

24-2 - Detektion des Tabakmosaikvirus mit Antikörper-Mimics aus Phagen Bibliotheken

Detection of tobacco mosaic virus with antibody mimics derived from a phage library

Dominik Klinkenbuss, Edgar Maiss

Leibniz Universität Hannover, Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung Phytomedizin, Herrenhäuser Straße 2, 30419 Hannover, Deutschland, - Kompetenznetz WeGa

Für den Nachweis von Phytopathogenen werden weltweit routinemäßig serologische Methoden wie z.B. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) eingesetzt. Neben diversen Vorteilen (u.a. Robustheit, relativ einfache Handhabung, Eignung für Massentests) hängen serologische Verfahren jedoch von begrenzten Ressourcen ab, da die benötigten Antikörper produziert und validiert werden müssen. Das Ziel dieser Studie war die Verringerung dieser Nachteile durch die Verwendung sogenannter antibody mimics. Diese stammen aus einer Phagen Bibliothek und sind, ähnlich wie Antikörper, gegen spezifische Zielmoleküle gerichtet. Die Bibliothek beinhaltet dabei Millionen unterschiedlicher Phagen mit einzigartigen artifiziellen Fusionsproteinen und wird in einem sogenannten Biopanning verwendet. Dabei werden Kombinationen aus Phage und Fusionsprotein gesucht, die eine hohe Bindungsaffinität zum Zielmolekül aufweisen (Smith 1985).

In dieser Arbeit wurden die kommerziell erhältlichen Phagen-Bibliotheken Ph.D.TM-12 und Ph.D.TM-C7C (New England Biolabs GmbH) in Panningrunden gegen das Tabakmosaikvirus (TMV) eingesetzt. Dieses phytopathogene Virus kann über 200 Pflanzenspezies infizieren (Scholthof 2004) und dabei zu stark ausgeprägten Symptomen bis hin zum Absterben der Wirtspflanzen führen. Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass Phagen mit Virusproteinen eine Protein-Protein Bindung eingehen können (z.B. Bai *et al.*, 2002, Heng *et al.* 2007).

In diesem Projekt konnten im Folgenden konservierte Sequenzen artifizierlicher Fusionsproteine von Phagen bestimmt werden, die positive Ergebnisse im ELISA mit TMV ergaben, während Phagen ohne die spezifischen Aminosäuremotive (Peptide) keinen Nachweis ermöglichten.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auf Phagen basierende „antibody mimics“ möglicherweise nützliche Werkzeuge für die Vereinfachung und Verbesserung von ELISAs beim Nachweis von Phytopathogenen sind.

Diese Studie läuft innerhalb des WeGa Kompetenznetzes und wird vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert.

Literatur

Bai, F. W., H. W. Zhang, J. Yan, Z. C. Qu, J. Xu, J. G. Wen, M. M. Ye, D. L. Shen, 2002: Selection of phage-display peptides that bind specifically to the outer coat protein of Rice black streaked dwarf virus. *Acta Virol* **46** (2), 85–90.

Heng, C. K., S. M. Noor, T. S. Yee, R. Y. Othman, 2007: Biopanning for banana streak virus binding peptide by Phage display peptide library. *J Biol Sci.* **7** (8), 1382–1387.

Scholthof, K. B. 2004: Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 13-34.

Smith, G. P. 1985: Filamentous Fusion Phage - Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **228** (4705), 1315-1317.

24-3 - Molekularbiologischer Assay zur schnellen Quantifizierung von *Rhizoctonia solani* AG2-2

Molecular assay for rapid quantification of Rhizoctonia solani AG2-2

Anne-Catherine Renner, Barbara Boine, Jan Nechwatal, Rudolf Apfelbeck², Michael Zellner

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz (IPS3c), 85354 Freising, Deutschland

²Arbeitsgemeinschaft zur Förderung des Zuckerrübenanbaues, ARGE Regensburg, 93092 Barbing, Deutschland

Rhizoctonia solani AG2-2 ist der Erreger der Späten Rübenfäule, er verursacht weltweit beträchtliche Schäden an Zuckerrüben (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*). Ein hohes Bodeninokulumpotential

von *R. solani* ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung der Wurzelfäule an Zuckerrüben. *R. solani* ist ein bodenbürtiges Pathogen und die Quantifizierung des *R. solani*-Inokulumpotentials eines Bodens ist schwierig. Bis heute existiert noch kein Monitoringsystem das routinemäßig für die Messung von *R. solani*-Bodenkonzentrationen eingesetzt wird. Um den Einfluss von verschiedenen ackerbaulichen Maßnahmen auf das *R. solani*-Inokulumpotential zu untersuchen, wurde innerhalb dieses Forschungsprojektes ein spezifischer molekularbiologischer Assay zur Erregerquantifizierung im Boden entwickelt. Der Assay basiert auf der Kombination eines Köderverfahrens mit Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Samen und der anschließenden Quantifizierung von *R. solani* AG2-2 mittels Real-Time PCR (qPCR) (Quinoa-qPCR-Assay). Entnommene Feldbodenproben werden zuerst gesiebt und anschließend in 300 g-Teilproben portioniert. Anschließend werden Quinoa-Samen auf dem zu analysierenden Boden ausgelegt um dort das aktiv wachsende Myzel von *R. solani* zu ködern. Die Inkubationszeit beträgt 5 Tage, danach wird DNA aus den Quinoa Samen extrahiert um im Anschluss mittels qPCR *R. solani* AG2-2 zu quantifizieren. Um die Anzahl an Sklerotien im Boden mit dem Quinoa-qPCR-Assay abzuschätzen, wurde eine Standardkurve mit bekannten *R. solani* Mengen erstellt. Zur Inokulation wurden *R. solani*-infizierte Mohnsamen, die in Größe und Form vergleichbar mit typischen Sklerotien von *R. solani* sind, verwendet. Wobei ein mit *R. solani* bewachsener Mohnsamen einem Sklerotium bzw. einer Infektionseinheit (IE) entspricht. Der Quinoa-qPCR-Assay war sehr sensitiv (1 IE in 1 kg Erde) und schnell (7 Tage). Eine Mischprobe von 300 g Erde war für eine Standard-Bodenbeprobung am kosten- und zeiteffektivsten. Je nach Ausstattung können bis zu 100 Bodenproben gleichzeitig analysiert werden. Erste Ergebnisse werden vorgestellt.

Literatur

BUDGE, G. E., M. W. SHAW, A. COLYER, S. PIETRAVALLE, N. BOONHAM, 2004: Molecular tools to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. *Plant Pathol.*, **58**, 1071–1080.

24-4 - Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in der Virusdiagnose

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for virus diagnosis

Heiko Ziebell

Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kann zur isothermalen Amplifikation von Nukleinsäuren genutzt werden. Gegenüber herkömmlichen PCR-Methoden weist LAMP einige Vorteile auf: Die Amplifikation bei konstanter Temperatur kann so z. B. auch in Wasserbädern oder Inkubatoren durchgeführt werden. Die besonderen Eigenschaften der genutzten Primer sowie der Polymerase erlauben eine schnellere Amplifikation der Zielregion im Vergleich zur (RT)-PCR, so dass positive Ergebnisse bereits nach 15 Minuten erzielt werden können; ein Extraschritt für die reverse Transkription von RNA entfällt. Zur Auswertung stehen verschiedene Methoden (Gelelektrophorese, Trübungsreaktionen, Farbumschlag, Fluoreszenzmessung) zur Verfügung. Zur Diagnose von Pflanzenviren mit RNA- oder DNA-Genom wurden verschiedene LAMP-Protokolle erfolgreich entwickelt.