



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Pentaplexní diagnostické qPCR systémy
pro simultánní identifikaci a kvantifikaci
tkání významných a minoritních
druhů hospodářských zvířat
s definovanou možností
využití pro kontrolu etických
požadavků halal potravin**

**Ing. Gabriela Bořilová, Ph.D.
Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D.
Mgr. Petr Králík, Ph.D.
Mgr. Bc. Monika Petráková**



UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

č. 94/2018

Pentaplexní diagnostické qPCR systémy pro simultánní identifikaci a kvantifikaci tkání významných a minoritních druhů hospodářských zvířat s definovanou možností využití pro kontrolu etických požadavků halal potravin

Autoři

Ing. Gabriela Bořilová, Ph.D.
Ing. Michaela Nesvadbová, Ph.D.
Mgr. Petr Králík, Ph.D.
Mgr. Bc. Monika Petráková

Metodika byla vytvořena na základě výsledků řešení projektu Ministerstva zemědělství
NAZV QJ1530107.

Tento výzkum byl finančně podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR v
rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601).

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: 6/2018

Vydalo: Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), Květná 15, 603 00 Brno

ISBN 978-80-88233-36-7
2018

Oponenti certifikované metodiky:

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Ústav fyziologie, morfologie a genetiky zvířat
Mendelova univerzita v Brně

Mgr. Lenka Bartošová, Ph.D.

Odbor laboratoří ústředního inspektorátu
Státní zemědělská a potravinářská inspekce

I. CÍL METODIKY

Certifikovaná metodika nabízí standardizovaný postup detekce tkání 18 hospodářsky významných živočišných 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*), který je založen na přítomnosti vybraných unikátních sekvencí ve struktuře DNA (kyselina deoxyribonukleová). Metodu 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). Nově navržené pentaplexní qPCR eseje, založené na principu detekce vybraných úseků genomové DNA, jsou vysoce citlivé; lze jimi prokázat přítomnost tkání daných druhů při koncentraci DNA 0,05 ng/μl. Certifikovaná metodika je plně využitelná nejen pro účely kontroly složení a ověřování autenticity potravin a krmiv, ale také pro kontrolu produktů farmaceutického nebo kosmetického průmyslu, které pracují se stejnou surovinovou základnou.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

0. Předmluva

Možnost komplexní analýzy pro ověření autenticity a zdravotní nezávadnosti potravin a krmiv patří k základním principům ochrany veřejného zdraví i ekonomických zájmů spotřebitelů. Průkaz kvality a autenticity potravin a krmiv a s tím spojené řešení metodických postupů pro odhalování falšování potravin a krmiv patří mezi klíčové cílové oblasti aplikované vědy a výzkumu. Ačkoli je falšování potravin zpravidla motivováno finančním ziskem, jeho důsledkem může být nejen snížení kvality a jakosti produktů, ale i přímé ohrožení veřejného zdraví. U vybraných typů potravin pak falšování postihuje i aspekt náboženský, etický či sociální, které mohou být klíčové v životním stylu specifických komunit spotřebitelů.

Tradiční postupy pro zajišťování bezpečnosti a kvality potravin založené na detekci nebezpečí a jeho eliminaci v průběhu výroby nejsou vhodné pro prevenci záměrného falšování, které je založené na zcela jiném principu. V současnosti je rozvinutá především oblast identifikace nebezpečí s následnou reakcí na jejich přítomnost. Ekonomicky motivované falšování vždy definují tři faktory: 1) možnost falšování provést; 2) motivace - finanční zisk; 3) absence kontrolních mechanismů (vnitřní systémy, standardy, analytika, apod.). Je zřejmé, že pro zajištění zdravotní nezávadnosti a potvrzení autenticity potravin a krmiv je nezbytně nutné rozvíjet strategii prevence, tedy omezení příležitostí k falšování a zamezení možností využití způsobů falšování. K dosažení tohoto cíle se jeví jako nezbytné zavedení multidisciplinárního přístupu, který sloučí analytické postupy (laboratorní analýzy) s poznatky z oborů technologie výroby potravin a krmiv, psychologie a kriminologie a aplikace potravinového a obchodního práva. Tento přístup by měl být implementován do strategických dokumentů a kontrolních systémů ve formě revize standardů pro bezpečnost potravin a krmiv ve všech segmentech od prvovýroby přes zpracovatele až po globální distributory, a to jak v oblasti prodeje, tak v oblasti gastronomie.

V důsledku stále se rozšiřujícího globálního trhu se jako nová cílová oblast jeví také falšování potravin pro konzumenty se specifickými náboženskými, sociálními nebo kulturními požadavky. Typickou komoditou jsou tzv. halal potraviny, suroviny a krmiva. Definice halal potravin je součástí islámského práva, které rozděluje potraviny na halal (povolené) a haram (zakázané) (Ceranica a Bozinovic, 2009). Počet příslušníků hlásících se k islámu představuje asi čtvrtinu celkové světové populace a každým rokem se počet muslimů zvyšuje (Hackett et al., 2015). Současně tak narůstají i požadavky na produkci halal potravin a tím i tlak na kontrolu jejich autenticity s cílenou detekcí přítomnosti nepovolených složek. S rostoucím počtem výrobců i distributorů halal potravin a také se zvyšujícím se počtem gastro-provozů nabízejících halal menu, pak logicky narůstá problém možného falšování těchto produktů obsahujících živočišné složky. Toto falšování (ať už záměrné z ekonomických důvodů nebo nezáměrné způsobené vlivem neznalosti náboženských pravidel) může zahrnovat například přidání vepřového masa, vnitřností, tuku či kůže do masných výrobků či použití vepřových stěv jako obalů, nebo přidání složek, které pochází z prasat – plazma, želatina, proteiny, kožní deriváty, které mohou být používány jak masném tak pekárenském, cukrárenském či lahůdkářském průmyslu, v gastronomických provozech či ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

Vývoj rychlé, spolehlivé, vysoce citlivé a časově i ekonomicky použitelné metody pro detekci a identifikaci tkání 18 významných a minoritních živočišných druhů byl identifikován jako jeden z klíčových cílů projektu NAZV QJ1530107 a certifikovaná metodika *Pentaplexní diagnostické qPCR systémy pro simultánní identifikaci a kvantifikaci tkání významných a minoritních druhů hospodářských zvířat s definovanou možností využití pro kontrolu etických požadavků halal potravin* dokladuje jeho úspěšné splnění.

0.1. Sekvence genu

Primery a sondy byly navrženy pomocí programu Oligo 7 (Rychlik, 2007).

0.1.1. BRAP (BRCA1 associated protein)

Protein, který je kódován genem *BRAP* je cytoplazmatický protein, který je schopen regulovat transport bílkovin do buněčného jádra tím, že zadržuje proteiny obsahující jaderný lokalizační signál v cytoplazmě. Tento protein kontroluje různé druhy mezibuněčných signálů. Je považován za prahový modulátor, který kontroluje citlivost MAPK signalizační dráhy, čímž udržují homeostázu v tkáňovém prostředí a řídí jadernou translokaci nukleárního faktoru kappa B (NF-κB). Gen *BRAP* je asociován také s několika onemocněními, které jsou způsobeny zánětlivými změnami včetně infarktu myokardu, aterosklerózy karotidních arterií nebo centrální obezity (Zhang et al., 2014).

Sekvence primerů a sondy pro *BRAP* qPCR – identifikace perlička (*Numida meleagris*):

RT_F80: 5'– GCA GCG CTG GCG TTA AGT TCC – 3'

RT_R80: 5'– CCA CTA AAA AGA GCC CGG CAC C – 3'

RT_P80: 5'– CY5 – CGT GGG TGG GAA GTT TGA GGG CAG G – BHQ2 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *BRAP* v rozsahu 564 – 696 bp (Acc. No. NC_034422.1:c6468096-6453599) a délka výsledného amplikonu je 133 bp.

0.1.2. F2 (coagulation factor II, thrombin)

Gen *F2* kóduje koagulační faktor II (protrombin), glykoprotein, který je syntetizovaný v játrech jako inaktivní prekurzor enzymu (zymogen), jehož tvorba závisí na přítomnosti vitamínu K. Protrombin je dále aktivován na serinový proteázový trombin, který je hlavním enzymem koagulační kaskády a hraje důležitou roli při homeostáze a trombóze – přeměňuje fibrinogen na fibrin při tvorbě krevních sraženin, stimuluje agregaci krevních destiček a aktivuje koagulační faktor V, VIII a XIII. Mutace v genu *F2* způsobují různé formy trombózy a dysprotrombinémie (Lancellotti a De Cristofaro, 2009).

Sekvence primerů a sondy pro *F2* qPCR – identifikace husa (*Anser anser*):

RT_F21: 5'– CTT GTG CGT GCT CTT CTC CCT GA – 3'

RT_R21: 5'– CGT GTT CAG AGC AGT GTA GAT GTC C – 3'

RT_P21: 5'– HEX– CTC AAA CAT CAT TCC TCT GTC ATT CTC ACG GGG TG – BHQ2
– 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *F2* v rozsahu 5863 – 5996 bp (Acc. No. NW_013185657.1:10766418-10778807) a délka výsledného ampliconu je 134 bp.

0.1.3. HPX (hemopexin)

Produktem genu *HPX* (hemopexin) je glykosylovaný protein s nejvyšší známou vazebnou afinitou k hemu, jehož funkce spočívá v transportu hemu z plazmy do jater a podílí se tak na ochraně buněk před oxidačním stresem prostřednictvím endocytózy LRP1 proteinů, která vede ke katabolismu hemové oxygenázy 1 (heme oxygenase-1) a následnému uvolnění železa z feritinu (Lawson et al., 2017).

Sekvence primerů a sondy pro *HPX* qPCR – identifikace zajíc (*Lepus europaeus*):

RT_F68: 5'– CTC CCT CTA GTC TGT CCT GTA GC – 3'

RT_R68: 5'– ATA CAA TAG AAT TCA GCA GTA AGG TTC ATG – 3'

RT_P68: 5'– ATTO425 – ATC CTT GAC TCT CCC CAC TGC CCT TAT GAT – DAB – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *HPX* v rozsahu 411 – 540 bp (Acc. No. FJ811725.1) a délka výsledného ampliconu je 130 bp.

0.1.4. MICAL1 (microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1)

Produkt genu *MICAL1* (microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1) patří do rodiny multidoménových proteinů MICAL, které se podílejí na kontrole dynamiky cytoskellu a s tím souvisejících základních biologických procesech, jako je např. kontakt buněk, buněčná diferenciace a migrace, růst axonů, větvení dendritů, formování neuromuskulárních spojení, angiogeneze, transport váčků a také genová transkripce (Vitali et al., 2016).

Sekvence primerů a sondy pro *MICAL1* qPCR – identifikace prase (*Sus scrofa*):

RT_F3: 5'– CCC CGC AAA TCC CTC AAC CA – 3'

RT_R3: 5'– TTC CAC TTC CCA TCA CCA AAA CTA CC – 3'

RT_P3: 5'– HEX – CTG ACT TGC CAC CGC TCA CAG CCG AG – BHQ1 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *MICAL1* v rozsahu 1046 – 1203 bp (Acc. No. NC_010443.5:c75522760-75511692) a délka výsledného amplikonu je 158 bp.

Sekvence primerů a sondy pro *MICAL1* qPCR – kur (*Gallus gallus*):

RT_F17: 5'– TTC ACA GCC TCG TTG CTT CCT CAT – 3'

RT_R16: 5'– AGG CAG CAT GGA GAG TTT GTT CG – 3'

RT_P14: 5'– ATTO425 – TGC CCC CAA GTG AGC CCC CAG TGC – DAB – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *MICAL1* v rozsahu 8111 – 8262 bp (Acc. No. NC_006113.5:29839-40913) a délka výsledného amplikonu je 152 bp.

Sekvence primerů a sondy pro *MICAL1* qPCR – klokan (*Macropus*):

RT_F67: 5'– CTT GGA TGT GGT ACA GGG GCA GAG – 3'

RT_R3'67: 5'– GTG TCA ACA TCC CAG CAT GCA CGC – 3'

RT_P67: 5'– ROX – AGT GGT TGA GGG ATG GAG CTG GGT GTA GG – BHQ2 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *MICAL1* v rozsahu 6118 – 6205 bp (Acc. No. ENSMEUG00000004627) a délka výsledného amplikonu je 88 bp.

0.1.5. *MICALL1* (MICAL like 1)

Produkty genu *MICALL1* náleží do skupiny proteinů vázajících lipidy s vyšší afinitou pro kyselinu fosfatidovou. Na endozomální membráně mohou působit produkty genu *MICALL1* jako downstreamový efektor proteinů Rab, které prostřednictvím cytosolických proteinů regulují tubulaci membrány. Dále se mohou podílet na pozdní fázi endocytózy a nepřímo hrát roli v růstu neuritů (Giridharan et al., 2013).

Sekvence primerů a sondy pro *MICALL1* qPCR – identifikace ovce (*Ovis aries*):

RT_F62: 5'– CTC AGC CTG TGG CCA GTG CTG – 3'

RT_R62: 5'– CCT TGA AGA TGA GGT GAC CAG GCC – 3'

RT_P62: 5'– HEX – CCA CGT GGG AAG TGC TGT GTC AGA GGG – BHQ1 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *MICALL1* v rozsahu 2253 – 2343 bp (Acc. NW_011942415.1:c2949713-2922279) a délka výsledného amplikonu je 91 bp.

0.1.6. *MED17* (mediator complex subunit 17)

Gen *MED17* kóduje jednu z 25 podjednotek tvořící preiniciační mediátorový komplex transkripce. Mediátorový komplex zprostředkovává přenos informací z transkripčních faktorů, které dokáží rozpoznat DNA enhancer (zesilovač) a tímto způsobem přímo regulovat iniciaci transkripce pomocí RNA polymerázy II (Hirabayashi et al., 2016).

Sekvence primerů a sondy pro *MED17* qPCR – identifikace krůta (*Meleagris gallopavo*):

RT_F50: 5' – GGT GCT GCC CTT GGG TCA C – 3'

RT_R50: 5' – CCA GGT CCC TTT CTG CCA AGC – 3'

RT_P50: 5' – FAM – CAG CAA TAC AGG CGT GGG AAA GAG TGG C – BHQ1 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *MED17* v rozsahu 1635 – 1724 bp (Acc. No. NC_015011.2:c180858832-180845598) a délka výsledného ampliconu je 90 bp.

0.1.7. *MMAB* (metabolism of cobalamin associated B)

Gen *MMAB* kóduje protein kobalamin adenosyltransferázu (ATR), který katalyzuje finální krok v přeměně vitamínu B12 prostřednictvím přenosu adenosylové skupiny z ATP na kobalamin za vzniku adenosylkobalaminu (AdoCbl) a také slouží jako chaperon při přenosu AdoCbl na methylmalonyl-CoA-mutázu (MCM). Mutace v tomto genu jsou příčinou methylmalonové acidurie (Illson et al., 2013).

Sekvence primerů a sondy pro *MMAB* qPCR – identifikace koza (*Capra hircus*):

RT_F84: 5' – GCA CTT CTG TCG GGC CGT GTG – 3'

RT_R84: 5' – CAC CGC CCC CTC CAA CTG C – 3'

RT_P84: 5' – ROX – CGA GCT GAG AGA CGG TAC AGG GCC TC – BHQ2 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *MMAB* v rozsahu 8625 – 8714 bp (Acc. No. NC_030824.1:c7494575-7482857) a délka výsledného ampliconu je 90 bp.

0.1.8. *PHKA2* (phosphorylase kinase regulatory subunit alpha 2)

Gen *PHKA2* kóduje alfa podjednotku fosforylázy-kinázy, která hraje hlavní roli při regulaci rozkladu glykogenu. Podjednotky, které jsou kódovány genem *PHKA2* v játrech a *PHKA1* ve svalové tkáni, prostřednictvím fosforylace, regulují aktivitu katalytických podjednotek gama, které obsahují aktivní místo enzymu a plní tak funkci fosforylázy-kinázy. Mutace v tomto genu jsou příčinou jaterní glykogenózy způsobující nedostatek enzymu glykogensyntetázy v játrech (Choi et al., 2016).

Sekvence primerů a sondy pro *PHKA2* qPCR – identifikace králík (*Oryctolagus cuniculus*):

RT_F74: 5'– GCG ACA ACA CTG CAG AGC ACC – 3'

RT_R74: 5'– CTA AAG GGC TTC GGT GAG ATG GTA TC – 3'

RT_P74: 5'– FAM – AGT GTC AGC AGA GTC GCC GAG TAT CAG C – BHQ1 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *PHKA2* v rozsahu 25152 – 25233 bp (Acc. No. NC_013690.1:c4749748-4678201) a délka výsledného ampliconu je 82 bp.

0.1.9. RPS7 (ribosomal protein S7)

Ribozomy jsou orgány buněk katalyzující syntézu proteinů, které jsou složeny z malé (40S) a velké (60S) podjednotky. Tyto podjednotky se skládají ze 4 druhů RNA a přibližně 80 strukturně odlišných proteinů. Gen *RPS7* kóduje ribozomální protein, který je součástí malé podjednotky (40S) ribozomů. Tento gen se dále podílí na regulaci apoptózy buněk a progresi p53 buněčného cyklu. Prostřednictvím signální dráhy PI3K/AKT a MAPK, produkty genu *RPS7* mohou také působit jako tumor supresory u karcinomu vaječníků (Zhang et al., 2016).

Sekvence primerů a sondy pro *RPS7* qPCR – tur (*Bos taurus*):

RT_F29: 5'– GCC CTT TGC CCA CCA CAG C – 3'

RT_R29: 5'– CCC GTG AGC TTC TTA TAG ACA CCA – 3'

RT_P29: 5'– FAM – CTA CCG TCC CCT GTG TGT GTT GTG ACC ATT – BHQ1 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *RPS7* v rozsahu 4978 – 5096 bp (Acc. No. NC_037335.1:c110992366-110987214) a délka výsledného ampliconu je 119 bp.

Sekvence primerů a sondy pro *RPS7* qPCR – buvol (*Bubalus bubalis*):

RT_F41: 5'– GTA GAG GGA AGA GCG GTG AGG – 3'

RT_R41: 5'– CTC AAA TCG ACA GCA AAA GTA AAC AAT G – 3'

RT_P41: 5'– ATTO425 – CAG TGG GCG CGG TGG GGT AAA GCA – DAB – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *RPS7* v rozsahu 2667 – 2777 bp (Acc. No. NC_037547.1:c173616710-173610980) a délka výsledného ampliconu je 111 bp.

Sekvence primerů a sondy pro *RPS7* qPCR – pštros (*Struthio camelus*):

RT_F34: 5'– GCC TGG TGC CTC TTG TCC TGT – 3'

RT_R34: 5'– AAA TCT CCC ATC TCT CAA TCC TCT CG – 3'

RT_P34: 5'– ATTO425 – CTG GCC CCA TCC TCT CGA CAC CCT CC – DAB – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *RPS7* v rozsahu 2011 – 2138 bp (Acc. No. NW_009270584.1:328779-335836) a délka výsledného ampliconu je 128 bp.

0.1.10. RPS14 (ribosomal protein S14)

Gen *RPS14* kóduje ribozomální protein, který je součástí malé podjednotky (40S) ribozomů. Tento gen je zapojen v 5q syndromu, který je způsoben delecí dlouhého raménka chromozomu 5 u lidí. Produkty tohoto genu negativně regulují aktivitu c-Myc, který je nezbytný pro normální buněčný růst a vývoj u savců. Nadměrná exprese c-Myc zvyšuje onkogenezi buněk, naopak deficiencie způsobuje, že buňky vystupují z buněčného cyklu a blokují buněčnou proliferaci. Produkty genu *RPS14* prostřednictvím přímé inhibice transkripční aktivity ovlivňují funkci c-Myc zprostředkováním degradace mRNA pomocí miRNA (Zhou et al., 2013).

Sekvence primerů a sondy pro *RPS14* qPCR – identifikace kůň (*Equus caballus*):

RT_F32: 5'– CCA GTG CCC TCA CGT GTG ATC T – 3'

RT_R32: 5'– AGA AGA GAG CTG GAT CAT TAG ACT GAG – 3'

RT_P32: 5'– CY5 – TCA GCT CAA AGG AAG AGG ACG TGT TAG CCC – BHQ2 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *RPS14* v rozsahu 5300 – 5430 bp (Acc. No. NC_009157.3:26891344-26897275) a délka výsledného amplikonu je 131 bp.

Sekvence primerů a sondy pro *RPS14* qPCR – identifikace osel (*Equus asinus*):

RT_F76: 5'– GGA GTC AGG ATT CTT TGG TTT CAG G – 3'

RT_R76: 5'– CCA GGA TGT ACC CTT CCA GAT GG – 3'

RT_P76: 5'– FAM – CCG GGT GAG GTT CTG CTG TCT CTG TCT TCT – BHQ1 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *RPS14* v rozsahu 1369 – 1472 bp (Acc. No. NW_014638069.1:c1889717-1883571) a délka výsledného amplikonu je 104 bp.

0.1.11. *RPS21* (ribosomal protein S21)

Gen *RPS21* kóduje ribozomální protein, který je součástí malé podjednotky 40S ribozomů, který je složen z 18S rRNA a 33 proteinových podjednotek. Protein náleží k rodině ribosomálních proteinů S21E a hraje důležitou roli při iniciaci translace, podílí se na regulaci syntézy bílkovin a růstu buněk (Verras et al., 2004).

Sekvence primerů a sondy pro *RPS21* qPCR – identifikace křepelka (*Coturnix japonica*):

RT_F35: 5'– GCT CGG TTC GGT CCA TCC AC – 3'

RT_R35: 5'– GCC ACA GCC CCT TTC TCA TCC – 3'

RT_P35: 5'– ROX – CGG AAA TGG TGA GTG GGG CTG CGG TAT T – BHQ2 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *RPS21* v rozsahu 329 – 444 bp (Acc. No. NC_029535.1:c7098188-7094238) a délka výsledného amplikonu je 116 bp.

0.1.12. SERPINE3 (serpin family E member 3)

Produkty genu *SERPINE3* patří do velké skupiny inhibitorů serpinových proteáz, které náleží do skupiny inhibitorů serinových proteáz. Serpiny hrají roli ve vytváření správného mikroprostředí pro růst a rozšiřování tumorů a při lokalizaci metastáz rakoviny prsu a plic (Świtnicki et al., 2016).

Sekvence primerů a sondy pro *SERPINE3* qPCR – identifikace kachna (*Anas platyrhynchos*):

RT_F26: 5' – GTG ATT TTC CAC TCA TCG CTC CAT T – 3'

RT_R26: 5' – GGA AAT CCA ATA ATG TCT CAG AAA CTC ACA – 3'

RT_P26: 5' – CY5 – TGA GTC CTG GGT AAA TCA AGG GGA GGG AAA GT – BHQ2 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *SERPINE3* v rozsahu 1485 – 1605 bp (Acc. No. NW_004677545.1:59514-69324) a délka výsledného amplikonu je 121 bp.

0.1.13. TRIB1 (tribbles pseudokinase 1)

Tribbles proteiny náleží u savců do rodiny proteinů, které nevykazují žádnou detekovatelnou kinázovou aktivitu a působí především jako molekulární adaptéry regulující jiné kinázy anebo jejich cíle. Produkty genu *TRIB1* hrají roli v metabolismu lipidů, lipoproteinů i glukózy a jsou spojeny se steatózou jater nebo leukémií (Soubeyrand et al., 2017).

Sekvence primerů a sondy pro *TRIB1* qPCR – identifikace krokodýl (*Crocodylus*):

RT_F75: 5' – GGA CTG CTT TAG AGA CAT TAG ATT TCA TAG – 3'

RT_R75: 5' – GTT CTT TCC ATT ATT AAT GTT GCT TGC TTG C – 3'

RT_P75: 5' – HEX – AGA TCA TCG AGT CCA GCC CCC TTT ACC TTG – BHQ2 – 3'

Těmito primery je možné amplifikovat část genu *TRIB1* v rozsahu 1906 – 2033 bp (Acc. No. NW_017728886.1:253501338-253506930) a délka výsledného amplikonu je 128 bp.

0.2. Interní amplifikační kontrola

Slouží ke sledování inhibice vlastní PCR, což umožní odhalit falešně negativní výsledek reakce.

Sekvence primerů a sondy pro IAC:

IAC nep/F57F: 5' – AGA GGA CCG GGA TAT TCG AC – 3'

IAC nep/F57R: 5' – AGG TAG TCC GAG GAA AAC TCT AAA C – 3'

IAC qPCRTM: 5' – Cy5 – GGC TCT TCT ATG TTC TGA CCT TGT TGG A – BHQ – 3'

Délka výsledného amplikonu je 141 bp.

1. Předmět a působnost

Tato metodika je závazná pro izolaci DNA ze vzorků živočišných tkání (tj. svalovina, tuk, chrupavka, vnitřnosti, krev a krevní deriváty, kůže a její deriváty, střeva, mezenterium, plazma, želatina, proteiny), ze vzorků potravin, potravinových surovin živočišného původu a krmiv, která jsou určena pet zvířata, a to za účelem qPCR identifikace 18 druhů hospodářských zvířat.

Podstata zkoušky

Podstatou zkoušky je izolace DNA sledovaného agens z testovaného vzorku pomocí komerčního kitu a systém multiplexních kvantitativních PCR (qPCR) s interní amplifikační kontrolou (IAC).

Vyvinutá metoda je schopna identifikovat následující tkáně nebo jejich komponenty 18 druhů hospodářských zvířat:

- svalovina – použití masa pro účely výživy lidí nebo zvířat
- tuk – surovina pro výrobu masných výrobků nebo i ostatních typů potravin (např. pečárské nebo cukrářské výrobky), použití v restauracích a gastroprovozech pro tepelnou úpravu smažením nebo restováním nebo jako součást vařených pokrmů
- kůže a její deriváty – kožní emulze, použití do masných výrobků
- vnitřnosti – použití do masných výrobků; použití jako vedlejší suroviny živočišného původu do krmiv pro zvířata
- střeva – přírodní (jedlý) obalový materiál pro masné výrobky, mohou se používat jako vedlejší suroviny živočišného původu do krmiv pro zvířata
- mezenterium – obalový materiál pro kulinární využití
- krev – surovina do masných výrobků; může se používat jako vedlejší surovina živočišného původu do krmiv pro zvířata
- plazma – náhrada masa do masných výrobků
- želatina – surovina pro potravinářský, kosmetický nebo farmaceutický průmysl
- proteiny – surovina pro produkci enzymů pro farmaceutický a kosmetický průmysl

2. Měřicí prostředky

- sada pipet:
 - s rozsahem nastavitelným od 200 – 1000 μ l (s chybou do 5 %)
 - s rozsahem nastavitelným od 20 – 200 μ l (s chybou do 5 %)
 - s rozsahem nastavitelným od 2 – 20 μ l (s chybou do 5 %)
 - s rozsahem nastavitelným od 0,5 – 10 μ l (s chybou do 5 %)
 - s rozsahem nastavitelným od 0,1 – 2,5 μ l (s chybou do 5 %)
- špičky s filtrem k pipetám s příslušným rozsahem
- kit na izolaci DNA DNeasy mericon Food Kit
- šroubovací zkumavky o objemu 2 ml
- sterilní mikrozukavky o objemu 1,5 a 2 ml
- pinzeta, nůžky, nůž, alobal
- chladnička
- mrazicí box (-20/-80 °C)
- váhy, třída přesnosti I
- termomixer Biosan TS-100
- vortex MixMate
- centrifuga MiniSpin Plus
- termoblok
- přístroj LightCycler 480 Instrument
- 96 jamková bílá plata, LightCycler 480
- centrifuga 5430
- vortex/centrifuga FVL-2400
- laminární box

3. Chemikálie a roztoky

3.1. Souprava na izolaci DNA

Izolace DNA se provádí s využitím kitu DNeasy mericon Food Kit, dodavatel Qiagen, katalogové číslo 69514. 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. Tento kit umožňuje izolaci i fragmentované DNA a efektivní odstranění nečistot a inhibitorů následných molekulárně-genetických analýz. Izolace DNA je založena na

modifikované CTAB metodě v kombinaci s využitím proteinázy K, kdy dochází nejprve k lýzi tkání a buněk a následně k vysrážení bílkovin se současným vysrážením jiných buněčných a potravinových inhibitorů. Po extrakci chloroformem se vodná fáze obsahující DNA smíchá s vazebným pufrům umožňující imobilizaci DNA na koloně se silikonovou membránou. Purifikovaná DNA je posléze eluována roztokem s nízkým obsahem solí. Izolační soupravu je možné skladovat při teplotě 15 – 25 °C.

3.2. Mastermix qPCR

LightCycler® 480 Probes Master (Roche), katalogové číslo 04 887 301 001. Master Mix je nutné skladovat při teplotě od -25 °C do -15 °C, nedoporučuje se opakované zamrazení s následným rozmrazováním pro další analýzu. Po prvním rozmrazení lze Master Mix skladovat po dobu max. 4 týdnů při teplotě od 2±0,5 °C do 8±0,5°C.

3.3. Voda pro qPCR

Pro ředění všech komponent qPCR reakce se používá PCR ultra čistá voda, dodavatel Top-Bio, katalogové číslo P040.

3.4. Ethanol

Používat výhradně nedenaturovaný 96 % etanol, dodavatel P-Lab, katalogové číslo E02301.

3.5. Uracil-DNA-glykosylaza

Každá kompetitivní qPCR reakce obsahuje UNG, dodavatel Roche, katalogové číslo 11 775 375 001.

3.6. Primery

Originální primery jsou dodávány v lyofilizovaném stavu od výrobce KRDL, Česká Republika. Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR ultra čisté vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. Primery jsou evidovány a uloženy v mrazničce při teplotě cca – 20 °C ± 4 °C po dobu max. 5 let. Je zakázáno pipetovat primery do qPCR přímo ze zásobní zkumavky.

3.7. Sondy

Originální sondy jsou dodávány v lyofilizovaném stavu od firmy Genetec Biotech (Česká Republika). Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR ultra čisté vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. SONDY jsou evidovány

a uloženy v mrazničce při teplotě cca $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu max. 5 let. Je zakázáno pipetovat sondy do qPCR přímo ze zásobní zkumavky.

3.8. Kvantifikační plazmidový gradient

Pro určení zastoupení jednotlivých živočišných komponent v potravinách bylo množství DNA ve vzorku stanoveno pomocí kvantifikačního standardu tvořeného ředěním DNA izolované z daného druhu v rozsahu (10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 a 0,01 ng/ μl).

3.9. Interní amplifikační kontroly (IACs)

IAC byla převzata z již dříve zavedeného systému pro detekci *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Slana et al., 2008). Ve zkratce, k části sekvence *SttS1* genu pocházející z brambor (*Solanum tuberosum*) jsou připojena vazebná místa pro hybridní primery nep/F57. Část sekvence těchto primerů je odvozená z genomu láčkovky (*Nepenthes*), část z genomu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Takto vytvořený DNA konstrukt byl klonován do TA vektoru pCR 2.1 (Invitrogen) a transformován do chemokompetentních buněk *Escherichia coli*. Po selekci pozitivních kolonií a pomnožení v tekutém médiu byly plazmidové inzerty ověřeny sekvenováním. U potvrzených plazmidů byla určena koncentrace a čistota pomocí měření absorbance. Zjištěná koncentrace byla přepočtena na počet plazmidových kopií na objem zásobního roztoku. Z něj byly desítkovým ředěním připraveny standardní roztoky IAC v rozmezí 10^8 až 10^0 kopií na μl . Plazmidový gradient IAC byl rozpuštěn v TE pufru bez přídavku čisté DNA z rybích spermií a skladován při teplotě cca $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve 2 ml zkumavkách se šroubovacím víčkem do vypotřebování.

4. Vzorkování, manipulace se vzorkem a jeho příprava

4.1. Odběr a příprava vzorků

Vzorky (tkáň, potraviny, potravinové suroviny živočišného původu, krmiva pro pet zvířata) jsou odebrány ve sterilním laboratorním prostředí z originálního obalu v množství 100 g s maximální odchylkou 5 g. Po odběru jsou vzorky řádně označeny a skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Evidence vzorků se řídí vnitřními předpisy laboratoře.

4.2. Izolace DNA

4.2.1 Před vlastní izolací

- 1) Předehřát termomixer na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Vlastní izolace DNA

- 1) Do zkumavky se šroubovacím víčkem (objem 2 ml) navážit 200 mg vzorku.
 - a) Tkáň, potraviny nebo krmiva (granule, konzervy, polokonzervy), které zvyšují po přidání roztoku svůj objem: navážit 2×100 mg a rozdělit do dvou zkumavek o objemu 2 ml.
 - b) Potraviny a krmiva konzistence tekutiny: odebrat 200 μ l.
 - c) Tuk nebo tukové krytí: odebrat 2×200 mg a rozdělit do 2 zkumavek (celkem 400 mg).
- 2) K naváženému vzorku přidat 1 ml Food Lysis Buffer a 2,5 μ l Proteinase K, zvortexovat 10 s.
- 3) Vzorky inkubovat v termomixeru při 60 ° C za stálého třepání 800 rpm přes noc (cca 18 hodin).
- 4) Vzorky ochladit na pokojovou teplotu.
- 5) Vzorky centrifugovat 5 min při 4.700 rpm.
- 6) Do čisté zkumavky napipetovat 500 μ l chloroformu a přidat maximální množství (cca 700 – 800 μ l) čistého supernatantu získaného v kroku 5. Pokud na povrchu vznikne povlak, odebere se čirá tekutina pod povlakem.
- 7) Zkumavky vortexovat 15 s a centrifugovat 15 min při 11.000 rpm.
- 8) Do čisté zkumavky napipetovat 700 μ l Buffer PB a 700 μ l horní vodné fáze (nebo maximální množství) získané v kroku 7, zvortexovat 10 s, krátce centrifugovat.
- 9) Roztok získaný v kroku 8 přenést na kolonku (maximálně 750 μ l), centrifugovat 1 min při 12.500 rpm, odpad vylít. Opakovat tento krok, dokud nebude zpracován veškerý roztok získaný v kroku 8. Pokud dojde k ucpání kolonky, lze pro jeden vzorek použít více kolonek.
- 10) Do kolonky přidat 500 μ l Buffer AW2, centrifugovat 1 min při 12.500 rpm, odpad vylít a znovu centrifugovat 1 min při 12.500 rpm.
- 11) Kolonku vložit do nové čisté 1,5ml zkumavky, přidat 75 μ l Buffer EB, inkubovat 5 min při pokojové teplotě a poté centrifugovat 1 min při 12.500 rpm.
- 12) Opakovat krok 11 (nanést na stejnou kolonku 75 μ l Buffer EB, inkubovat 5 min při pokojové teplotě a centrifugovat 1 min při 12.500 rpm).
- 13) Výsledkem je získání 150 μ l DNA z analyzovaného vzorku.

5. Postup zkoušky

5.1. Bezpečnostní opatření

Provedení metody nevyžaduje žádné zvláštní bezpečnostní opatření.

5.2. Okolní podmínky zkoušky

Provedení metody nevyžaduje kontrolu žádných okolních podmínek.

5.3. Množství vzorku

DNA se izoluje z 200 mg tuhých vzorků, 200 µl kapalných vzorků nebo 2 × 200 mg tuku nebo tukového krytí. Do qPCR reakce se používá 5 µl vzorku naředěného na koncentraci DNA 5 – 20 ng/µl.

5.4. Slepý pokus

5.4.1. Negativní izolační kontrola (NIC)

Provádí se stejně jako izolace DNA ze vzorku tkání. Jako vzorek do izolačního kitu je místo alikvotu tkáně použita voda v ekvivalentním množství. Jedna NIC musí být použita na každou izolaci. Jedna série zahrnuje maximálně 11 vzorků a 1 NIC, tj. celkem 12 analýz.

5.4.2. Pozitivní izolační kontrola

Tato kontrola se neprovádí.

5.4.3. Negativní PCR kontrola

Jako vzorek je do PCR reakce přidána PCR ultra čistá voda v ekvivalentním množství. Jeden slepý vzorek musí být použit při každém qPCR experimentu.

5.4.4. Pozitivní PCR kontrola

Jako pozitivní kontrola slouží kvantifikační standardy (sériově naředěná DNA příslušných živočišných druhů). Musí být použita při každém qPCR experimentu.

5.5. Kalibrace měřicího prostředku před zkouškou

Kalibrace LightCycler přístroje je zajištěna vnitřním testem, který je součástí dodaného softwarového vybavení.

5.6. Provedení zkoušky

5.6.1. Příprava amplifikační směsi pro PCR

V prvním kroku připravit 4 různé mixy (detailně popsáno v tabulkách níže) obsahující všechny primery i sondy pro detekci výše uvedených živočišných druhů a primery, sondu i plasmidy pro IAC. Namíchat mixy pro více běhů, vytvořit alikvoty a skladovat při cca -20 °C ± 4 °C po dobu nejdéle 6 měsíců. Alikvoty mixu lze opakovaně zamrazovat a rozmrazovat.

Tabulka 1: Sestavení mixů

Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix4
Kur domácí (ATTO425)	Buvol domácí (ATTO425)	Pštros dvouprstý (ATTO425)	Zajíc polní (ATTO425)
Tur domácí (FAM)	Králík domácí (FAM)	Krůta domácí (FAM)	Osel domácí (FAM)
Prase domácí (HEX)	Ovce domácí (HEX)	Husa domácí (HEX)	Krokodýl (HEX)
IAC (CY5)	Koza domácí (ROX)	Křepelka japonská (ROX)	Klokan (ROX)
	Kůň domácí (CY5)	Kachna domácí (CY5)	Perlička (CY5)

Tabulka 2: Příprava mixu 1

Složka	Výsledné množství na 1 reakci	Množství na 1000 µl mixu (na 1 reakci přijde 1µl mixu)
PCR voda		848 µl
Primer RT_F17 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R16 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P14 (100 µM)	0,2 pmol	2 µl
Primer RT_F29 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R29 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P29 (100 µM)	1 pmol	10 µl

Primer RT_F3 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R3 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P3 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer IAC nep/F57 F (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer IAC nep/F57 R (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda IAC F57 P (100 µM)	4 pmol	40 µl
IAC (10 ⁷)	10 ⁵ kopií	10 µl

Tabulka 3: Příprava mixu 2

Složka	Výsledné množství na 1 reakci	Množství na 1000 µl mixu (na 1 reakci přijde 1µl mixu)
PCR voda		648 µl
Primer RT_F41 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R41 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P41 (100 µM)	0,2 pmol	2 µl
Primer RT_F74 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R74 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P74 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F62 (100 µM)	10 pmol	100 µl
Primer RT_R62 (100 µM)	10 pmol	100 µl
Sonda RT_P62 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F84 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R84 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P84 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F32 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R32 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P32 (100 µM)	4 pmol	40 µl

Tabulka 4: Příprava mixu 3

Složka	Výsledné množství na 1 reakci	Množství na 1000 µl mixu (na 1 reakci přijde 1µl mixu)
PCR voda		828 µl
Primer RT_F34 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R34 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P34 (100 µM)	0,2 pmol	2 µl
Primer RT_F50 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R50 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P50 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F21 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R21 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P21 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F35 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R35 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P35 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F26 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R26 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P26 (100 µM)	4 pmol	40 µl

Tabulka 5: Příprava mixu 4

Složka	Výsledné množství na 1 reakci	Množství na 1000 µl mixu (na 1 reakci přijde 1µl mixu)
PCR voda		828 µl
Primer RT_F68 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R68 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P68 (100 µM)	0,2 pmol	2 µl
Primer RT_F76 (100 µM)	1 pmol	10 µl

Primer RT_R76 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P76 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F75 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R75 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P75 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F67 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R67 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P67 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_F80 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Primer RT_R80 (100 µM)	1 pmol	10 µl
Sonda RT_P80 (100 µM)	4 pmol	40 µl

Bezprostředně před vlastní analýzou připravit premix 1–4 obsahující příslušný mix 1–4, UNG a probes master, přesné složení viz Tabulka 6.

Tabulka 6: Příprava premixu

Složka	Množství na 1 reakci (20 µl)	Množství na 100 reakcí
PCR voda	3,8 µl	380 µl
Příslušný mix (viz tab.výše)	1 µl	100 µl
UNG (Roche)	0,2 µl	20 µl
LightCycler® 480 Probes Master (2x conc.)	10 µl	1000 µl
Celkem	15 µl	1500 µl

5.6.2. Provedení qPCR experimentu na LC 480

Připravený premix rozpipetovat po 15 µl do jednotlivých jamek na 96 jamkovou destičku (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, bílá). V každém qPCR experimentu musí být obsaženy: kvantifikační standardy (sériově naředěná DNA příslušných živočišných druhů) o koncentraci 10 ng/µl; 5 ng/µl; 1 ng/µl; 0,5 ng/µl; 0,1 ng/µl; 0,05 ng/µl; 0,01 ng/µl, pipetovat vždy 5 µl. Následně do zbylých jamek pipetovat 5 µl testované DNA (o koncentraci 5–20 ng/ul). Každý izolovaný vzorek DNA je analyzován qPCR systémem v duplikátu.

Vzorky pipetovat na 96-jamkovou destičku v pořadí (1) kvantifikační standardy; (2) negativní kontrola; (3) analyzované vzorky a NIC. Na jednu 96-jamkovou destičku je možno pipetovat 1 – 4 izolační běhy společně s kvantifikačním gradientem (Tabulka 7).

Vzorky označené S10 – S0,01 představují kvantifikační standardy (naředěná DNA příslušných živočišných druhů). K-neg označuje negativní kontrolu. Vzorky označené jako vz. 1 – 40 představují analyzované vzorky; označení repl. značí duplikát analyzovaného vzorku. Vzorky označené jako NIC1 – NIC4 představují negativní izolační kontrolu. Všechny multiplexní qPCR jsou optimalizovány na jednotný qPCR protokol, takže malé množství vzorků je možné analyzovat na přítomnost více druhů v rámci jednoho experimentu.

Tabulka 7: Příklad uspořádání qPCR destičky

	B1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S10	vz.1	repl.A2	vz.9	repl.A4	vz.17	repl.A6	vz.25	repl.A8	vz.33	repl.A10	NIC1
B	S5	vz.2	repl.B2	vz.10	repl.B4	vz.18	repl.B6	vz.26	repl.B8	vz.34	repl.B10	NIC2
C	S1	vz.3	repl.C2	vz.11	repl.C4	vz.19	repl.C6	vz.27	repl.C8	vz.35	repl.C10	NIC3
D	S0,5	vz.4	repl.D2	vz.12	repl.D4	vz.20	repl.D6	vz.28	repl.D8	vz.36	repl.D10	NIC4
E	S0,1	vz.5	repl.E2	vz.13	repl.E4	vz.21	repl.E6	vz.29	repl.E8	vz.37	repl.E10	repl.A12
F	S0,05	vz.6	repl.F2	vz.14	repl.F4	vz.22	repl.F6	vz.30	repl.F8	vz.38	repl.F10	repl.B12
G	S0,01	vz.7	repl.G2	vz.15	repl.G4	vz.23	repl.G6	vz.31	repl.G8	vz.39	repl.G10	repl.C12
H	K-neg	vz.8	repl.H2	vz.16	repl.H4	vz.24	repl.H6	vz.32	repl.H8	vz.40	repl.H10	repl.D12

Destičku přelepit krycí fólií a centrifugovat 2.000 g po dobu 2 min. Centrifugovanou 96-jamkovou destičku vložit do přístroje LC 480 a spustit program (Tabulka 8).

Tabulka 8: Nastavení teploty, času a počtu opakování u jednotlivých cyklů

			Ramp Rate	Aquisition mode
Úvodní denaturace		95 °C/7 min	4,4 °C/s	
Denaturace	47 cyklů	95° C/5 s	4,4 °C/s	
Annealing a Extenze		60° C/40 s	2,2 °C/s	Single
Chlazení		40° C/30 s	2,2 °C/s	

Tabulka 9 a 10: Nastavení excitačních a emisních filtrů (pro měření fluorescence u jednotlivých reportérů) v přístroji LightCycler® 480

E x c i t a t i o n	E m i s s i o n						
		488	510	580	610	640	660
	440	×					
	465		×				
	498						
	533			×	×		
	618						×

Selected Filter Combination List					
Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integratic Time (sec.)
440	488	ATTO425	1	10	2
465	510	FAM	1	10	2
533	580	HEX	1	10	2
533	610	ROX	1	10	2
618	660	CY5	1	10	2

Hodnocení experimentů probíhá v prostředí softwaru LightCycler (version LCS480 1.2.0.169) pomocí druhého derivačního maxima (pro IAC, kanál Cy5) a „Fit point“ analýzy (pro detekci živočišných druhů). Přepočet relativního množství ng DNA provádět vždy podle kvantifikačního gradientu DNA v daném experimentu.

5.7. Výpočet a vyjádření výsledků

Před zhodnocením výsledků je nutné nejprve provést tzv. „color kompenzaci“ pro příslušné kanály.

Hodnocení výsledků dále probíhá ve dvou po sobě následujících krocích:

5.7.1. Kvalitativní hodnocení

Hodnocení se provádí podle následující tabulky a je platné pouze pro LC 480:

Tabulka 11: Postup při kvalitativním vyhodnocení

Fluorescence cílových genů	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
<i>Pozitivní</i>	<i>Pozitivní</i>	<i>Vzorek je pozitivní</i>
<i>Pozitivní</i>	Negativní	<i>Vzorek je pozitivní</i>
Negativní	<i>Pozitivní</i>	Vzorek je negativní
Negativní	Negativní	Vzorek je inhibován

Pokud je vzorek inhibován, je nutné buď zopakovat qPCR experiment s naředěnou izolovanou DNA, nebo izolaci DNA ze zásobního duplikátu.

5.7.2 Kvantitativní hodnocení

Určení množství dané DNA ve vzorcích probíhá v softwaru LightCycler (version LCS480 1.2.0.169) na základě odečtu C_q hodnoty a následného výpočtu koncentrace podle kalibrační křivky tvořené gradientem DNA daného druhu se známou koncentrací.

6 Validace

V četnosti minimálně 1× za rok provést mezilaboratorní test.

6.1 Specifita

V případě qPCR systému nebyla nalezena žádná křížová reakce s jinými druhy hospodářských, domácích a volně žijících zvířat. Seznam druhů pro ověření specifity testu je znázorněn v Tabulce 12. Použití hydrolyzačních sond jako druhého specifického oligonukleotidu nevyžaduje dodatečné potvrzení identity PCR produktu nezávislou metodou (např. sekvenování, Southern blot apod).

Tabulka 12: Výpis živočišných druhů, na kterých byla testována specifita olig

1	Bažant obecný	21	Los evropský
2	Buvol indický	22	Losos obecný
3	Daněk skvrnitý	23	Medvěd
4	Holub domácí	24	Medvěd hnědý
5	Husa domácí	25	Muflon evropský
6	Jelen evropský, sika	26	Mýval severní
7	Kachna domácí, divoká	27	Orebice horská

8	Kapr obecný	28	Osel domácí
9	Klokan	29	Ovce domácí
10	Kočka domácí	30	Perlička domácí
11	Koroptev polní	31	Pes domácí
12	Koza domácí	32	Potkan obecný
13	Králík domácí	33	Prase domácí, divoké
14	Krocan domácí	34	Psík mývalovitý
15	Krokodýl	35	Pštros dvouprstý
16	Křepelka japonská	36	Sob polární
17	Kůň domácí, islandský	37	Srnec obecný
18	Kuna skalní, lesní	38	Tchoř tmavý
19	Kur domácí	39	Tur domácí
20	Liška obecná	40	Zajíc polní

Testy exkluzivity byly dále provedeny na DNA ze vzorků rostlinných druhů, které patří mezi časté komponenty v krmivech a zpracovaných potravinách živočišného původu. Pro izolaci DNA byla použita semena, listy, plody, hlízy, bulvy nebo pupeny. Seznam testovaných vzorků je uveden v Tabulce 13.

Tabulka 13: Výpis rostlinných vzorků, na kterých byla testována specifita olig

1	Anýz	27	Jalovec	53	Pomelo
2	Banán	28	Jedlý kaštan	54	Pomeranč
3	Bobkový list	29	Kiwi	55	Psyllium
4	Borůvka	30	Kmín	56	Rajče
5	Brambora	31	Kopřiva	57	Rajče cherry
6	Brusinka	32	Kurkuma	58	Rakytník
7	Celer	33	Lískový ořech	59	Rozmarýn
8	Cibule	34	Listový špenát	60	Ryngle, pupen
9	Citron	35	Lněné semínko	61	Rýže bílá
10	Cizrna	36	Majoránka	62	Saturejka
11	Čekanka	37	Maliny	63	Sezamové semínko
12	Černý rybíz, pupen	38	Mandarinka	64	Skořice mletá
13	Červená řepa	39	Máta peprná	65	Slunečnice semínko
14	Česnek	40	Mořské řasy	66	Sója
15	Čočka velkozrná	41	Mrkev	67	Spirulina

16	Dýně	42	Muškatový oříšek, mletý	68	Šalvěj
17	Fazole červená	43	Nové koření	69	Švestka, pupen
18	Fenykl	44	Oregano	70	Třešeň, pupen
19	Heřmánek	45	Ořešák, pupen	71	Tykev semínka
20	Hrách	46	Ostropestřec	72	Tymián
21	Hruška	47	Ostružina, plod	73	Vanilka, list
22	Hřebíček	48	Pampeliška	74	Višeň, pupen
23	Chia semínka	49	Paprika	75	Vlašský ořech
24	Chilli mleté	50	Pepř černý	76	Zázvor
25	Jablko	51	Petržel	77	Zelený čaj
26	Jahoda	52	Podzemnice olejná	78	Žlutý meloun

Opakovatelnost a určení LOD

Kur domácí			
naředěná DNA (ng/μl)	naměřená (ng/μl)		
	průměr	směrodatná odchylka	variační koeficient
10	11,3250	0,8258	7,2915
5	5,1425	0,3613	7,0266
1	0,7870	0,0679	8,6297
0,5	0,5283	0,0411	7,7746
0,1	0,0876	0,0111	12,6499
0,05	0,0634	0,0038	5,9254
0,01	0,0086	0,0008	9,2341
0,005	0,0057	0,0018	31,7177
0,001	0,0006	0,0003	52,9086

Tur domácí			
naředěná DNA (ng/μl)	naměřená (ng/μl)		
	průměr	směrodatná odchylka	variační koeficient
10	10,9000	0,6364	5,8385
5	4,8025	0,2130	4,4352
1	0,8853	0,0584	6,6020
0,5	0,5030	0,0234	4,6476
0,1	0,1028	0,0072	7,0219
0,05	0,0557	0,0073	13,1824
0,01	0,0095	0,0004	4,5662
0,005	0,0048	0,0014	29,8632
0,001	0,0004	0,0003	71,8935

Prase domácí	
	naměřená (ng/μl)

naředěná DNA (ng/μl)	průměr	směrodatná odchylka	variační koeficient
10	9,9825	0,3753	3,7592
5	4,7350	0,3012	6,3613
1	0,9568	0,0727	7,5975
0,5	0,5270	0,0495	9,3923
0,1	0,0989	0,0068	6,9031
0,05	0,0624	0,0090	14,3720
0,01	0,0086	0,0010	11,4440
0,005	0,0040	0,0037	93,1129
0,001	0,0030	0,0013	42,3807

Na základě testování opakovatelnosti a určení citlivosti (LOD) na 3 základních druzích (prase, tur a kur) byl stanoven LOD ve všech 3 případech na 0,01 ng/μl vstupního množství DNA.

Kritériem stanovení byla hodnota variačního koeficientu < 30%.

7. Operativní řízení jakosti

Je řešeno

- 1) kontrolou pomocí negativní izolační kontroly během izolace DNA (viz bod 5.4.1.),
- 2) pozitivní a negativní kontrolou během qPCR (viz body 5.4.3. a 5.4.4.),
- 3) duplicitní izolací DNA a nezávislou qPCR analýzou.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPU“

V současné době není k dispozici žádná legislativně závazná metoda pro detekci a identifikaci živočišných tkání v potravinách a krmivech. V laboratorní praxi se využívá jak proteinová analýza (imunologické, chromatografické a spektroskopické metody), tak metabolomické metody, jejichž použití je však limitováno u vícesložkových a technologicky opracovaných potravin. Metody založené na teplotně stabilní DNA představují vhodnou metodickou alternativu. Molekulárně-genetické metody jsou vysoce specifické, citlivé, rychlé, interpretačně přesné a v současné laboratorní praxi běžně ekonomicky dostupné. Nově navržené qPCR systémy, založené na detekci vybraných úseků genomové DNA jsou vysoce citlivé a lze jimi prokázat přítomnost tkání analyzovaných druhů již při koncentraci DNA 0,01 ng/μl jak ve vzorcích syrových tkání, tak u zpracovaných potravin a krmiv nebo jejich komponent. Významným novým přístupem popsaných qPCR systémů je fakt, že jsou založeny na amplifikaci fragmentů genomové DNA, které se vyskytují v buňce v jediné kopii. Většina dosavadních qPCR systémů pro detekci živočišné DNA je založena na amplifikaci mitochondriální a vzhledem k tomu, že počet kopií mitochondriálního genomu závisí na typu

buňky a tkáně, metody zaměřené na jednokopiové geny jsou vhodnější pro kvantifikaci než metody amplifikující fragmenty mitochondriálních genů. Předložená metodika představuje komplexní postup definovaný od odběru a přípravy vzorků, přes izolaci DNA po nové původní pentaplexní qPCR detekční systémy včetně popisu vyhodnocení a interpretace výsledků. Zároveň byly logicky navrženy tak, že první multiplex (tur, prase, kur a IAC) bude aplikován na každý vzorek. Touto analýzou budou ve vzorku identifikovány nejběžnější suroviny živočišného původu a díky IAC bude odhalena případná inhibice izolované DNA.

Vzhledem k tomu, že první multiplexní qPCR systémem bude prováděn vždy, neobsahují další qPCR systémy IAC. Metodika je plně využitelná pro účely kontroly přítomnosti živočišných tkání v potravinách a krmivech a dalších nepotravinářských produktech. Předložené multiplexní qPCR systémy pro detekci tkání vybraných živočišných druhů byly zavedeny s ohledem na jejich budoucí diagnostické uplatnění. Proto u ní byla provedena kompletní optimalizace, otestována specificita a citlivost, propracován systém kontrol, včetně interních amplifikačních kontrol a interpretace výsledků. Předložené qPCR systémy splňují všechny nároky kladené na diagnostické soupravy pro rutinní použití.

Multiplexní qPCR systémy jsou navrženy tak, aby jejich hlavní analytické parametry včetně limitu detekce, meze kvantifikace, robustnosti, opakovatelnosti a přesnosti byly srovnatelné se singlplexními reakcemi a zároveň aby dokázaly pracovat s mezí citlivosti nad tzv. technologickými kontaminacemi, což minimalizuje riziko falešně pozitivních výsledků. Díky možnosti souběžné detekce, identifikace a kvantifikace několika (až 5) zvolených živočišných druhů dochází k velmi výrazné časové úspoře při přípravě reakce a také k výraznému snížení finančních nákladů. Hlavní výhodou však zůstává přímá cílená detekce vybraných živočišných druhů, kdy je možné vhodným sestavením multiplexu zároveň detekovat přítomnost tkání nedeklarovaných živočišných druhů.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika je určena pro přímou detekci a identifikaci tkání 18 živočišných druhů. Vysoce citlivou metodu lze použít pro detekci a průkaz přítomnosti všech typů tkání, kterými jsou svalovina, tuk, chrupavky, vnitřnosti, krev a krevní deriváty, kůže a její deriváty, střeva, mezenterium, plazma, želatina a proteiny a to jak ve vzorcích nezpracovaných surovin, tak ve vzorcích potravin a krmiv, které byly technologicky zpracovány. Metodika je cílena také na ověřování složení a autenticity potravin a krmiv s definovanými náboženskými a etnickými požadavky, zejména na halal potraviny a krmiva. Uživatel využije výsledků certifikované

metodiky pro účely kontroly složení a ověřování autenticity potravin a krmiv a pro kontrolu produktů farmaceutického nebo kosmetického průmyslu.

Uživatelé metodiky bude Státní zemědělská a potravinářská inspekce, která využije výsledků certifikované metodiky pro rozšíření portfolia kontrolních diagnostických metod v rámci své působnosti jako státního kontrolního a dozorového orgánu. Uživatelé metodiky / výsledků budou případně další diagnostické laboratoře pro rozšíření portfolia preventivně diagnostických metod dostupných pro producenty, zpracovatele a distributory potravin a krmiv pro ověřování složení a správnosti označování.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Falšování potravin a krmiv živočišného původu patří k aktuálním a závažným problémům. Globalizace obchodu s potravinami a surovinami pro výrobu potravin spolu s prudce rostoucí kupní silou populace jsou v přímé souvislosti se zvyšujícím se počtem záměrně i nezáměrně falšovaných potravin. Různé statistické zdroje uvádějí procenta chybně nebo klamavě označených potravin živočišného původu na hranici 8 % – 15 % v zemích Evropské unie, 20 % v Turecku a 19 % v USA (Ali et al., 2014, Ballin et al., 2009, Ulca et al., 2013). V oblasti výroby, distribuce a konzumace masných výrobků se uplatňují regionální a etnické konvence a zvyklosti, jejichž nedodržení či překročení představuje nejen ekonomický, ale především osobní mentální a náboženský problém (judaismus, islám). Jedná se například o omezení konzumace krve, orgánů či dalších tkání hospodářských zvířat, anebo dále masa z šelem, psů, koní, volně žijících zvířat nebo i prasat. U produktů ze třetích zemí bylo záměrné falšování prokázáno např. u masných polotovarů, baleného děleného masa i masných výrobků z Číny, kdy byla deklarovaná jehněčí svalovina nahrazována svalovinou norků, lišek nebo krys (Beijing, 2013). V souvislosti s aktuální celosvětovou migrací obyvatel začínají země, pro které byly ještě před 10 lety halal potraviny okrajovou záležitostí, produkovat či obchodovat nebo importovat stále více těchto potravin, krmiv a ostatních produktů. Nárůst muslimské populace a potřeba zvýšené produkce halal potravin se odráží v objemu jejich produkce. V současnosti se roční obrát trhu s halal potravinami odhaduje na více než 1,6 bilionů dolarů a jejich podíl na světové produkci potravin bude v příštích letech nepochybně narůstat (Lubis et al., 2016; Sow et al., 2017). Nejvíce halal potravin se vyrábí v Saudské Arábii, Malajsii, Spojených Arabských Emirátech, Indonésii a Egyptě, jejichž produkce představuje asi 42 % z celkové výroby halal potravin. Mezi zeměmi EU největší podíl produkce halal potravin připadá na Francii, ale vzhledem k migrační vlně se bude množství těchto potravin zvyšovat i v jiných zemích EU (Benzertih et al., 2018).

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře spočívají především v pořízení spotřebního materiálu, souprav na izolaci DNA a chemikálií na provedení qPCR. Náklady na přístroje a nástroje, jako jsou pipety, centrifugy, vortexy, váhy, termobloky, thermocycler a mechanický homogénizátor, nejsou započítány, neboť jsou předpokládaným vybavením laboratoře využívající metodiku.

Náklady na vyšetření jednoho vzorku a vybavení specializované laboratoře jsou uvedeny v následujících tabulkách. Všechny ceny jsou aktuální k datu vydání metodiky a zahrnují DPH.

Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku jedním multiplexem uvedené metodiky. Kalkulace zahrnuje i průměrné náklady na pozitivní a negativní kontroly.

Položka	Obvyklá cena
Izolace DNA (cena izolační soupravy, zkumavky)	200 Kč
qPCR (enzymy, všechny sady primerů a sond)	70 Kč
Spotřební materiál (špičky s filtrem, zkumavky, rukavice a desinfekce)	100 Kč
Celkem	370 Kč

Komplexní analýza jednoho vzorku všemi 4 multiplexními systémy stojí jen materiálových nákladech 570 Kč. Lidská práce, odpisy a režijní náklady nejsou zahrnuty, protože jejich výše je závislá na dané instituci provádějící analýzu.

Ekonomický přínos pro uživatele:

Problematika kvality a bezpečnosti potravin patří mezi vysoce aktuální témata řešená jak na úrovni Evropské unie, tak celosvětově. Mezi základní řídicí dokumenty České republiky v této oblasti patří v současné době Strategie bezpečnosti potravin a výživy 2014 – 2020, kde jako jedno z hlavních východisek pro stanovení priorit dokument uvádí v negativních trendech rozvoj klamání spotřebitele a falšování potravin, zejména pak narůstající trend chybného označování potravin s cílem zatajit přítomnost určité složky v potravině. Za hlavní příčinu je považován stále sílící tlak na cenu potravin a také vysokou poptávku veřejnosti po levných potravinách. Mezi základní priority pro období 2014-2020 patří aktivní boj proti klamání spotřebitele v oblasti označování a falšování potravin. Podobně Ministerstvo průmyslu a obchodu (MPO) vytvořilo strategický dokument „Priority spotřebitelské politiky 2015 – 2020“,

ve kterém se zaměřuje především na ochranu zájmu spotřebitelů a boj proti nekalým obchodním praktikám jak u potravin, tak u nepotravinářských výrobků.

Tyto strategické dokumenty dokládají, nezbytnost vývoje nových, robustních, vysoce citlivých metod a jejich rychlé uvádění do laboratorní praxe pro kontrolu kvality a deklarovaného složení potravin, krmiv a případně nepotravinářských výrobků vycházejících ze stejné surovinové základny.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ali ME, Razzak MA, Hamid SBA 2014: Multiplex PCR in Species Authentication: Probability and Prospects - A Review. Food Analytical Methods, 7: 1933–1949.

Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH 2009: Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration?. Meat science, 83: 165-174.

Bejing AP 2013: Rat meat sold as lamb in latest China food scandal.

Benzertiha A, Kierończyk B, Rawski M, Józefiak A, Mazurkiewicz J, Józefiak D, Messikh MS, Świątkiewicz S 2018: Cultural and practical aspects of halal slaughtering in food production. Med Weter, 74: 371–376.

Ceranic S, Bozinovic N 2009: Possibilities and significance of HAS implementation (halal assurance system) in existing quality system in food industry. Biotechnol Anim Husb, 25: 261–266.

Choi R, Park HD, Kang B, Choi SY, Ki CS, Lee SY, Kim JW, Song J, Choe YH 2016: PHKA2 mutation spectrum in Korean patients with glycogen storage disease type IX: prevalence of deletion mutations. BMC medical genetics, 17: 33.

Giridharan SS, Cai B, Vitale N, Naslavsky N, Caplan S 2013: Cooperation of MICAL-L1, syndapin2, and phosphatidic acid in tubular recycling endosome biogenesis. Molecular biology of the cell, 24: 1776–1790.

Hackett C, Connor P, Stonawski M, Skirbekk V, Potančoková M, Abel G 2015: The future of world religions: Population growth projections, 2010-2050. Pew Research Center, Washington, DC, 245 p.

Hirabayashi S, Saitsu H, Matsumoto N 2016: Distinct but milder phenotypes with choreiform movements in siblings with compound heterozygous mutations in the transcription preinitiation mediator complex subunit 17 (MED17). Brain and Development, 38: 118–123.

Illson ML, Dempsey-Nunez L, Kent J, Huang Q, Brebner A, Raff ML, Watkins D, Gilfix BM, Wittwer CT, Rosenblatt DS 2013: High resolution melting analysis of the MMAB gene in cblB

patients and in those with undiagnosed methylmalonic aciduria. *Molecular genetics and metabolism*, 11: 86–89.

Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R 2009: Congenital prothrombin deficiency: an update. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 39:596–606.

Lawson HA, Zayed M, Wayhart JP, Fabbrini E, Love-Gregory L, Klein S, Semenkovich CF 2017: Physiologic and genetic evidence links hemopexin to triglycerides in mice and humans. *International Journal of Obesity*, 41: 631.

Lubis HN, Mohd-Naim NF, Alizul NN, Ahmed MU 2016: From market to food plate: Current trusted technology and innovations in halal food analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 58: 55–68.

Rychlik, W 2007: OLIGO 7 primer analysis software. *Methods in molecular biology*, 402: 35–60.

Sow LC., Peh, Y. R., Pekerti, B. N., Fu, C., Bansal, N., & Yang, H. (2017). Nanostructural analysis and textural modification of tilapia fish gelatin affected by gellan and calcium chloride addition. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 137-145.

Soubeyrand S, Martinuk A, McPherson R 2017: TRIB1 is a positive regulator of hepatocyte nuclear factor 4-alpha. *Scientific Reports*, 7: 5574.

Świtnicki MP, Juul M, Madsen T, Sørensen KD, Pedersen JS 2016: PINCAGE: probabilistic integration of cancer genomics data for perturbed gene identification and sample classification. *Bioinformatics*, 32: 1353–1365.

Ulca P, Balta H, Çağın I, Senyuva HZ 2013: Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat science*, 94: 280–284.

Verras M, Theodoraki MA, Mintzas AC 2004: Cloning, characterization, and developmental expression of the ribosomal protein S21 gene of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 56:133–142.

Vitali T, Maffioli E, Tedeschi G, Vanoni MA 2016: Properties and catalytic activities of MICAL1, the flavoenzyme involved in cytoskeleton dynamics, and modulation by its CH, LIM and C-terminal domains. *Archives of biochemistry and biophysics*, 593: 24–37.

Zhang F, Liu C, Xu Y, Qi G, Yuan G, Cheng Z, Wang J, Wang G, Wang Z, Zhu W, Zhou Z, Zhao X, Tian L, Jin C, Yuan J, Zhang G, Chen Y, Wang L, Lu T, Yan H, Ruan Y, Yue W,

Zhang D 2014: A two-stage association study suggests BRAP as a susceptibility gene for schizophrenia. PloS one, 9: e86037.

Zhang W, Tong D, Liu F, Li D, Li J, Cheng X, Wang Z 2016: RPS7 inhibits colorectal cancer growth via decreasing HIF-1 α -mediated glycolysis. Oncotarget, 7: 5800.

Zhou X, Hao Q, Liao JM, Liao P, Lu H 2013: Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity. Journal of Biological Chemistry, 288: 21793–21801.

VII. SEZNAM PREZENTACÍ VÝSLEDKŮ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Borilova G, Petrakova M, Kralik P 2017: qPCR Method for Detection of Halal Food Adulteration. Conference Proceedings, ICAFRd 2017: 19th International Conference on Adulterated Food and Rapid Detection, Barcelona, 19 (10) Part XXI.

Bořilová G, Nesvadbová M, Králík P, Petráková M 2018: Vývoj nových metod qPCR pro ověření kvality a autenticity potravin a krmiv. Sborník abstraktů Hygiena a technologie potravin, XLVIII. Lenfeldovy a Höklovy dny, Brno, s. 29.

Bořilová G, Nesvadbová M, Petráková M, Králík P 2018: Hodnocení autenticity potravin a krmiv pomocí molekulárních metod. Sborník souhrnů sdělení ze XLVIII. Symposia o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, s. 25.

Petrakova M, Nesvadbova M, Kralik P, Borilova G 2018: Identification of animal species and their detection in food and feed by multiplex real-time PCR. International Symposium Food Fraud Prevention and Effective Food Allergen Management, Vienna. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods 10: Supplement 1, S18.

Servusová E, Piskatá Z, Reslová N, Králík P 2018: Identifikace živočišných druhů v potravinách a krmivech pomocí metody MOL-PCR. Sborník abstraktů Hygiena a technologie potravin, XLVIII. Lenfeldovy a Höklovy dny, Brno, s. 79.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz