	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

## ZKOUŠENÍ SADBY A ODRŮD BRAMBOR NA PŘÍTOMNOST VIRŮ METODOU ELISA

### 1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost bramborových virů. Jedná se o svinutku listovou (leafroll virus, LR), virus Y, X, A, M a S.

Metodika popisuje obecné zásady pěstování rostlin z bramborových hlíz ve skleníku a postup pro laboratorní zkoušku.

### 2 Princip

Postup je založen na tzv. ELISA metodě (enzyme-linked immunosorbent assays) využívající specifické reakce antigen – protilátka, přičemž antigenem je virus. V případě přítomnosti viru ve šťávě rostliny bramborové natě, která se testuje, dojde k jeho navázání na protilátku konjugovanou enzymem alkalickou fosfatázou a po následné aplikaci substrátu 4-nitrofenylfosfát k uvolnění žlutého 4-nitrofenolu. Detekci je možné provést vizuálně nebo spektrofotometricky při 405 nm. Jestliže virus není přítomen, nedojde k vazbě antigen-protilátka a tudíž ani k barevné reakci.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Protilátky pro jednotlivé viry, imunoglobulin (IgG a IgG-konjugát) pro imunoanalýzu (výrobce Bioreba, Prime Diagnostics, Roche, Adgen, Adgia, Sanofi, Boehringer atd.). Protilátky se ředí podle návodu výrobce.

2 Dezinfekční roztok.

Používá se pro dezinfekci nádob, nástrojů, rukavic, hlíz, obalů, stolů, odpadních vod apod., při testování karanténních bakterií a výsadbě ve skleníku. Podle okolností se volí některé z těchto činidel, případně i další s podobným účinkem:

manganistan draselný č. nebo p. a.,  $\text{KMnO}_4$ , 0,1% vodný roztok,


etylalkohol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , (70 – 80)% vodný roztok,

chloramin, ředí se podle pokynů výrobce,

Sekusept, ředí se podle pokynů výrobce,

Ajatin, ředí se podle pokynů výrobce,

Savo, ředí se podle pokynů výrobce.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

### 3 Zásobní roztok kyseliny gibberelové.

Používá se pro přípravu pracovního roztoku A (4).

Technická kyselina gibberelová (GA 3) 0,5 g  
Metanol 10 ml.

Příprava: V kádince se v 10 ml metanolu rozpustí 0,5g kyseliny gibberelové a dokonale se rozmíchá. Skladuje se v chladničce.

### 4 Pracovní roztok A kyseliny gibberelové.

Používá se pro přípravu pracovního roztoku B (5).

Zásobní roztok (3) 1 ml

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se pipetuje 1 ml zásobního roztoku kyseliny gibberelové (3) a vodou (15) se doplní po značku. Přípravuje se vždy čerstvý.

### 5 Pracovní roztok B kyseliny gibberelové.

Používá se k namáčení vykrájených řízků pro přerušení dormance, připravuje se vždy čerstvý. Pro namáčení řízků se může použít třikrát po sobě, pak se připraví čerstvý.

Pracovní roztok A (4), (10 – 100) ml/l, v závislosti na velikosti klíčků. Koncentrovanější roztok se používá v období po sklizni, méně koncentrovaný v jarních měsících v období rostoucí enzymové aktivity hlízy.

Příprava: Do 1000ml kádinky se pipetuje nebo pomocí odměrného válce odměří potřebné množství pracovního roztoku A (4) a doplní do 1 litru vodou (15) a promíchá.

### 6 Rindit. Používá se k přerušení vegetačního klidu brambor místo kyseliny gibberelové. Je zdraví škodlivý.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 636 ml etylenchlorhydrinu technického, 273 ml dichlorethanu technického a 91 ml tetrachlormetanu technického. POZOR! Jednotlivé chemikálie i roztok jsou zdraví škodlivé.


### 7 Potahovací pufr (Coating Buffer).

Používá se k „potahování“ mikrotitračních destiček specifickým IgG. POZOR! Obsahuje velmi toxický azid sodný. Skladuje se v chladničce (1 – 2) měsíce.

Příprava: 1,59 g uhličitanu sodného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g hydrogenuhličitanu sodného NaHCO<sub>3</sub> a 0,2 g azidu sodného NaN<sub>3</sub> se rozpustí v kádince asi ve 100 ml vody (15). Po úplném rozpuštění a dokonalém rozmíchání se kvantitativně převedou do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku vodou (15), upraví se pH na 9,6 pomocí 3 mol/l roztoku NaOH nebo koncentrované HCl.

### 8 Zásobní roztok pro přípravu pufrů, PBS.

Používá se k přípravě vymývacího, extrakčního a konjugátového pufru. POZOR! Obsahuje velmi toxický azid sodný. Skladuje se v chladničce (1 – 2) měsíce. Jedná se o značně nasycený roztok, obtížně se rozpouští, v chladničce může dojít k rekrystalizaci. Pomůže mírné zahřátí a intenzivní míchání.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

Příprava: 80 g chloridu sodného NaCl, 2 g dihydrogenfosforečnanu draselného  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11,5 g hydrogenfosforečnanu sodného  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 g chloridu draselného KCl a 2 g azidu sodného  $\text{NaN}_3$  se rozpustí se v 1000ml kádince asi v 900ml vody (15). Po úplném rozpuštění a dokonalém rozmíchání se kvantitativně převedou do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku vodou (15).

#### 9 Vymývací pufr (Washing Buffer).

Používá se k vymývání mikrotitračních destiček po inkubaci potahovacího roztoku, extraktu a konjugátu. **POZOR!** Obsahuje velmi toxický azid sodný. Skladuje se v chladničce (1 – 2) měsíce.

Příprava: Do 1000ml kádinky se odměří pomocí pipety nebo odměrného válce 100 ml PBS zásobního (8) a 0,5 ml Tweenu 20, promíchá a doplní vodou (15) do 1 litru.

#### 10 Extrakční pufr základní.

Používá se k extrakci antigenu z rostlinných pletiv nebo k ředění vylisované buněčné šťávy. Dojde-li v průběhu skladování k zakalení, dále se nepoužívá.

Příprava: Do 1000ml kádinky se odměří pipetou 100 ml PBS zásobního (8) a 0,5 ml Tweenu 20, přidá se 20 g PVP (Polyvinylpyrrolidone, MW 24000) rozpustí se v asi 900 ml vody (15), po úplném rozpuštění a dokonalém rozmíchání se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku vodou (15). pH se upraví na 7,4 pomocí 3M roztoku NaOH nebo koncentrované HCl.

#### 11 Konjugátový pufr.

Používá se k ředění konjugované specifické protilátky. **POZOR!** Obsahuje velmi toxický azid sodný. V případě výskytu zákalu během skladování se dále nesmí používat.

Příprava: Do 1000ml kádinky se odměří pipetou 100 ml PBS zásobního (8) a 0,5 ml Tweenu 20, přidá se 20 g PVP, 2 g BSA a 0,2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , rozpustí asi v 900 ml vody (15), po úplném rozpuštění a dokonalém rozmíchání se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku vodou (15). Upraví se pH na 7,4 pomocí 3 mol/l roztoku NaOH nebo koncentrované HCl.


#### 12 Substrátový pufr.

Používá se k ředění p-nitrofenyl fosfátu. **POZOR!** Obsahuje velmi toxický azid sodný. Skladuje se v chladničce (1 – 2) měsíce.

Příprava: Do 1000ml kádinky se odměří odměrným válcem 97 ml diethanolaminu, min. 99%,  $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ , rozpustí asi v 900 ml vody (15) a přidá se 0.2g azidu sodného  $\text{NaN}_3$ , rozmíchá a kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky, doplní po značku koncentrovanou HCl (16) se upraví pH na 9,8.

#### 13 p-nitrofenyl fosfát, disodná sůl, hexahydrát (PNPP) pro enzymovou imunologii, min 98%, 1 g/l.

Příprava: Bezprostředně před použitím se 1 g PNPP dokonale rozpustí v 1000 ml substrátového pufru (12). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0


- 14 Roztok pro zastavení reakce, NaOH, c= 120 g/l .  
Příprava: V 1000ml kádince nebo odměrné baňce se asi ve 400 ml vody (15) rozpustí 120 g NaOH, rozpustí se a po vytemperování doplní po značku.
- 15 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 16 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná

### Poznámky

- 1 *Rindit obsahuje potenciální karcinogen dichloretan.*
- 2 *PNPP je teplo a světlocitlivá látka. Při přípravě pufru je třeba výrazně omezit vliv světla. Je nezbytné ji uchovávat v tmavé nebo pro světlo nepropustné nádobě. Při aplikaci je pak nevyhnutelné ji chránit před přímým slunečním světlem.*

### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Lis na rostliny.
- 2 Promývačka mikrodestiček.
- 3 Spektrofotometr pro čtení mikrodestiček.
- 4 pH metr.
- 5 Chladnička.
- 6 Mrazicí box.
- 7 Biologický termostat.
- 8 Mikropipeta 8-kanálová, (50 – 200) µl a špičky.
- 9 Mikropipeta 1-kanálová a špičky.
- 10 Dávkovač roztoků.
- 11 Sterilní, polystyrenové mikrotitrační destičky - 96 jamek, víčka (nejlépe plastová) na mikrotitrační destičky, mikrozkušavky (nejlépe plastové).
- 12 Vykrajovací půlkulovitá lžička
- 13 Analytické váhy s přesností nejméně 0,001 g.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

## 5 Postup

### 5.1 Vzorek

Jako vzorky pro testování jsou v závislosti na roční době používány hlízy nebo nat' brambor. Hlízy nesmějí být poškozeny, musejí být bez známek plísně a hniloby. Nat' nesmí být výrazně seschlá a zažloutlá a musí být bez přítomnosti plísně.

Zkušební vzorek pro posklizňovou zkoušku musí mít minimálně 110 hlíz, pro revizní zkoušku má vždy 2 části po 110 hlízách.

Vzorek ve formě hlíz se umístí do skladu s vhodnými podmínkami pro skladování brambor (stálá nízká teplota, vlhkost vzduchu, větrání, tma, eliminace škůdců), kde může být uložen maximálně po dobu trvání vegetačních schopností hlízy. Je vhodnější ho zpracovat dříve, s ohledem na stav obdržených hlíz a jejich vysychání nebo ihned po doručení. Vzorky ve formě natě se zpracovávají ihned po doručení.

Se vzorky se manipuluje šetrně, aby nedošlo k poškození hlíz.

### 5.2 Pracovní postup

#### 5.2.1 Posklizňová zkouška – skleníková část

##### Pěstební substrát


Používá se kroupený substrát např. Rašelina Soběslav a.s., který je namíchaný ze 3 dílů rašeliny a 1 dílu říčního písku, s přídavkem mletého vápence, aby pH substrátu bylo 5,9 až 6,2.

##### Poznámky

- 3 *Substrát je možno recyklovat. Recyklace substrátu: Po vyvezení použitého substrátu ze skleníku se kompostuje po dobu 2 let. Takto vzniklý kompost se pak mísí s novou rašelinou v poměru (1 : 1) m/m, na polovinu se sníží přídavek písku a vápence. Namíchaná směs se nechá min. 5 týdnů uležet. Poté se dezinfikuje propařením horkou párou min. 3 h. Propařený substrát se před použitím nechá uležet min. 5 týdnů. Skladování je možné na volném prostranství. Před výsadbou je nutno nechat substrát vytemperovat min. na 15 °C.*

##### Vykrajování řízků z hlíz pro výsadbu

Na hlíze se najde vhodné očko co nejbliže její korunce, vydesinfikovanou speciální půlkulovitou lžičkou se vykrojí očko s co největším segmentem dužiny asi (2 × 2) cm. Po každém takto vykrojeném řízku se vykrajovací lžička namočí do desinfekčního roztoku (2), který se mění po vykrojení maximálně dvou vzorků. Vykrajují se jen zdravá očka, pokud je na řezu náznak hniloby, řízek se vyřadí a vykrojí nový, podle okolností z té samé nebo jiné hlízy vzorku.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

### Přerušení vegetačního klidu (dormance)

Pro přerušení vegetačního klidu hlízy se používá pracovní roztok B kyseliny giberelové (5), koncentrovanější se používá po sklizni a u odrůd s tuhou dormancí, méně koncentrovaný v jarních měsících. Giberelin se nesmí aplikovat na naklíčené hlízy, poškozují klíčky a je účinný pouze na čerstvém řezu, ne přes slupku nebo zaschlý řez.

Čerstvě vykrojené řízky v nekovové misce se zalijí na (10 – 15) min pracovním roztokem B kyseliny giberelové (5), pak se vyjmou, uloží na vhodnou podložku a do druhého dne nechají okapat a oschnout. Roztok (5) lze použít maximálně třikrát, pak je nutno připravit čerstvý. Za podmínky vyloučení možných zdravotních rizik, je možno k přerušení dormance použít preparaci v parách rinditu (6):

Do vzduchotěsného prostoru (dobře uzavřený sud, igelitový pytel, komora apod.) se umístí velká plochá nádoba s rinditem a nad ní hlízy tak, aby nepřišly do styku s tekutinou, ale jen s parami rinditu. Dávka rinditu je při zcela naplněném prostoru (0,5 – 1) ml/1 kg hlíz, teplota při preparaci kolem 24 °C, doba (24 – 48) h podle stupně dormance hlíz (brzy po sklizni je doba preparace delší) a odrůdy. Před další manipulací s hlízami je nezbytné páry rinditu dokonale odvětrat. Preparované hlízy se nakličují v zatemnělé místnosti při relativní vlhkosti vzduchu nad 90 % a při teplotě (20 – 24) °C.

V podzimní etapě zkoušek se máčejí všechny vzorky, jestliže již zřetelně neklíčí, v jarní etapě jen odrůdy s tuhou dormancí, pokud již zřetelně neklíčí.

### Výsadba řízků


Na stoly ve skleníku se položí pás plastové folie a zahne se tak, aby se vytvořila „vana“. Na folii se naveze substrát a rozhrne podle výšky okrajů stolů na výšku vrstvy minimálně 4 cm. Na vrstvu substrátu se přiloží šablona o velikosti sponu minimálně (4,5 × 4,5) cm. Každý řízek se lehkým tlakem prstů zamáčkne očkem vzhůru do středu oka šablony a zasype vrstvou substrátu vysokou (2 – 3) cm, která se urovná podle výšky okraje stolu, šablona se pak odstraní. Řízky s náznakem hniloby se vyřadí a zlikvidují. Mezi dvěma vzorky se musí vynechat min. 5 cm a vzorky označit zapíchnutou jmenovkou s evidenčním číslem. Údaje o výsadbě (datum výsadby, počet a čísla vzorků) je nutné zaznamenávat.

Substrát se naváží na stoly krátce před výsadbou nebo již rozvrstvený substrát se průběžně zavlažuje, jinak přeschne a po výsadbě špatně přijímá vodu, je-li substrát na skládce zmrzlý musí se před výsadbou nechat rozmraznout a nechat vytemperovat na min. 15 °C.

### Ošetřování vysázených vzorků

Teplota ve skleníku udržuje v rozmezí (12 – 20) °C, za slunečného počasí může být teplota vyšší než 20 °C, v průběhu klíčení a vzcházení je třeba podle možností teplotu udržovat na optimálních (20 – 22) °C ve dne a (18 – 20) °C v noci. Jsou-li rostliny vzešlé, je vhodné snížit teplotu podle možností na optimálních (18 – 20) °C ve dne a 15 °C v noci.

První záливka se provede 2 dny po výsadbě, musí být vydatná a opakovaná, jinak dojde ke zpoždění vzcházení. Je nutné rovnoměrně provlhnout celou výšku vrstvy substrátu. Dále se zalévá, když osychá povrch substrátu, první dny lze zalévat postřikem, později s nárůstem listů podmokem jen mezi rostliny, aby voda nepřišla na listy rostlin. Zalévají se i vzorky

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

ostříhané pro laboratorní zkoušku, dokud se neoznačí jako vzorek určený k likvidaci. Při nižších teplotách se zalévá méně, při vyšších teplotách se větrá a stíní.

Objeví-li se na povrchu substrátu povlak plísně, ošetří se vhodným fungicidem. Při výskytu hmyzích škůdců se ošetřuje pesticidy jen v případě, že je rostliny třeba uchovat pro pozdější opakovanou zkoušku.

Nedostatek tepla a nadbytek vláhy zvyšuje riziko hnilobných procesů, vysoká teplota a nadbytek vláhy riziko rozvoje plísně bramborové.

### 5.2.2 Posklizňová zkouška - laboratorní část

#### Příprava roztoků, evidence a ověření účinnosti protilátek

Pro imunoanalytickou zkoušku metodou ELISA se užívají tyto roztoky:

potahovací pufr (7), pH 9,6,  
pufr zásobní (PBS) (8),  
vymývací pufr (9),  
extrakční pufr (10), pH 7,4,  
konjugátový pufr (11), pH 7,4,  
substrátový pufr (12), pH 9,8.

Pufry lze skladovat (1 – 2) měsíce v zakryté nádobě při (4 – 8) °C. Před použitím se pufry vytemperují na pokojovou teplotu. Zakalený pufr již nelze použít.


Každá nová dodávka protilátek se zaeviduje s uvedením druhu, výrobce, šarže, množství, ředění a expirační doby a průběžně se odepisují spotřebovaná balení protilátek a sleduje jejich expirační doba. Ta platí pro nenačatá balení, je proto vhodné ho po otevření co nejdříve spotřebovat.

U každé nové dodávky nebo po delší přestávce ve zkoušení nebo po uběhnutí expirační doby je nutno ověřit účinnost protilátek (pozitivní kontrolou).

#### Potahování a skladování mikrotitračních destiček

Mikrotitrační destičky se po vyjmutí z obalu označí zkratkou viru a datem potahování. Připraví se potahovací roztok (7) s příslušnou protilátkou IgG, jejíž koncentrace je uvedena v pokynech výrobce, 10 ml na 1 mikrodestičku. Je možno testovat současně více virů na jedné mikrotitrační destičce. V tom případě se rozpustí v potahovacím pufru (7) více druhů protilátek IgG, v množství odpovídajícím zkoušení jednoho viru samostatně a opět v koncentraci danou výrobcem protilátky.

Roztokem potahovacího pufru s IgG se naplní jamky mikrotitrační destičky, vždy (0,100 – 0,200) ml na 1 jamku, pak se zakryjí a inkubují 4 h v termostatu při (30 ± 1) °C nebo přes noc v chladničce při (4 – 8) °C. Inkubaci v chladničce lze prodloužit na více dní, pokud se zabrání odpařování roztoku z jamek (účinné zakrytí). Při tomto způsobu lze předpokládat účinnější navázání IgG. Po inkubaci se destičky vymyjí způsobem uvedeným v kapitole „Vymývání mikrodestiček“ (3 cykly).

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

Po vymytí se destičky mohou ihned používat nebo po oschnutí uložit dobře zakryté k pozdějšímu použití do mrazicího boxu (–15 až –20 °C). Zabalené v mikroténovém sáčku je lze v mrazicím boxu skladovat až 6 měsíců.

### Poznámky

- 4 *Před uložením potažených destiček do mrazicího boxu se do jamky pro pozitivní kontrolu může aplikovat pozitivní kontrola příslušného viru. Běžně se pozitivní kontrola příslušného viru aplikuje současně se vzorky. Jednou rozmražená destička se již znovu nezmrazuje.*

### Vymývání mikrodestiček

Vymývání se provádí vždy po inkubaci potahovacího roztoku (3 cykly), extraktu (3 cykly) a roztoku konjugátu (4 cykly). Předchozí roztok se odstraní odsátím nebo energickým vyklepnutím. Vymývání je vhodné provádět na promývačce s odsáváním.

Zásobní lahev se naplní vymývacím pufrem (9) nebo vodou (15) s Tweenem, přístroj se uvede do chodu a nastaví potřebný objem plnění. Před vlastním vymýváním je nutné propláchnout celý systém přístroje a pak jej dokonale naplnit vymývacím pufrem (9), pufrem se také naplní až po okraj jamky na mikrodestičkách. Vymývací cyklus se opakuje tolikrát, kolikrát je předepsáno, viz výše. Během práce je důležitá kontrola správného plnění a odsávání, v případě potřeby se pročistí kanálky. Po každém použití se musí přístroj důkladně propláchnout vodou (15).


Vymývání bez promývačky lze použít po prověření, že nedochází ke zhoršení kvality testu, promývá se vodou (15) s Tweenem. Všechny jamky se naplní mírným proudem stříčkou po okraj a energickým třepnutím se vyprázdní. Tento cyklus se opakuje tolikrát, kolikrát je předepsáno, viz výše. Opět je třeba dbát na to, aby se v každém cyklu skutečně naplnila a vyprázdnila každá jamka (kontrolovat zejména jamky v rozích mikrodestičky). Různé postupy vymývání lze kombinovat (pozn. 5).

Po skončení vymývání se zbytky promývacího pufru důkladně vyklepou do čistého savého materiálu a bez většího prodlení aplikuje další roztok.

### Poznámky

- 5 *Příliš intenzivní vymývání může odstranit komplexy navázané na stěnách jamek a snížit účinnost testu.*



 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	9
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

### Odběr vzorků rostlin pro laboratorní test

Je-li to možné, vzorky je vhodné odebírat v pořadí, v jakém byly vysázeny. Předem se posoudí, zda jsou rostliny dostatečně vzrostlé pro laboratorní zkoušku, přičemž nesmějí být mladší než 4 týdny od výsadby. Dále se posoudí, zda je počet vzešlých rostlin pro zkoušku dostatečný. Pro test celého vzorku se odebírá 92 rostlin. Minimální přípustné počty, pokud vzešlo méně rostlin, jsou pro test celého vzorku tyto:

pro 1 vzorek a	1 díl	celkem	70 rostlin	
	2 díly	celkem	130 rostlin	
	3 díly	celkem	180 rostlin	
	4 díly	celkem	220 rostlin	
	5 dílů	celkem	250 rostlin	
	6 dílů	celkem	300 rostlin	a dále vždy 50 rostlin na 1 díl.

Pokud je předepsáno testování jen 45 rostlin na díl, nesmí být počet odebraných rostlin nikdy nižší.

Rostliny se odebírají do vhodných nádob, do každé jeden vzorek. Z každé rostliny se odstříhne olistěná část stonku. Vzešlo-li z jednoho oka více stonků, odebere se jen jeden z nich. Odebírají se všechny rostliny, pokud jsou alespoň tak velké, aby bylo možné z nich bezpečně získat potřebné množství šťávy. Během trhání se nevybírají zdravé nebo naopak nemocné rostliny. Počty odebraných rostlin se poznamenají a bez prodlení dodají k dalšímu zpracování.


Nedostatečně vzrostlý vzorek se přeskočí a otrhá se později. Pokud vzorek není dostatečně vzrostlý a je zřejmé, že potřebný počet rostlin v přiměřené době nevzejde, zajistí se jeho opakovaná výsadba nebo se požádá o jeho náhradní vzorkování. Pokud je nutno opakovat test již jednou ostříhaného vzorku, je lépe nechat před dalším odběrem zbytky rostlin 1 až 2 týdny regenerovat.

### Příprava vzorku - lisování

Před vlastním lisováním rostlinné šťávy se nastaví intenzita a délka oplachování válců lisu. Je-li součástí lisu dávkovač, nejdříve se propláchne vodou (15) a následně extrakčním pufrem (10), kterým se i naplní, pak se nastaví jeho potřebný dávkovaný objem (1 – 1,5) ml. Buněčná šťáva se ředí extrakčním pufrem v poměru (1 : 10) až (1 : 20).

Připraví se vzorek nebo více vzorků určených na jednu mikrodestičku. Rostlina se vloží mezi rotující válce a zachytí se potřebné množství stékající buněčné šťávy do mikrozkuřavky. Množství extraktu je závislé na počtu testovaných virů.

Je-li rostlina malá, vloží se mezi válce lisu celá, jinak se použije jen tolik, aby se získalo potřebné množství šťávy, nejlépe starší plně vyvinutý list. Je-li rostlina tak malá, že by se z ní nezískal dostatek šťávy, přikápně se na drť mezi válci několik kapek extrakčního pufru (10). V případě potřeby lze lisovat i dvě nebo více rostlin najednou. Přitom se musí dbát, aby ve stékající šťávě byla rovnoměrně zastoupena šťáva ze všech současně lisovaných rostlin. Před vložením další rostliny mezi válce je nutno počkat, až z válců steče oplachovací voda, aby se neředila šťáva. Po vylisování rostliny nebo více rostlin najednou se spustí důkladné oplachování válců a nadávkuje ke šťávě extrakční pufr (10). Tímto způsobem se vylisuje celý

	Národní referenční laboratoř	Strana	10
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

vzorek, který musí obsahovat minimálně tolik rostlin, jak je uvedeno v předchozí kapitole. Po dolisování jednoho vzorku se válce lisu důkladně opláchnou.

Po skončení práce je nutno lisovací válce vyčistit a dávkovač propláchnout horkou vodou (15).

Z mikrozkupek se odpipetuje 150 µl čerstvé buněčné šťávy do jiných mikrozkupek, kde se naředí extrakčním pufrem v objemu 1,5 ml.

K mikrozkupek s vylisovanou šťávou jednotlivých rostlin celého vzorku se zařazuje t mikrozkupek s pozitivní kontrolou (čerstvá šťáva z rostliny bramboru napadená příslušným virem zředěná stejně jako extrakt vzorků nebo komerčně dodávaná lyofilizovaná pozitivní kontrola příslušného viru, ředěná podle pokynů výrobce) a mikrozkupek s negativní kontrolou (samotný pufr nebo šťáva prokazatelně zdravé rostliny). Počet vylisovaných rostlin se zaznamená. Doba použitelnosti buněčné šťávy s extrakčním roztokem je maximálně 3 dny. Skladování je nutné při (4 – 8) °C.

### Poznámky

- 6 *Po celou dobu práce s lisem je nezbytné dbát na bezpečnost práce, aby se ruka, vlasy, část oděvu nebo nějaký předmět nedostaly mezi rotující válce. Rukavice se nepoužívají.*

### Aplikace a inkubace extraktu

Připraví se protilátkou (IgG) potažené mikrodestičky (kap. “Potahování a skladování mikrodestiček“), na které se bude extrakt aplikovat. Pokud se užívají mikrodestičky z mrazicího boxu, nechají se předem vytemperovat na laboratorní teplotu. Extrakt se pipetuje v objemu (0,100 – 0,200) ml tak, aby nebyl větší než pipetovaný objem potahovacího pufru s protilátkou IgG příslušného viru. Zbytky extraktu v mikrozkupekách se uloží do lednice k případnému opakování zkoušky.


Mikrodestičky s přeneseným extraktem se inkubují zakryté přes noc v chladničce při (4 – 8)° C. Inkubaci je možno prodloužit i na (2 – 3) dny. Po skončení inkubace se mikrodestičky 3 × vymyjí (viz. kap. “Vymývání mikrodestiček“).

### Poznámky

- 7 *Je nutno pracovat pozorně, protože chyby při přenášení extraktu mohou vést k záměně pozic testů na destičce nebo ke vzájemné kontaminaci mezi mikrozkupekami nebo jamkami mikrodestiček.*
- 8 *Pufry nesmějí odkapávat ze špiček pipet a rozstříkavat se po stěnách jamky. Mohly by být příčinou zdánlivě pozitivních reakcí. Toto se týká zejména aplikace extrakčního pufru s buněčnou šťávou na potažené mikrodestičky.*

### Aplikace a inkubace konjugátu

V konjugátovém pufru (11) se rozpustí výrobcem předepsané množství konjugované protilátky (1). Je možno testovat současně více virů na jedné mikrotitrační destičce. V tom případě se rozpustí v konjugátovém pufru (11) více druhů příslušné protilátky IgG-konjugát, v množství odpovídajícím zkoušení jednoho viru samostatně a opět v koncentraci danou

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	11
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

výrobce protilátky. Do jamky mikrodestiček vymytých po inkubaci extraktu se pipetuje (0,100 – 0,200) ml konjugátového pufru (11). Hladina konjugátového roztoku nesmí být vyšší než potažená výška jamky potahovacím roztokem s IgG (možnost výskytu falešně pozitivních reakcí).

Mikrodestičky s konjugátovým pufrem inkubujeme těmito možnými způsoby:

- přes noc v chladničce při (4 – 8) °C, inkubaci lze prodloužit na 2 až 3 dny,
- v termostatu 5 h při (30 ± 1) °C nebo 4 h při (34 ± 1) °C.

Je nezbytné zabránit odpařování roztoku přikrytím mikrodestiček víčky, jinak dochází k tzv. „okrajovému efektu“ (nespecifické reakce).

Po skončení inkubace se mikrodestička s konjugátovým pufrem 4 × promyje (viz kap. „Vymývání mikrodestiček“).

### **Aplikace a inkubace enzymového substrátu**

V substrátovém pufre se těsně před použitím dokonale rozpustí a rozmíchá předepsané množství PNPP (13). Substrátovým pufrem se naplní vymyté jamky mikrodestičky v objemu (0,100 – 0,200) ml. Pipetované množství je stejné jako u všech předchozích používaných pufrů. Je vhodné postupovat podle virů v pořadí svinutka, X, M, S, Y a A. Pořadí je dáno dobou vybarvování reakce od nejdelší (svinutka) po nejkratší (virus A). Inkubace probíhá při laboratorní teplotě. K dávkování lze použít vícekanálovou pipetu, ruční nebo automatický dávkovač. Reakci lze zastavit přidáním 0,050 ml 3 mol/l NaOH (14) do každé jamky.


### **5.2.3 Obecné zásady pro mytí laboratorního skla a plastových laboratorních pomůcek**

#### **Špičky do pipet**

- 1 Bezprostředně po použití namočit špičky do vody (15).
- 2 Přes noc namočit do roztoku mycího prostředku.
- 3 Propláchnout 3 × ve studené nebo jen mírně vlažné vodě (15).
- 4 Propláchnout ve vodě (15).
- 5 Každá špička musí být ve výše uvedených proplachovacích krocích vždy naplněna a vyprázdněna.
- 6 Domýt 1 h v ultrazvukové vaně ve vodě (15).
- 7 Vytřepat, usušit.

#### **Testovací trubičky (mikrozkumavky)**

- 1 Vyprázdnit zbytek extraktu a důkladně vypláchnout.
- 2 Namočit do roztoku enzymatického prášku (prášku s přídavkem bioaktivní složky) a nechat působit přes noc.
- 3 Minimálně 4 × vypláchnout vodou (15).
- 4 Každá mikrozkumavka musí být ve výše uvedených proplachovacích krocích vždy naplněna a vyprázdněna.
- 5 Domýt 1 h v ultrazvukové vaně ve vodě (15).
- 6 Vytřepat, usušit.

 <p>Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský</p>	Národní referenční laboratoř	Strana	12
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

### Běžné laboratorní sklo

Zbytky roztoků se naředí vodou a vylejí.

Manuální mytí:

- Laboratorní sklo se umývá v teplé vodě s mycím prostředkem, na hrubší nečistoty se použije kartáč nebo houba.
- Sklo se pečlivě opláchne v teplé vodě a následně ve vodě (15).
- Sklo se nechá okapat a oschnout.
- Nádobí lze umýt také v myčce laboratorního skla.

### Likvidace mikrodestiček

Z destiček na jednorázové použití se po testech vyklepe roztok, propláchnou se vodou, voda, se poté vyklepe a uloží se do kontejneru pro likvidaci.

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

Testy se hodnotí použitím fotometru při vlnové délce 405 nm po 1 h vybarvování. Součástí hodnocení může být i vizuální kontrola tohoto hodnocení.


U vzorku se počítají jednotlivé pozitivní reakce pro každý virus zvlášť. Pokud se vyskytne u téhož vzorku pozitivní reakce ve stejné pozici na více destičkách (u různých virů), započítává se do % TVCH (těžké virové choroby) jen jeden, podle tohoto pořadí: svinutka Y, A, X, M, S.

Za pozitivní reakce se považují hodnoty absorbance při 405 nm vyšší než 0,25. Tato hodnota je trojnásobek průměrné absorbance negativních kontrol zdravé rostliny.

### Poznámky

#### 9 Mohou nastat tyto problémy při hodnocení

- *Zdánlivě pozitivní reakce vždy na stejných pozicích u různých virů a různých vzorků – špatná funkce promývačky, zbytky konjugátu nebo extraktu v jamkách, nerovnoměrné a nepečlivé pipetování.*
- *Zdánlivě pozitivní reakce vždy na stejných pozicích u více virů v tomtéž vzorku - špatně vymytý mycí prostředek ve zkumavce.*
  - *Žloutnou jamky v okrajových řadách tzv. „okrajový efekt“ způsobený odpařováním konjugátového roztoku během inkubace.*
  - *Různé nečistoty v jamkách mohou způsobit zežloutnutí substrátu. Mohou to být částice prachu nebo zbytky rostlinné šťávy ulpívající na dně jamky a neodstraněné při vymývání. Tento jev je možno rozpoznat podle toho, že žloutnutí vychází z jednoho bodu a postupně se šíří.*
  - *Žloutnoucí pozadí postupně překrývá pozitivní reakce - příliš velká koncentrace protilátek, extraktu nebo PNPP, případně příliš dlouhá inkubace.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	13
	<b>Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu</b>	Vydání	4
	40310.1 – Zkoušení sadby a odrůd brambor na přítomnost virů metodou ELISA	Revize	0

## 7 Literatura

- 1 ČSN 46 0611 Osivo a sadba. Vzorkování a zkoušení sadby brambor, část 2. Český normalizační institut, Praha, duben 1987.
- 2 L. Albrechtová: Stanovení rostlinných virů dvojitou sendvičovou metodou ELISA s IgG značenými alkalickou fosfatázou. Sborník přednášek odborného semináře „Praktická diagnostika rostlinných virů ELISA testem“, Praha6-Ruzyně, Výzkumný ústav rostlinné výroby, říjen 1986.
- 3 M. Navrátil, M. Luhový: Enzymy a enzymové substráty použitelné v ELISA testech. Sborník přednášek odborného semináře „Praktická diagnostika rostlinných virů ELISA testem“, Praha6-Ruzyně, Výzkumný ústav rostlinné výroby, říjen 1986.
- 4 M. F. Clark, A. N. Adams: Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J.gen.Virol.*, vol 34, 476-483, 1977.
- 5 U. Ehlers, H. J. Vetten, H. L. Paul: Detection of potato leafroll virus in primarily infected tubers by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopath.Z.* 107, 37-46, 1983.
- 6 P. Korpraditskul, R. Casper, D. E. Lesemann: Evaluation of test reaction times and some characteristic of the enzyme-conjugation in enzyme-linked immunosorbent assay. *Phyopath. Z.* 96,281-285,1979.
- 7 E.Krezdorn: Enzym-Immunoassays zur in vitro-Bestimmung von Kartoffelviren. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, manuskript.
- 8 Bioreba AG: Doporučené firemní postupy pro ELISA testy, aplikační literatura.
- 9 Phytodiagnostica Boehringer Mannheim GmbH: Doporučené firemní postupy pro ELISA testy, aplikační literatura.
- 10 J. Soukupová: Pracovní postupy užívané v Oddělení imunologických testací v Dobřichovicích, ÚKZÚZ, nepublikováno.
- 11 Vyhláška č. 129/2012 Sb., v platném znění, o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu.
- 12 Bioreba AG: Technical information. Simple ELISA Data Analysis.