

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 671

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-34478**
(22) Přihlášeno: **19.12.2017**
(47) Zapsáno: **03.04.2018**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Jan Gebauer, Ph.D., Opava, Kateřinky, CZ
Hana Kudláčková, Dolní Kounice, CZ
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D., Tišnov, CZ
MVDr. Martin Faldyna, Ph.D., Velešovice, CZ
- (74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
bělidle 64/3, 150 00 Praha 5, Smíchov

- (54) Název užitého vzoru:
**Diagnostická sada pro detekci protilátek
proti gonadotropin-uvolňujícímu hormonu
v séru prasat**

CZ 31671 U1

Diagnostická sada pro detekci protilátek proti gonadotropin-uvolňujícímu hormonu v séru prasat

Oblast techniky

5 Předkládané technické řešení se týká diagnostické sady pro metodu ELISA pro detekci protilátek proti gonadotropin-uvolňujícímu hormonu (GnRH, gonadotropin-releasing hormone) v séru prasat.

Dosavadní stav techniky

10 Kančí pach je nepříjemná senzorická odchylka, která se může objevit při tepelné úpravě masa pocházejícího z nekastrovaných kanců. Podle stávající legislativy se jedná o senzoricky změněnou potravinu nevhodnou k lidskému konzumu. Potlačení kančího pachu u vepřového masa je dnes v praxi řešeno chirurgickým odstraněním varlat u kanečků ve věku do 7 dní života. Na základě stanoviska vědecké komise pro zdraví a dobré životní podmínky zvířat Evropského úřadu pro bezpečnost potravin se evropské země zavázaly k postupnému upouštění od chirurgické kastrace od 1. ledna 2018. Jako alternativu k současné praxi lze použít chirurgické odstranění varlat s použitím anestézie, porážení a jatečné zpracování prasat v nižší porážkové hmotnosti (a tím nižším věku ještě před nástupem kančího pachu), úpravy krmné dávky nebo tzv. imunokastrace. Aplikace preparátu proti tvorbě kančího pachu Improvac® byla již schválena pro použití v 55 zemích včetně EU.

20 Aplikace tohoto imunopreparátu vede k indukci protilátek proti GnRH, který je zodpovědný za uvolnění gonadotropních hormonů - luteinizační hormon a folikuly stimulující hormon, které kontrolují funkci varlat, např. produkci testosteronu a jiných steroidů varlat včetně androstenonu, který je zodpovědný za kančí pach. K úspěšnému použití je zapotřebí aplikovat zvířeti 2 dávky, mezi kterými musí být minimální interval 4 týdny. Takto je dosaženo dočasného potlačení funkce varlat. Tento účinek se projeví v průběhu jednoho týdne po aplikaci a snížení hodnot androsteronu a skatolu bylo prokázáno od 4 do 6 týdnů po aplikaci (Zamaratskaia aj., 2008, Effect of a Gonadotropin-releasing Hormone Vaccine (Improvac™) on Steroid Hormones, Boar Taint Compounds and Performance in Entire Male Pigs. Reproduction in Domestic Animals, 43, 351-359). Proto se druhá dávka aplikuje 4 až 6 týdnů před porážkou. Úspěšnost imunokastrace lze stanovit z morfologických ukazatelů varlat. V minulosti byla zaznamenána tendence ke zmenšování velikosti a hmotnosti varlat v souvislosti s aplikací preparátu. Tyto parametry však mohou být významně ovlivňovány výživou, genetickými vlivy, věkem, atd. Proto jsou objektivním indikátorem úspěšné imunokastrace zejména histologické změny v semenotvorných stočených kanálcích a v intersticiu varlete. Ty zahrnují zejména zmenšení průměru kanálek, redukci intersticia a počtu Leydigových buněk a redukci zárodečného epitelu. Žádná z těchto 30 metod ale není schopná detekovat úspěšnost imunitní odpovědi na aplikaci imunopreparátu ještě za života zvířete. Naopak metoda průkazu hladiny specifických protilátek proti GnRH kanců imunizovaných preparátem Improvac® by tuto možnost nabízela. Dosud však nebyla navržena žádná diagnostická souprava, která by detekovala přítomnost protilátek proti GnRH v séru prasat.

Podstata technického řešení

40 Předkládané technické řešení poskytuje diagnostickou sadu pro detekci protilátek proti gonadotropin-uvolňujícímu hormonu (GnRH) metodou ELISA v séru prasat, která obsahuje rekombinantní prasečí gonadotropin-uvolňující hormon (rGnRH protein).

45 Ve výhodném provedení má rekombinantní prasečí GnRH protein sekvenci: QHWSYGLRPG GKRNAENVID SFQEMAKEVA RLAEPQRFEC TAHQPRSPLR DLKGALESLE EEETGQKT.

Diagnostická sada s výhodou obsahuje vícejamkovou destičku s v jamkách navázaným rekombinantním prasečím GnRH proteinem, a dále pak konjugát křenové peroxidázy s polyklonální anti-prasečí protilátkou.

Dále předkládané technické řešení poskytuje primery pro amplifikaci kódující sekvence GnRH proteinu pro přípravu plasmidu nesoucího rekombinantní prasečí GnRH protein:

sekvence 5'-3'

Forward: GACGATGACGATAAG CAACACTGGTCCTATGGATTGC

5 Reverse: CCAAGCTTCGAATTG TTAAGTCTTCTGCCCAGTTTCCTC

Tyto primery jsou zejména vhodné pro přípravu kódující sekvence pro vložení do vektoru pTrcHis TOPO® (Invitrogen).

10 Kódující sekvenci pro rekombinantní přípravu požadovaného GnRH proteinu lze získat amplifikací s pomocí uvedených primerů z tkáně prasečího hypothalamu, a pomocí plasmidu vnést do hostitelské buňky, kde se rekombinantní protein produkuje.

Uvedená diagnostická sada dovoluje detekovat přítomnost protilátek proti GnRH v séru prasat, a tedy stanovit hladinu specifických protilátek proti GnRH kanců imunizovaných preparátem Improvac®.

Objasnění výkresů

15 Obrázek 1: dynamika přítomnosti protilátek proti gonadotropin-releasing hormonu v séru prasat detekovaná ELISA metodou s využitím rekombinantního prasečího GnRH

Příklad uskutečnění technického řešení

Použité kmeny

20 Pro konstrukci plasmidu, transformaci i expresi rekombinantního prasečího GnRH proteinu byl použit kmen *Escherichia coli* K12/DH10B T1^R SA (Thermo Fischer Scientific, USA).

Návrh a příprava inzertu

25 Z hypothalamu mozku prasete byla odebrána tkáň, jako výchozí materiál pro amplifikaci sekvence pro GnRH protein. K cca 50 mg tkáně byl přidán 1 ml TRI Reagent® roztoku (Sigma-Aldrich, USA). Tkáň byla homogenizována pomocí přístroje MagNA Lyser (Roche, Švýcarsko) dvěma 30s cykly. Po přidání 100 µl bromanizolu (MRC, USA) a 15 minutové inkubaci byl vzorek centrifugován (10 min, 12.000 x g, 4 °C). Horní vodná fáze, která obsahuje celkovou RNA tkáň, byla odebrána a smíchána s 500 µl isopropanolu (Penta, ČR) pro precipitaci RNA. Centrifugovaná peleta byla promyta 1 ml 75 % ethanolu (Penta, ČR), promytá peleta pak rozpuštěna ve vodě přečištěné od enzymů RNáz.

30 Celková mRNA tkáň byla pomocí reverzní transkripce přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí M-MLV transkriptázy (Thermo Fischer Scientific, USA) podle návodu výrobce. Jako primery byly použity Oligo dT v koncentraci 25 µg/ml. Takto připravená cDNA byla následně použita jako templát pro amplifikaci sekvence v PCR reakci.

35 Primery pro amplifikaci sekvence byly navrženy pro prasečí Gonadotropin-releasing hormone I (Progonadoliberin-1, gen GNRH1, databáze UniProt P49921) bez signálního peptidu – 23 aminokyselin z N-konce proteinu.

Primery pro tuto sekvenci byly prodlouženy o 15 nukleotidů (Tabulka 1) komplementárních ke koncovým úsekům použitého vektoru pTrcHis TOPO® (Invitrogen, USA).

40 Tabulka 1: Sekvence primerů pro rGnRH, včetně 15 nukleotidového přesahu do vektoru pTrcHis TOPO®

sekvence 5'-3'

Forward: GACGATGACGATAAG CAACACTGGTCCTATGGATTGC

Reverse: CCAAGCTTCGAATTG TTAAGTCTTCTGCCCAGTTTCCTC

Pomocí metody polymerázové řetězové reakce byla provedena amplifikace sekvence pro prasečí GnRH bez signálního peptidu s uvedenými primery v tabulce 1. Po smíchání 12,5 µl Plain PP MasterMixu (Top-Bio, ČR), 1 µl obou primerů (10 µM), 1 µl cDNA templátu a 9,5 µl H₂O bylo provedeno 30 cyklů PCR reakce (Tabulka 2).

5 Tabulka 2: Jednotlivé kroky PCR reakce

krok	čas	teplota
1	3 min	95 °C
2	0,5 min	94 °C
3	0,5 min	55 °C
4	1 min	72 °C
5	<i>kroky 2-4 29x opakovat</i>	
6	10 min	72 °C
7	∞	10 °C

Přítomnost amplifikátu byla potvrzena pomocí DNA elektroforézy na 1,2% agarózovém gelu s 2 µl/100 ml Midori green (Nippon Genetics, Japonsko) pro UV detekci.

Klonování a transformace do *E. coli*

- 10 Ligace insertu (sekvence pro rGnRH) do vektoru (plazmid pTrcHis TOPO® s genem pro rezistenci k ampicilinu a HisTag značkou pro detekci a izolaci proteinu) byla provedena metodou Seamless cloning (GENEART Seamless Cloning and Assembly Kit, Invitrogen, USA), podle návodu výrobce. Po transformaci ligovaného vektoru s insertem do chemicky kompetentních buněk *E. coli* DH10B byly bakterie vysety na Petriho misky s LB agarem s 50 µg/ml ampicilinu.
- 15 Po inkubaci při 37 °C byly identifikovány kolonie pozitivní na přítomnost sekvence pro rGnRH pomocí PCR reakce.

Indukce exprese rekombinantního GnRH v bakteriích *E. coli*

- Individuální kolonie, které byly vybrány na základě rezistence k ampicilinu a s prokázanou přítomností sekvence pro GnRH, byly použity k inokulaci 10 ml LB média (20 g/l LB, 0,5 % glukosy, 50 µg/ml ampicilinu) v 50 ml sterilní zkumavce. Kultivace proběhla v inkubátoru při 37 °C za stálého třepání (250 až 300 ot/min) přes noc (16 až 18 h). Buňky narostlých bakterií byly zakoncentrovány do pelety centrifugací (1.500 až 3.000 x g, 10 min pokojová teplota). Supernatant byl odstraněn dekantací. Peleta buněk obsahující bakterie byla resuspendována v 10 ml LB média bez glukosy (20 g/l LB, 50 µg/ml ampicilinu) a kultivována v inkubátoru při 37 °C za stálého třepání (250 až 300 ot/min) do optické hustoty kultury OD₆₀₀ = 0,6 (buňky v logaritmické fázi růstu). Poté byla indukce exprese zahájena přidávkem IPTG do konečné koncentrace 1 mM. Kultura byla umístěna do inkubátoru (37 °C, 250 až 300 ot./min). Poté byly odebrány 1 ml alikvoty v časových intervalech (0, 1,5, 3,4, 5,6 a 20 h) z důvodů nalezení optimální doby produkce rekombinantního GnRH proteinu. Alikvoty byly umístěny do 1,5ml zkumavek, následně centrifugovány (14.000 x g, 10 min, pokojová teplota). Pelety s bakteriemi byly resuspendovány v Laemmli vzorkovém pufru, povařeny (5 min, 95 °C), sonikovány (Sonopuls HD 3 100, Bandelin, Německo, 6 min., na ledu) a podrobeny analýze pomocí SDS-PAGE a imunoblotu na přítomnost rekombinantního GnRH proteinu. K detekci byla použita monoklonální protilátka proti HisTag značce na N-konci rGnRH proteinu (Thermo Fisher Scientific, USA), jako sekundární protilátka kozi anti-myši polyklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Bethyl, USA). Vizualizace proteinů na membráně byla provedena pomocí 3,3'-diaminobenzidinu jako chromogenu.

Z výsledků je patrné, že optimální produkce rekombinantního GnRH nastala po 6 hodinách po její indukci IPTG.

40 Produkce rekombinantního GnRH

Klon bakterie s prokázanou produkcí rekombinantního GnRH (rGnRH) byl kultivován v 5 ml LB média (20 g/l LB, 0,5 % glukosy, 50 µg/ml ampicilinu) v 50 ml sterilní zkumavce v inkubátoru

při 37 °C za stálého třepání (250 až 300 ot/min) přes noc (16 až 18 h). Buňky narostlých bakterií byly zakoncentrovány do pelety centrifugací při 1.500 až 3.000 x g, 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn dekantací. Peleta buněk obsahující bakterie byla resuspendována v 5 ml LB média bez glukosy (20 g/l LB, 50 µg/ml ampicilinu) a následně 3 ml takto narostlé

5 čerstvé kultury bylo přeneseno do 150 ml LB média bez glukosy (20 g/l LB, 50 µg/ml ampicilinu) kultivováno v inkubátoru při 37 °C za stálého třepání (250 až 300 ot/min) do optické hustoty kultury OD₆₀₀ = 0,6. Poté byla indukce exprese zahájena přidáním IPTG do konečné koncentrace 1 mM. Kultura byla umístěna do inkubátoru (37 °C, 250 až 300 ot/min) a kultivována po dobu 6 h (při delší době inkubace dochází k úbytku produkce rGnRH).

10 Aminokyselinová sekvence rekombinantního proteinu GnRH (rGnRH) je:

QHSYGLRPG GKRNAENVID SFQEMAKEVA RLAEPQRFEC TAHQPRSPLR DLKGA-
LESLI EEETGQKT

Purifikace rekombinantního GnRH

15 Buňky narostlých bakterií produkujících rekombinantní protein byly zakoncentrovány do pelety centrifugací (7.000 x g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn dekantací. Peleta buněk obsahující bakterie byla resuspendována a promyta v PBS. Následně byla peleta resuspendována v 5 až 10 ml PBS, sonikována (Sonopuls HD 3100, Bandelin, Německo, 6 min., na ledu) a centrifugována (15.000 x g, 10 min, 4 °C). Takto vzniklý supernatant byl převeden do nanášecího pufru (0,02 M fosfát sodný, 0,5 M NaCl, pH 7,4) pomocí odsolovací kolony (PD-10, Sephadex G-25 GE Healthcare, Velká Británie). Rekombinantní GnRH s N-terminálním His-
20 Tagem byl izolován pomocí Ni-chelatační chromatografie (HiTrap Chelating HP kolona, GE Healthcare, Velká Británie), která byla provedena na zařízení FPLC (Pharmacia, Švédsko). Po navázání a následném promytí pomocí nanášecího pufru se zvýšenou koncentrací imidazolu (40 mM), byl rekombinantní GnRH protein uvolněn elučním puftrem (0,02 M fosfát sodný, 0,5 M
25 NaCl and 250 mM imidazol, pH 7,4). Průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE a imunoblotu. K detekci byla použita monoklonální protilátka proti HisTag značce na N-konci rGnRH proteinu, jako sekundární protilátka kozí anti-myší polyklonální protilátka konjugovaná s křenuvou peroxidázou. Vizualizace proteinů na membráně byla provedena pomocí 3,3'-diaminobenzidinu jako chromogenu.

30 Eluát s rGnRH byl zakoncentrován a použit jako antigen pro imunoblot a metodu ELISA s využitím sér z prasat imunizovaných přípravkem Improvac®.

Ověření přítomnosti rGnRH pomocí LC-MS/MS

35 Z SDS-PAGE gelu vzorku Eluce po Ni-chelatační chromatografii byla skalpelem vyříznuta oblast pod 15 kDa a byla provedena hmotnostně spektrometrická analýza pro potvrzení přítomnosti prasečího rGnRH. LC-MS/MS systém byl vybaven kapalinovým chromatografem (RSLCnano. Thermo Fisher Scientific) spojeným on-line s nanoelektrosprejem a vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem (Orbitrap Velos Pro). Naměřená spektra byla v softwaru Proteome Discoverer prohledána pomocí programu Sequest HT (Thermo Fischer Scientific, USA) s využitím proteinové databáze (*E. coli* databáze s přidáním sekvencí pro prasečí Progonadoliberin1 upravený o sekvenci aminokyselin z pTrcHis vektoru na N-konci proteinu, UniProt databáze).
40 Ve vyšetřovaném vzorku jsme potvrdili přítomnost prasečího rGnRH s vysokým skóre (FDR 0,01, pokrytí proteinu cca 50 %).

Sestavení ELISA soupravy

45 Jako antigen byl použit rGnRH naředěný tak, aby jeho koncentrace byla 1 µl/ml ve vazném karbonátovém pufru o pH 9,6. To bylo aplikováno v objemu 100 µl do jamek mikrotitrační destičky (Maxisorb, NUNC, USA). Vazba na dno jamky probíhala přes noc při 4 °C. Následovalo 5x promytí destiček směsí PBS a 0,05% Tween 20 s použitím poloautomatické promývačky ELx50 (Biotek Instrumentals, USA). Obsazení případných nespecifických vazebných míst bylo provedeno přidáním roztoku obsahujícího 0,5 % kaseinu a 10 % sacharózy na 30 min a následným
50 proplachem. Vyšetřovaná séra před a po aplikaci preparátu Improvac® byla naředěna 300x. Re-

dicí roztok obsahoval PBS, 0,05% Tween 20 a 0,5% kaseinový hydrolyzát. Inkubace sér v jamkách mikrotitrační destičky probíhala při pokojové teplotě po dobu 60 minut následované 5x promytím směsí PBS a 0,05% Tween 20.

5 Do jamek byl přidán 50.000x ředěný konjugát křenové peroxidázy s polyklonální protilátkou anti-pig IgG (Bethyl, USA) v objemu 100 µl na jamku v ředícím roztoku (PBS, 0,05 % Tween a 0,5 % kaseinový hydrolyzát). Inkubace při pokojové teplotě trvala 30 minut a byla následována 5x promytím směsí PBS a 0,05% Tween 20. V dalším kroku byl aplikován substrát TMB (Testline, ČR) v objemu 100 µl do každé jamky, který se nechal působit po dobu 30 min. Průběh reakce byl zastaven přidáním 2 M H₂SO₄ v objemu 50 µl do každé jamky. Absorbance intenzity barevné reakce byla měřena při 450 nm (multifunkční reader Synergy H1, Biotek Instrumentals, USA).

Validace ELISA soupravy

Homogenita potažení destičky

15 Prováděla se v dané šarži na jedné mikrotitrační destičce v 96 jamkách s jedním sérem v ředění 300x. Provedl se standardní test podle pracovního postupu uvedeného výše a byly vypočteny hodnoty průměru absorbancí, směrodatné výběrové odchylky a variačního koeficientu.

Výpočet:

- průměrná hodnota absorbance - vzorec č. 1

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

20 kde x... hodnota absorbance vzorku

n ... počet vzorků

- směrodatná výběrová odchylka - vzorec č. 2

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

kde x... hodnota absorbance vzorku

25 x... průměrná hodnota absorbance

n... počet vzorků

- variační koeficient - vzorec č. 3

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

kde SD... směrodatná výběrová odchylka

30 x... průměrná hodnota absorbance

Vypočtené hodnoty

průměrná hodnota 0,4271

směrodatná výběrová odchylka 0,0231

variační koeficient 5,42 %

35 Opakovatelnost - intra-assay

Prováděla se v jedné šarži na jedné mikrotitrační destičce minimálně se 4 vzorky v zastoupení 2 vzorky s nízkou absorbancí a 2 a vzorky s vysokou absorbancí v 16 jamkách od každého vzorku. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše. Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatné výběrové odchylky a variační koeficienty.

Pro celý rozsah byla následně vypočtena směrodatná odchylka a variační koeficient, které vyjadřují přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah.

Výpočet: průměrné hodnoty absorbance, směrodatné výběrové odchylky a variační koeficienty viz vzorce č. 1, 2 a 3.

- 5 • přesnost pro celý rozsah - vzorec č. 4

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 \dots (n_k - 1)s_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

kde s... směrodatná výběrová odchylka vzorku

n... počet vzorků

- relativní přesnost pro celý rozsah - vzorec č. 5

$$CV = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)v_1^2 + (n_2 - 1)v_2^2 \dots (n_k - 1)v_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) \dots (n_k - 1)}}$$

10

kde v... variační koeficient vzorku

n... počet vzorků

Vypočtené hodnoty

přesnost pro celý rozsah 0,0627

15 relativní přesnost pro celý rozsah 9,96 %

Opakovatelnost - inter-assay

Prováděla se v jedné šarži jako 10 samostatných analýz. Testovaly se 4 vzorky - 2 s nízkou a 2 s vysokou absorbancí, každý vzorek ve 4 jamkách, současně se analyzovaly slepé vzorky a kontrolní séra soupravy testované šarže. Provedl se test podle pracovního postupu uvedeného výše.

20 Pro každý vzorek byla vypočtena průměrná hodnota absorbance, směrodatná výběrová odchylka a variační koeficient a pro celý rozsah soupravy přesnost a relativní přesnost. Výpočet: průměrná hodnota absorbance, směrodatná výběrová odchylka, variační koeficient, přesnost a relativní přesnost pro celý rozsah - viz vzorce č. 1 až 5.

Vypočtené hodnoty

25 Přesnost pro celý rozsah 0,0514

Relativní přesnost pro celý rozsah 7,25 %

Ověření použitelnosti ELISA metody na reálných vzorcích

30 ELISA test sestavený a použitý tak, jak je popsáno v předchozích kapitolách, byl ověřen na reálných vzorcích. Tyto vzorky byly získány v průběhu experimentálního použití preparátu Improvac® v prostorách experimentálního zařízení Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. Tento pokus byl schválen rezortní komisí Ministerstva zemědělství ČR pod kódem MZe 1685.

Pokus byl rozdělen do dvou na sobě nezávislých časově oddělených opakování. Celkem bylo použito 40 kanečků rozdělených pro tyto účely do 3 skupin:

- 10 kanečků kastrovaných imunizací preparátem Improvac® v souladu s doporučením výrobce;
- 35 10 kanečků kastrovaných chirurgicky ve věku 6 až 7 dní života;
- 20 kanečků nekastrovaných vůbec.

Jako další kontrola bylo použito 10 nemanipulovaných prasniček.

Z výsledků shrnutých na Obrázku 1 je patrné, že sestavená souprava ELISA může sloužit k detekci přítomnosti protilátek proti GnRH v séru prasat.

NÁROKY NA OCHRANU

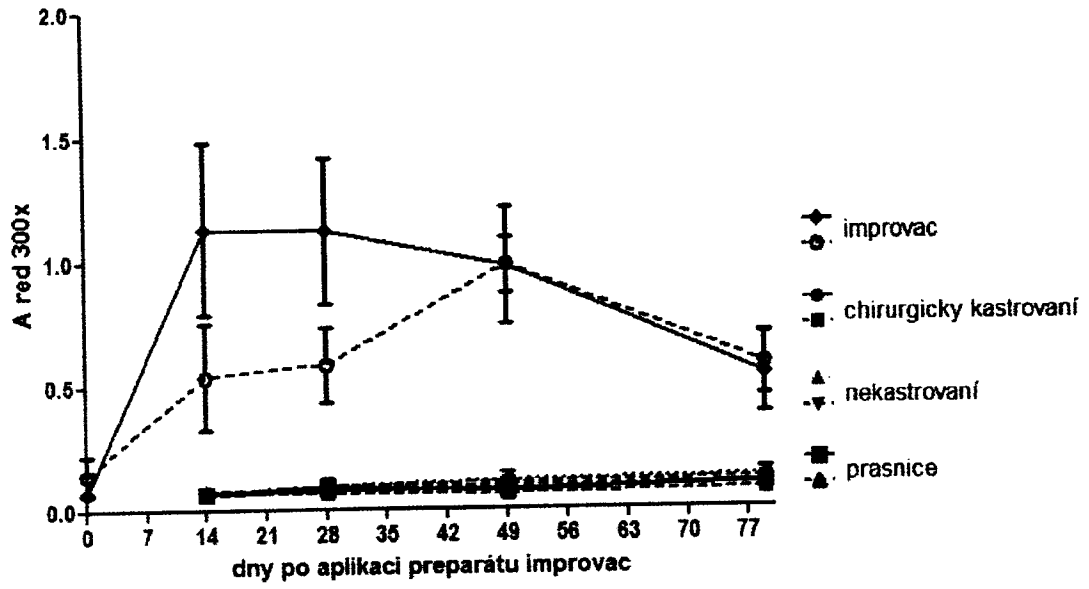
- 5 1. Diagnostická sada pro detekci protilátek proti gonadotropin-uvolňujícímu hormonu v séru prasat metodou ELISA, **vyznačená tím**, že obsahuje rekombinantní prasečí gonadotropin-uvolňující hormon.
2. Diagnostická sada podle nároku 1, **vyznačená tím**, že rekombinantní prasečí gonadotropin-uvolňující hormon má aminokyselinovou sekvenci: QHWSYGLRPG GKR-NAENVID SFQEMAKEVA RLAEPQRFEC TAHQPRSPLR DLKGALES LI EEETGQKT.
- 10 3. Diagnostická sada podle nároku 1 nebo 2, **vyznačená tím**, že obsahuje vícejamkovou destičku s v jamkách navázaným rekombinantním prasečím gonadotropin-uvolňujícím hormonem, a konjugát křenové peroxidázy s polyklonální anti-prasečí protilátkou.
- 15 4. Primery pro amplifikaci kódující sekvence proteinu gonadotropin-uvolňujícího hormonu pro přípravu plasmidu nesoucího rekombinantní prasečí protein gonadotropin-uvolňující hormon, mající následující sekvence 5'-3':

Forward: GACGATGACGATAAG

CAACACTGGTCCTATGGATTGC

Reverse: CCAAGCTTCGAATTG

TTAAGTCTTCTGCCAGTTTCCTC



Obrázek 1

Konec dokumentu