

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 34 033

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/6888* (2018.01)  
*C12N 15/11* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-37414**  
(22) Přihlášeno: **07.04.2020**  
(47) Zapsáno: **26.05.2020**

- (73) Majitel:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,  
Brno, Medlánky, CZ  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno,  
Královo Pole, CZ
- (72) Původce:  
Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D., Moravany, CZ  
Ing. Gabriela Bořilová, Ph.D., Brno, Kohoutovice,  
CZ  
Mgr. Monika Dufková, Zakřany, CZ  
Mgr. Petr Králík, Ph.D., Brno, Líšeň, CZ  
Mgr. Radka Hulánková, Ph.D., Brno, Královo Pole,  
CZ  
MVDr. Zora Piskatá, Ph.D., Břeclav, CZ
- (74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:  
**Souprava pro multiplexní detekci DNA  
hospodářských zvířat**

## Souprava pro multiplexní detekci DNA hospodářských zvířat

### Oblast techniky

5

Předložené technické řešení je určeno pro komplexní identifikaci a kvantifikaci významných a minoritních druhů až osmnácti hospodářských zvířat metodou multiplexní (kvantitativní) transkripční polymerázové řetězové reakce v reálném čase (multiplexní real-time PCR neboli qPCR) s použitím interní amplifikační kontroly (IAC) při analýze každého jednoho vzorku. Metoda zahrnuje identifikaci těchto druhů: prase domácí (*Sus scrofa*), tur domácí (*Bos taurus*), ovce domácí (*Ovis aries*), koza domácí (*Capra hircus*), kůň domácí (*Equus caballus*), buvol domácí (*Bubalus bubalis*), osel domácí (*Equus asinus*), králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*), zajíc polní (*Lepus europaeus*), klokan (*Macropus*), krokodýl (*Crocodylus*), kur domácí (*Gallus gallus*), krůta domácí (*Meleagris gallopavo*), husa domácí (*Anser anser*), kachna domácí (*Anas platyrhynchos*), křepelka japonská (*Coturnix japonica*), pštros dvouprstý (*Struthio camelus*) a perlička kropenatá (*Numida meleagris*). Navržený postup testování lze využít v oblasti bezpečnosti potravin k autentizaci druhového složení potravin či krmiv, ale také pro kontrolu produktů farmaceutického nebo kosmetického průmyslu.

20

### Dosavadní stav techniky

Možnost komplexní analýzy pro ověření autenticity a zdravotní nezávadnosti potravin a krmiv patří k základním principům ochrany veřejného zdraví i ekonomických zájmů spotřebitelů. Ačkoli je falšování potravin zpravidla motivováno finančním ziskem, jeho důsledkem je nejen snížení kvality potravin, ale i ohrožení zdraví spotřebitelů.

V současné době není k dispozici žádná legislativně závazná metoda pro detekci a identifikaci živočišných tkání v potravinách a krmivech. V laboratorní praxi se využívají metody metabolické a metody proteinové analýzy (imunologické, chromatografické a spektroskopické metody), použití těchto metod je však u vícesložkových a technologicky opracovaných potravin limitováno. V současné době se začíná prosazovat v identifikaci tkání živočišného původu v potravinách a krmivech ve zvýšené míře využití molekulárně-genetických metod, založených na amplifikaci a vizualizaci relativně teplotně stabilní DNA metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). qPCR je vysoce specifická, citlivá, rychlá a v laboratorní praxi běžně ekonomicky dostupná metoda.

Na současném trhu jsou dostupné komerční produkty k identifikaci pouze základních majoritních druhů. Mezi nejvýznamnější globální distributory patří společnost ThermoFisher Scientific, která nabízí kity RapidFinder™ pro detekci drůbeže, jelena, koně, kozy, krůty, kura, ovce, prasete, srnce a tura. Jako další příklad setu dostupného v České republice lze uvést sady od výrobce Qiagen k identifikaci buvola, jelena, koně, kozy, krůty, kura, ovce, prasete a tura, či výrobce MB minerva biolabs s kitem Meat ID™ Screen k určení koně, kozy, krůty, kura, osla, ovce, prasete, ryb, tura, velblouda a zebry. Sety Food safe kit od výrobce Biopremier umožňují detekovat v potravinách DNA pouze jednoho konkrétního druhu. V nabídce českého dodavatele jsou zatím k dispozici sety pro detekci tura, koně, prasete, kura, kachny a krůty. Identifikaci živočišných druhů pomocí qPCR je možné si objednat i jako službu, jako akreditovaný semikvantitativní test ji nabízí například firma Eurofins. V nabídce je detekce kura, husy, kachny, krůty, ovce, prasete, tura a koně. Cena této služby závisí na počtu detekovaných druhů a na míře zpracování potravy.

50

Vedle těchto testů je v odborné literatuře popsána celá řada qPCR metod designovaných a prováděných v laboratořích pro průkaz živočišných komponent v potravinách a krmivech. Kvalita těchto qPCR metod je ovšem různá a ve většině případů nesplňují kritéria kladená na diagnostické soupravy pro rutinní použití. Toto zahrnuje mimo jiné systém pozitivních a negativních kontrol procesu izolace DNA a následné analýzy pomocí qPCR včetně použití

55

interní amplifikační kontroly (IAC), která je naprosto nezbytná k odlišení skutečně negativních a inhibovaných vzorků a která musí být součástí každé diagnostické soupravy založené na qPCR. Dalším nedostatkem převážně většiny těchto qPCR systémů, ale i výše uvedených komerčních řešení, je nutnost provádět analýzy na průkaz jednotlivých živočišných druhů v sérii monoplexních qPCR reakcí, což ve svém důsledku zvyšuje finanční náklady na materiál a lidskou práci.

#### Podstata technického řešení

Uvedené nedostatky současných postupů technicky řeší vyvinutá analytická souprava pro simultánní multiplexní identifikaci a kvantifikaci alespoň dvou, a nejvýše 18, nejen významných, ale i minoritních druhů hospodářských zvířat metodou multiplexní qPCR s použitím interní amplifikační kontroly při analýze každého jednoho vzorku. Podstata technického řešení spočívá v tom, že obsahuje specifické primery a TaqMan sondy o unikátní oligonukleotidové sekvenci. Sondy lze značit libovolnými fluorofory a zhasěči dle vybrané kombinace a použitého přístroje. Vhodné fluorofory zahrnují např. HEX, FAM, Cy5, ATTO425. Vhodné zhasěče zahrnují např. BHQ1, BHQ2, DAB.

Souprava podle předkládaného technického řešení tedy obsahuje alespoň dvě sady pro detekci DNA hospodářských zvířat vybrané z následujících sad:

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA prasete domácího (*Sus scrofa*):

forward primer: 5' - CCC CGC AAA TCC CTC AAC CA – 3'  
reverse primer: 5' - TTC CAC TTC CCA TCA CCA AAA CTA CC – 3'  
sonda: 5' - CTG ACT TGC CAC CGC TCA CAG CCG AG – 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *MICAL1* v rozsahu 1046 až 1203 bp (Acc. No. NC\_010443.5:c75522760-75511692) a délka výsledného amplikonu je 158 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA tura domácího (*Bos taurus*):

forward primer: 5' - GCC CTT TGC CCA CCA CAG C – 3'  
reverse primer: 5' - CCC GTG AGC TTC TTA TAG ACA CCA – 3'  
sonda: 5' - CTA CCG TCC CCT GTG TGT GTT GTG ACC ATT – 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *RPS7* v rozsahu 4978 až 5096 bp (Acc. No. NC\_037335.1:c110992366-110987214) a délka výsledného amplikonu je 119 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA ovce domácí (*Ovis aries*):

forward primer: 5' - CTC AGC CTG TGG CCA GTG CTG – 3'  
reverse primer: 5' - CCT TGA AGA TGA GGT GAC CAG GCC – 3'  
sonda: 5' - CCA CGT GGG AAG TGC TGT GTC AGA GGG – 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *MICAL1* v rozsahu 2253 až 2343 bp (Acc. No. NW\_011942415.1:c2949713-2922279) a délka výsledného amplikonu je 91 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA kozy domácí (*Capra hircus*):

forward primer: 5' - GCA CTT CTG TCG GGC CGT GTG -3'  
reverse primer: 5' - CAC CGC CCC CTC CAA CTG C-3'  
sonda: 5' - CGA GCT GAG AGA CGG TAC AGG GCC TC - 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu MMAB v rozsahu 8625 až 8714 bp (Acc. No. NC\_030824.1:c7494575-7482857) a délka výsledného amplikonu je 90 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA koně domácího (*Equus caballus*):

5

forward primer: 5' - CCA GTG CCC TCA CGT GTG ATC T - 3'

reverse primer: 5' - AGA AGA GAG CTG GAT CAT TAG ACT GAG - 3'

sonda: 5' - TCA GCT CAA AGG AAG AGG ACG TGT TAG CCC - 3'

10 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu RPS14 v rozsahu 5300 až 5430 bp (Acc. No. NC\_009157.3:26891344-26897275) a délka výsledného amplikonu je 131 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA buvola domácího (*Bubalus bubalis*):

15 forward primer: 5' - GTA GAG GGA AGA GCG GTG AGG - 3'

reverse primer: 5' - CTC AAA TCG ACA GCA AAA GTA AAC AAT G - 3'

sonda: 5' - CAG TGG GCG CGG TGG GGT AAA GCA - 3'

20 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu RPS7 v rozsahu 2667 až 2777 bp (Acc. No. NC\_037547.1:c173616710-173610980) a délka výsledného amplikonu je 111 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA osla domácího (*Equus asinus*):

25 forward primer: 5' - GGA GTC AGG ATT CTT TGG TTT CAG G - 3'

reverse primer: 5' - CCA GGA TGT ACC CTT CCA GAT GG - 3'

sonda: 5' - CCG GGT GAG GTT CTG CTG TCT CTG TCT TCT - 3'

30 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu RPS14 v rozsahu 1369 až 1472 bp (Acc. No. NW\_014638069.1:c1889717-1883571) a délka výsledného amplikonu je 104 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*):

forward primer: 5' - GCG ACA ACA CTG CAG AGC ACC - 3'

35 reverse primer: 5' - CTA AAG GGC TTC GGT GAG ATG GTA TC - 3'

sonda: 5' - AGT GTC AGC AGA GTC GCC GAG TAT CAG C - 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu PHKA2 v rozsahu 25152 až 25233 bp (Acc. No. NC\_013690.1:c4749748-4678201) a délka výsledného amplikonu je 82 bp.

40 - sada oligonukleotidů pro detekci DNA zajíce polního (*Lepus europaeus*):

forward primer: 5' - CTC CCT CTA GTC TGT CCT GTA GC - 3'

reverse primer: 5' - ATA CAA TAG AAT TCA GCA GTA AGG TTC ATG - 3'

45 sonda: 5' - ATC CTT GAC TCT CCC CAC TGC CCT TAT GAT - 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu HPX v rozsahu 411 až 540 bp (Acc. No. FJ811725.1) a délka výsledného amplikonu je 130 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA klokana (*Macropus*):

50

forward primer: 5' - CTT GGA TGT GGT ACA GGG GCA GAG - 3'

reverse primer: 5' - GTG TCA ACA TCC CAG CAT GCA CGC - 3'

sonda: 5' - AGT GGT TGA GGG ATG GAG CTG GGT GTA GG - 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *MICAL1* v rozsahu 6118 až 6205 bp (Acc. No. ENSMEUG00000004627) a délka výsledného amplikonu je 88 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA krokodýla (*Crocodylus*):

5

forward primer: 5' - GGA CTG CTT TAG AGA CAT TAG ATT TCA TAG -3'

reverse primer: 5' - GTT CTT TCC ATT ATT AAT GTT GCT TGC TTG C -3'

sonda: 5' - AGA TCA TCG AGT CCA GCC CCC TTT ACC TTG - 3'

10 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *TRIB1* v rozsahu 1906 až 2033 bp (Acc. No. NW\_017728886.1:253501338-253506930) a délka výsledného amplikonu je 128 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA kura domácího (*Gallus gallus*):

15 forward primer: 5' - TTC ACA GCC TCG TTG CTT CCT CAT - 3'

reverse primer: 5' - AGG CAG CAT GGA GAG TTT GTT CG - 3'

sonda: 5' - TGC CCC CAA GTG AGC CCC CAG TGC - 3'

20 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *MICAL1* v rozsahu 8111 až 8262 bp (Acc. No. NC\_006113.5:29839-40913) a délka výsledného amplikonu je 152 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA krůty domácí (*Meleagris gallopavo*):

25 forward primer: 5' - GGT GCT GCC CTT GGG TCA C - 3'

reverse primer: 5' - CCA GGT CCC TTT CTG CCA AGC - 3'

sonda: 5' - CAG CAA TAC AGG CGT GGG AAA GAG TGG C - 3'

30 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *MEDI7* v rozsahu 1635 až 1724 bp (Acc. No. NC\_015011.2:c180858832-180845598) a délka výsledného amplikonu je 90 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA husy domácí (*Anser anser*):

35 forward primer: 5' - CTT GTG CGT GCT CTT CTC CCT GA - 3'

reverse primer: 5' - CGT GTT CAG AGC AGT GTA GAT GTC C -3'

sonda: 5' - CTC AAA CAT CAT TCC TCT GTC ATT CTC ACG GGG TG - 3'

40 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *F2* v rozsahu 5863 až 5996 bp (Acc. No. NW\_013185657.1:10766418-10778807) a délka výsledného amplikonu je 134 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA kachny domácí (*Anas platyrhynchos*):

45 forward primer: 5' - GTG ATT TTC CAC TCA TCG CTC CAT T - 3'

reverse primer: 5' - GGA AAT CCA ATA ATG TCT CAG AAA CTC ACA - 3'

sonda: 5' - TGA GTC CTG GGT AAA TCA AGG GGA GGG AAA GT - 3'

50 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *SERPINE3* v rozsahu 1485 až 1605 bp (Acc. No. NW\_004677545.1:59514-69324) a délka výsledného amplikonu je 121 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA křepelky japonské (*Coturnix japonica*):

forward primer: 5' - GCT CGG TTC GGT CCA TCC AC - 3'

reverse primer: 5' - GCC ACA GCC CCT TTC TCA TCC - 3'

sonda: 5' - CGG AAA TGG TGA GTG GGG CTG CGG TAT T - 3'

Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *RPS21* v rozsahu 329 až 444 bp (Acc. No. NC\_029535.1:c7098188-7094238) a délka výsledného amplikonu je 116 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA pštrosa dvouprstého (*Struthio camelus*):

5

forward primer: 5' - GCC TGG TGC CTC TTG TCC TGT - 3'

reverse primer: 5' - AAA TCT CCC ATC TCT CAA TCC TCT CG - 3'

sonda: 5' - CTG GCC CCA TCC TCT CGA CAC CCT CC - 3'

10 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *RPS7* v rozsahu 2011 až 2138 bp (Acc. No. NW\_009270584.1:328779-335836) a délka výsledného amplikonu je 128 bp.

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA perličky kropenaté (*Numida meleagris*):

15 forward primer: 5' - GCA GCG CTG GCG TTA AGT TCC - 3'

reverse primer: 5' - CCA CTA AAA AGA GCC CGG CAC C - 3'

sonda: 5' - CGT GGG TGG GAA GTT TGA GGG CAG G - 3'

20 Tyto oligonukleotidy nasedají na část genu *BRAP* v rozsahu 564 až 696 bp (Acc. No. NC\_034422.1:c6468096-6453599) a délka výsledného amplikonu je 133 bp.

Ve výhodném provedení souprava dále obsahuje sadu oligonukleotidů pro interní amplifikační kontrolu (IAC):

25 forward primer: 5' - AGA GGA CCG GGA TAT TCG AC - 3'

reverse primer: 5' - AGG TAG TCC GAG GAA AAC TCT AAA C - 3'

sonda: 5' - GGC TCT TCT ATG TTC TGA CCT TGT TGG A - 3'

Délka výsledného amplikonu je 141 bp:

30

GCAGCGCTGGCGTTAAGTTCCAAATACTTAAGGCTCTTCTATGTTCTGACCTTGTTGGA  
TTCCACACTTTCGACTATGCTCGACATTACTGGTTCCTTTCGTGTTGCAGTCGAATGGT  
TTAGAGTTTTCTCGGACTACCT

35 Vnitřní sekvence pochází z genu *StTS* (*Solanum tuberosum trehalose synthase*).

Ve výhodných provedeních souprava obsahuje 3 až 4 výše uvedené sady oligonukleotidů pro detekci DNA hospodářských zvířat. Každý vzorek je tak souběžně analyzován pomocí několika multiplexních qPCR souprav, které jsou poskládány do logických celků a pokrývají spektrum nejčastějších živočišných druhů používaných při výrobě potravin a krmiv. IAC je obsažena v prvním qPCR multiplexu. Tedy v první qPCR analýze je identifikována případná inhibice amplifikace ve vzorku a v následných analýzách již není nutné inhibici prokazovat, což vede k úspoře finančních nákladů.

45 Ve výhodných provedeních obsahují multiplexní soupravy následující kombinace sad oligonukleotidů:

- multiplexní souprava obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA kura, krůty, prasete;

50 - multiplexní souprava obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA buvola, tura, ovce, kozy;

- multiplexní souprava obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA pštrosa, křepelky, husy a kachny;

55

- multiplexní souprava obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA zajíce, králíka, koně;
- multiplexní souprava obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA klokana, osla, krokodýla a perličky.

5

Významným inovativním aspektem předloženého technického řešení je použití designu vlastních primerů a sond pro amplifikaci DNA jednotlivých živočišných druhů. Na základě rozsáhlé srovnávací analýzy byly vytipovány jedinečné oblasti v genomu vybraných živočišných druhů, do nichž byly umístěny sekvence primerů a sond. Vedle originality sekvencí toto řešení odstraňuje problémy s využitím sekvencí mitochondriální DNA, jmenovitě genu pro cytochrom b, na kterém je založena drtivá většina qPCR systémů používaných pro druhovou identifikaci. Tyto problémy spočívají především ve vysoké podobnosti jednotlivých sekvencí cytochromu b mezi jednotlivými druhy, takže specifická qPCR reakcí může být nedostatečná, což je i jeden z důvodů pro velmi nízkou možnost multiplexního uspořádání qPCR systémů založených na amplifikaci cytochromu b. Dalším zásadním problémem dosavadního stavu techniky je fakt, že mitochondriální DNA se v buňce vyskytuje ve značném množství kopií a je závislá na typu buňky a tkáně a tedy případná kvantifikace a celková interpretace výsledků je na základě dat získaných z těchto qPCR systémů velmi obtížná. Tyto nedostatky odstraňuje předložené řešení, protože všechny použité primery a sondy byly navrženy do oblastí, které se v genomu daného druhu vyskytují pouze v jedné kopii.

V dalším výhodném provedení technického řešení jsou sondy v jedné multiplexní soupravě obsahující až 4 sady oligonukleotidů pro detekci DNA hospodářských zvířat označeny fluorofory tak, že každá sonda je označena jedním fluoroforem vybraným ze skupiny fluoroforů ATTO425, FAM, HEX a Cy5, přičemž každá sonda je označena jiným fluoroforem než kterákoliv jiná sonda v této multiplexní soupravě. V tomto provedení je unikátní výhodou použití specifické kombinace fluorescenčních barviv (ATO425, FAM, HEX a Cy5), což umožnilo vytvořit kvadruplexní (amplifikující zároveň 4 nezávislé sekvence DNA) qPCR systémy. Uvedená kombinace fluoroforů se vyznačuje kvalitním neinterferujícím fluorescenčním signálem, velmi dobrou interpretovatelností výsledků, a především univerzálním použitím. Tato kombinace má potenciál pro uplatnění v dalších kvadruplexních qPCR systémech např. pro detekci patogenů v potravinách a krmivech.

Pomocí metody multiplex qPCR s využitím zde popsaných souprav oligonukleotidů lze prokázat přítomnost DNA analyzovaných druhů jak ve vzorcích syrových tkání, tak u zpracovaných potravin a krmiv nebo jejich komponent. Soupravy podle technického řešení lze použít pro detekci všech typů tkání, které mohou být hlavní či vedlejší surovinou obsaženou v potravinách a krmivech; mezi tyto tkáně patří svalovina, tuk, chrupavky, vnitřnosti, krev a krevní deriváty, kůže a její deriváty, střeva, mezenterium, plazma, želatina a proteiny. DNA představuje oproti proteinům stabilní molekulu, kterou je možné v různém stupni fragmentace extrahovat i z technologicky zpracovaných potravin a krmiv (tj. i z potravin vyrobených s využitím vysokého stupně mělnění surovin, různých úrovní tepelné úpravy či za použití vysokého tlaku).

#### 45 Příklady uskutečnění technického řešení

Soupravy byly původci s úspěchem ověřeny v praxi v laboratoři Veterinární a farmaceutické univerzity Brno na Ústavu hygieny a technologie masa na vzorcích průmyslově zpracovaných krmiv pro zvířata v zájmovém chovu, zakoupených v tržní síti. V následujících příkladech bylo za použití soupravy o níže uvedeném optimálním složení testováno mimo jiné 7 granulovaných a konzervovaných krmiv pro psy a kočky s deklarovaným obsahem:

- 1) kachního, kuřecího, křepelčího a krůtího masa;
- 2) buvolího, jehněčího a hovězího masa;
- 55 3) kuřecího, králíčího, jehněčího a vepřového masa;

- 4) pštrošího a drůbežího masa;
- 5) koňského a kachního masa;
- 6) hovězího a husího masa;
- 7) kozího, kachního, vepřového a jehněčího masa.

5

V uvedených výrobcích byla za použití předloženého technického řešení potvrzena přítomnost DNA všech deklarovaných druhů masa.

#### Izolace DNA

10

Použití přístupu multiplex qPCR vyžaduje izolaci DNA z testovaných vzorků, s ohledem na použití vhodného izolačního kitu. K izolaci byl využit DNeasy mericon Food Kit (dodavatel Qiagen). Tento kit je určen pro izolaci DNA z potravin a krmiv, včetně vzorků, u kterých je DNA značně degradována vlivem mechanického, tepelného či tlakového opracování surovin. Podrobný postup extrakce DNA je popsán v návodu dodaném výrobcem.

15

#### Příprava amplifikační směsi pro qPCR

20

Je obecně známo, že základem amplifikační směsi je PCR master a specifické oligonukleotidy. Složení směsi pro 1 reakci bylo: 1 x koncentrovaný LightCycler® 480 Probes Master (Roche), 0,2 U Uracil-DNA-glykosylázy (Roche), 1 pmol každého primeru, 0,2 pmol sondy značené ATTO425/DAB, 1 pmol sondy značené FAM/BHQ1, HEX/BHQ1 a 4 pmol sondy značené Cy5/BHQ2, vše ředěno ultračistou vodou. Minimálně v jedné amplifikační směsi musí být obsažena IAC (10\*5 kopií/reakci). V tabulce níže je uvedeno složení pěti multiplexních sad, které při současném použití dovoluují detekovat DNA všech 18 hospodářských zvířat. Sekvence primerů a sond jsou takové, jak je uvedeno u jednotlivých sad v kapitole Podstata technického řešení. V tabulkách jsou primery charakterizovány uvedením druhu zvířete, a sondy uvedením druhu zvířete a fluoroforu, kterým je daná sonda označena.

25

Tabulka č. 1. Amplifikační směs pro detekci DNA nejčastěji potravinářsky zpracovávaných hospodářských druhů: kura, krůty, prasete, doplněná o interní amplifikační kontrolu (IAC)

30

Složka	Koncentrace přidávané složky	Množství na 1 reakci	Množství na 100 reakcí
Voda o čistotě pro PCR		3,7 µl	370 µl
Kur forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Kur reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Kur sonda ATTO425	4 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Krůta forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Krůta reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Krůta sonda FAM	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Prase forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Prase reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Prase sonda HEX	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
IAC forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
IAC reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
IAC sonda Cy5	80 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
IAC plasmid	10*6 kopií	0,1 µl	10 µl
Uracil-DNA-glykosyláza	1 U/µl	0,2 µl	20 µl
LightCycler® 480 Probes Master	2 x konc.	10 µl	1000 µl



Celkem	15 µl	1500 µl
--------	-------	---------

Tabulka č. 2. Amplifikační směs pro detekci DNA buvola, tura, ovce, kozy (možno využít i při hodnocení mléčných výrobků)

Složka	Koncentrace přidávané složky	Množství na 1 reakci	Množství na 100 reakcí
Voda o čistotě pro PCR		3,8 µl	380 µl
Buvol forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Buvol reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Buvol sonda ATTO425	4 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Tur forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Tur reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Tur sonda FAM	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Ovce forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Ovce reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Ovce sonda HEX	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Koza forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Koza reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Koza sonda Cy5	80 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Uracil-DNA-glykosyláza	1 U/µl	0,2 µl	20 µl
LightCycler® 480 Probes Master	2 x konc.	10 µl	1000 µl
Celkem		15 µl	1500 µl

5

Tabulka č. 3. Amplifikační směs pro detekci DNA hrabavé a vodní drůbeže: pštrosa, křepelky, husy a kachny

Složka	Koncentrace přidávané složky	Množství na 1 reakci	Množství na 100 reakcí
Voda o čistotě pro PCR		3,8 µl	380 µl
Pštros forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Pštros reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Pštros sonda ATTO425	4 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Křepelka forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Křepelka reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Křepelka sonda FAM	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Husa forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Husa reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Husa sonda HEX	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Kachna forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Kachna reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Kachna sonda Cy5	80 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Uracil-DNA-glykosyláza	1 U/µl	0,2 µl	20 µl
LightCycler® 480 Probes Master	2 x konc.	10 µl	1000 µl
Celkem		15 µl	1500 µl

10

Tabulka č. 4. Amplifikační směs pro detekci DNA zajíce, králíka, koně

Složka	Koncentrace přidávané složky	Množství na 1 reakci	Množství na 100 reakcí
Voda o čistotě pro PCR		4,05 µl	405 µl
Zajíc forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Zajíc reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Zajíc sonda ATTO425	4 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Králík forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Králík reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Králík sonda FAM	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Kůň forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Kůň reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Kůň sonda Cy5	80 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Uracil-DNA-glykosyláza	1 U/µl	0,2 µl	20 µl
LightCycler® 480 Probes Master	2 x konc.	10 µl	1000 µl
<b>Celkem</b>		<b>15 µl</b>	<b>1500 µl</b>

5 Tabulka č. 5. Amplifikační směs pro detekci DNA minoritních druhů hospodářských zvířat: klokan, osla, krokodýla a perličky

Složka	Koncentrace přidávané složky	Množství na 1 reakci	Množství na 100 reakcí
Voda o čistotě pro PCR		3,8 µl	380 µl
Klokan forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Klokan reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Klokan sonda ATTO425	4 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Osel forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Osel reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Osel sonda FAM	20 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Krokodýl forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Krokodýl reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Krokodýl sonda HEX	80 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Perlička forward primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Perlička reverse primer	10 pmol/µl	0,1 µl	10 µl
Perlička sonda Cy5	80 pmol/µl	0,05 µl	5 µl
Uracil-DNA-glykosyláza	1 U/µl	0,2 µl	20 µl
LightCycler® 480 Probes Master	2 x konc.	10 µl	1000 µl
<b>Celkem</b>		<b>15 µl</b>	<b>1500 µl</b>

## Multiplex qPCR analýza

- 10 Po rozpipetování se k připravené amplifikační směsi přidá 5 µl testované genomické DNA (koncentrace 5 až 20 ng/µl). Reakce probíhala v přístroji pro qPCR (např. Lightcycler 480 Instrument, Roche) schopném simultánního snímání fluorescence barviv, která byla použita pro
- 15 značení sond. Je nutné, aby každý „PCR běh“ obsahoval pozitivní a negativní kontrolu, případně rozředěný standard. Teplotní program se skládal z počáteční denaturace po dobu 7 min při teplotě 95 °C následované 47 cykly složenými ze dvou kroků - denaturace při 95 °C po dobu 5 s a hybridizace primerů při 60 °C po dobu 40 s.

## Zpracování dat a interpretace výsledků

5 Hodnocení experimentů probíhá pomocí druhého derivačního maxima (pro IAC) a „Fit point“ analýzy (pro detekci živočišných druhů). Nejprve je třeba zkontrolovat, že testovaná DNA neobsahuje inhibitory (pozitivní signál v kanálu pro IAC). Následně lze hodnotit kvalitativně detekci jednotlivých hospodářských druhů zvířat či kvantitativně přepočítat relativního množství DNA dle standardu.

10

Průmyslová využitelnost

15 Soupravu pro současnou komplexní a multiplexní identifikaci a kvantifikaci významných a minoritních druhů hospodářských zvířat lze využít pro účely kontroly složení a ověřování autenticity potravin a krmiv, dále také pro kontrolu produktů farmaceutického nebo kosmetického průmyslu, které pracují se stejnou surovinovou základnou v oblasti bezpečnosti potravin.

## NÁROKY NA OCHRANU

20

1. Souprava pro multiplexní detekci DNA hospodářských zvířat metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň dvě sady pro detekci DNA hospodářských zvířat vybrané z následujících sad:

25

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA prasete domácího, *Sus scrofa*:

forward primer: 5' - CCC CGC AAA TCC CTC AAC CA - 3'

reverse primer: 5' - TTC CAC TTC CCA TCA CCA AAA CTA CC - 3'

30

sonda: 5' - CTG ACT TGC CAC CGC TCA CAG CCG AG - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA tura domácího, *Bos taurus*:

forward primer: 5' - GCC CTT TGC CCA CCA CAG C - 3'

35

reverse primer: 5' - CCC GTG AGC TTC TTA TAG ACA CCA - 3'

sonda: 5' - CTA CCG TCC CCT GTG TGT GTT GTG ACC ATT - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA ovce domácí, *Ovis aries*:

40

forward primer: 5' - CTC AGC CTG TGG CCA GTG CTG - 3'

reverse primer: 5' - CCT TGA AGA TGA GGT GAC CAG GCC - 3'

sonda: 5' - CCA CGT GGG AAG TGC TGT GTC AGA GGG - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA kozy domácí, *Capra hircus*:

45

forward primer: 5' - GCA CTT CTG TCG GGC CGT GTG - 3'

reverse primer: 5' - CAC CGC CCC CTC CAA CTG C - 3'

sonda: 5' - CGA GCT GAG AGA CGG TAC AGG GCC TC - 3'

50

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA koně domácího, *Equus caballus*:

forward primer: 5' - CCA GTG CCC TCA CGT GTG ATC T - 3'

reverse primer: 5' - AGA AGA GAG CTG GAT CAT TAG ACT GAG - 3'

sonda: 5' - TCA GCT CAA AGG AAG AGG ACG TGT TAG CCC - 3'

55

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA buvola domácího, *Bubalus bubalis*:

forward primer: 5' - GTA GAG GGA AGA GCG GTG AGG - 3'

reverse primer: 5' - CTC AAA TCG ACA GCA AAA GTA AAC AAT G - 3'

5 sonda: 5' - CAG TGG GCG CGG TGG GGT AAA GCA - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA osla domácího, *Equus asinus*:

forward primer: 5' - GGA GTC AGG ATT CTT TGG TTT CAG G - 3'

10 reverse primer: 5' - CCA GGA TGT ACC CTT CCA GAT GG - 3'

sonda: 5' - CCG GGT GAG GTT CTG CTG TCT CTG TCT TCT - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA králíka domácího, *Oryctolagus cuniculus*:

15 forward primer: 5' - GCG ACA ACA CTG CAG AGC ACC - 3'

reverse primer: 5' - CTA AAG GGC TTC GGT GAG ATG GTA TC - 3'

sonda: 5' - AGT GTC AGC AGA GTC GCC GAG TAT CAG C - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA zajíce polního, *Lepus europaeus*:

20

forward primer: 5' - CTC CCT CTA GTC TGT CCT GTA GC - 3'

reverse primer: 5' - ATA CAA TAG AAT TCA GCA GTA AGG TTC ATG - 3'

sonda: 5' - ATC CTT GAC TCT CCC CAC TGC CCT TAT GAT - 3'

25 - sada oligonukleotidů pro detekci DNA klokana, *Macropus*:

forward primer: 5' - CTT GGA TGT GGT ACA GGG GCA GAG - 3'

reverse primer: 5' - GTG TCA ACA TCC CAG CAT GCA CGC - 3'

30 sonda: 5' - AGT GGT TGA GGG ATG GAG CTG GGT GTA GG - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA krokodýla, *Crocodylus*:

forward primer: 5' - GGA CTG CTT TAG AGA CAT TAG ATT TCA TAG - 3'

35 reverse primer: 5' - GTT CTT TCC ATT ATT AAT GTT GCT TGC TTG C - 3'

sonda: 5' - AGA TCA TCG AGT CCA GCC CCC TTT ACC TTG - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA kura domácího, *Gallus gallus*:

forward primer: 5' - TTC ACA GCC TCG TTG CTT CCT CAT - 3'

40 reverse primer: 5' - AGG CAG CAT GGA GAG TTT GTT CG - 3'

sonda: 5' - TGC CCC CAA GTG AGC CCC CAG TGC - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA krůty domácí, *Meleagris gallopavo*:

45 forward primer: 5' - GGT GCT GCC CTT GGG TCA C - 3'

reverse primer: 5' - CCA GGT CCC TTT CTG CCA AGC - 3'

sonda: 5' - CAG CAA TAC AGG CGT GGG AAA GAG TGG C - 3'

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA husy domácí, *Anser anser*:

50

forward primer: 5' - CTT GTG CGT GCT CTT CTC CCT GA - 3'

reverse primer: 5' - CGT GTT CAG AGC AGT GTA GAT GTC C - 3'

sonda: 5' - CTC AAA CAT CAT TCC TCT GTC ATT CTC ACG GGG TG - 3'

55 - sada oligonukleotidů pro detekci DNA kachny domácí, *Anas platyrhynchos*:

forward primer: 5' - GTG ATT TTC CAC TCA TCG CTC CAT T - 3'  
 reverse primer: 5' - GGA AAT CCA ATA ATG TCT CAG AAA CTC ACA - 3'  
 sonda: 5' - TGA GTC CTG GGT AAA TCA AGG GGA GGG AAA GT - 3'

5

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA křepelky japonské, *Coturnix japonica*:

forward primer: 5' - GCT CGG TTC GGT CCA TCC AC - 3'  
 reverse primer: 5' - GCC ACA GCC CCT TTC TCA TCC - 3'  
 sonda: 5' - CGG AAA TGG TGA GTG GGG CTG CGG TAT T - 3'

10

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA pštrosa dvouprstého, *Struthio camelus*:

forward primer: 5' - GCC TGG TGC CTC TTG TCC TGT - 3'  
 reverse primer: 5' - AAA TCT CCC ATC TCT CAA TCC TCT CG - 3'  
 sonda: 5' - CTG GCC CCA TCC TCT CGA CAC CCT CC - 3'

15

- sada oligonukleotidů pro detekci DNA perličky kropenaté, *Numida meleagris*:

forward primer: 5' - GCA GCG CTG GCG TTA AGT TCC -3'  
 reverse primer: 5' - CCA CTA AAA AGA GCC CGG CAC C -3'  
 sonda: 5' - CGT GGG TGG GAA GTT TGA GGG CAG G - 3'.

20

2. Souprava podle nároku 1, **vyznačená tím**, že dále obsahuje sadu oligonukleotidů pro interní amplifikační kontrolu - IAC:

25

forward primer: 5' - AGA GGA CCG GGA TAT TCG AC - 3'  
 reverse primer: 5' - AGG TAG TCC GAG GAA AAC TCT AAA C - 3'  
 sonda: 5' - GGC TCT TCT ATG TTC TGA CCT TGT TGG A - 3',

30

a plasmid s vloženou sekvencí: GCAGCGCTGGCGTTAAGTTCCAAATACTTAAGGCT  
 CTTCTATGTTCTGACCTTGTTGGATTCCACACTTTCGACTATGCTCGACATTACTGGTTC  
 CTTTCGTGTTGCAGTCGAATGGTTTAGAGTTTCCTCGGACTACCT.

3. Souprava podle nároku 1 nebo 2, **vyznačená tím**, že souprava obsahuje 3 až 4 sady oligonukleotidů pro detekci DNA hospodářských zvířat, vybrané ze sad uvedených v nároku 1.

35

4. Souprava podle nároku 3, **vyznačená tím**, že je vybraná ze skupiny zahrnující:

40 - multiplexní soupravu obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA kura, krůty, prasete;

- multiplexní soupravu obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA buvola, tura, ovce, kozy;

45 - multiplexní soupravu obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA pštrosa, křepelky, husy a kachny;

- multiplexní soupravu obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA zajíce, králíka, koně; a

50 - multiplexní soupravu obsahující sady oligonukleotidů pro detekci DNA klokana, osla, krokodýla a perličky.

5. Souprava podle nároku 3 nebo 4, **vyznačená tím**, že sondy v jedné multiplexní soupravě obsahující 3 až 4 sady oligonukleotidů pro detekci DNA hospodářských zvířat jsou označeny fluorofory tak, že každá sonda je označena jedním fluoroforem vybraným ze skupiny fluoroforů

55

ATTO425, FAM, HEX a Cy5, přičemž každá sonda je označena jiným fluoroforem než kterákoliv jiná sonda v této multiplexní soupravě.

- 5 6. Souprava podle nároku 3 nebo 4, **vyznačená tím**, že sondy v jedné multiplexní soupravě obsahující 3 až 4 sady oligonukleotidů pro detekci DNA hospodářských zvířat jsou označeny fluorofory a zhášeči tak, že každá sonda je označena jednou kombinací fluorofor/zhášeč vybranou ze skupiny kombinací fluorofor/zhášeč ATTO425/DAB, FAM/BHQ1, HEX/BHQ1 a Cy5/BHQ2, přičemž každá sonda je označena jinou kombinací fluorofor/zhášeč než kterákoliv jiná sonda v této multiplexní soupravě.

10