

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 422

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2018.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36811**
(22) Přihlášeno: **25.10.2019**
(47) Zapsáno: **26.11.2019**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
- (72) Původce:
RNDr. Lubomír Janda, Ph.D., Brno, Bohunice, CZ
Bc. Michaela Šťastná, Fulnek, CZ
Mgr. Adam Norek, Ph.D., Brno, Štýřice, CZ
Mgr. Helena Juřicová, Ph.D., Brno, Královo Pole,
CZ
doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., Velešovice, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
**Sada pro identifikaci probiotického
laktobacilového kmene štěpícího
imunotoxické lepkové peptidy**

CZ 33422 U1

Sada pro identifikaci probiotického laktobacilového kmene štěpícího imunotoxické lepkové peptidy

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká sady primerů pro identifikaci probiotického mikroorganismu s požadovanou aktivitou pro štěpení imunotoxických lepkových peptidů.

10

Dosavadní stav techniky

15 Glutenová enteropatie (celiakie), ale i pocity diskomfortu vyvolané nestravitelnými lepkovými peptidy způsobují poškození střevní bariéry, což je problém, který se nedá léčit. Ze statistik navíc vyplývá, že tato nemoc je na vzestupu.

20 Glutenová enteropatie (celiakie) není jediné onemocnění spojené s nesnášenlivostí lepku. V dnešní době rozlišujeme také neceliakální glutenovou senzitivitu, Duhringovu dermatitidu a alergii na lepek. Neceliakální glutenová senzitivita je onemocnění projevující se gastrointestinálními a extraintestinálními symptomy, které vyvolá přítomnost lepku ve stravě u jedinců, u kterých byly vyloučeny jiné choroby spojené s intolerancí lepku. Duhringova dermatitida je kožním projevem nesnášenlivosti lepkových peptidů, je však vzácnější než celiakie. Projevuje se výskytem drobných intenzivně svědících puchýřků, které připomínají opar. U alergie na lepek chybí typické poškození sliznice střeva, které je diagnostickým základem pro
25 glutenovou enteropatii. Projevem této alergie nejsou pouze gastrointestinální příznaky ale také respirační potíže. Glutenová ataxie je autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému, hlavně mozečku, které je navozeno glutenem. Problémem v diagnostice nemocí souvisejících s lepkem je především nepřítomnost typických symptomů či nedostatečná informovanost jak potenciálních pacientů, tak i odborné veřejnosti.

30

Leppek je směs proteinů obilovin, takzvaných prolaminů a gluteninů. Lepkové peptidy zapojené do celiakie jsou obecně velmi bohaté na prolinové a glutaminové zbytky, což je znak, který přispívá k jejich rezistenci vůči proteolýze v lidském střevě. Z literatury jsou známé peptidy s prokázanou významností v etiologii celiakie. Například peptid o velikosti 33 aminokyselin, vzniklý štěpením α -gliadinu LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPQF, nebo identický
35 menší peptid o velikosti 16 aminokyselin QLQFPQPQLPYPQPQ. Z ω -gliadinu, respektive z C-konce hordeinu je znám peptid o velikosti 17 aminokyselin QPQQPFPQPQPFPWQP. Při porušeném střevním epitelu, mohou tyto peptidy procházet střevní bariérou. Proniknou-li peptidy přes střevní bariéru, stávají se vysoce afinitním substrátem pro tkáňovou transglutaminázu 2 (TG2). TG2 je endomysialní intracelulární enzym, který se podílí na normální epiteliální diferenciaci aktivací transformujícího růstového faktoru beta. TG2 zprostředkuje po styku s prolaminou jejich deamidaci do imunoreaktivních peptidů, což zvyšuje afinitu s HLA imunokompetentními buňkami (HLA – DQ2/8). Iniciátorem imunitní reakce je tedy komplex
40 TG2 s deamidovaným prolaminem, který způsobí indukci T lymfocytární odpovědi, aktivaci B lymfocytů a tvorbu protilátek. Protilátky proti tkáňové transglutamináze přímo blokují intestinální epiteliální diferenciaci. K diagnostice tohoto onemocnění se proto používá testování na přítomnost autoproti látek proti TG a gliadinům. Symptomy onemocnění jsou pestrá škála potíží a závisí na genetických vlivech, věku, délce trvání expozice lepku a rozsahu střevního poškození. Tenké střevo může být poškozeno již od prvního styku s obilovinami, zatímco
50 klinické příznaky se mohou projevit až za různě dlouhou dobu. Mezi typické příznaky u dětí patří průjemy, kolikovitá bolest břicha, anemie a neprosívání. Také může dojít k výskytu takzvaného „gliadinového šoku“, což je těžký průběh celiakie s průjmy, dehydratací a minerálním rozvratem, je to však vzácná komplikace onemocnění. U dospělé populace se snižuje množství gastrointestinálních projevů a nastupují spíše mimostřevní příznaky, to však může platit i u dětí.

55

Celiakální sprue, především ta neléčená, může vést k řadě zdravotních komplikací. Mezi takové komplikace patří anémie, krvácivé projevy (způsobené nedostatkem vitamínu K), trombózy, metabolická osteopatie (komplexní porucha vstřebávání vápníku, vitamínu D či aminokyselin) nebo také gynekologické poruchy. Mezi komplikace u glutenové intolerance patří i psychické poruchy jako deprese a neurologická onemocnění. S celiakií spojená autoimunitní onemocnění pravděpodobně souvisí s genetickou predispozicí, neboť některé asociované choroby sdílejí podobné HLA antigeny. Mezi tyto autoimunitní onemocnění patří například diabetes mellitus I. typu, autoimunní tyreoiditida. Dále mezi potíže sdružené s celiakií patří revmatoidní artritida, systémové onemocnění pojiva, autoimunní hepatitida, ataxie, epilepsie.

V současné době pacienti trpící celiakií nebo neceliakálními senzitivitami na lepek mají prakticky jedinou možnost řešení svých zdravotních problémů, a tou je dodržování bezlepkové diety, s níž jsou spojena velká omezení, zvýšené náklady, a další problémy.

Možnou alternativou v řešení problému nutné diety je použití enzymů, které by byly schopny snížit množství toxických gliadinových peptidů. Na trhu existuje celá řada enzymových přípravků, které obsahují směs enzymů z různých organismů. Přípravek Gluten Prima obsahuje kromě neutrální proteázy i amylázu a glukoamylázu, která by měla pomoci natrávit bílé pečivo. Přípravek Gluten Digest obsahuje řadu proteáz z různých plísní rodu *Aspergillus*, včetně amylázy a glukoamylázy. Přípravek Lepek Fit je založen na enzymech z papáje včetně papainu, což je cysteinová proteáza se širokou substrátovou specifitou včetně klíčové dipeptidyl peptidázové aktivity, která štěpí lepkové peptidy „gliadiny“. V USA se prodává produkt s názvem GliadinX, což je enzym Prolyl Endopeptidáza z *Aspergillus niger*, která by měla účinně štěpit α -gliadiny. V Austrálii se prodává výrobek GlutenGuard, který obsahuje kromě papainu i chymopapain a caricain, což jsou papainu podobné cysteinové proteázy. V současné době je v USA klinicky zkoušen výrobek KumaMax, což je rekombinantně upravený enzym kumamolysin z acidofilní bakterie *Alicyclobacillus sendaiensis* schopný trávit glutenové proteiny v kyselém prostředí žaludku.

Kromě úvah používat štěpící enzymy z různých zdrojů se vyskytují úvahy snížit imunotoxické gliadiny už přímo ve zdroji, a to například díky mutačnímu šlechtění u obilovin s delecí chromosomů odpovědných za expresi imunotoxických gliadinů (van den Broeck a kol., Theor. Appl. Genet. 2010, 121:1527). Další možností, jak snížit lepek v pečivu je znovu používat po staletí ověřený způsob výroby pečiva pomocí kvásku, založený na kynutí těsta pomocí mléčných bakterií a kvasinek. Na rozdíl od moderních postupů urychlujících výrobu pečiva, bez kvásku nedochází v pečivu k natrávení proteinů včetně imunotoxických α -gliadinů. Další, čistě farmaceutický přístup chce využít známé inhibitory transglutaminázy 2, například cystamin. Uvažuje se také o zablokování vazebného místa HLA-DQ2 nebo o modulaci zánětlivých cytokinů při léčbě lepkové intolerance (Gobbetti a kol., Food Microbiology, 2007, 24:1527). Vývoj vakcíny Nexvax2 představuje konkrétní řešení tohoto problému. Vakcína je podávána intradermálně, kdy dochází k přeprogramování T-lymfocytů a zastavení autoimunitní odpovědi na lepek přítomný ve stěvě. Je však vhodná pouze pro pacienty s HLA/DQ2.5 genem.

45 Podstata technického řešení

X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidáza je klíčový enzym schopný štěpit imunotoxické lepkové peptidy. Ne všechny kmény probiotických mikroorganismů produkují stejné množství tohoto enzymu, což je dáno jednak uspořádáním genů v daném lokusu (obr. 1) a také aminokyselinovým složením X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy (SEQ. ID 1).

Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro identifikaci probiotického laktobacilového kmene štěpícího imunotoxické lepkové peptidy, která obsahuje

55 forward primer 1 (FWP1): TGTTGCGGTAGGTATATTGG (SEQ ID NO. 1)

reverse primer 1 (RVP1): TAAGCTAGCTAAAGAAACACC (SEQ ID NO. 2)
 forward primer 2 (FWP2): GATACTAAACCTAGTATTTAACGAC (SEQ ID NO. 3)
 reverse primer 2 (RVP2): ATCGTCATAACAATTTTAGTACTG (SEQ ID NO. 4)

- 5 První sada primerů, (FWP1 a RVP1), je určena pro identifikaci X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy v lokusu s genem pro flipázu. Sekvence identifikovaná prvním setem primerů je následující sekvence, v níž první podtržená část odpovídá části genu flipázy a druhá podtržená část odpovídá části genu X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy, přičemž tučně vyznačené jsou oblasti pro nasedání forward primeru (FWP1) a reverse primeru (RVP1).

10

TGTTGCGGTAGGTATATTGGTGTATGGTATAATGATATTATTATTAACCTACGA
TTTTAGATTACGCAAAAGAGATTCTTTTCAAAGAAAGAAATAATTTAGTTAGGAGA
 AGTATATTTATGAAAAAATTATTTGTATCTAGCATGGTACTAGTGAGTTTGTAAACAT
 TAGGTGCATGTTCTAATGATGGTAACAAGAGTAGTATGTCATCTGCTAATCATGAAT
 15 CAAGCAAAAATGTAGAAAAGACAAAGAAACAGATAAAAGCAACTGCAGTTTCTTCC
 GTAGATGAGGATAGTACAAGTATTGCGAATAATGATAAATAGTGGTGAAGAAAGCAG
 TTCAAGCAATAACTCTGCGGTGTCTTCTCAAAGTAGTGAAAGTAGCAGTAATAGTAG
 TAATAAAAATTCTACTACTTCTTCCAAAAGCAATTTTCTCAAGAACAAATTGCAGC
 TTTGGCATCTTGGTATACAGGAAATATAAAAAATAGTAAAATAGTGGTTCATAATAT
 20 GGGAAATTATAATGCTGTAAGTGATGATAATGGAAACTTATTATTTGCATATAGTGT
 TTCTGGAGATAATGTAAGTTGGTGGCTTTGGGGATAAGCCTTGGGATGAAGTAAA
 TATCTCAAATCTAAATGATAAAGCATCTCAACAGGGACAATCAGATAATGTAATAG
 TGTTGCAAATAATACTACATTTACAGATGGATACTAAACCTAGTATTTAACGACTATT
 AATAAACAAACGCAGATAAATCAAGACAATAACGTCTTGTTTCATCTGCGTTTTTGT
 25 TTATTCTTCTATTGGAAGTAAGCAATATGAGCCTGTAGTATCAATGCGATATGAATTT
TCTTCATTACCTTGTAAGTCATTTCCATATCAGTTGCATAGATTACTAAGCCTAACT
TATGTCCTTTTGGAAAGATGGTAGAACATAGGTTGTGTAGTAATCTCAACATCGTAGA
ATTTATTAGCTTCAAGTTCATCAGTACTAAAATTGTTATGACGATTTTGTAAAGTTCAA
GTGAGCTTGTGTAACCATCTTAAAAGGTGTTTCTTTAGCTAGCTTA (SEQ ID NO. 5)

30

V PCR reakci s první sadou primerů (FWP1 a RVP1) se zjišťuje vytvoření produktu očekávané délky odpovídající přítomnosti obou genů ve stejném lokusu (1074 pb). Produkt lze například detekovat gelovou DNA elektroforézou nebo jinými metodami detekujícími přítomnost / délku specifického produktu. Citlivost této sady je nejméně 10^3 kopií nutných k vytvoření viditelného produktu na gelu.

35

- Druhá sada primerů (FWP2 a RVP2) je určena pro ověření specifické nukleotidové sekvence genu pro X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázu. Citlivost této sady je nejméně 10^1 kopií nutných k vytvoření viditelného produktu na gelu. Cílová sekvence této sady primerů je následující, přičemž podtržena je část odpovídající části genu X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy, přičemž tučně vyznačené jsou oblasti nasedání forward a reverse primeru:

40

GATACTAAACCTAGTATTTAACGACTATTAATAAACAAACGCAGATAAATCAAGA
CAATAACGTCTTGTTTCATCTGCGTTTTTGTATAATTCTTCTATTGGAAGTAAGCAATAT
 45 **GAGCCTGTAGTATCAATGCGATATGAATTTTCTTCATTACCTTGTAAGTCATTTCCA**
TATCAGTTGCATAGATTACTAAGCCTAACTTATGTCCTTTTGGAAAGATGGTAGAACAT
AGGTTGTGTAGTAATCTCAACATCGTAGAATTTATTAGCTTCAAGTTCATCAGTACT
AAAATTGTTATGACGAT (SEQ ID NO. 6)

50

Druhá sada primerů (FWP2 a RVP2) ověřuje, že je přítomen gen pro X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázu s kóženou aminokyselinovou sekvencí, která zajišťuje jeho aktivitu.

Sada podle předkládaného řešení může s výhodou dále obsahovat alespoň jeden umělý substrát pro detekci enzymové aktivity X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy. Touto detekcí se jednoznačně prokazuje, že daný kmen kromě správného genomového lokusu a správné

55

aminokyselinové sekvence enzymu X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy má za definovaných podmínek požadovanou enzymovou aktivitu. Umělé substráty jsou: Gly-Pro-7-amido-4-methylkumarin hydrobromid (GP-AMC) a Lys-Pro-7-amido-4-methylkumarin hydrobromid (KP-AMC).

5

Objasnění výkresů

Obrázek 1: Zobrazení okolí genu pro XPDAD u kmene *L. salivarius* An63, GLT = glycosyltransferáza, UDP = UDP-galactopyranózo-mutáza, FLP = flipáza, XPDAD = X-prolyl dipeptidyl aminopeptidáza, CPA = Kation-protonový transportní kanál, AAC = D-alanyl – D-alanine karboxypeptidáza, NAD = NAD(P)H-dependent oxidoreduktáza.

Obrázek 2: Obrázek zobrazuje elektroforetický gel se specifickým produktem o velikosti 1074 párů bazí s templátem chromozomální DNA kmene *L. salivarius* An63 (1) a se směsí chromozomální DNA kmene An63 a An84 (2). V ostatních drahách, kde není vidět žádný produkt je voda (3), An84 (4), An453 (5), An879 (6) a směs více kmenů (7). V poslední dráze se nachází délkový standard (8).

Obrázek 3: Obrázek zobrazuje elektroforetický gel se specifickým produktem o velikosti 1074 párů bazí s templátem chromozomální DNA kmene *L. salivarius* An63 v koncentraci 10^5 kopií (1), 10^4 kopií (2), 10^3 kopií (3), 10^2 kopií (4), 10^1 kopií (5-7) a 10^0 kopií (8-11). V poslední dráze se nachází délkový standard (12).

Obrázek 4: Obrázek zobrazuje elektroforetický gel se specifickým produktem o velikosti 304 párů bazí. V první dráze se nachází délkový standard (1). V dalších drahách je PCR produkt s templátem chromozomální DNA kmene *L. salivarius* An63 (2) a se směsí chromozomální DNA kmene An63 a An84 (3). V ostatních drahách, kde není vidět žádný produkt je voda (4), An84 (5), An453 (6), An879 (7) a směs více kmenů (8).

Obrázek 5: Obrázek zobrazuje elektroforetický gel se specifickým produktem o velikosti 304 párů bazí s templátem chromozomální DNA kmene *L. salivarius* An63 v koncentraci 10^5 kopií (1), 10^4 kopií (2), 10^3 kopií (3), 10^2 kopií (4), 10^1 kopií (5-7) a 10^0 kopií (8-11). V poslední dráze se nachází délkový standard (12).

35

Obrázek 6: Graf zobrazuje hodnoty relativní fluorescenční jednotky (RFU) pro jednotlivé kmeny *L. salivarius* An63, An84 a An453, které byly kultivovány na minimálním médiu s přidaným kvasničným extraktem. Výsledky jsou zobrazeny pro substrát KP-AMC.

Obrázek 7: Graf zobrazuje hodnoty relativní fluorescenční jednotky (RFU) pro jednotlivé kmeny *L. salivarius* An63, An84 a An453, které byly kultivovány na minimálním médiu s přidaným kvasničným extraktem. Výsledky jsou zobrazeny pro substrát GP-AMC.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: PCR amplifikace specifického lokusu X-prolyl-dipeptidyl amiopeptidázy s flipázou měřeno pomocí první sady primerů (FWP1 a RVP1)

PCR reakce pro amplifikaci specifického produktu pomocí první sady primerů (FWP1 a RVP1) o celkové délce 1074 bazí probíhala v reakční směsi obsahující reakční pufr (75mM Tris-HCl, 20mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Tween 20 (hmotn./obj.), 2,5mM MgCl_2 , pH je titrováno na 8,8), ekvimolární směs deoxynukleotid trifosfátů deoxyadenosinu, deoxyguanosinu, deoxythymidinu a deoxycytosinu v celkové koncentraci 0,625mM, termostabilní Taq DNA dependentní DNA polymerázu, forward primer FWP1 (5 μmol) a reverse primer RVP1 (5 μmol). Celkový objem

55

reakce byl 10 µl. Teplotní profil PCR reakce byl určen pomocí gradientové PCR se zjištěným optimem teploty pro nasedání primerů stanoveným na 55 °C. Finální reakční profil se skládá z denaturačního kroku 95 °C 10 min, 45 opakujících se cyklů 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, posledním krokem je závěrečná syntéza při 72 °C po dobu 10 minut.

5

Citlivost reakce, definovaná jako pravděpodobnost specifické amplifikace pozitivního standardu genomové DNA, u *L. salivarius* kmenu An63 v ředící řadě 10⁵ až 10² kopií na 1 µl reakce byla u reakcí obsahující více než 2500 kopií templátové DNA vyšší než 99 %. Pravděpodobnost pozitivního specifického zachytu u reakcí obsahujících 500 kopií templátové DNA byla stanovena na 40 %. U nižších počtů kopií templátové DNA citlivost reakce stanovena nebyla.

10

Specifita reakce byla ověřena na sérii vzorků příbuzných kmenů a jejich směsí, z nichž jen některé obsahovaly specifickou templátovou DNA. Specifita byla verifikována celkem na šesti vzorcích DNA. PCR založená na sadě forward primeru FWP1 a reverse primeru RVP1 specificky odlišila jako pozitivní vzorek obsahující izolovanou DNA z kmene An63 *L. salivarius*, směsný vzorek, do nějž byla přidána izolovaná genomová DNA z kmene An84 *L. salivarius* a jako negativní čtyři kontrolní kmeny *L. salivarius* An84, An453, An879 a MIX těchto kmenů. Výsledky jsou znázorněny na obr. 2 a 3.

15

20 Příklad 2: PCR amplifikace specifické nukleotidové sekvence X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy měřeno s druhou sadou primerů (FWP2 a RVP2)

PCR reakce pro amplifikaci specifického produktu pomocí sady primerů forward primer FWP2 a reverse primer RVP2 o celkové délce 304 bází probíhá v reakční směsi obsahující reakční pufr (75mM Tris-HCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20 (hmotn./obj.), 2,5mM MgCl₂, pH je titrováno na 8,8), ekvimolární směs deoxynukleotid trifosfátů deoxyadenosinu, deoxyguanosinu, deoxythymidinu a deoxycytosinu v celkové koncentraci 0,625mM, termostabilní Taq DNA dependentní DNA polymerázu, forward primer 2 (5 µmol) a reverse primer 2 (5 µmol). Celkový objem reakce je 10 µl. Teplotní profil PCR reakce byl určen pomocí gradientové PCR se zjištěným optimem teploty pro nasedání primerů stanoveným na 55 °C. Finální reakční profil se skládá z denaturačního kroku 95 °C 10 min., 45 opakujících se cyklů 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, posledním krokem je závěrečná syntéza při 72 °C po dobu 10 minut.

25

30

Citlivost reakce, definována jako pravděpodobnost specifické amplifikace pozitivního standardu genomové DNA, u *L. salivarius* kmene An63 v ředící řadě 10⁵ až 10² kopií na 1 µl reakce, byla u reakcí obsahující více než 250 kopií templátové DNA vyšší než 99 %. Pravděpodobnost pozitivního specifického zachytu u reakcí obsahujících pět kopií templátové DNA byl stanoven na 47 %. U nižších počtů kopií templátové DNA citlivost reakce stanovena nebyla.

35

40 Specifita reakce byla ověřena na sérii vzorků příbuzných kmenů a jejich směsí, z nichž jen některé obsahovaly specifickou templátovou DNA. Specifita byla verifikována celkem na šesti vzorcích DNA. PCR založená na sadě forward primeru FWP2 a reverse primeru RVP2 specificky odlišila jako pozitivní vzorek obsahující izolovanou DNA z kmene An63 *L. salivarius*, směsný vzorek, do nějž byla přidána izolovaná genomová DNA z kmene An84 *L. salivarius* a jako negativní čtyři kontrolní kmeny *L. salivarius* An84, An453, An879 a MIX těchto kmenů.

45

Výsledky jsou znázorněny na obr. 4 a 5.

Příklad 3: Detekce enzymové aktivity X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy u kmene *L. salivarius*

50

Kultivace:

Bakterie *Lactobacillus salivarius* byly kultivovány v tekutém médiu BHI (Brain Heart Infusion) o objemu 5 ml v anaerobním prostředí (10% CO₂, 5% H₂ a 85% N₂) při 37 °C po dobu 24 hodin. Médium bylo zaočkováno 20 µl kultury o OD 1.

55

Lýze buněk:

- 5 Po kultivaci byly buňky stočeny (3 600 ot/min, 4 °C, 15 min), médium bylo odlito, ke každému vzorku byl přidán 1 ml pufru Tris-HCl (0,1M o pH=8) a následně byly stočeny (3 600 ot/min., 4 °C, 15 min). Nejprve byly pelety zváženy v předem zvážených mikrozkuvkách a následně byl přidán 1 ml Tris-HCl pufru a 10 µl lysozymu (koncentrace 10 mg/ml). Následně byly buňky rozbity ultrazvukem po dobu 5 min (amplituda 35 %, puls 1 s, pauza 3 s). Poté byly buňky
10 stočeny (15 000 g, 4 °C, 10 min) a supernatant byl použit k měření aktivity.

Měření aktivity:

- Enzymatická kinetika byla měřena za použití umělých fluorescenčních substrátů
15 Gly-Pro-7-amido-4-methylkumarin hydrobromid (GP-AMC)
a substrátu Lys-Pro-7-amido-4-methylkumarin hydrobromid (KP-AMC). Do mikrotitrační destičky bylo dávkováno 35 µl Tris-HCl pufru a 15 µl lyzátu, tato směs byla inkubována 10 min při 37 °C. Poté bylo přidáno ke každému vzorku 50 µl směsi obsahující 48 µl Tris-HCl pufru, 1 µl substrátu a 1 µl PEGu (1%). Aktivita byla měřena jednu hodinu (kinetický interval měření
20 22 s, excitační vlnová délka 360 nm, emisní vlnová délka 453 nm). U lyzátu byla změřena proteinová koncentrace podle metody BCA a aktivita byla přepočtena na jednotku proteinové koncentrace a jednotku hmotnosti pelety. Výsledky jsou znázorněny na obr. 6 a 7.

25

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada pro identifikaci probiotického laktobacilového kmene štěpícího imunotoxické lepkové peptidy, **vyznačená tím**, že obsahuje

30

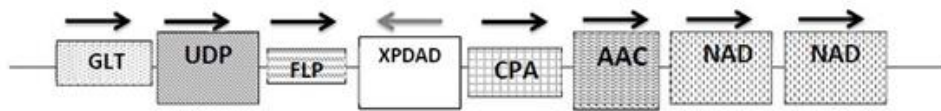
forward primer 1: TGTTGCGGTAGGTATATTGG
reverse primer 1: TAAGCTAGCTAAAGAAACACC
forward primer 2: GATACTAAACCTAGTATTTAACGAC
reverse primer 2: ATCGTCATAACAATTTTAGTACTG.

35

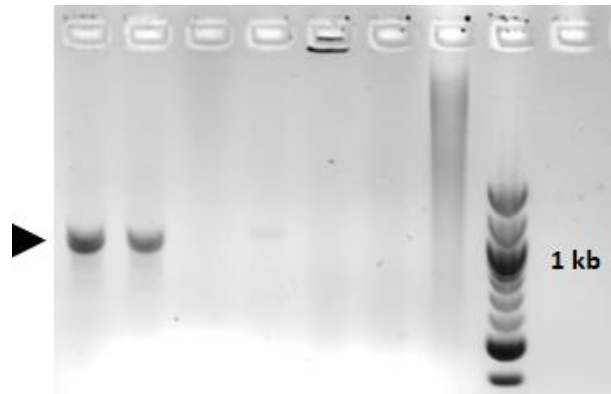
2. Sada podle nároku 1, **vyznačená tím**, že dále obsahuje alespoň jeden umělý substrát pro detekci enzymové aktivity X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidázy, vybraný ze skupiny zahrnující Gly-Pro-7-amido-4-methylkumarin hydrobromid a Lys-Pro-7-amido-4-methylkumarin hydrobromid.

40

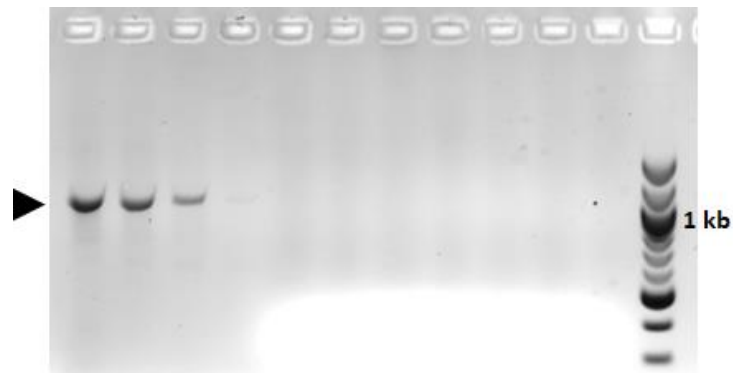
5 výkresů



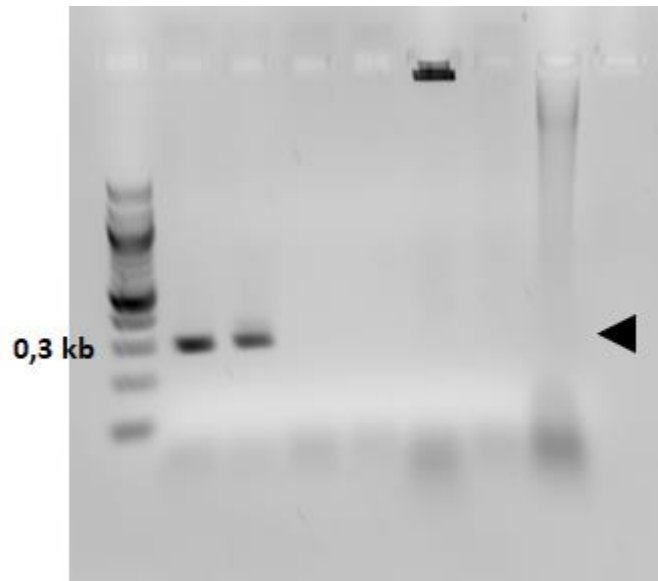
Obr. 1



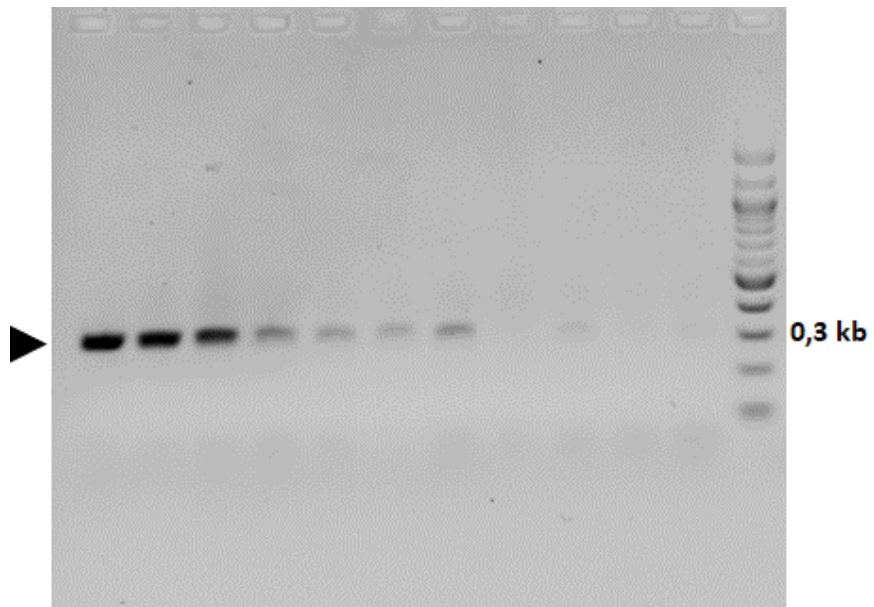
Obr. 2



Obr. 3

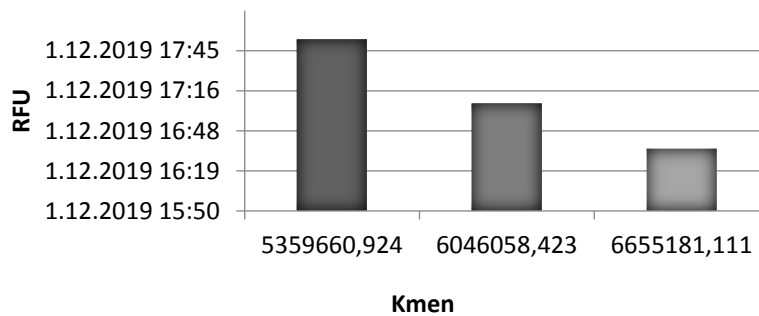


Obr. 4

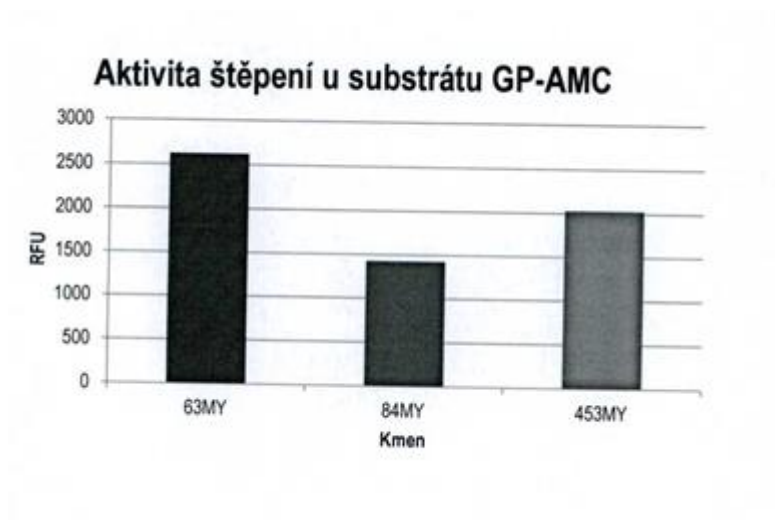


Obr. 5

Aktivita štěpení u substrátu KP-AMC



Obr. 6



Obr. 7

SEQUENCE LISTING

<110> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
 <120> Sada pro identifikaci probiotického laktobacilového kmene
 štěpícího imunotoxické lepkové peptidy
 <130> P
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> forward primer 1
 <400> 1
 tgttgcggtg ggtatattgg 20
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> reverse primer 1
 <400> 2
 taagctagct aaagaaacac c 21
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> forward primer 2
 <400> 3
 gatactaaac ctagtattta acgac 25
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> reverse primer 2
 <400> 4
 atcgtcataa caattttagt actg 24
 <210> 5
 <211> 1074

<212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> amplifikovaný úsek 1

<400> 5
 tgttgccgta ggtatattgg tgtatggtat aatgatatta ttattaaaac ctacgatttt 60
 agattacgca aaagagattc ttttcaaaag aaagaaataa tttagttagg agaagtatat 120
 ttatgaaaaa attatttgta tctagcatgg tactagtggag tttgtaaca ttaggtgcat 180
 gttctaataga tggtaacaag agtagtatgt catctgctaa tcatgaatca agcaaaaatg 240
 tagaaaagac aaagaaacag ataaaagcaa ctgcagtttc ttccgtagat gaggatagta 300
 caagtattgc gaataatgat aatagtgggtg aagaaagcag ttcaagcaat aactctgagg 360
 tgtcttctca aagtagtgaa agtagcagta atagtagtaa taaaaattct actacttctt 420
 ccaaaaagca attttctcaa gaacaaattg cagctttggc atcttggtat acaggaaata 480
 taaaaaatag taaaatagtg gttcataata tgggaaatta taatgctgta agtgatgata 540
 atggaaactt attatttgca tatagtgttt ctggagataa tgtaaaagtt ggtggctttg 600
 gggataagcc ttgggatgaa gtaaatactc caaatctaaa tgataaagca tctcaacagg 660
 gacaatcaga taatgtaaat agtggtgcaa ataatactac atttacagat ggatactaaa 720
 cctagtattt aacgactatt aataaacaaa cgcagataaa tcaagacaat aacgtcttgt 780
 ttcatctgag tttttgttta ttcttctatt ggaagtaagc aatatgagcc tgtagtatca 840
 atgagatag aattttcttc attaccttgt aaagtcattt ccatatcagt tgcataagatt 900
 actaagccta acttatgtcc ttttgaaga tggtagaaca taggttgtgt agtaacttca 960
 acatcgtaga atttattagc ttcaagttca tcagtactaa aattggtatg acgattttgt 1020
 aagttcaagt gagcttgggt aaccatctta aaaggtgttt ctttagctag cttta 1074

<210> 6
 <211> 304
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> amplifikovaný úsek 2

<400> 6
 gatactaaac ctagtattta acgactatta ataaacaaac gcagataaat caagacaata 60
 acgtcttgggt tcatctgagt ttttgtttat tcttctattg gaagtaagca atatgagcct 120
 gtagtatcaa tgcgatatga attttcttca ttaccttggta aagtcatttc catatcagtt 180
 gcatagatta ctaagcctaa cttatgtcct tttggaagat ggtagaacat aggttgtgta 240
 gtaactctcaa catcgtagaa tttattagct tcaagttcat cagtactaaa attggtatga 300
 cgat 304