

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 424

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6888 (2018.01)

C12Q 1/6862 (2018.01)

C12Q 1/6855 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36833**
(22) Přihlášeno: **31.10.2019**
(47) Zapsáno: **26.11.2019**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
- (72) Původce:
MVDr. Zora Piskatá, Ph.D., Břeclav, CZ
Mgr. Petr Králík, Ph.D., Brno, Líšeň, CZ
Mgr. Bc. Eliška Servusová, Ph.D., Knínice, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
**Diagnostická souprava pro multiplexní
detekci DNA skotu, prasete, ovce, kozy a
kura v potravinách a krmivech metodou
MOL-PCR**

CZ 33424 U1

Diagnostická souprava pro multiplexní detekci DNA skotu, prasete, ovce, kozy a kura v potravinách a krmivech metodou MOL-PCR

5 Oblast techniky

Předložené technické řešení je zaměřeno na diagnostiku pěti hlavních potravinářských druhů zvířat - skotu (*Bos taurus*), prasete (*Sus scrofa domesticus*), kura (*Gallus gallus f. domestica*), ovce (*Ovis aries*) a kozy (*Capra aegagrus hircus*) - v potravinách a krmivech s ohledem na jejich složení, za účelem ověření autenticity druhů deklarovaných, případně průkazu druhů nedeklarovaných. Předmětem technického řešení je jedinečná forma xMAP array, tzv. MOL-PCR, což je multiplexní oligonukleotidová ligace v přítomnosti cílové genomové DNA spojená s následnou amplifikací ligované DNA pomocí PCR a vizualizací jednotlivých PCR produktů pomocí fluorescenčně značených sond (oligonukleotidů) navázaných na magnetické mikrokuličky.

Dosavadní stav techniky

Prokazování falšování potravin patří mezi priority z hlediska ochrany zdravotních i ekonomických zájmů spotřebitele. Ověřování přítomnosti deklarovaných, případně detekce nedeklarovaných, živočišných druhů patří mezi základní kontrolní postupy stanovení autenticity potravin a krmiv vycházející z platné legislativy. Ne vždy se označení živočišného druhu na obalu výrobku (potravin, krmiva) shoduje s reálným obsahem výrobku. Pro identifikaci druhů ve zpracovaných potravinářských produktech je proto nutné aplikovat detekční postupy, které jsou založené zejména na analýze proteinů nebo molekul DNA extrahovaných z živočišných tkání. V současné době není k dispozici žádná legislativně závazná metoda pro detekci a identifikaci živočišných tkání v potravinách a krmivech. Aktuálně jsou dostupné komerční produkty např. firmy Bioteccon Diagnostics pro jednodruhovou identifikaci skotu, prasete, koně, ovce, kozy, kuřete a osla, nebo od firmy Eurofins k detekci DNA skotu, prasete, koně, ovce, kozy, osla, kuřete, krůty, kachny nebo husy. Firma R-biopharm nabízí detekční soupravy – tetraplexy pro detekci tří druhů plus interní amplifikační kontrola (IAC), ostatní kity jsou většinou zaměřeny pouze na jednodruhovou detekci. Dále je v odborné literatuře popsána celá řada PCR metod pro průkaz živočišných komponent v potravinách a krmivech. Tyto metody v převážné většině nebyly validovány podle platných kritérií a jejich využití v podobě diagnostické soupravy pro rutinní použití tak není možné (např. metoda polymerázové řetězové reakce - PCR nebo real-time PCR). Tyto metody jsou obvykle také zaměřeny na detekci jednotlivých druhů (tzv. monoplexní reakce) v rámci jedné analýzy, což ve svém důsledku zvyšuje finanční náklady na materiál a lidskou práci. Další metoda – sekvenování - NG sekvenování (sekvenování pokročilé generace, next generation sequencing) dokáže definovat jednodruhové matrice, v případě výskytu směsného vzorku však může nastat problém s interpretací výsledků získaných sekvenováním. Stejně tak sekvenování DNA izolované z vysoce tepelně i jinak technologicky (chemicky, mechanicky) opracované potraviny, případně potraviny obsahující další příměsi a aditiva, může znemožnit úspěšné vyhodnocení celé sekvenační analýzy. Při technologickém opracování dochází k procesům, které vedou ve větší či menší míře k rozpadu molekuly DNA na jednotlivé fragmenty (obvykle menší než 150 bp). Je tedy rozhodující, jak velký úsek se použije k sekvenaci. Obecně čím delší je detekovaný úsek, tím méně je pravděpodobné, že tak dlouhý úsek bude zachován i u vysoce technologicky opracovaných potravin.

Dalším aspektem je zacílení dosud publikovaných metodických postupů na detekci převážně mitochondriálního genomu (*control regions*, cytochrom *b*), jehož sekvence jsou u detekovaných organismů velmi podobné, což může jak při použití sekvenování, tak především při použití metod PCR představovat problém se specificitou a s tím spojenou interpretací výsledků.

55

Podstata technického řešení

Nedostatky současných postupů na detekci a identifikaci druhového složení potravin a krmiv řeší předkládaná diagnostická souprava, která je určena pro postupy založené na metodě MOL-PCR. Metoda MOL-PCR představuje inovaci v metodologii kontroly složení potravin a krmiv, jejíž přínos spočívá především v multiplexním simultánním stanovení několika živočišných druhů v rámci jedné analýzy. MOL-PCR byla poprvé popsána v roce 2010 (Deshpande, A. *et al.* A rapid multiplex assay for nucleic acid-based diagnostics. *Journal of Microbiological Methods* **80**, 155–163, 2010), a její provádění zahrnuje tři kroky: multiplexní oligonukleotidovou ligaci dvou sond (moligonukleotidů) částečně komplementárních k sousedícím úsekům templátu a nesoucích úseky pro nasedání PCR primerů, následnou monoplexní PCR amplifikaci produktů ligace s pomocí PCR primerů nasedajících na příslušné úseky produktů ligace, a následnou detekci signálu, například prostřednictvím hybridizace produktů PCR amplifikace k oligonukleotidům navázaným na magnetických mikrokuličkách a detekci na těchto mikrokuličkách, například s využitím fluorescenční značky vázané na jenom z primerů použitých v PCR amplifikaci (MagPix detekce).

Předmětem předkládaného řešení je tedy diagnostická souprava pro stanovení přítomnosti DNA skotu (*Bos taurus*), prasete (*Sus scrofa domestica*), kura (*Gallus gallus f. domestica*), ovce (*Ovis aries*) a kozy (*Capra aegagrus hircus*) v potravinách a krmivech, jejíž podstatou je to, že obsahuje specifické moligonukleotidy, o následujících sekvencích.

Ve zde uvedených sekvencích moligonukleotidů znamenají podtržené části sekvence nasedající na templátovou DNA příslušného druhu, tučně vyznačené části sekvence pro nasedání univerzálních primerů, a část bez tučného vyznačení a podtržení v moligonukleotidu 2 odpovídá TAG sekvenci MTAG-A027/A029/A056/A061/A057 umožňující specifickou vazbu k magnetickým mikrokuličkám. „Pho“ znamená fosfátovou skupinu.

Sekvence moligonukleotidů pro ligační detekci DNA prasete:

SuMOL1

5'-Pho-TATGGTTTAGAATGCAAAGGCTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

SuMOL2

5'-ACTCGTAGGGAATAAAACCGTAAGATGATAGTTAAGTGAAGTTATGAAATCATTAAATGTGTAAGGGGTG-3'

Tyto moligonukleotidy SuMOL1 a SuMOL2 nasedají na část genu *MICAL1* v rozsahu 3001 až 3047 bp (Acc. No. NC_010443.5:c75522760-75511692).

Sekvence moligonukleotidů pro ligační detekci DNA kozy:

CapMOL1

45

5'-Pho-TTCAGTGAGAGCCCAGCAGTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

CapMOL2

50

5'-ACTCGTAGGGAATAAAACCGTTTTAAGTGAGTTATAGAAGTAGTAGGCCAGAAGGACAAGAAACAG-3'

Tyto moligonukleotidy CapMOL1 a CapMOL2 nasedají na část genu *MICAL1* v rozsahu 5675 až 5714 bp (Acc. No. NC_030816.1 (28007621-28019243)).

Sekvence moligonukleotidů pro ligační detekci DNA skotu:

BoMOL1

5 5'-Pho-CGGGTAAAGGAGGAGCGTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

BoMOL2

10 5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTAATTAGAAGTAAGTAGAGTTTAAGGCGACTTTGATCCGGTTCTT-3'

Tyto moligonukleotidy BoMOL1 a BoMOL2 nasedají na část genu *RPS7* v rozsahu 2265 až 2301 bp (Acc. No. NC_037335.1:c110992366-110987214).

Sekvence moligonukleotidů pro ligační detekci DNA ovce:

15

OvMOL1

5'-Pho-TCTGCTGACCTCCATGAGCTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

20 OvMOL2

5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTCCTGAGCAGAGCTTCACTG-3'

25 Tyto moligonukleotidy OvMOL1 a OvMOL2 nasedají na část genu *RPS16* v rozsahu 906 až 943 bp (Acc. No. NC_040265.1 (52017815-52020331)).

Sekvence moligonukleotidů pro ligační detekci DNA kura:

30

GalMOL1

5'-Pho-CCTCATCGTGTGGGTTTGCTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

GalMOL2

35 5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGAGTATTAGTAGTTATTGTAAGTTCTTCACAGCCTCGTTGCTT-3'

Tyto moligonukleotidy GalMOL1 a GalMOL2 nasedají na část genu *MICAL1* v rozsahu 8109 až 8147 bp (Acc. No. NC_006113.5:29839-40913).

40 Souprava obsahující výše uvedené moligonukleotidové sekvence umožňuje analýzu vzorků potravin a krmiv na přítomnost DNA skotu (*Bos taurus*), prasete (*Sus scrofa domesticus*), kura (*Gallus gallus* f. *domestica*), ovce (*Ovis aries*) a kozy (*Capra aegagrus hircus*). Souprava může dále umožňovat kontrolu celého analytického postupu pomocí interní amplifikační kontroly (IC). IC byla navržena tak, aby pro všechny MOL-PCR systémy mohl být použit stejný pár IC
45 moligonukleotidů a stejná sada univerzálních PCR primerů; jedná se tedy o univerzální IC. Při přípravě IC byla použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých druhů; konkrétně se jedná o mitochondriální DNA vakovlka tasmánského (*Thylacinus cynocephalus*, Acc. No. FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*, Acc. No. AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z (Mikel, P. *et al.*
50 Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Use As Potential Process Control Viruses for Detection and Quantification of Enteric RNA Viruses in Different Matrices. *Frontiers in Microbiology* 7, doi:10.3389/fmicb.2016.01911, 2016) syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu (výsledný plazmid je zde nazýván IC plazmid).

Sekvence moligonukleotidů pro IC:

IC_2_M1

5 5' - Pho- ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG- 3'

IC_2_M2

10 5' - ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACACACGCAATCACCAC- 3'

Tyto moligonukleotidy IC_2_M1 a IC_2_M2 nasedají na de novo syntetizovanou 150 bp dlouhou sekvenci v rozsahu 84 až 126 bp (oblasti nasedání jsou podtrženy, oblast pro jeden moligonukleotid je navíc kurzívou, pro druhý bez kurzívy):

15 CGCTTCCGTCAAACCCCTAAACCGGATGATAGACCTCACCTCCCCGCCCAATACTGA
AATCTCATTAAATACGCATACCCCCACTATACACACGCAATCACCACATTAGCACAATGA
ATAATCATCGTACGGGAGAAAACATTCTAAACCC.

20 Souprava dále obsahuje univerzální amplifikační primery pro PCR reakce. Univerzální primery byly převzaty z publikace Thierry et al. (2013). Reverzní primer je značen fluoroforem BODIPY-TMRX, který v reakci slouží jako reportérová molekula značící výsledný produkt. Tyto primery mají následující sekvence:

25 forward primer: 5' – CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA – 3'

reverse primer: 5' – BODIPY-TMRX - ACTCGTAGGGAATAAACCGT – 3'

30 Souprava podle technického řešení s výhodou obsahuje jednu nádobku obsahující reakční směs pro ligaci, která zahrnuje ligační pufr, směs moligonukleotidů 1 a 2 o výše uvedených sekvencích pro všechny uvedené živočišné druhy a vodu v kvalitě pro PCR, volitelně i moligonukleotidy 1 a 2 pro interní amplifikační kontrolu, a volitelně IC plazmid; druhou nádobku obsahující enzym ligázu; a třetí nádobku obsahující reakční směs zahrnující enzym polymerázu, reakční pufr pro PCR, směs deoxynukleosid trifosfátů (dNTP), univerzální forward primer, univerzální reverse primer a vodu v kvalitě pro PCR.

35 Detekční souprava umožňuje podle technického řešení multiplexní simultánní stanovení pěti živočišných druhů v rámci jedné analýzy. Výhodou soupravy je podle technického řešení také její schopnost detekce velmi krátkých DNA fragmentů (přibližně 100 bp), čímž může být usnadněna druhová identifikace ve zpracovaných potravinách, kdy vlivem technologických procesů dochází často k degradaci DNA a jejímu rozpadu na kratší fragmenty. Navržené technické řešení dokáže překonat také nedostatek dosud používaných metod, který spočívá v problematické identifikaci živočišných druhů ve směsném vícedruhovém vzorku (potravině). Poskytuje totiž řešení, které kombinuje cílenou detekci (podobně jako PCR), která je citlivější a dokáže identifikovat jednotlivé komponenty ve vícesložkových potravinách, s necílenou multiplexní detekcí (podobně jako sekvenování), která je schopná identifikovat širší spektrum cílů.

50 Navržené MOL-PCR systémy jsou navíc podle technického řešení založeny na amplifikaci genomové DNA, která oproti standardně používaným cílům v mitochondriální DNA poskytuje vyšší specifitu, a především bude zaručeno, že v tkáních bude vždy stejné množství kopií cílové DNA, na rozdíl od mitochondriální DNA. V kombinaci s interní amplifikační kontrolou dochází zároveň k eliminaci falešně negativních výsledků způsobených přítomností inhibitorů. Souprava podle technického řešení tak umožňuje rychlý skrining vyšetřovaného vzorku na širokou škálu živočišných druhů v jedné reakci, což v porovnání s monoplexními PCR systémy snižuje finanční náklady a čas nutný na komplexní analýzu jednoho vzorku.

55

Popsané technické řešení (diagnostická souprava vhodná pro identifikaci DNA cílových druhů metodou MOL-PCR) bylo cíleně navrženo a otestováno pro průkaz přítomnosti DNA cílových druhů jak ve vzorcích syrových tkání, tak u zpracovaných potravin a krmiv nebo jejich komponent. Metodu lze podle technického řešení použít pro detekci všech typů tkání, které mohou být hlavní či vedlejší surovinou obsaženou v potravinách a krmivech; mezi tyto tkáně patří svalovina, chrupavky, vnitřnosti, kůže a její deriváty nebo střeva. DNA představuje oproti proteinům stabilní molekulu, kterou je možné v různém stupni fragmentace extrahovat i z technologicky zpracovaných potravin a krmiv (tj. i z potravin vyrobených s využitím vysokého stupně mělnění surovin, různých úrovní tepelné úpravy či za použití vysokého tlaku).

Souprava byla testována také na specificitu. Nebyla nalezena žádná křížová reakce s jinými druhy hospodářských, domácích a volně žijících zvířat, či rostlinných komponent, které by mohly být součástí potravin nebo krmiv.

Souprava podle technického řešení optimálně obsahuje

Název	Objem reakcí 20/50	Složky	Objem reakcí 20/50 [μ l]
LIG1	440/1100 μ l	ligační pufr-Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase Buffer 10x (New England BioLabs, Massachusetts, USA) specifické moligonukleotidy 1 a 2 pro každý druh (1 pmol/ μ l) moligonukleotidy pro IC 1 a 2 (1 pmol/ μ l) IC plazmid 10^4 / μ l voda	50/125 10 x 2,5/10 x 6,25 2 x 2,5/2 x 6,25 2/5 358/895
LIG2	10/25 μ l	enzym ligáza-Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase (New England BioLabs, Massachusetts, USA)	10/25
PCR	360/900 μ l	EliZyme TM HS Robust MIX (2x) (enzym polymerázu, reakční pufr, dNTP) (Elisabeth Pharmacon, Czech Republic) univerzální forward primer (10 pmol/ μ l) univerzální reverse primer (10 pmol/ μ l), voda	240/600 3/7,5 12/30 105/262,5
MES	50/125 μ l	pufr MES 0,1 M	
NaCl	16/40 μ l	NaCl 5 M	
TE	30/76 μ l	pufr (Tris-EDTA pufr) 1X	
MAG	3,6/8,9 μ l	směs potažených magnetických kuliček ^a	
AP	900/2 x 1125 μ l	analyzační pufr AP	
CP	10 x 5/10 x 12,5 μ l	pozitivní kontrola ^b	

^aMAG MagPlex Microspheres 12.5×10^6 mikrokuliček/ml, Luminex Corp., Texas, USA); kuličky byly potaženy anti-TAG sekvencemi podle protokolu dodaného výrobcem (Bio-Rad, Kalifornie, USA). $1250 \text{ kuliček} / \text{koncentrace kuliček} [\text{kuličky}/\mu\text{l}] = \text{objem daného mixu kuliček k přidání} [\mu\text{l}]$

^bCP směs DNA detekovaných druhů o koncentraci 10 ng/ μ l

LIG1, LIG2, PCR, CP – uchovávat při -20 °C

MES, NaCl, TE, MAG, AP – uchovávat při 2 až 8 °C

Přehled cílových oblastí, TAGů a regionů mikrokuliček pro jednotlivé živočišné druhy.

30

Živočišný druh	Cílová oblast	TAG na sondě moligonukleotid 2	Mikrokuličky (region)
Skot	<i>RPS7</i>	MTAG-A056	013
Prase	<i>mical1</i>	MTAG-A027	021
Kur	<i>mical1</i>	MTAG-A057	014
Ovce	<i>RPS16</i>	MTAG-A061	015
Koza	<i>mical1</i>	MTAG-A029	029

Příklady uskutečnění technického řešení

- 5 V následujících příkladech byl testován masný výrobek – salám s deklarovaným obsahem vepřového masa. V příkladech byla použita souprava o výše uvedeném optimálním složení.

Izolace DNA

- 10 Předpokladem správného provedení celého řešení je extrakce dostatečně kvalitní DNA z potravin nebo krmiv. K tomuto účelu byl použit kit DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Německo), který je určen pro izolaci DNA i z vysoce tepelně ošetřených potravin, kde se předpokládá vysoká míra fragmentace DNA. Podrobný postup extrakce DNA je dodáván výrobcem.

15

Popis metody MOL-PCR

- Technologie xMAP je založena na zachycení fluorescenčně značených cílových molekul ze vzorku pomocí navržených druhově specifických sond (MOLig), z nichž jedna obsahuje specifickou sekvenci (tzv. TAG), která je komplementární k antiTAGu na povrchu magnetické mikrokuličky. Přístroj MagPix rozpozná typ kuličky podle fluorescence a pokud je na ní navázána cílová sekvence označená jinou fluorescenční barvou, je potvrzena přítomnost cíle ve vzorku. MOL-PCR (Multiplex Oligonucleotide Ligation-PCR) je založena na ligaci syntetizovaných oligonukleotidů v přítomnosti cílové molekuly DNA, následné amplifikaci s univerzálními primery, hybridizaci MOL-PCR produktů smíchaných s kuličkovým mixem a po přidání analyzačního pufru vlastní analýze v přístroji MagPix, zpracování dat a interpretaci výsledků.

25

Ligace

30

- rozmrazit a následně promíchat LIG1 a LIG2
- LIG1 rozpipetovat po 22 µl do 0,2 ml zkumavek

35

- k 22 µl reakční směsi LIG1 přidat 0,5 µl LIG2
- ke směsi LIG1 a LIG2 přidat 2,5 µl izolované DNA, v případě pozitivní kontroly 2,5 µl CP (po otevření jednoho alikvotu CP lze tento uchovat již pouze při teplotě 2 až 8 °C po dobu max. 1 měsíce)

40

- krátce stočit

45

- ligace probíhá v termocykleru za předem stanovených teplotních a časových podmínek: 95 °C/10 min, 95 °C/30 s + 59 °C/1 min, 20 x opakování, udržování při 10 °C do dalšího zpracování

PCR s univerzálními primery

- rozmrazit a promíchat PCR směs
- roztok PCR rozplnit po 18 µl do 0,2 ml zkumavek
- přidat 6 µl ligačního produktu z předchozího kroku
- amplifikace ligačního produktu s univerzálními primery probíhá v termocykleru za předem nastavených teplotních a časových podmínek: 95 °C/2 min, 95 °C/15 s + 60 °C/15 s + 72 °C/15 s, 40 x opakování, udržování při 10 °C do dalšího zpracování

Hybridizace

- z lednice nachystat MES, NaCl, MAG a TE
- rozpipetujeme podle Tabulky 1 v celkovém objemu 5 µl na jednu reakci
- ke směsi MES, NaCl, MAG a TE přidáme 10 µl MOL-PCR produktu a provedeme hybridizaci v termocykleru za následujících podmínek: 96 °C/90 s, 37 °C 30 min, udržování při 10 °C do dalšího zpracování.

Tabulka 1. Příprava kuličkového mixu

Reagencie	1 reakce	20 x	50 x
MES 0,1 M	2,5 µl	50 µl	125 µl
NaCl 5 M	0,8 µl	16 µl	40 µl
MAG*	0,18 µl	3,5 µl	9 µl
TE pufr 1X	1,52 µl	30,5 µl	76 µl
Celkem	5 µl	100 µl	250 µl

*1 250 kuliček / koncentrace kuliček [kuličky/µl] = objem daného mixu kuliček k přidání [µl]

Analýza v přístroji MagPix

- k 15 µl hybridizační směsi přidáme 45 µl AP a provedeme vlastní analýzu v přístroji MagPix (MagPix device (Bio-Plex MAGPIX, Bio-Rad, Kalifornie, USA) podle návodu výrobce.

Zpracování dat a interpretace výsledků

Jednotlivé naměřené MFI (medián intenzity fluorescence) hodnoty vzorků se podělí MFI hodnotou negativní kontroly NTC (no template control). Je-li výsledný **poměr (P) vyšší než 4** a zároveň **hodnota MFI daného vzorku vyšší než 200**, vzorek je pozitivní. Kvalitativní hodnocení se provádí podle Tabulky 2.

Tabulka 2. Kvalitativní hodnocení.

Cíl	IAC	Celkový výsledek
Pozitivní	Pozitivní	Vzorek je pozitivní
Pozitivní	Negativní	Vzorek je pozitivní
Negativní	Pozitivní	Vzorek je negativní
Negativní	Negativní	Vzorek je inhibován

Vzorek je považován za pozitivní, pokud je pozitivní alespoň v jednom opakování.

Vyšetřený masný výrobek obsahoval DNA prasete (hodnota MFI byla 1406), čímž byla potvrzena druhová deklarace uvedená na výrobku.

5

Průmyslová využitelnost

Souprava je využitelná jako diagnostický nástroj pro odhalování falšování potravin a krmiv způsobeným druhovou záměnou prostřednictvím orgánů státní správy (SZPI, SVS) v rámci akreditované laboratoře pro detekci falšování potravin a krmiv na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. Brno. Kromě orgánů státní správy může být metodika využita také soukromými subjekty a spotřebiteli pro prokazování jakosti potravin a krmiv.

15

NÁROKY NA OCHRANU

1. Diagnostická souprava pro stanovení přítomnosti DNA skotu *Bos taurus*, prasete *Sus scrofa domestica*, kura *Gallus gallus* f. *domestica*, ovce *Ovis aries* a kozy *Capra aegagrus hircus* v potravinách a krmivech metodou MOL-PCR, **vyznačující se tím**, že obsahuje kombinaci moligonukleotidů pro ligační detekci DNA uvedených živočišných druhů, přičemž uvedené moligonukleotidy jsou tvořeny sekvencemi:

25

SuMOL1

5'-Pho-TATGGTTTAGAATGCAAAGGCTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

30

SuMOL2

5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTAAGATGATAGTTAAGTGTAAGTTATGAAATCATTAAATGTGTAAAGGGTG-3'

35

CapMOL1

5'-Pho-TTCAGTGAGAGCCCAGCAGTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

CapMOL2

40

5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTTTTAAGTGAGTTATAGAAGTAGTAGGCCAGAAGGACAAGAAACAG-3'

BoMOL1

45

5'-Pho-CGGGTAAAGGAGGAGCGTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

BoMOL2

5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTAATTAGAAGTAAGTAGAGTTAAGGCGACTTTGATCCGGTTCCTT-3'

50

OvMOL1

5'-Pho-TCTGCTGACCTCCATGAGCTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

OvMOL2

55

5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTCCTGAGCAGAGCTTCACTG-3'

GalMOL1

5'-Pho-CCTCATCGTGTGGGTTTGCTCTCACTTCTTACTACCGCG-3'

GalMOL2

5 5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGAGTATTAGTAGTTATTGTAAGTTCTTCACAGCCTCGTTGCTT-3'

kde Pho značí fosfát,

10 a souprava dále obsahuje univerzální amplifikační primery pro PCR reakce tvořené následujícími sekvencemi:

univerzální forward primer: 5'-CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA-3'

15 univerzální reverse primer: 5'-BODIPY-TMRX - ACTCGTAGGGAATAAACCGT-3'.

2. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje moligonukleotidy pro interní amplifikační kontrolu, přičemž uvedené moligonukleotidy jsou tvořeny sekvencemi:

IC_2_M1

20

5'-Pho- ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG-3';

IC_2_M2

25

5'-ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACACACGCAATCACCAC-3'.

3. Souprava podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje:

30 - první nádobku obsahující reakční směs pro ligaci, která zahrnuje ligační pufr, směs moligonukleotidů 1 a 2 pro všechny uvedené živočišné druhy, a vodu v kvalitě pro PCR;

- druhou nádobku obsahující enzym ligázu; a

35 - třetí nádobku obsahující reakční směs zahrnující enzym polymerázu, reakční pufr pro PCR, směs deoxynukleosid trifosfátů, univerzální forward primer, univerzální reverse primer a vodu v kvalitě pro PCR.

4. Souprava podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že obsahuje:

40 - první nádobku obsahující reakční směs pro ligaci, která zahrnuje ligační pufr, směs moligonukleotidů 1 a 2 pro všechny uvedené živočišné druhy, moligonukleotidy 1 a 2 pro interní amplifikační kontrolu, IC plazmid s klonovanou kontrolní syntetickou sekvencí
CGCTTCCGTCAAACCCCTAAACCGGATGATAGACCTCACCTCCCCGCCCAATACTGA
AATCTCATTAATACGCATACCCCACTATACACACGCAATCACCACATTAGCACAAT
45 GAATAATCATCGTACGGGAGAAAACATTCTAAACCC, a vodu v kvalitě pro PCR;

- druhou nádobku obsahující enzym ligázu; a

50 - třetí nádobku obsahující reakční směs zahrnující enzym polymerázu, reakční pufr pro PCR, směs deoxynukleosid trifosfátů, univerzální forward primer, univerzální reverse primer a vodu v kvalitě pro PCR.