

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 32 249

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35331**  
(22) Přihlášeno: **08.09.2018**  
(47) Zapsáno: **29.10.2018**

- (73) Majitel:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,  
Brno, Medlánky, CZ
- (72) Původce:  
doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., Velešovice, CZ  
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D., Velešovice, CZ  
MVDr. Jitka Matiašovicová, Ph.D., Hostěnice, CZ  
Mgr. Bc. Darina Čejková, Ph.D., Brno, Židenice,  
CZ  
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D., Janová, CZ  
Mgr. Miroslava Kollarčíková, Kuřim, CZ  
Ing. Daniela Karasová, Ph.D., Brno, Žabovřesky,  
CZ  
Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D., Brno, Stránice,  
CZ
- (74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Na bělidle 64/3, 150 00 Praha 5,  
Smíchov

- (54) Název užitného vzoru:  
**Sada primerů pro detekci Megasphaera  
elsdenii pomocí metody PCR v reálném čase**

CZ 32249 U1

## Sada primerů pro detekci *Megasphaera elsdenii* pomocí metody PCR v reálném čase

### Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení poskytuje sadu primerů pro specifické detekce a kvantifikace *Megasphaera elsdenii* (*M. elsdenii*) v trusu nebo v obsahu tráveniny kuřat a slepic (drůbeže) pomocí metody PCR v reálném čase (real time PCR).

10

### Dosavadní stav techniky

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

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

*M. elsdenii* je běžnou součástí střevní mikroflóry všech teplokrevných živočichů, tedy ptáků a savců, u kterých tvoří okolo 0,5 % z celkové mikroflóry. U kuřat v komerční produkci se v trávicím traktu objevuje od 10. týdne života (Videnska P, Sedlar K, Lukac M, Faldynova M, Gerzova L, Cejkova D, Sisak F, Rychlik I. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. PLoS One 2014;9:e115142). *M. elsdenii* patří mezi významné producenty butyrátu (Polansky O, Sekelova Z, Faldynova M, Sebkova A, Sisak F, Rychlik I. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. Appl Environ Microbiol 2015;82:1569-76). Produkce butyrátu má přitom pozitivní vliv na funkci trávicího traktu, protože potlačuje virulenci patogenů jako např. *Salmonella* Enteritidis (Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel F. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. Appl Environ Microbiol 2006;72:946-9). Butyrát je současně preferovaný zdroj energie epiteliálních buněk v trávicím traktu (Fleming SE, Fitch MD,

DeVries S, Liu ML, Kight C. Nutrient utilization by cells isolated from rat jejunum, cecum and colon. J Nutr 1991;121:869-878) a posiluje integritu střevního epitelu (Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, Glover LE, Kominsky DJ, Magnuson A, Weir TL, Ehrentraut SF, Pickel C, Kuhn KA, Lanis JM, Nguyen V, Taylor CT, Colgan SP. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. Cell Host Microbe. 2015;17:662-671). *M. elsdenii* navíc může účinně kolonizovat trávicí trakt drůbeže od prvních dnů života kuřat a lze o ní uvažovat jako o bakterii s probiotickým potenciálem (dosud nepublikované výsledky). Všechny tyto skutečnosti znamenají, že přítomnost *M. elsdenii* je pozitivním znakem zdravotního stavu, a naopak úbytek nebo absence je indikátorem nežádoucího složení střevní mikroflóry a nesprávné funkce trávicího traktu.

Podmínky pro selektivní kultivaci *M. elsdenii* nejsou známy. *M. elsdenii* sice lze kultivovat na WCHA nebo YCFA agaroch za striktně anaerobních podmínek, avšak tyto agary podporují růst i mnoha dalších anaerobních bakterií. Po výsevu tráveniny nebo trusu na uvedené kultivační půdy pak narostou kolonie tvořené *M. elsdenii* současně se stovkami kolonií dalších necílových bakterií. Použití vzorku trusu jako výchozího materiálu dále zhoršuje pravděpodobnost kultivačního záchytu *M. elsdenii*, protože jakákoli expozice trusu velmi rychle vede k inaktivaci *M. elsdenii* vzdušným kyslíkem. Kultivační kvantifikace *M. elsdenii* proto není možná, a to i přesto, že tuto bakterii lze považovat za příznak dobrého zdravotního stavu a funkčního trávicího systému.

#### Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je sada primerů pro metodu PCR v reálném čase (real time PCR) obsahující primery Megasph\_F3: ACGTCAACGAAGCCGAATACA (SEQ ID NO. 1), Megasph\_R3: CGACGACCATGAACTGAATG (SEQ ID NO. 2), které specificky detekují *M. elsdenii* ve vzorcích.

Ve výhodném provedení může sada primerů dále obsahovat primery 16S\_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S\_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikující část genu pro 16S rRNA u všech eubakterií, tato sada je vhodná pro kvantitativní stanovení *M. elsdenii* ve vzorcích.

Sady primerů podle tohoto technického řešení jsou vhodné pro použití při způsobu detekce bakterie *Megasphaera elsdenii* v obsahu trávicího traktu a trusu drůbeže, při němž se ze vzorku izoluje DNA, a následně se izolovaná DNA podrobí amplifikační reakci metodou real time PCR s primery Megasph\_F3: ACGTCAACGAAGCCGAATACA (SEQ ID NO. 1), Megasph\_R3: CGACGACCATGAACTGAATG (SEQ ID NO. 2).

Uvedené primery zajišťují amplifikaci PCR produktu, kterým je 135 bp dlouhá část genu pro glukarátový transportér (glucarate transporter). Tato sekvence je specifická pro *M. elsdenii* a nedochází ke křížovým reakcím s dalšími mikroorganismy přítomnými v kuřecím trusu či trávenině. Bylo experimentálně ověřeno, že uvedené primery jeví nejvyšší specifitu pro stanovení *M. elsdenii* z testovaných dvojic primerů.

Při požadavku na kvantitativní stanovení *M. elsdenii* ve vzorku lze dále provést amplifikační reakci s primery 16S\_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO. 3) a 16S\_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT (SEQ ID NO. 4) amplifikujícími část genu pro 16S rRNA u všech eubakterií. Amplifikace eubakteriální DNA se využije při kvantifikaci *M. elsdenii*, kdy se vypočte poměr amplifikačního produktu specifického pro *M. elsdenii* vůči amplifikačnímu produktu pro všechny eubakterie.

Poměr amplifikačního produktu specifického pro *M. elsdenii* se vypočte s výhodou tak, že se

nejprve odečte Ct hodnota amplifikace *M. elsdenii* (Megasph\_F3 a R3) od Ct hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (16S\_F1 a R1) čímž se získá rozdíl mezi hodnotami Ct ( $\Delta Ct$ ). Následně se na tento rozdíl umocní základ 2 ( $2^{\Delta Ct}$ ), vypočte se převrácená hodnota ( $1/2^{\Delta Ct}$ ) a výsledek se vynásobí číslem 100 ( $100 \times 1/2^{\Delta Ct}$ ), čímž se získá podíl *M. elsdenii* v celé eubakteriální populaci v procentech.

Před návrhem specifických primerů byly postupně izolovány anaerobní bakterie z trávicího traktu drůbeže a u 327 z nich byly stanoveny kompletní sekvence genomu. U všech bakterií byly předpovězeny všechny geny, které kódují proteiny. Protože se v mnoha případech podařilo získat více než jednoho zástupce daného bakteriálního druhu, bylo možno porovnat, které geny se vyskytují u všech izolátů cílového druhu a současně zcela chybí u všech necílových druhů. V případě *M. elsdenii* jsme identifikovali 32 genů, které se vyskytly pouze u obou izolátů *M. elsdenii*, které jsme sekvenovali, a naopak zcela chyběly u zbylých 325 bakterií. Z těchto genů byly vybrány tři geny k dalšímu testování. Při selekci tří genů bylo zohledněno, aby i) délka genů byla větší než 500 bp ii) se cílové geny vyskytovaly na co nejdelších kontizích (contig) po sekvenování, iii) se cílové geny vyskytovaly uprostřed kontigů a ne na jejich koncích a iv) aby název genu snižoval pravděpodobnost jejich výskytu na mobilních genetických elementech (byly vyloučeny geny s názvy transposase, integrase, phage, conjugative apod), které se mohou vyskytovat v nejednoznačném počtu kopií na genom. Funkčnost navržených primerů byla ověřena na testovacích vzorcích a ze tří navržených dvojic primerů byla určena ta dvojice primerů, která na testovacích vzorcích opakovaně vykazovala nejnižší hodnoty Ct po analýze pomocí real time PCR. Funkčnost vybrané sady primerů byla následně ověřena na reálných vzorcích trusu kuřat, u kterých bylo zastoupení *M. elsdenii* stanoveno jak pomocí real time PCR s primery podle předkládaného technického řešení, tak i sekvenováním V3 a V4 variabilních oblastí genů pro 16S rRNA. Výstupy obou metod si odpovídají, což znamená, že stejně kvalitního výsledku lze dosáhnout náročnějším sekvenováním i jednodušší a praktičtější metodou real time PCR, použijí-li se pro real time PCR primery podle předkládaného technického řešení, tak i sekvenováním V3 a V4 variabilních oblastí genů pro 16S rRNA. Výstupy obou metod si odpovídají, to znamená, že stejně kvalitního výsledku lze dosáhnout náročnějším sekvenováním i jednodušší a praktičtější metodou real time PCR, použijí-li se pro real time PCR primery podle tohoto technického řešení.

### Objasnění výkresů

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

### Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Návrh primerů pro specifickou detekci *M. elsdenii*

Cílový gen pro glukarátový transportér (glucarate transporter) se vyskytoval u obou izolátů *M. elsdenii*, u kterých byla stanovena kompletní sekvence jejich genomu. Tento gen se však nevyskytoval u žádné další bakterie. V cílovém genu byla i mezi porovnanými izoláty pozorována určitá variabilita, a proto byly primery navrženy do oblastí, která byla u obou izolátů identická. Níže jsou zde uvedeny části z celé sekvence genu pro glukarátový transportér pro oba izoláty, a to části, která je rozhodující pro návrh primerů. Oblasti odpovídající primerům podle technického řešení jsou podtrženy (forward primer – jednoduché podtržení, reverse primer – dvojité podtržení).

Izolát An286 (SEQ ID NO. 5)

```

CCCGTCGTCGGCCCGCCATTACGGTCGCCCTCATGGCCGCCATGGGCTGGCATGCCGTA      540
TTCATCATCTTCGGCCTCGTCGGCATCGTCTGGCCTGGGTATGGCACAATAACGCCAC        600
GATAACCCGGCTCACAGCCCCTACGTCAACGAAGCCGAATACGCTCATATCACCGAAGGC      660
CGCGCCGCTGCCAGTGAAAAGAAAAGCGTCGCCCCGTGGAGCAAATTCCTCCGCTCGTCC      720
CAGTTCTGGGCCGTCGGCCATTCAGTTCATGGTCGTCGACTACATCATGTACGTCTTCCTG      780
GCCTGGCTGCCCCCTGTACCTGACCGAAGTGACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATGGGCATC    840
TGGGCTTCTTTCCCGTGGATCGCCCTCATGGCCATGGTCTTCGTCGCCGGTTATATTTCC    900

```

Izolát An771 (SEQ ID NO. 6)

```

CCCGTCGTCGGCCCGCCATTACGGTCGCCCTCATGGCCGCCATGGGCTGGCATGCCGTA      540
TTCATCATCTTCGGCCTCGTCGGCATCGTCTGGCCTGGGTATGGCACAATAACGCCAC        600
GATAACCCGGCTCACAGCCCCTACGTCAACGAAGCCGAATACGCTCATATCACCGAAGGC      660
CGCGCCGCTGCCAGTGAAAAGAAAAGCGTCGCCCCGTGGAGCAAATTCCTCCGCTCGTCC      720
CAGTTCTGGGCCGTCGGCCATTCAGTTCATGGTCGTCGACTACATCATGTACGTCTTCCTG      780
GCCTGGCTGCCCCCTGTACCTGACCGAAGTGACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATGGGCATC    840
TGGGCTTCTTTCCCGTGGATCGCCCTCATGGCCATGGTCTTCGTCGCCGGCTATATTTCT    900

```

5 Příklad 2:

V následujícím příkladu byla izolována DNA z trusu kuřat pomocí QIAmp DNA Stool kitu (Qiagen, Německo). Získaná DNA byla využita jako templát v PCR se třemi různými dvojicemi primerů pro průkaz a kvantifikaci *M. elsdenii*.

10

Vzorek	16S rRNA	Megasph1	Megasph2	Megasph3
čistá kultura 1	11,56	17,50	17,47	17,48
čistá kultura 2	12,08	17,35	16,75	17,05
kuře 1	12,06	17,0	16,1	16,5
kuře 2	11,60	ND	ND	ND
kuře 3	11,67	27,98	ND	ND
kuře 4	11,99	ND	ND	32,66
kuře 5	16,62	ND	ND	ND
kuře 6	17,3	ND	ND	32,78
kuře 7	17,59	30,07	29,19	29,69
průměrné Ct	13,60889	17,29	16,78	17,01

Legenda k tabulce:

15 16S rRNA – cílové byly geny pro eubakteriální 16S rRNA, použité primery 16S\_F1, 16S\_R1.

Megasph1 – cílový gen byl hemin ABC transportér, permeáza (hemin ABC transporter, permease protein), použity byly primery cílené na tento gen

20 Megasph2 – cílový gen byl methionin gama-lyáza (methionine  $\gamma$ -lyasa), použity byly primery cílené na tento gen

Megasph3 – cílový gen byl glukarátový transportér (glucarate transporter), použité primery: Megasph\_F3, Megasph\_R3.

25

ND - nedetekováno

Ze tří testovaných dvojic primerů byla nejnižší hodnota Ct dosahována u primerů amplifikujících část genu pro methionin gama-lyázu (methionine  $\gamma$ -lyase). U genu pro glukarátový transportér

byla Ct hodnota o 0,2 cykly vyšší než při amplifikaci části genu pro methionin gama-lyázu. V mezidobí však byl izolován a sekvenován další nezávislý izolát *M. elsdenii* An771. Porovnáním sekvencí primerů a celogenomových sekvencí *M. elsdenii* An286 a An771 bylo zjištěno, že dostupné kmeny se odlišují v sekvencích genu pro methionin gama-lyázu v místě návrhu reverse primeru. Naopak, sekvence genů pro glukarátový transportér v místě návrhu forward i reverse primerů byly u obou kmenů identické. Proto byly jako *M. elsdenii* specifické primery identifikovány primery cílené na gen pro glukarátový transportér.

#### 10 Experimentální schéma

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

Real time PCR ve formátu „SybrGreen“ byla provedena s využitím SybrGreen Master Mix (Qiagen, Německo). Amplifikační podmínky se sestávaly z 35 cyklů s následnou denaturační analýzou pro potvrzení identity vzniklého amplifikačního produktu. Každý cyklus se sestával z 30 s inkubace při 55 °C, 30 s inkubace při 72 °C a 30 s inkubace při 94 °C. Po každém cyklu se stanovila fluorescence ve vzorku a překročení prahové hodnoty fluorescence po určitém cyklu bylo vyjádřeno hodnotou Ct (threshold cycle). Na PCR bezprostředně navazovala denaturační analýza, při které se vzniklé amplifikační produkty vytemperovaly na 45 °C a v jednotlivých intervalech se postupně zahřívaly až na 95 °C. Při určité teplotě (teplota  $T_m$ , temperature of melting) došlo k rozpadu dvoušroubovicových molekul PCR produktů na jednovláknové molekuly DNA, který byl spojen s uvolněním barvičky SybrGreen z DNA a poklesem fluorescence. Protože teplota rozpadu dvoušroubovice na jednořetězcová vlákna je ovlivněna sekvencí, z teploty  $T_m$  lze usuzovat na identitu vzniklého PCR produktu. Real time PCR byla prováděna s primery specifickými pro *M. elsdenii* (Megasph\_F3, Megasph\_R3) a současně s primery 16S\_F1 TCCTACGGGAGGCAGCAG a 16S\_R1 CGTATTACCGCGGCTGCT amplifikujícími část genu pro 16S rRNA všech eubaktérií. Amplifikace eubakteriální DNA byla využita pouze pro kvantifikaci *M. elsdenii*.

#### Výsledky

Ze tří testovaných dvojic primerů amplifikujících částí tří zcela odlišných genů byly jako *M. elsdenii* specifické primery vyhodnoceny primery vedoucí k amplifikaci části genu pro glukarátový transportér. Tato dvojice primerů je považována za nejvhodnější pro průkaz a kvantifikaci *M. elsdenii*. Teplota tání  $T_m$  výsledného PCR produktu byla 84,77 °C. Následně jsme kvantifikovali *M. elsdenii* pomocí real time PCR a současně i sekvenováním V3/V4 části genu pro 16S rRNA v reálných vzorcích. Porovnání zastoupení *M. elsdenii* v testovaných vzorcích stanovené oběma metodami jsme provedli výpočtem korelačních a regresních koeficientů. Korelační koeficient 0,818 i regresní hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,6539$  (viz Obr. 1) shodně potvrdily značnou shodu ve výstupu obou postupů, a tedy relevanci detekce a kvantifikace *M. elsdenii* pomocí real time PCR. Navržená real time PCR definovaná sekvencemi primerů je tedy specifická a vhodná pro kvantifikaci *M. elsdenii* v reálných vzorcích trusu nebo obsahu trávicího traktu drůbeže.

## SEQUENCE LISTING

5 <110> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
 <120> Způsob a sada pro detekci Megasphaera elsdenii  
 <130> P3  
 10 <160> 6  
 <170> PatentIn version 3.5  
 15 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> forward primer  
 <400> 1  
 acgtcaacga agccgaatac a 21  
 25 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> reverse primer  
 <400> 2  
 35 cgacgaccat gaactgaatg 20  
 <210> 3  
 <211> 18  
 40 <212> DNA  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> forward primer  
 45 <400> 3  
 tcctacggga ggcagcag 18  
 50 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> artificial  
 55

	<220>		
	<223>	reverse primer	
5	<400>	4	
		cgtattaccg cggctgct	18
	<210>	5	
10	<211>	420	
	<212>	DNA	
	<213>	Megasphaera elsdenii	
	<400>	5	
15		cccgtcgtcg gcccggccat tacggcgcgcc ctcatggccg ccatgggctg gcatgccgta	60
		ttcatcatct tggcctcgt cggcatcgtc ctggcctggg tatggcaca atagccac	120
		gataaccgg ctcacagccc ctacgtcaac gaagccgaat acgctcatat caccgaaggc	180
20		cgcgccgctg ccagtgaaaa gaaaagcgtc gcccctgga gcaaattct cgcctcgtcc	240
		cagttctggg ccgtcggcat tcagttcatg gtcgtcgact acatcatgta cgtcttctg	300
25		gcctggctgc ccctgtacct gacggaagtg cacaacctgt ccctgaaagc tatgggcatc	360
		tgggcttct tccctggat cgcctcatg gccatgtct tcgtgccgg ttatattcc	420
	<210>	6	
30	<211>	420	
	<212>	DNA	
	<213>	Megasphaera elsdenii	
	<400>	6	
35		cccgtcgtcg gcccggccat tacggcgcgcc ctcatggccg ccatgggctg gcatgccgta	60
		ttcatcatct tggcctcgt cggcatcgtc ctggcctggg tatggcaca atagccac	120
		gataaccgg ctcacagccc ctacgtcaac gaagccgaat acgctcatat caccgaaggc	180
40		cgcgccgctg ccagtgaaaa gaaaagcgtc gcccctgga gcaaattct cgcctcgtcc	240
		cagttctggg ccgtcggcat tcagttcatg gtcgtcgact acatcatgta cgtcttctg	300
45		gcctggctgc ccctgtacct gacggaagtg cacaacctgt ccctgaaagc tatggcgtc	360
		tgggcttct tccctggat cgcctcatg gccatgtct tcgtgccgg ctatattct	420
50			
55			



## NÁROKY NA OCHRANU

5

1. Sada primerů pro detekci bakterie *Megasphaera elsdenii* ve vzorcích metodou PCR v reálném čase, **vyznačující se tím**, že obsahuje primery

Megasph\_F3: ACGTCAACGAAGCCGAATACA SEQ ID NO. 1

a

10 Megasph\_R3: CGACGACCATGAACTGAATG SEQ ID NO. 2.

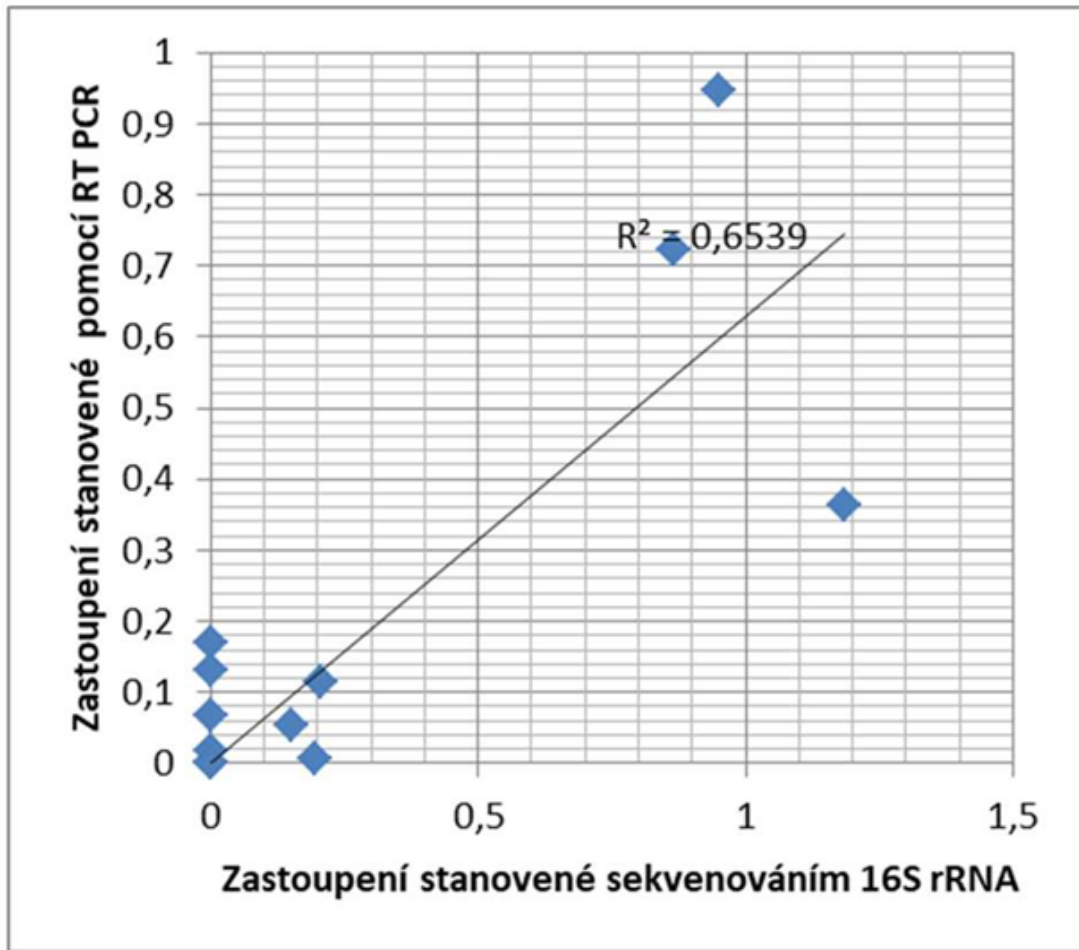
2. Sada podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje primery

16S\_F1: TCCTACGGGAGGCAGCAG SEQ ID NO. 3

a

15 16S\_R1: CGTATTACCGCGGCTGCT SEQ ID NO. 4.

1 výkres



Obr. 1