

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 092

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/689 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-456**
(22) Přihlášeno: **08.09.2018**
(40) Zveřejněno: **02.01.2020**
(Věstník č. 1/2020)
(47) Uděleno: **20.11.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **02.01.2020**
(Věstník č. 1/2020)

(56) Relevantní dokumenty:

LUND M. et al.: „Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*- and *Subdoligranulum variabile*-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR,“ *Poultry Science*, vol. 89, no. 6, 2010, str. 1217 - 1224, ISSN 0032-5791; GONG J. et al.: „16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca,“ *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 59, no. 1, 2007, str. 147 - 157, ISSN 0168-6496; WISE M. G. et al.: „Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets,“ *Journal of Applied Microbiology*, vol. 102, no. 4, 2007, str. 1138 - 1149, ISSN 1364-5072; HOLD G. L. et al.: „Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces,“ *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 7, 2003, str. 4320 - 4324, ISSN 0099-2240.
EP 3130680.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D., Velešovice, CZ
MVDr. Jitka Matiašovicová, Ph.D., Hostěnice, CZ
Mgr. Bc. Darina Čejková, Ph.D., Brno, Židenice,
CZ
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D., Janová, CZ
Mgr. Miroslava Kollarčíková, Kuřim, CZ
Ing. Daniela Karasová, Ph.D., Brno, Žabovřesky,
CZ
Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D., Brno, Stránice,
CZ

(74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

Způsob detekce *Faecalibacterium prausnitzii* pomocí metody PCR v reálném čase a sada primerů pro tento způsob detekce *F. prausnitzii*

(57) Anotace:

Předkládané řešení poskytuje způsob specifické detekce bakterie *Faecalibacterium prausnitzii* v obsahu trávicího traktu nebo trusu drůbeže, při němž se ze vzorku izoluje DNA, a následně se izolovaná DNA podrobí amplifikační reakci metodou real-time PCR s primery
FaecF2: CGAGGGCCTGGACTTCATCAAG,
FaecR2: GCCGGTGATCCACTCGTTGGAC.

Způsob detekce *Faecalibacterium prausnitzii* pomocí metody PCR v reálném čase a sada primerů pro tento způsob detekce *F. prausnitzii*

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález poskytuje způsob specifické detekce a kvantifikace *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*) v trusu nebo v obsahu tráveniny kuřat a slepic pomocí metody PCR v reálném čase (real time PCR). Dále vynález poskytuje sadu primerů pro použití při tomto způsobu detekce *F. prausnitzii*.

Dosavadní stav techniky

15 Střevní mikroflóra podstatným způsobem ovlivňuje a charakterizuje zdravotní stav hostitele. Stanovit skladbu střevní mikroflóry však není snadné, protože naprostá většina z asi tisíce různých bakteriálních druhů, které kolonizují trávicí trakt, jsou striktní anaerobové. Jejich kultivace se tedy musí provádět za anaerobních podmínek a vzhledem k jejich různorodosti pro mnoho z nich nejsou známy specifické kultivační podmínky. Přitom pod pojmem „specifické kultivační podmínky“ je nutno chápat podmínky, které umožní růst cílové bakterie a současně potlačí růst všech ostatních bakterií. Kultivace vybraných bakterií trávicího traktu včetně *F. prausnitzii* za účelem jejich specifické kvantifikace je proto v současnosti nemožná.

25 Problémy spojené se specifickou kultivací anaerobních bakterií z trávicího traktu se v poslední době řeší alternativními přístupy založenými na průkazu nukleových kyselin ve vzorcích. V posledních 10 letech se velmi rozšířilo stanovení skladby střevní mikroflóry pomocí nové generace sekvenování nukleových kyselin (next-generation sequencing), které je v případě sledování skladby bakteriálních populací velmi často spojené s předchozí PCR amplifikací části genu pro 16S rRNA. Tento nástroj však zůstává poměrně finančně nákladný a v jednom stanovení se obvykle analyzuje více vzorků. V laboratoři původců tohoto vynálezu se například zpracovává narázově vždy 160 vzorků, a tak určitou dobu trvá, než se nashromáždí vzorky k analýze. Proto jsou zapotřebí i operativnější metody, u kterých by nebylo potřeba čekat týdny na kumulaci mezi sebou nesouvisejících vzorků. Pro tyto potřeby se nabízí využití PCR přísně specifické pro cílovou bakterii. PCR průkaz, ve srovnání s využitím sekvenování nové generace, má výhodu i v tom, že není ovlivněn počtem kopií genů pro 16S rRNA anebo velikostí genomů, což jsou faktory, které ovlivňují výstupy ze sekvenování. Přestože je tedy PCR přímočará volba, problémy vyvstávají v okamžiku návrhu specifických primerů. Typicky není známo, na jaké sekvence je vhodné primery navrhnout, které části genomu cílové bakterie jsou pro ni přísně specifické a které se naopak mohou vyskytovat i v necílových druzích. Při množství bakterií, které osídlují trávicí trakt (cca 1000 různých druhů u každého jedince) a počtu genů, které každá bakterie kóduje (obvykle 1500 až 5000 genů u každé bakterie v závislosti na konkrétním bakteriálním druhu), je nalezení cílových sekvencí a následně PCR primerů velmi náročné.

45 *F. prausnitzii* je běžnou součástí střevní mikroflóry všech teplokrevných živočichů, tedy ptáků a savců, u kterých tvoří okolo 1 % z celkové mikroflóry. U kuřat v komerční produkci se v trávicím traktu objevuje od 3. týdne života (Videnska P, Sedlar K, Lukac M, Faldynova M, Gerzova L, Cejkova D, Sisak F, Rychlik I. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. PLoS One 2014;9:e115142). *F. prausnitzii* patří mezi producenty butyrátu s významným pozitivním účinkem na funkci trávicího traktu (Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Suris-Valls R, Aldeguer X, Sabat-Mir M, Duncan SH, Flint HJ, Garcia-Gil LJ. Changes in the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* phylogroups I and II in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease and patients with colorectal cancer. Inflamm Bowel Dis 2016;22:28-41; Zhou L, Zhang M, Wang Y, Dorfman RG, Liu H, Yu T, Chen X, Tang D, Xu L, Yin Y, Pan Y, Zhou Q, Zhou Y, Yu C. *Faecalibacterium prausnitzii* produces butyrate to maintain Th17/Treg balance and to ameliorate colorectal colitis by

inhibiting histone deacetylase 1. Inflamm Bowel Dis 2018. doi: 10.1093/ibd/izy182). *F. prausnitzii* navíc může účinně kolonizovat trávicí trakt drůbeže od prvních týdnů života a lze o něm uvažovat jako o bakterii s probiotickým potenciálem (dosud nepublikované výsledky). Naopak ze všech bakterií osídlujících trávicí trakt patří *F. prausnitzii* mezi bakterie nejcitlivější na kyslík. *F. prausnitzii* hyne již během hodinové expozice v aerobním prostředí (Medvecký M, Cejková D, Polanský O, Karasová D, Kubasová T, Cizek A, Rychlík I. Whole genome sequencing and function prediction of 133 gut anaerobes isolated from chicken caecum in pure cultures. BMC Genomics 2018;19:561). *F. prausnitzii* proto patří mezi bakterie, které jako první mizí z trávicího traktu při zánětlivých reakcích, při kterých ve střevě dochází k lokální produkci molekul reaktivního kyslíku v důsledku aktivace imunitního systému. Přítomnost *F. prausnitzii* je proto pozitivním znakem zdravotního stavu drůbeže, a naopak úbytek je indikátorem nežádoucího složení střevní mikrobioty a nesprávné funkce trávicího traktu.

Podmínky pro selektivní kultivaci *F. prausnitzii* nejsou známy. *F. prausnitzii* sice lze kultivovat na WCHA nebo YCFA agaroch za striktně anaerobních podmínek, avšak tyto agary podporují růst i mnoha dalších anaerobních bakterií. Po výsevu tráveniny nebo trusu drůbeže na uvedené kultivační půdy narostou kolonie tvořené *F. prausnitzii* současně se stovkami kolonií dalších necílových bakterií. Použití vzorku trusu jako výchozího materiálu dále zhoršuje pravděpodobnost kultivačního zachytu *F. prausnitzii*, protože jakákoli expozice trusu velmi rychle vede k inaktivaci *F. prausnitzii* vzdušným kyslíkem. Kultivační kvantifikace *F. prausnitzii* proto není možná, a to i přes nesporný význam této bakterie pro optimální funkci trávicího traktu.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob detekce bakterie *Faecalibacterium prausnitzii* v obsahu trávicího traktu a trusu drůbeže, jehož podstata spočívá v tom, že se ze vzorku izoluje DNA, a následně se izolovaná DNA podrobí amplifikační reakci metodou PCR v reálném čase (real-time PCR) s primery

FaecF2: CGAGGGCCTGGACTTCATCAAG (SEQ ID NO. 1),
 FaecR2: GCCGGTGATCCACTCGTTGGAC (SEQ ID NO. 2).

Uvedené primery zajišťují amplifikaci PCR produktu, kterým je 118 bp dlouhá část genu pro hypotetický protein FIG00646903. Tato sekvence je specifická pro *F. prausnitzii* a nedochází ke křížovým reakcím s dalšími mikroorganismy přítomnými v drůbežím trusu či trávenině. Bylo experimentálně ověřeno, že uvedené primery jeví nejvyšší specifitu pro stanovení *F. prausnitzii* z testovaných dvojic primerů.

Ve výhodném provedení se dále provede amplifikační reakce s primery 16S_An_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_An_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikujícími část genu pro 16S rRNA všech eubakterií. Amplifikace eubakteriální DNA se využije při kvantifikaci *F. prausnitzii*, kdy se vypočte poměr amplifikačního produktu specifického pro *F. prausnitzii* vůči amplifikačnímu produktu pro všechny eubakterie.

Poměr amplifikačního produktu specifického pro *F. prausnitzii* se vypočte s výhodou tak, že se nejprve odečte Ct hodnota amplifikace *F. prausnitzii* (FaecF2 a R2) od Ct hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (16S_An_F1 a R1) čímž se získá rozdíl mezi hodnotami Ct (ΔCt). Následně se na tento rozdíl umocní základ 2 ($2^{\Delta Ct}$), vypočte se převrácená hodnota ($1/2^{\Delta Ct}$) a výsledek se vynásobí číslem 100 ($100 \times 1/2^{\Delta Ct}$), čímž se získá podíl *F. prausnitzii* v celé eubakteriální populaci v procentech.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále sada primerů pro real time PCR obsahující primery
 FaecF2: CGAGGGCCTGGACTTCATCAAG (SEQ ID NO. 1) a FaecR2:

GCCGGTGATCCACTCGTTGGAC (SEQ ID NO. 2), které specificky detekují *F. prausnitzii* ve vzorcích.

5 Ve výhodném provedení může sada primerů dále obsahovat primery 16S_An_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_An_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikující část genu pro 16S rRNA u všech eubaktérií, tato sada je vhodná pro kvantitativní stanovení *F. prausnitzii* ve vzorcích.

10 Před návrhem specifických primerů byly v laboratoři původců tohoto vynálezu postupně izolovány anaerobní bakterie z trávicího traktu drůbeže a u 327 z nich byly stanoveny kompletní sekvence genomu. U všech bakterií byly předpovězeny všechny geny, které kódují proteiny. Protože se v mnoha případech podařilo získat více než jednoho zástupce daného bakteriálního druhu, bylo možno porovnat, které geny se vyskytují u všech izolátů cílového druhu a současně zcela chybí u všech necílových druhů. V případě *F. prausnitzii* jsme identifikovali 55 genů, které se vyskytly u všech pěti izolátů *F. prausnitzii*, které jsme sekvenovali, a naopak zcela chyběly u zbylých 322 bakterií. Z těchto genů byly vybrány tři geny k dalšímu testování. Při selekci tří genů bylo zohledněno, aby i) délka genů byla větší než 500 bp, ii) se cílové geny vyskytovaly na co nejdelších kontizích (contig) po sekvenování, iii) se cílové geny vyskytovaly uprostřed kontigů a ne na jejich koncích a iv) název genu snižoval pravděpodobnost jejich výskytu na mobilních genetických elementech (byly vyloučeny geny s názvy transposase, integrase, phage, conjugative apod), které se mohou vyskytovat v nejednoznačném počtu kopií na genom. S využitím sekvencí těchto genů byly navrženy primery pro real time PCR do míst, ve kterých byly sekvence cílových genů u všech pěti nezávislých izolátů *F. prausnitzii* zcela identické. Funkčnost navržených primerů byla ověřena na testovacích vzorcích a ze tří navržených dvojic primerů byla určena ta dvojice primerů, která na testovacích vzorcích opakovaně vykazovala nejnižší hodnoty Ct po analýze pomocí real time PCR. Funkčnost vybrané sady primerů byla následně ověřena na reálných vzorcích trusu kuřat, u kterých jsme zastoupení *F. prausnitzii* stanovili jak pomocí real time PCR s primery, které jsou předmětem tohoto patentu, tak i sekvenováním V3 a V4 variabilních oblastí genů pro 16S rRNA. Bylo zjištěno, že výstupy obou metod si odpovídají, což znamená, že stejně kvalitního výsledku lze dosáhnout náročnějším sekvenováním i jednodušší a praktičtější metodou real time PCR, použijí-li se pro real time PCR primery podle tohoto vynálezu.

35 Objasnění výkresů

Obr. 1. Bodový korelační graf pro porovnání detekce *F. prausnitzii* pomocí real time PCR a sekvenováním genů pro 16S rRNA. Vybrané vzorky byly analyzovány oběma postupy a výsledky (vypočtené procentuální zastoupení stanovené každou metodou) jsou vyneseny na osách X a Y.

Příklady uskutečnění vynálezu

45 **Příklad 1: Návrh primerů pro specifickou detekci *F. prausnitzii***

Cílový gen pro hypotetický protein FIG00646903 se vyskytoval u všech pěti izolátů *F. prausnitzii*, u kterých byla stanovena kompletní sekvence jejich genomu. Tento gen se však nevyskytoval u žádné další bakterie. V cílovém genu byla i mezi porovnávanými izoláty pozorována určitá variabilita, a proto byly primery navrženy do oblastí, která byla u všech pěti izolátů identická. Níže jsou zde uvedeny části z celé sekvence genu pro hypotetický protein FIG00646903 pro všech pět izolátů *F. prausnitzii*, a to části která je rozhodující pro návrh primerů. Oblasti odpovídající primerům podle vynálezu jsou podtrženy (forward primer – jednoduché podtržení, reverse primer – dvojité podtržení).

55

Izolát ANA077 (SEQ ID NO. 5)

GAGGATTACTACCCCTGCACCTGGGCGGCTACGACCGTATGATCCTGACCGTCTTCTAT 660
 CTGGAGTCCATCTACGGCAAGGATTGGGCTGATCCCTCCACCTCCACCCTGAACTACACC 720
 GCCGACGAGATCGCCGAGGGCCTGGACTTCATCAAGAGCCTGGTGGACAAGCACGTCATC 780
 ATGCCCCTGCCACCTACTACGGCAACAACGGTTCCACCGCTGCCAACCAGGTCCAACGAG 840
TGGATCACCGGCAAGCTGGCCGGCATCTTCGAGTGGGATTCCGCTGCTTCCAAGTACCGT 900
 GACGCTCTGGACACCGACAACCGCGACGGCTTACCCTGGGCGAGGAGATCCAGTTCGGC 960
 GACTACAAGGGCGGCTTCACCAAGGTTTCCATGGGCTGGCCATCACCAAGACCTGCCAG 1020

Izolát ANA192 (SEQ ID NO. 6)

GAGGATTACTACCCCTGCACCTGGGCGGCTACGACCGTATGATCCTGACCGTCTTCTAT 660
 CTGGAGTCCATCTACGGCAAGGATTGGGCTGATCCCTCCACCTCCACCCTGAACTACACC 720
 GCCGACGAGATCGCCGAGGGCCTGGACTTCATCAAGAGCCTGGTGGACAAGCACGTCATC 780
 ATGCCCCTGCCACCTACTACGGCAACAACGGTTCCACCGCTGCCAACCAGGTCCAACGAG 840
TGGATCACCGGCAAACTGGCCGGCATCTTCGAGTGGGATTCCGCTGCTTCCAAGTACCGT 900
 GACGCTCTGGACACCGACAACCGCGACGGCTTACCCTGGGCGAGGAGATCCAGTTCGGC 960
 GACTACAAGGGCGGCTTCACCAAGGTTTCCATGGGCTGGCCATCACCAAGACCTGCCAG 1020

Izolát ANA122 (SEQ ID NO. 7)

GAGGATTACTACCCCTGCACCTGGGCGGCTACGATCGTATGATCCTGACCGTCTTCTAT 660
 CTGGAGTCCATCTATGGCAAGGATTGGGCTGATCCCTCCACCTCCACCCTGAACTACACC 720
 GCCGACGAGATCGCCGAGGGCCTGGACTTCATCAAGAGCCTGGTGGACAAGCACGTCATC 780
 ATGCCCCTGCCACCTACTACGGCAACAACGGTTCCACCGCTGCCAACCAGGTCCAACGAG 840
TGGATCACCGGCAAGCTGGCCGGCATCTTCGAGTGGGATTCCGCTGCTTCCAAGTACCGT 900
 GACGCTCTGGACACCGACAACCGCGACGGCTTACCCTGGGCGAGGAGATCCAGTTCGGC 960
 GACTACAAGGGCGGCTTCACCAAGGTTTCCATGGGCTGGCCATCACCAAGACCTGCCAG 1020

5

Izolát ANA058 (SEQ ID NO. 8)

GAGGACTACTATCCCCTGCACCTGGGCGGCTACGACCGTATGATCGCCATGGTCTTCTAT 654
 CTGGAGTCCATCTACGGCAAGGATTGGGCCGATCCACCACCTCCACCCTGAACTACACC 714
 CGCGATGAGATCATCGAGGGCCTGGACTTCATCAAGAGCCTGGTGGACCGCCATGTCATC 774
 ATGCCCCTGCCACCTACTACGGCAACAACGGTCCACCAGCCGAGCCAGGTCCAACGAG 834
TGGATCACCGGCCAGCTGGCAGGTATCTTTGAGTGGGACTCCGGCGCTCTGAAGTATCTG 894
 GAGGGCCTGGACACCGAGAACCAGCGACGGCTTACCCTGGGCGACGAGATCAAGTACGGC 954
 GAGTACAACGGCGGCTTCACCAAGGTCTCGATGGCTCTGGCCATTACCAAGACCTGCCAG 1014

Izolát ANA121 (SEQ ID NO. 9)

GAGGACTACTATCCCCTGCACCTGGGCGGCTACGACCGTATGATCGCCATGGTCTTCTAT 654
 CTGGAGTCCATCTACGGCAAGGATTGGGCCGATCCACCACCTCCACCCTGAACTACACC 714
 CGCGATGAGATCATCGAGGGCCTGGACTTCATCAAGAGCCTGGTGGACCGCCACGTCATC 774
 ATGCCCCTGCCACCTACTACGGCAACAACGGTCCACCAGCCGAGCCAGGTCCAACGAG 834
TGGATCACCGGCCAGCTGGCAGGTATCTTTGAGTGGGACTCCGGCGCTCTGAAGTATCTG 894
 GAGGGCCTGGACACCGAGAACCAGCGACGGCTTACCCTGGGCGACGAGATCAAGTACGGC 954
 GACTACAACGGCGGCTTCACCAAGGTCTCGATGGCTCTGGCTATCACCCAGACCTGCCAG 1014

10

Příklad 2:

V následujícím příkladu byla izolována DNA z trusu kuřat a slepic a z kuřat, jimž byla podána kultura *F. prausnitzii*, pomocí QIAmp DNA Stool kitu (Qiagen, Německo). Získaná DNA byla využita jako templát v PCR se třemi různými dvojicemi primerů pro průkaz a kvantifikaci *F. prausnitzii*. Výsledky získané z PCR jsou shrnuty v následující Tabulce 1.

15

Tabulka 1 Naměřené hodnoty Ct u zkoumaných vzorků

Vzorek	16S rRNA	Fae1	Fae2	Fae3
čistá kultura 1	8,46	10,80	11,58	11,58
čistá kultura 2	8,80	11,28	11,97	11,93
čistá kultura 3	13,55	16,15	16,67	16,66
čistá kultura 4	14,22	15,68	16,42	16,85
slepice 1	6,00	20,44	15,85	20,46
slepice 2	6,73	19,71	15,62	20,14
slepice 3	7,95	19,46	16,99	23,87
slepice 4	7,54	22,79	18,47	26,64
slepice 5	8,07	21,43	19,02	25,74
kuře kontrola	9,20	32,15	31,15	34,25
kuře kontrola	9,38	32,17	31,60	35,47
kuře kontrola	9,62	31,31	31,76	31,39
kuře kontrola	10,34	32,62	33,55	32,22
průměrné Ct	9,22	17,53	15,84	19,32

5

Legenda k tabulce:

16S rRNA – cílové byly geny pro eubakteriální 16S rRNA, použité primery 16S_An_F1, 16S_An_R1.

10 Fae1 – cílový gen byl předpovězený přenašeč glukózy ze shluku genů pro metabolismus beta-glukozidů, použity byly primery cílené na tento gen

Fae2 – cílový gen byl FIG00646903: hypotetický protein, použity byly primery FaecF2 a FaecR2

Fae3 – cílový gen byl FIG00646909: hypotetický protein, použity byly primery cílené na tento gen

ND – nedetekováno

15

Ze tří testovaných dvojic primerů byla nejnižší hodnota Ct opakovaně dosahována u primerů amplifikující část genu pro FIG00646903: hypotetický protein. Proto jsme za *F. prausnitzii* specifické považovali primery cílené na gen pro FIG00646903: hypotetický protein.

20 Experimentální schéma

25 V následujícím příkladu byla izolována DNA z trusu kurů pomocí QIAmp DNA Stool kitu (Qiagen, Německo). Získaná DNA byla využita jako templát v PCR pro průkaz a kvantifikaci *F. prausnitzii* a současně jako templát pro stanovení skladby mikroflóry pomocí sekvenování genů pro 16S rRNA. Skladba mikroflóry v testovaných vzorcích byla stanovena sekvenováním části genů pro 16S rRNA jak jsme popsali dříve (Videnska et al. PLoS One 2014;9:e115142). Z výsledných dat jsme pro následné porovnání využili jen údaje pro *F. prausnitzii*.

30 Real time PCR ve formátu „SybrGreen“, byla provedena s využitím SybrGreen Master Mix (Qiagen, Německo). Amplifikační podmínky sestávaly z 35 cyklů s následnou denaturační analýzou pro potvrzení identity vzniklého amplifikačního produktu. Každý cyklus sestával z 30 s inkubace při 55 °C, 30 s inkubace při 72 °C a 30 s inkubace při 94 °C. Po každém cyklu se stanovila fluorescence ve vzorku a překročení prahové hodnoty fluorescence po určitém cyklu bylo vyjádřeno hodnotou Ct (threshold cycle). Na PCR bezprostředně navazovala denaturační analýza, při které se vzniklé amplifikační produkty vytemperovaly na 45 °C a v jednotlivých intervalech se postupně zahřívaly až na 95 °C. Při určité teplotě (teplota T_m, temperature of

35

melting) došlo k rozpadu dvoušroubovicových molekul PCR produktů na jednovláknité molekuly DNA, který byl spojen s uvolněním barvičky SybrGreen z DNA a poklesem fluorescence. Protože teplota rozpadu dvoušroubovice na jednořetězcová vlákna je ovlivněna sekvencí, z teploty T_m lze usuzovat na identitu vzniklého PCR produktu. Real time PCR byla prováděna s primery specifickými pro *F. prausnitzii* (FaecF2 a FaecR2) a současně s primery 16S_An_F1 TCCTACGGGAGGCAGCAG a 16S_An_R1 CGTATTACCGCGGCTGCT amplifikujícími část genu pro 16S rRNA všech eubakterií. Amplifikace eubakteriální DNA byla využita pouze pro kvantifikaci *F. prausnitzii*.

10 Výsledky

Ze tří testovaných dvojic primerů amplifikujících částí tří zcela odlišných genů byla nejnižší hodnota C_t opakovaně dosahována u primerů amplifikujících část genu pro hypotetický protein FIG00646903. Tato dvojice primerů proto byla dále považována za nejvýhodnější pro průkaz a kvantifikaci *F. prausnitzii*. Teplota tání T_m tohoto produktu byla 84,95 °C. Následně jsme kvantifikovali *F. prausnitzii* pomocí real time PCR a současně i sekvenováním V3/V4 části genu pro 16S rRNA v reálných vzorcích. Porovnání zastoupení *F. prausnitzii* v testovaných populacích stanovené oběma metodami jsme provedli výpočtem korelačních a regresních koeficientů. Korelační koeficient 0,804 i regresní hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,6467$ (viz Obr. 1) shodně potvrdily značnou shodu ve výstupu obou postupů, a tedy relevanci detekce a kvantifikace *F. prausnitzii* pomocí real time PCR. Navržená real time PCR definovaná sekvencemi primerů je tedy specifická a vhodná pro kvantifikaci *F. prausnitzii* v reálných vzorcích trusu nebo obsahu trávicího traktu.

25 Seznam sekvencí

<110> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

<120> Sada primerů a způsob detekce *F. prausnitzii*

30

<130> P1

<160> 9

35 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

40

<213> artificial

<220>

<223> forward primer

45

<400> 1

cgagggctg gacttcatca ag

22

<210> 2

<211> 22

50

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> reverse primer

55

	<400> 2	
	gccggtgac cactcgttgg ac	22
5	<210> 3 <211> 18 <212> DNA <213> artificial	
10	<220> <223> forward primer	
	<400> 3	
	tcctacggga ggcagcag	18
15	<210> 4 <211> 18 <212> DNA <213> artificial	
20	<220> <223> reverse primer	
	<400> 4	
25	cgtattaccg cggetgct	18
	<210> 5 <211> 420 <212> DNA <213> Faecalibacterium prausnitzii	
30	<400> 5	
	gaggattact accccctgca cctgggcggc tacgaccgta tgatcctgac cgtcttctat	60
	ctggagtcca tctacggcaa ggattgggct gatccctcca ctccaccct gaactacacc	120
	gccgacgaga tcgccgaggg cctggacttc atcaagagcc tgggtggacaa gcacgtcatc	180
35	atgccctgc ccactacta cggcaacaac ggtccaccg ctgccaacca gtccaacgag	240
	tggataccg gcaagctggc cggcatcttc gagtgggatt ccgctgcttc caagtaccgt	300
	gacgctctgg acaccgaaa ccgcgacggc ttaccctgg gcgaggagat ccagttcggc	360
	gactacaagg gggcttcac caaggtttcc atgggcctgg ccatcaccaa gacctgccag	420
40	<210> 6 <211> 420 <212> DNA <213> Faecalibacterium prausnitzii	
45	<400> 6	
	gaggattact accccctgca cctgggcggc tacgaccgta tgatcctgac cgtcttctat	60
	ctggagtcca tctacggcaa ggattgggct gatccctcca ctccaccct gaactacacc	120
	gccgacgaga tcgccgaggg cctggacttc atcaagagcc tgggtggacaa gcacgtcatc	180
	atgccctgc ccactacta cggcaacaac ggtccaccg ctgccaacca gtccaacgag	240
50	tggataccg gcaactggc cggcatcttc gagtgggatt ccgctgcttc caagtaccgt	300
	gacgctctgg acaccgaaa ccgcgacggc ttaccctgg gcgaggagat ccagttcggc	360
	gactacaagg gggcttcac caaggtttcc atgggcctgg ccatcaccaa gacctgccag	420
55	<210> 7 <211> 420	

<212> DNA

<213> *Faecalibacterium prausnitzii*

<400> 7

5	gaggactact acccctgca cctgggcggc tacgatcgta tgatectgac cgtcttctat	60
	ctggagtcca tctatggcaa ggattgggct gatccctcca cctccaccct gaactacacc	120
	gccgacgaga tcgccgaggg cctggacttc atcaagagcc tggaggacaa gcacgtcatc	180
	atgccctgc ccactacta cggcaacaac gggtccaccg ctgccaacca gtccaacgag	240
	tggatcaccg gcaagctggc cggcatcttc gattgggatt ccgctgcttc caagtaccgt	300
10	gacgtcttgg acaccgacaa ccgcgacggc ttcaccgtgg gcgaggagat ccagtcgggc	360
	gactacaagg gcggcttcac caaggtttcc atgggcttgg ccatcaccaa gacctgccag	420

<210> 8

15 <211> 420

<212> DNA

<213> *Faecalibacterium prausnitzii*

<400> 8

20	gaggactact atcccctgca cctgggcggc tacgaccgta tgateccat ggtcttctat	60
	ctggagtcca tctacggcaa ggattgggccc gatccacca cctccaccct gaactacacc	120
	cgcgatgaga tcatcgaggg cctggacttc atcaagagcc tggaggaccg ccacgtcatc	180
	atgccctgc ccactacta cggcaacaac gggtccaccg ccgccagcca gtccaacgag	240
	tggatcaccg gccagctggc aggtatcttt gattgggact ccggcgtctt gaagtatctg	300
25	gagggcctgg acaccgagaa ccgcgacggc ttcaccgtgg gcgacgagat caagtacggc	360
	gagtacaacg gcggcttcac caaggtctcg atggcttgg ccatcaccaa gacctgccag	420

<210> 9

30 <211> 420

<212> DNA

<213> *Faecalibacterium prausnitzii*

<400> 9

35	gaggactact atcccctgca cctgggcggc tacgaccgta tgateccat ggtcttctat	60
	ctggagtcca tctacggcaa ggattgggccc gatccacca cctccaccct gaactacacc	120
	cgcgatgaga tcatcgaggg cctggacttc atcaagagcc tggaggaccg ccacgtcatc	180
	atgccctgc ccactacta cggcaacaac gggtccaccg ccgccagcca gtccaacgag	240
	tggatcaccg gccagctggc aggtatcttt gattgggact ccggcgtctt gaagtatctg	300
40	gagggcctgg acaccgagaa ccgcgacggc ttcaccgtgg gcgacgagat caagtacggc	360
	gactacaacg gcggcttcac caaggtctcg atggcttgg ctatcaccaa gacctgccag	420

45

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detekce bakterie *Faecalibacterium prausnitzii* v obsahu trávicího traktu nebo trusu drůbeže, **vyznačený tím**, že se ze vzorku izoluje DNA, a následně se izolovaná DNA podrobí
50 amplifikační reakci s primery

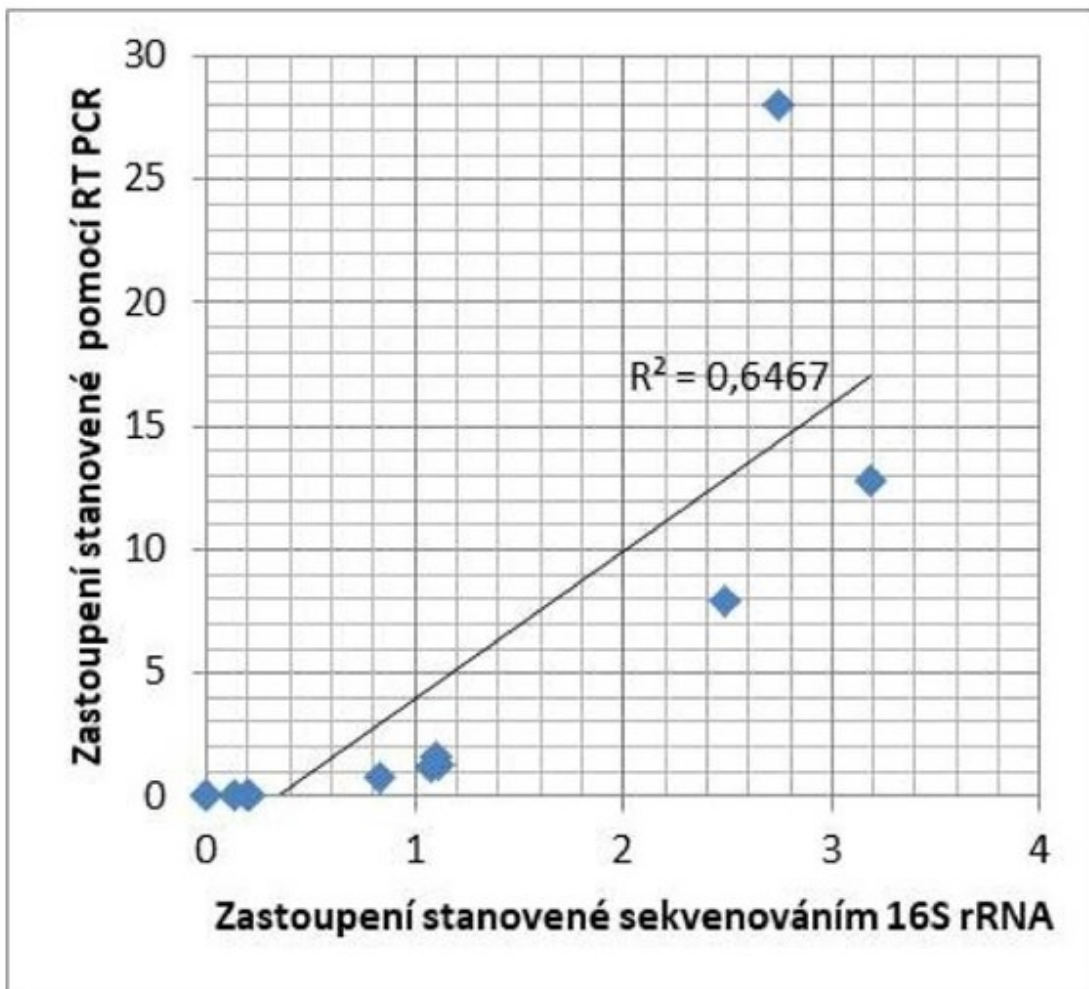
FaecF2: CGAGGGCCTGGACTTCATCAAG (SEQ ID NO. 1),

FaecR2: GCCGGTGATCCACTCGTTGGAC (SEQ ID NO. 2)

55 metodou PCR v reálném čase.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že se dále provede amplifikační reakce metodou PCR v reálném čase s primery 16S_An_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_An_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikujícími část genu pro 16S rRNA u všech eubakterií a vypočte se podíl *Faecalibacterium prausnitzii* na celkovém počtu eubakterií.
3. Způsob podle nároku 2, **vyznačený tím**, že se podíl *Faecalibacterium prausnitzii* na celkovém počtu eubakterií vypočte tak, že se nejprve odečte Ct hodnota amplifikace *Faecalibacterium prausnitzii* od Ct hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (ΔCt), následně se na tento rozdíl umocní základ 2 ($2^{\Delta Ct}$), vypočte se převrácená hodnota ($1/2^{\Delta Ct}$) a výsledek se vynásobí číslem 100 ($100 \times 1/2^{\Delta Ct}$), čímž se získá podíl *Faecalibacterium prausnitzii* v celé eubakteriální populaci v procentech.
4. Sada primerů pro detekci bakterie *Faecalibacterium prausnitzii* ve vzorcích metodou real time PCR, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery FaecF2: CGAGGGCCTGGACTTCATCAAG (SEQ ID NO. 1) a FaecR2: GCCGGTGATCCACTCGTTGGAC (SEQ ID NO. 2).
5. Sada podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje primery 16S_An_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S_An_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4).

1 výkres



Obr. 1

