

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRUMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.07.2010**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **25.01.2012**
(Věstník č. 4/2012)

(21) Číslo dokumentu:

2010-551

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha 6 -
Ruzyně, CZ

(72) Puvodce:

Tomková Lenka Ing., Týn nad Vltavou, CZ

(74) Zástupce:

Ministerstvo zemědělství ČR, Mgr. Hana Jirkalová,
Těšnov 17, Praha 1, 11705

(54) Název přihlášky vynálezu:

Reakční směs pro molekulární diagnostiku alel lakázy ječmene in vitro

(57) Anotace:

Řešení se týká reakční směsi pro molekulární diagnostiku alel lakázy ječmene in vitro, která je charakterizována tím, že její specifickou rozpoznávací složku ve směru 5' - 3' tvoří oligonukleotidové sekvence specifických primerů o složení Lac-F: 5'-CCACAGGAGCAGTTGCAGTC-3' a Lac-R: 5'-GCCGTGTTGGTGTCGTTGTT-3, přičemž dále obsahuje reakční pufr, deoxyribonukleotidy, vodu, ionty hořčíku, enzym polymerázu a je použitelná pro polymerázovou řetězovou reakci.

Reakční směs pro molekulární diagnostiku alel lakázy ječmene *in vitro*

Oblast techniky

Řešení se týká reakční směsi pro stanovení přítomnosti alternativních forem genu pro lakázu ječmene pomocí polymerázové řetězové reakce (dále PCR).

Dosavadní stav techniky

Lakáza (benzendiol: oxidoreduktáza kyslíku; EC 1.10.3.2) je měď obsahující enzym, který oxidační polyfenoly, diaminy, aromatické aminy, benzenothioly a mnoho dalších sloučenin (Thurston, 1994). Lakázy hrají důležitou roli v řadě enzymatických katalytických mechanismů a jsou jim přisuzovány různé role zahrnující odpověď na poranění rostliny, vývoj plodu různých druhů ovoce, rekonstrukce buněčné stěny a zejména je důležitý vliv lakázy na syntézu ligninu a tvorbu buněčné stěny. Lakáza je nejčastěji izolována z bakterií, hub a některých rostlinných druhů. Enzym je vysoce používán v řadě průmyslových odvětví, včetně potravinářského průmyslu zahrnující pivovarnictví.

V pivovarnictví je vedle tradičních technologií v některých případech využívána lakáza jako aditivum do mladiny. Podle Mathiasena (1995) přidáním lakázy na konci procesu výroby piva se odstraní některé nežádoucí vlivy přítomného kyslíku. Lakáza odstraňuje přebytečný kyslík, čímž zvýší trvanlivost piva po dobu skladování a současně odstraní i zbytkové polyfenoly v pivu. Alternativní formy lakázy mají různou účinnost a substrátovou specifitu.

Metoda detekující rozdílné alely genu pro lakázu u ječmene nebyla zatím publikována. Různé alely lakázy ječmene determinují formy enzymu s rozdílnou aktivitou a ovlivňují tak především množství a složení polyfenolů ve

sladu ječmene. Rychlá a přesná molekulární diagnostika vzorků odrůd a genotypů ječmene na přítomnost různých forem alel lakázy je velice potřebná zejména pro společnosti zabývající se šlechtěním, které vyvíjejí nové odrůdy vhodné z hlediska dalšího průmyslového a potravinářského zpracování.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje reakční směs pro molekulární diagnostiku alel lakázy ječmene *in vitro*, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že její specifickou rozpoznávací složku ve směru 5'-3' tvoří nové oligonukleotidové sekvence specifických primerů o složení

Lac-F: 5'-CCACAGGAGCAGTTGCAGTC-3' a

Lac-R: 5'-GCCGTGTTCGTGTCGTTGTT-3,

přičemž dále obsahuje reakční pufr, deoxyribonukleotidy, vodu, ionty hořčíku, enzym polymerázu a je použitelná pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).

Reakční směs podle vynálezu je charakterizována tím, že obsahuje 1 mikrolitr vzorku DNA ječmene o doporučené koncentraci 100 nanogramů na mikrolitr, 2,5 mikrolitru 10 x PCR pufru, 1 mikrolitr směsi deoxyribonukleotidů o koncentraci 5 mikromolární, 17,8 mikrolitrů sigma vody, 0,2 mikrolitru DNA polymerázy, 1,2 mikrolitru hořčnatých iontů o koncentraci 25 mikromolární, 1 mikrolitr primeru Lac-F a 1 mikrolitr primeru Lac-R, oba o koncentraci 6,25 pikomolu.

Podstatou vynálezu jsou i nové oligonukleotidové sekvence specifických primerů o složení

Lac-F: 5'-CCACAGGAGCAGTTGCAGTC-3' a

Lac-R: 5'-GCCGTGTTCGTGTCGTTGTT-3,

které jsou určeny pro detekci alternativních alel ječmenů. Byly navrženy pomocí programu Primer 3 a jejich syntéza byla provedena u firmy zabývající se syntézou oligonukleotidů.

Technické řešení je unikátní v následujících aspektech: odstraňuje problém diagnostiky alel lakázy ječmene, neboť v současné době neexistuje žádný alternativní systém.

Reakční směs podle vynálezu pro detekci alel lakázy u ječmene pomocí molekulární metody PCR *in vitro* je optimalizovaná pro podmínky nejen České Republiky, ale lze ji použít celosvětově. Tato reakční směs pro PCR obsahuje specifické primery vhodné pro detekci alel u všech odrůd ječmene a to jak jarního tak ozimého, protože umožňuje diagnostikovat alely na úrovni DNA determinující proteiny lišící se počtem aminokyselin v řetězci. U zkoumaných vzorků ječmene, kde je přítomna alela lakázy s inzercí vzniká produkt o délce 159 párů bází, přičemž standardní alela poskytuje produkt o délce 135 párů bází.

Reakční směs podle vynálezu pro detekci byla připravována v mikrozkuhavce a obsahuje 1 mikrolitr vzorku DNA ječmene o doporučené koncentraci 100 nanogramů na mikrolitr, 2,5 mikrolitru 10 x PCR pufru, 1 mikrolitr směsi deoxyribonukleotidů o koncentraci 5 mikromolární, 17,8 mikrolitrů sigma vody, 0,2 mikrolitru (5 U/μl) DNA polymerázy, 1,2 mikrolitru hořečnatých iontů o koncentraci 25 mikromolární, 1 mikrolitr Lac-F a 1 mikrolitr primeru Lac-R, oba o koncentraci 6,25 pikomolu. Polymerázová řetězová reakce probíhala v termocykleru při následujícím teplotním profilu: 5 minut při 94 °C, následuje 35 cyklů zahrnující 3 teplotní fáze (40 sekund při 94 °C, 40 s při 60 °C a 40 s při 72 °C), nakonec byla reakce zahřívána po dobu 10 minut na teplotu 72 °C pro dokončení polymerázové řetězové reakce.

Délka získaného produktu se rozliší na 2% agarosovém gelu pomocí délkového standardu Gene Ruler 100bp, přičemž standardní alela poskytuje produkt o délce 135 párů bází a alela s inzercí poskytuje produkt o délce 159 párů bází.

Reakční směs podle vynálezu obsahující specifickou sekvenci primerů, která nebyla dříve publikována, umožňuje přímo amplifikovat specifický úsek DNA ječmene, který prokáže přítomnost alternativních alel kódujících enzym lakázu. Navržené technické řešení nemá v současné době alternativu. Takto

průkazných výsledků v diagnostice různých forem genu pro lakázu ječmene nebylo zatím nikdy dosaženo.

Následující příklady provedení reakční směsi podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ji jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení

Příklad 1

Pro analýzu byly použity listy ječmene. DNA byla izolována pomocí modifikované extrakční metody CTAB (MURRAY a THOMPSON 1980). Koncentrace izolované DNA byla změřena na spektrofotometru a následně upravena pro PCR na doporučenou koncentraci 100 nanogramů na mikrolitr. Do sterilní mikrozkušavky o objemu 200 mikrolitrů byla napipetovaná reakční směs (tzv. PCR kit) skládající se z: 2,5 mikrolitru 10 x PCR pufru, 1 mikrolitr směsi deoxyribonukleotidů o koncentraci 5 mikromolární (Invitrogen), 17,8 mikrolitru sigma vody, 0,2 mikrolitru (5 U/μl) DNA polymerázy (Quigen), 1,2 mikrolitru 25 mikromolární koncentraci hořečnaté sloučeniny, zejména chloridu hořečnatého, 1 mikrolitr primeru Lac-F a 1 mikrolitr primeru Lac-R, oba o koncentraci 6,25 pikomolu. K tomuto „Master mixu“ se pak přidal 1 mikrolitr DNA vzorku ječmene o doporučené koncentraci 100 nanogramů na mikrolitr.

Vlastní PCR probíhala v termocykleru, např. Veriti™ (Applied biosystems). První část reakce probíhala 5 minut při 94 °C, následuje 35 cyklů zahrnující 3 teplotní fáze (40 sekund při 94 °C, 40 s při 60 °C a 40 s při 72 °C) nakonec byla reakce zahřívána po dobu 10 minut na teplotu 72 °C pro dokončení PCR.

Délka získaného produktu byla rozlišena na 2% agarosovém gelu pomocí délkového standardu Gene Ruler 100bp (Fermentas), přičemž standardní alela poskytuje produkt o délce 135 párů bází a alela detekující alelu s inzercí poskytuje produkt o délce 159 párů bází.

Takto lze testovat jak odrůdy a genotypy ječmene ve šlechtících podnicích, tak i vzorky ječmene a z něho odvozené produkty v laboratořích potravinářského průmyslu.

Původci byla úspěšně ověřena reakční směs pro detekci alel lakázy ječmene podle vynálezu v laboratořích ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze – Ruzyni, CZ.

Průmyslová využitelnost

Reakční směs pro molekulární detekci alel lakázy u ječmene je možné dodávat zkušebním laboratořím ve formě detekčního kitu. Uživatel přidá pouze vlastní vzorek DNA a vykoná reakci podle přesně stanovených podmínek. Navrženým postupem lze stanovit přítomnost různých alel lakázy a tím přesně stanovit další průmyslové využití ječmene nebo odvozeného produktu.

Použitá literatura

Mathiasen TE (1995). Laccase and beer storage. PCT Int. Appl. WO 9521240

Murray HG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res 8:4321-4325.

PATENTOVÉ NÁROKY

1 Reakční směs pro molekulární diagnostiku alel lakázy ječmene *in vitro*, **vyznačující se tím**, že její specifickou rozpoznávací složku ve směru 5'- 3' tvoří nové oligonukleotidové sekvence specifických primerů o složení

Lac-F: 5'- CCACAGGAGCAGTTGCAGTC-3' a

Lac-R: 5'- GCCGTGTTCGTGTCGTTGTT-3,

přičemž dále obsahuje reakční pufr, deoxyribonukleotidy, vodu, ionty hořčíku, enzym polymerázu a je použitelná pro polymerázovou řetězovou reakci.

2. Reakční směs podle nároku 1 pro polymerázovou řetězovou reakci, **vyznačující se tím**, že obsahuje 1 mikrolitr vzorku DNA ječmene o koncentraci 100 nanogramů na mikrolitr, 2,5 mikrolitru 10 x PCR pufru, 1 mikrolitr směsi deoxyribonukleotidů o koncentraci 5 mikromolární, 17,8 mikrolitrů sigma vody, 0,2 mikrolitru DNA polymerázy, 1,2 mikrolitru hořečnatých iontů o koncentraci 25 mikromolární, 1 mikrolitr primeru Lac-F a 1 mikrolitr primeru Lac-R, oba o koncentraci 6,25 pikomolu.

3. Oligonukleotidové sekvence specifických primerů o složení

Lac-F: 5'- CCACAGGAGCAGTTGCAGTC-3' a

Lac-R: 5'- GCCGTGTTCGTGTCGTTGTT-3.