – Sepharosu bylo nutné pH nerozpustné frakce 7,5 až 8,0, jelikož v této pH oblasti nejsou dusíky imidazolových kruhů histidinových zbytků protonizovány a tudíž jsou schopné volnými elektronovými páry interagovat s neobsazenými d-orbitaly nikelnatého iontu. Proteiny bez hexahistidinové kotvy by pak měli projít bez interakce a naopak proteiny s kotvou zůstat navázané na stacionární fázi. K eluci proteinu byl pak využit 0.5 M imidazol jako kompetitivní činidlo k histidinovým zbytkům eluovaného proteinu. Výsledkem by měl být purifikovaný TGBp1, což ale SDS-PAGE analýza jednotlivých frakcí chromatografie neprokázala. Důvodem mohla být nedokonalá expozice hexahistidinové kotvy a tedy minimální interakce se stacionární fází, což jsme vyloučili použitím vysoce denaturačního prostředí 8 M močoviny ve vzorku a v chromatografických roztocích. Dále z výsledků SDS-PAGE analýzy bylo zřejmé, že eluát byl kontaminován bakteriálními proteiny, ačkoliv byl použit 0,5 M NaCl, který bránil elektrostatickým interakcím nežádoucích proteinů s matricí, a také 50 mM imidazol v promývacím pufru B, který by měl uvolnit kontaminanty z matrice. Protože získaný protein TGBp1 nebyl homogenní, nebyl použit pro přípravu polyklonální protilátky proti TGBp1.

Pro produkci polyklonální protilátky proti rekombinantnímu TGBp1 byl antigen získán izolací po elektroforetickém rozdělení nerozpustné frakce na 12% SDS polyakrylamidovém gelu. Proužky odpovídající TGBp1 byly vyřezány skalpelem a nejdříve drceny ve třecí míse v kapalném dusíku. Polyakrylamidový gel znesnadňoval emulgaci v PBS+T, ale nakonec byly připravené a zamražené jednotlivé alikvoty pro imunizaci. Imunizace probíhala 80 dní s přestávkou 21 dní mezi jednotlivými aplikacemi upraveného

antigenu. Byl proveden částečný odběr po čtvrté dávce a po 14ti dnech od poslední dávky došlo k úplnému vykrvení.

Připravená protilátka reagovala s homologním antigenem jak v PTA ELISE, tak v metodě Western blot. Reakce s PMTV infekčním rostlinným materiálem proběhla v metodě Western blot, ale v PTA ELISE v daném ředění nereagovala, ale ani nevykazovala žádný nespecifický signál. Tyto výsledky získané pro TGBp1 byly srovnatelné s předešlými výsledky získanými pro protilátku připravenou proti rekombinantnímu PMTV kapsidovému proteinu CP.³

Lepší reaktivitu protilátky ve Western blotu lze vysvětlit tím, že daná metoda má v porovnání s ELISA nižší detekční limit. Protilátka byla připravena proti denaturovanému TGBp1, který byl částečně purifikován elektroforeticky, dá se tedy předpokládat, že i při reakci s rostlinným materiálem detekuje přednostně nekonformační epitopy antigenů, které vznikají při jeho elektroforetickém rozdělení, tzv. neotypy. Získaná protilátka má tedy vzhledem k povaze použitého antigenu velmi dobrou účinnost a bude moci být využívána nejen pro zpřesnění detekce PMTV, ale i pro další studium životního cyklu tohoto patogenu.

Využití rekombinantních proteinů je atraktivní přístup při přípravě protilátek proti rostlinným virům, které se v infikovaných rostlinách vyskytují v nízkých koncentracích a obtížně se purifikují. Na druhé straně se však využití protilátek proti strukturním rekombinantním proteinům v diagnostických testech někdy jeví jako neúčinné v rozeznávání jejich nativních epitopů.⁴² Existují proto alternativní detekční techniky jako TBIA nebo DIBA – ELISA, díky kterým se dá těmto těžkostem předejít.⁴³

Detekce PMTV v infikovaném rostlinném materiálu byla provedena také pomocí metody IC RT PCR. Tato metoda se ukázala být velmi účinná, jelikož byl PMTV nejdříve koncentrován na pevném povrchu použitím polyklonální protilátky proti kapsidovému proteinu CP. Pak byl cíleně vybrán žádaný úsek PMTV genomu a pomocí RT PCR přepsán do cDNA, která byla dále replikována pomocí PCR, čímž se účinnost detekce PMTV mnohonásobně zvýšila. Výhodou této metody je také nulové pozadí, protože si můžeme pomocí primerů vymezit jakýkoliv úsek PMTV genomu, který chceme v rostlině detekovat, a nebo studovat jeho výskyt v různých částech hostitele. Nevýhodou je, že u studovaného viru musíme znát jeho genom a že ze získaného výsledku pomocí elektroforézy v agarosovém gelu nelze přímo určit koncentraci PMTV partikulí v infikovaném rostlinném pletivu.

Posledním úkolem mé práce bylo pokusit se dokázat vzájemnou interakci mezi dvěma molekulami TGBp1 proteinu a dále interakci mezi kapsidovým proteinem CP a

proteinem TGBp1. Z literatury je známo, že několik molekul TGBp1 proteinu kooperativně obaluje a stabilizuje RNA a tvoří tak ribonukleoproteinové komplexy důležité pro transport PMTV genomu z buňky do buňky hostitele. Můžeme tedy očekávat, že molekuly tohoto proteinu spolu interagují v rámci spolupráce při mezibuněčném transportu a to hlavně při „přetahování“ virové RNA přes PD do sousední buňky.¹⁸ Far Western blot jsme však se dvěma TGBp1 proteiny neprováděli, protože v našem uspořádání nebylo možné tuhle interakci prokázat, jelikož polyklonální i antiHis protilátka by detekovaly TGBp1 jak bez interakce, tak při interakci s druhou molekulou TGBp1. Vhodné by bylo připravit si TGBp1 značený jinak než hexahistidinem, nebo pokusit se tuto interakci prokázat kvasinkovým dvouhybridním systémem.²³

Interakci mezi kapsidovým proteinem CP a proteinem TGBp1 se nám prokázat pomocí metody Far Western blot podařilo. Na počátku jsme v rámci této metody používali pro rozdělení nerozpustné frakce kapsidového proteinu CP metodu SDS-PAGE. Nejdříve jsme si vyzkoušeli, jaké množství obou nerozpustných frakcí budeme v této metodě používat, abychom zamezili tvorbě vysokého pozadí a získané výsledky byly relevantní. Tento přístup byl nutný, protože oba proteiny jsme používali ve formě solubilizovaných nerozpustných frakcí, a proto se dalo očekávat vysoké pozadí metody. Interakce mezi CP a TGBp1 proteiny byla potvrzena, protože výběrem negativních kontrol jsme postupně vyloučili veškeré možné interferující reakce. Jednou z důležitých negativních kontrol byla interakce mezi CP a nerozpustnou frakci bakteriální exprese s prázdným pQE-32, kterou jsme detekovali polyklonální protilátkou proti TGBp1. Bylo zjištěno, že CP s bakteriálními proteiny v uvažované oblasti neinteraguje.

Dále jsme předpokládali, že v prostředí bez SDS by mohl být CP lépe nebo jiným způsobem svinutý a tak pro interakci s TGBp1 dostupnější. Proto jsme provedli elektroforézu za nativních podmínek. U tohoto provedení elektroforézy však nastaly potíže s kontrolní detekcí CP pomocí komerční anti - His protilátky. Tento fakt se dá vysvětlit tím, že v prostředí bez SDS není expozice hexahistidinu dostatečná pro detekci touto protilátkou, zatímco denaturující podmínky expozici hexahistidinu naopak podpoří. Vyzkoušeli jsme proto detekci CP pomocí polyklonální protilátky proti PMTV a monoklonální protilátky proti PMTV. Jako nejvhodnější se ukázalo použití polyklonální protilátky, monoklonální protilátka v tomto uspořádání kapsidový protein CP rovněž nedetekovala.

Největší potíží u nativní elektroforézy bylo také méně dokonalé zaostření jednotlivých proteinových zón, ačkoliv byla aparatura po celou dobu elektroforézy chlazená,

které pak činilo výsledky méně jasné a s vysokým pozadím. Byl vyzkoušen 10% a 8% spodní rozdělovací gel, lepší výsledky jsme získali použitím 10% gelu.

Konečné výsledky potvrzují výskyt protein-proteinové interakce mezi CP a TGBp1. Je však potřeba zjistit, jestli je skutečně tato interakce jenom jednostranná, nebo by proběhla i naopak a to tedy i v případě, když bychom pomocí SDS-PAGE nebo nativní elektroforézy rozdělili nerozpustnou frakci TGBp1 a pokusili se o interakci s CP. Z našich výsledku je v této souvislosti důležitý poznatek, že nerozpustná frakce TGBp1 se pomocí nativní elektroforézy špatně dělí a TGBp1 není dobře detekován, výsledek je nejasný a tudíž nevhodný pro provádění Far Western blotu. Dále je také nutné zmínit se, že oba proteiny neměly svůj přirozený charakter, protože byly připraveny prokaryotickým systémem.

Metody, které jsem ve své práci používala, patří mezi standardní, v naší laboratoři již delší dobu používané a osvědčené. Při produkci TGBp1 proteinu se nejlépe osvědčily bakterie *E.coli* kmene TG1. Největším problémem byla Ni^{2+} chelatační chromatografie, která se v naší laboratoři teprve zaváděla. Taky jsme zaváděli metodu Far Western blot. U této metody je nejdůležitější při prokazování interakce mezi dvěma proteiny zvážit a zajistit veškeré možné negativní a pozitivní kontroly

V následujících pokusech se naše laboratoř zaměří na studování protein-proteinových interakcí některých proteinů PMTV metodou kvasinkového dvojhybridního systému, která je v tomto případě mnohem výhodnější, protože proteinové interakce jsou pozorovány na úrovni regulace exprese reportérových genů u kvasinek.

6. Souhrn

Byl připraven vektor pQE-32 obsahující oblast kódující protein složený z části TGBp1 proteinu zkráceného na 3' konci a hexahistidinu.

Byla provedena exprese TGBp1 v bakteriích *E. coli* TG1 ve větším měřítku.

Bylo zjištěno, že purifikace TGBp1 pomocí Ni²⁺ chelatační chromatografie nevedla ke získání homogenního proteinu.

Byla připravena polyklonální protilátka třídy IgG proti rekombinantnímu elektroforeticky izolovanému TGBp1 proteinu.

Byla studována aktivita připravené protilátky reakcemi s PMTV infekčním rostlinným materiálem a homologním antigenem metodou Western blot.

Bylo zjištěno, že izolovaná IgG frakce z antiTGBp1 antiséra v daném ředění a uspořádání PTA ELISA reaguje specificky s homologním antigenem, ale není účinná pro detekci PMTV antigenů v rostlinném materiálu. Protilátka neposkytuje žádnou nespecifickou odezvu s kontrolními rostlinnými vzorky.

Byla provedena detekce PMTV pomocí metody IC RT PCR.

Byla zjištěná protein-proteinová interakce mezi kapsidovým proteinem CP a proteinem TGBp1 mop-top viru bramboru metodou Far Western blot.

7. Seznam použité literatury

- 1/ Rosypal, S.& kol.: Replikace a exprese virového genomu v rostlinné buňce, v knize Úvod do molekulární biologie (díl čtvrtý), Brno, 909 - 910 (2002)
- 2/ Žemla, J., Čiampor, F., Labuda, M.: Vírusy rostlín, v knize Špeciálna virológia, (Slovak Academy Press), Bratislava, str. 155 - 192 (1998)
- 3/ Čeřovská, N., Moravec, T., Rosecká, P., Dědič, P., Filigarová, M.: J. Phytopathology 151, 195 - 200 (2003)
- 4/ <http://www.umext.maine.edu/onlinepubs/htmlpubs/2437.htm>
- 5/ <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=389&figno=01>
- 6/ <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=389&figno=03>
- 7/ <http://www.scri.sari.ac.uk/SCRI/nmsruntime/saveasdialog.asp?IID=1694&sID=463>
- 8/ Torrance, L.: Pomoviruses, v knize Encyclopaedia of Virology (Second Edition), Academic Press, London, 1361 - 1364 (1999)
- 9/ Sandgren, M., Savenkov, E.I., Valkonen, J.P.T.: Arch. Virol. 146, 467 - 477 (2001)
- 10/ Kallender, H., Buck, K.W., Brunt, A.A.: J. Pl. Path. 96, 47 - 50 (1990)
- 11/ Savenkov, E.I., Sandgren, M., Valkonen, J.P.T.: J. Gen. Virol. 80, 2779 - 2784 (1999)
- 12/ Savenkov, E.I., Germundsson, A., Zamyatin Jr., A.A., Sandgren, M., Valkonen, J.P.T.: J. gen. Virol. 84, 1001 - 1005 (2003)
- 13/ Scott, K.P., Kashiwazaki, S., Reavy, B., Harrison, B.D.: J. Gen. Virol. 75, 3561 - 3568 (1994)
- 14/ Narayanasamy, P.: Plant-Viral Pathogen Interactions, v knize Immunology in Plant Health and Its Impact on Food Safety, (Food Products Press), New York, str. 165 - 195 (2005)
- 15/ Baneyx, F.: Curr. Opin. Biotechnol. 10, 411 - 421 (1999)
- 16/ Sokmen, M.A., Barker, H., Torrance, L.: Ann. Appl. Biol. 133, 55 - 63 (1998)
- 17/ McGeachy, K.D., Barker, H.: Mol. Plant-Microbe Interact. 13, 125 - 128 (2000)
- 18/ Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K., Schaad, M.C.: Plant Cell 8, 1669 - 1681 (1996)
- 19/ Šetlík, I., Seidlová, F., Šantrůček, J.: Organogeneze, v elektronických skriptech Fyziologie rostlin: www.bf.jcu.cz/structure/katedry/kfyziologie/pre/11.pdf

- 20/ Chen, M.H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K., Citovsky, V.: *EMBO J.* 19, 913 - 920 (2000)
- 21/ Morozov, S.Yu., Solovyev, A.G.: *J. Gen. Virol.* 84, 1351 - 1366 (2003)
- 22/ Zamyatnin Jr., A.A., Solovyev, A.G., Savenkov, E.I., Germundsson, A., Sandgren, M., Valkonen, J.P.T., Morozov, S.Yu.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 921 - 930 (2004)
- 23/ Cowan, G.H., Lioliopoulou, F., Ziegler, A., Torrance, L.: *Virology* 298, 106 - 115 (2002)
- 24/ Haupt, S., Cowan, G.H., Ziegler, A., Roberts, A.G., Oparka, K.J., Torrance, L.: *The Plant Cell* 17, 164 - 181 (2005)
- 25/ Gorshkova, E.N., Erokhina, T.N., Stroganova, T.A., Yelina, N.E., Zamyatnin, A.A., Kalinina, N.O., Schiemann, J., Solovyev, A.G., Morozov, S.Yu.: *J. Gen. Virol.* 84, 985 - 994 (2003)
- 26/ Germundsson, A.: Transgenic Resistance to PMTV and PVA Provides Novel Insights to Viral Long-Distance Movement: Doctoral thesis Faculty of Natural Resources and Agricultural Science Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Department of Plant Biology and Forest Genetics, str. 9-10, 16 - 20 (2005)
- 27/ Lukhovitskaya, N.I., Yelina, N.E., Zamyatnin, Jr. A.A., Schepetilnikov, M.V., Solovyev, A.G., Sandgren, M., Morozov, S.Yu., Valkonen, J.P.T., Savenkov, E.I.: *J. Gen. Virol.* 86, 2879 - 2889 (2005)
- 28/ Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning/ A Laboratory Manual* (Second edition), Nolan, Ch., Ed., Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Barbor, New York (1989)
- 29/ Westermeier, R.: *Electrophoresis in Practice* (Second Edition), VCH A Wiley Copany, Německo (1997)
- 30/ Kmoníčková, J., Diplomová práce, PřF UK, Praha 2005
- 31/ Lee, D.H., Lee, Ch.B.: *Plant Science* 159, 75 – 85 (2000)
- 32/ Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 – 254 (1976)
- 33/ Katalog a návod firmy Qiagen (2001)
- 34/ Steinbuch, M., Audran, R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 279 – 284 (1969)
- 35/ Zouhar, J.: *Chem. Listy* 93, 683 - 685 (1999)
- 36/ Smith, M.C., Furman, T.C., Ingolia, T.D., Pidgeon Ch.: *J. Biol. Chem.* 263, 7211-7215 (1988)

- 37/ Paunovic, I., Schulin, R., Nowack, B.: J. Chromatography A 1100, 176–184 (2005)
- 38/ Novák, F.: Imunochemické metody, v knize Klinická biochemie, (Karolinum), Praha, str. 75-107 (2002)
- 39/ Hall, R.A: Studying Protein-Protein Interactions via Blot Overlay or Far Western Blot, v knize Protein-Protein Interactions, (Humana Press), Atlanta, 167 – 174 (2004)
- 40/ <http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=BDAE338C-43BF-4FBA-B7D3-56C477BAEB9B>
- 41/ Nielsen, S.L., Nicolaisen, M.: Arch. Virol. 148, 381-388 (2003)
- 42/ Čerovská, N., Filigarová, M., Pečenková, T.: J. Phytopathology 154, 1-6 (2006)
- 43/ Korimbocus, J., Preston, S., Danks, C., Barker, I., Coates, D., Boonham, N.: J. Phytopathology 150, 488-494 (2002)

