



ČESKÁ REPUBLIKA
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ



OSVĚDČENÍ

O ZÁPISU UŽITNÉHO VZORU

Josef Kratochvíl
předseda
Úřadu průmyslového vlastnictví

Úřad průmyslového vlastnictví

zapsal podle § 11 odst. 1 zákona č. 478/1992 Sb., v platném znění, do rejstříku

UŽITNÝ VZOR

číslo

37208

na technické řešení uvedené v příloženém popisu.

V Praze dne: 25.07.2023

Za správnost:

Jiří Voráček
oddělení rejstříků

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitého vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Číslo zápisu: **37208**

Datum zápisu: 25.07.2023

Číslo přihlášky: **2023-41098**

Datum přihlášení: 23.06.2023

MPT: C 12 Q 1/68 (2018.01)
C 12 Q 1/6876 (2018.01)
C 12 Q 1/686 (2018.01)
C 12 Q 1/6888 (2018.01)

Název: Sada pro detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v biologickém materiálu

Majitel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy

Původce: RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves
Mgr. Lucie Valentová, Ph.D., Dobrá Voda u Hořic
Ing. Martina Rejlová, Dvůr Králové nad Labem

Sekvence nukleotidů / aminokyselin dle ST.26: <https://isdv.upv.cz/doc/st26/PUV2023-41098.xml>

SHA-1: d90868cf780288f353d9ec9531b8b7a7f977c8ce

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 208

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/6888 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-41098**
(22) Přihlášeno: **23.06.2023**
(47) Zapsáno: **25.07.2023**

- (73) Majitel:
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy,
CZ
- (72) Původce:
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vitiněves, CZ
Mgr. Lucie Valentová, Ph.D., Dobrá Voda u Hořic,
CZ
Ing. Martina Rejlová, Dvůr Králové nad Labem, CZ

- (54) Název užitého vzoru:
**Sada pro detekci virů raspberry virus 1 a
raspberry virus 2 v biologickém materiálu**

Sada pro detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v biologickém materiálu

Oblast techniky

5

Řešení se týká sady primerů a sond pro PCR detekci nově objevených virů raspberry virus 1 (rod *Enamovirus*) a raspberry virus 2 (rod *Rubodvirus*) metodou PCR v biologickém materiálu.

Dosavadní stav techniky

Maliny patří mezi velmi vyhledávané ovoce a v České republice má jejich pěstování dlouholetou tradici, ať již mezi zahrádkáři tak velkopěstiteli. Pro úspěšnou produkci této komodity je proto nezbytné sledovat zdravotní stav nejen produkčních výsadeb, ale zejména rozmnožovacího materiálu.

Maliníky napadá mnoho virů, např. apple mosaic virus (ApMV), arabis mosaic virus (ArMV), black raspberry necrosis virus (BRNV), cucumber mosaic virus (CMV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV), raspberry leaf mottle virus (RLMV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry vein chlorosis virus (RVCV), rubus yellow net virus (RYNV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV) a tomato black ring virus (TBRV). Viry se vyskytují velmi často v komplexu a způsobují onemocnění maliníku, které vede ke snížení výnosů.

Moderní metody sekvenování umožňují identifikovat nové viry, pro které je třeba vyvinout diagnostický systém, který by umožňoval nejen další výzkum, ale i využití pro rutinní ověřování zdravotního stavu rostlinného materiálu v diagnostických laboratořích. Při analýze rostlin maliníku byly nalezeny nové viry, které byly dle taxonomických pravidel prozatím pojmenovány jako raspberry virus 1, který je příbuzný s viry rodu *Enamovirus*, a raspberry virus 2 příbuzný s viry rodu *Rubodvirus*. Pro tyto viry nebyl dosud vyvinut specifický diagnostický systém na principu real-time PCR, který by umožňoval jejich současnou detekci.

Podstata technického řešení

Kvalitativní nebo kvantitativní detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v biologickém materiálu umožňuje sada PCR primerů a sond podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
 SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1)
 SEQ ID NO. 3: AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG (Sonda 1)
 SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTCCTCAAAG (Forward primer 2)
 SEQ ID NO. 5: CTYACCCTAAAATCAACCACATAAAT (Reverse primer 2)
 SEQ ID NO. 6: CCCTCAAGCCATTATGCTGATC (Sonda 2)
 SEQ ID NO. 7: CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC (Sonda 3),

kde hybridizační sondy jsou vhodně označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce,

přičemž pro PCR detekci viru raspberry virus 1 obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
 SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1)
 SEQ ID NO. 3: AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG (Sonda 1),

55

a pro PCR detekci viru raspberry virus 2 obsahuje sada primerů a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTCCTCAAAG (Forward primer 2)

5 SEQ ID NO. 5: CTYACCCTAAAATCAACACATAAAT (Reverse primer 2)

SEQ ID NO. 6: CCCTCAAGCCATTATGCTGATC (Sonda 2)

SEQ ID NO. 7: CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC (Sonda 3).

10 Výše uvedené sady primerů a sond jsou vhodné pro současnou nebo individuální kvalitativní nebo kvantitativní detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v biologickém materiálu s vysokou specificitou metodou založenou na metodě PCR. Metodou PCR se rozumí klasické uspořádání PCR reakce s detekcí ampliconů pomocí gelové elektroforézy nebo digitální PCR nebo real-time PCR využívající k detekci interkalační barviva nebo různě značené hybridizační sondy podle 15 technického řešení a další varianty metody PCR známé odborníkovi v oboru. Ve výhodném provedení technického řešení je PCR produkt detekován v reálném čase pomocí real-time PCR, a ještě výhodněji pomocí značených hybridizačních sond. V jedné PCR reakci je tak možné stanovit konkrétní virus z výše uvedených virů, který je zodpovědný za vznik onemocnění.

20 Hybridizační sondy mohou být pro účely jejich detekce značeny fluorescenčně, radioaktivně, neradioaktivně nebo dalšími způsoby známými odborníkovi v oboru. Ve výhodném provedení technického řešení jsou hybridizační sondy pro detekci jednotlivých virů značeny fluorescenčně, a ještě výhodněji pomocí odlišných fluoroforů pro jednotlivé viry, což umožňuje jejich současnou detekci v jedné PCR reakci.

25 Návrh sad primerů a hybridizačních sond podle technického řešení pro detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 byl proveden ve dvou krocích: i) Analýza sekvencí vlastních izolátů těchto virů; ii) Návrh sad primerů a hybridizačních sond pro detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2.

30 Detekce virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 může být dle provedení technického řešení provedena v jakémkoliv rostlinném materiálu, s výhodou je rostlinným materiálem list.

35 Prvním krokem detekce virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v rostlinném materiálu je izolace celkové RNA a její přepis do cDNA pomocí RNA-dependentní DNA polymerázy a sady náhodných primerů metodami známými v oboru. Vytvořená cDNA je následně analyzována na přítomnost nukleové kyseliny virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 metodou PCR sadami primerů a hybridizačních sond podle technického řešení.

40 Příklady provedení technického řešení jsou zde uvedeny pouze pro ilustraci a žádným způsobem neomezuji rozsah této přihlášky, která je vymezena připojeným nárokem a podrobně popsána v popisu technického řešení. Odborník v oboru bude schopen učinit různé modifikace použitého způsobu PCR a uvedených primerů tak, aby nedošlo ke snížení specificity PCR detekce.

45 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Návrh sekvencí primerů a sond

50 Sekvence různých izolátů virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 byly získány vlastní vynálezovou činností. Pro analýzu variability sekvencí byla použita metoda pairwise alignment, algoritmus Geneious Alignment v programu Geneious Prime. Pro návržení sad primerů a hybridizačních sond byly použity konzervované oblasti genomu virů vykazující nejvyšší sekvenční homologii napříč všemi izoláty. Primery a hybridizační sondy byly navrženy pomocí programu Geneious Prime.

55

Tabulka 1. Přehled primerů a sond pro detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2.

SEQ ID NO.	Popis	Virus	Sekvence (Dle IUPAC: Y zastupuje C nebo T; R zastupuje A nebo G; S zastupuje G nebo C; W zastupuje A nebo T)
SEQ ID NO. 1	Forward primer 1	raspberry virus 1	CTGGCGTACAGAAATCGGG
SEQ ID NO. 2	Reverse primer 1	raspberry virus 1	AGCACCAGCATATTGGGAC
SEQ ID NO. 3	Sonda 1	raspberry virus 1	AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG
SEQ ID NO. 4	Forward primer 2	raspberry virus 2, kmen A, kmen B	AATCAATGTTGAAAYTGTTCAAAAG
SEQ ID NO. 5	Reverse primer 2	raspberry virus 2, kmen A, kmen B	CTYACCCTAAAATCAACCACATAAAT
SEQ ID NO. 6	Sonda 2	raspberry virus 2, kmen A	CCCTCAAGCCATTATGCTGATC
SEQ ID NO. 7	Sonda 3	raspberry virus 2, kmen B	CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC

5 Nasedání primerů a sond na referenční sekvence ukazuje Tabulka 2.

Tabulka 2. Nasedání primerů a sond použitých pro detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2. Místa pro nasedání primerů a sond jsou vyznačena tučně. Podtržením je vyznačeno nasedání primerů a sond v reverzní orientaci.

10

- Místa pro nasedání primerů a sond použitých pro detekci viru raspberry virus 1

Izolát CF322 1 **SEQ ID NO. 1** TAC**CTGGCGTACAGAAATCGGG**TTTCGTACAACTACCTCCTCCTCT**SEQ ID NO. 3** **AAATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG**CCCCARTATGCTGGTGTGAG
ATGGACCGCATGCTTTAGCCCAAGCATGTTATGGAGGAGGAGATTAAAGCTCCTACGCCCAATACAA**CCAGGGTTATACGACCAGCA**CTC

- Místa pro nasedání primerů a sond použitých pro detekci viru raspberry virus 2

Kmen A, izolát CF861 1 **SEQ ID NO. 4** AC**AAATCAATGTTGAATTGTTTCCAAAAG**ATCAGCATAATGGCTTGAGGGAAATTTATGTGGTTGATTTAGGGTAAGGAT
TGTTTAAGTTACAACCTAACCAAGGTTTT**CTAGTCGTATTACCGAACTCCCTTTAAATACACCAACTAAAATCCCATTC**CTA

Kmen B, izolát C9830 1 **SEQ ID NO. 4** AC**AAATCAATGTTGA**ACTGTTTCCAAAAGATC**ACACACACGGTTTGAGGGAAATTTATGTGGTTGATTTAGGGT**GAGGAT
TGTTTAAGTTACAACCTGACCAAGGTTTT**CTAGTTGTTGTTGCCAACTCCCTTTAAATACACCAACTAAAATCCCATTC**CTA

15 **Příklad 2: Simplexová kvalitativní detekce viru raspberry virus 1 v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání**

20 Pro detekci viru raspberry virus 1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy RibospinTM Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

25 SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1).

30 PCR amplifikace probíhala v PCR cyklu C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s. Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplicony analyzovány elektroforetický na 4% agarózovém gelu. U vzorků pozitivních na přítomnost viru raspberry virus 1 byl identifikován proužek o velikosti 83 bp.

Příklad 3: Simplexová kvalitativní detekce viru raspberry virus 2 v biologickém materiálu metodou PCR v klasickém uspořádání

5 Pro detekci viru raspberry virus 2 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý. V reakci byly použity tyto primery:

10 SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTTCCAAAAG (Forward primer 2)
SEQ ID NO. 5: CTYACCCTAAAATCAACCACATAAAT (Reverse primer 2).

15 PCR amplifikace probíhala v PCR cykleru C1000 (Biorad) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s. Po ukončení reakce byly výsledné PCR amplikony analyzovány elektroforeticky na 4% agarózovém gelu. U vzorků pozitivních na přítomnost viru raspberry virus 2 byl identifikován proužek o velikosti 76 bp.

20 Příklad 4: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru raspberry virus 1 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

25 Pro detekci viru raspberry virus 1 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

30 Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru raspberry virus 1 použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1).

35 Real-time PCR probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu. Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR amplikonů.

40 V ještě výhodnějším provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru raspberry virus 1 použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM sonda. V reakci byly použity tyto primery a sonda:

45 SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1)
SEQ ID NO. 3: AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG (Sonda 1).

50 Real-time PCR probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

55 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost viru raspberry virus 1 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři vzorky (standarty) viru raspberry virus 1

o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru raspberry virus 1 ve vzorku.

5 Příklad 5: Simplexová kvalitativní a kvantitativní detekce viru raspberry virus 2 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

Pro detekci viru raspberry virus 2 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla
10 použita jako templát pro real-time PCR reakci.

Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru raspberry virus 2 použito interkalační barvivo s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza
15 (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (Biotium). V reakci byly použity tyto primery:

SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTTCCAAAAG (Forward primer 2)

SEQ ID NO. 5: CTYACCCTAAAATCAACCACATAAAT (Reverse primer 2).

20 Real-time PCR probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu. Pozitivní nálezy získané pomocí real-time PCR byly ověřeny melting analýzou s určením charakteristické křivky tání specifických PCR ampliconů.

25 V ještě výhodnějším provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci viru raspberry virus 2 použito fluorescenčně značené hybridizační sondy s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 150 nM sonda 2; 150 nM sonda 3. V reakci byly použity tyto primery a sondy:

30 SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTTCCAAAAG (Forward primer 2)

SEQ ID NO. 5: CTYACCCTAAAATCAACCACATAAAT (Reverse primer 2)

SEQ ID NO. 6: CCCTCAAGCCATTATGCTGATC (Sonda 2)

SEQ ID NO. 7: CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC (Sonda 3).

35 Real-time PCR probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

40 Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost viru raspberry virus 2 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři vzorky (standardy) viru raspberry virus 2 o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla u pozitivních vzorků použita pro stanovení koncentrace viru raspberry virus 2 ve vzorku.

45 Příklad 6: Současná multiplexová kvalitativní a kvantitativní detekce virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v biologickém materiálu metodou real-time PCR

Pro současnou detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 byla z infikovaných rostlin izolována celková RNA pomocí soupravy Ribospin™ Plant (GeneAll). Izolovaná RNA byla
50 použita pro přípravu cDNA s využitím náhodných primerů (Roche) a M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR reakci.

Ve výhodném provedení technického řešení je pro real-time PCR detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 použito odlišně fluorescenčně značených hybridizačních sond specifických pro
55 příslušný virus s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl cDNA; 1x PCR Blue reakční pufr

(Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 μM dNTP každý; 1 U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 200 nM sonda 1; 150 nM sonda 2; 150 nM sonda 3. V reakci byly použity tyto primery a sondy:

- 5 SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
 SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1)
 SEQ ID NO. 3: AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG (Sonda 1)
 SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTTCCAAAAG (Forward primer 2)
 SEQ ID NO. 5: CTYACCCCTAAAATCAACCACATAAAT (Reverse primer 2)
 10 SEQ ID NO. 6: CCCTCAAGCCATTATGCTGATC (Sonda 2)
 SEQ ID NO. 7: CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC (Sonda 3).

Real-time PCR probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem:
 94 °C/5 minut; 40x cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/20 s, 72 °C/20 s, s odečtem fluorescence
 15 v příslušném kanálu podle typu značení sondy.

Pozitivní nálezy získané pomocí PCR v tomto uspořádání byly porovnány s výsledky ze
 simplexových detekcí virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2, které již byly ověřeny. Ve všech
 případech nálezy ze současné detekce obou virů v jedné PCR reakci souhlasily s výsledky ze
 20 simplexových reakcí.

Ve výhodném provedení technického řešení byla přítomnost virů raspberry virus 1 a raspberry
 virus 2 stanovena kvantitativně. Do real-time PCR běhu byly přidány čtyři vzorky (standarty)
 raspberry viru 1 a raspberry viru 2 o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestrojení
 25 kalibrační křivky. Koncentrace virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 u pozitivních vzorků byla
 stanovena podle příslušné kalibrační křivky.

Průmyslová využitelnost

30 Nově navržené primery a hybridizační sondy byly optimalizovány pro použití v sadě pro současnou
 kvalitativní a kvantitativní detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v jedné PCR reakci.
 Nová sada primerů a hybridizačních sond tedy oproti dosavadnímu stavu techniky umožňuje
 diagnostiku těchto virů v biologickém materiálu. Včasnou diagnostikou je možné eliminovat
 35 napadený rozmnožovací materiál maliníku a zamezit tak budoucím hospodářským ztrátám.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada primerů a sond pro současnou PCR detekci virů raspberry virus 1 a raspberry virus 2 v biologickém materiálu, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1)
SEQ ID NO. 3: AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG (Sonda 1)
SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTTCCAAAAG (Forward primer 2)
SEQ ID NO. 5: CTYACCCTAAAATCAACCACATAAAT (Reverse primer 2)
SEQ ID NO. 6: CCCTCAAGCCATTATGCTGATC (Sonda 2)
SEQ ID NO. 7: CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC (Sonda 3),

kde hybridizační sondy jsou označeny pro jejich současnou detekci v průběhu PCR reakce, přičemž pro PCR detekci viru raspberry virus 1 obsahuje sada primery a značenou hybridizační sondu, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 1: CTGGCGTACAGAAATCGGG (Forward primer 1)
SEQ ID NO. 2: AGCACCAGCATATTGGGAC (Reverse primer 1)
SEQ ID NO. 3: AATTCGAGGATGCGGGTTATGTTG (Sonda 1),

a pro PCR detekci viru raspberry virus 2 obsahuje sada primery a značené hybridizační sondy, jejichž sekvence jsou

SEQ ID NO. 4: AATTCAATGTTGAAYTGTTTCCAAAAG (Forward primer 2)
SEQ ID NO. 5: CTYACCCTAAAATCAACCACATAAAT (Reverse primer 2)
SEQ ID NO. 6: CCCTCAAGCCATTATGCTGATC (Sonda 2)
SEQ ID NO. 7: CCCTCAAACCGTTGTGTTGATC (Sonda 3).