

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 448

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6888 (2018.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)
C12R 1/72 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40058**
(22) Přihlášeno: **04.07.2022**
(47) Zapsáno: **18.10.2022**

- (73) Majitel:
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Brno, Medlánky, CZ
- (72) Původce:
Ing. Romana Bačová, Ph.D., Bučovice, CZ
Mgr. Monika Morávková, Ph.D., Kuřim, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
**Oligonukleotidy pro MOL-PCR detekci
kvasinkových a prototékových infekcí**

Oligonukleotidy pro MOL-PCR detekci kvasinkových a prototékových infekcí

Oblast techniky

5

Předmětem technického řešení jsou oligonukleotidy pro použití v MOL-PCR (polymerázová řetězová reakce s multiplexní ligací oligonukleotidů) diagnostice kvasinkové a prototékové infekce v oblasti veterinární medicíny a bezpečnosti potravin.

10

Dosavadní stav techniky

V současné době existuje řada způsobů fenotypové a genotypové identifikace kvasinek. Nejčastěji se využívá klasické kultivace na běžných půdách s následnou mikroskopickou, případně biochemickou identifikací. V posledních letech se značně využívají i chromogenní půdy nebo identifikace pomocí metody hmotnostní spektrometrie MALDI TOF.

Záchyt prototékové infekce je většinou závažnější než záchyt kvasinkové či bakteriální nákazy, jelikož stále chybí informace o efektivních léčebných prostředcích a v případě infekce je obecně doporučováno vyřadit infikovaný kus z chovu. Navíc identifikace prototék kultivací jsou komplikované, jelikož na běžných půdách může být snadno přerůstána bakteriální či kvasinkovou mikrobiotou.

Jednou z možností detekce a identifikace patogenních či potenciálně patogenních agens přímo ze vzorku bez předešlé kultivace jsou metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). Nejběžnější metodou je metoda real-time PCR, která umožňuje detekovat a kvantifikovat specifický úsek DNA z řady matric. Nevýhodou této metody je ale fakt, že v jedné reakci mohou být většinou detekovány maximálně 3 až 4 detekční cíle včetně interní amplifikační kontroly.

Jedinečnost metody MOL-PCR spočívá v možnosti multiplexní reakce (detekce až 50 rozličných cílů v jedné reakci), což snižuje výslednou cenu za jednu analýzu. Identifikace některých vybraných druhů kvasinek pomocí MOL-PCR již byla popsána v několika málo publikacích, v nichž jsou identifikace založené na sekvenaci genu 18S ribozomální podjednotky.

Stále přetrvává potřeba navrhnout takové uspořádání reakce MOL-PCR, které by dovolilo efektivní a relevantní diagnostiku kvasinkových a prototékových patogenů.

Podstata technického řešení

40

Předkládané technické řešení poskytuje sadu oligonukleotidů pro detekci kvasinek a prototék relevantních pro prostředí České republiky metodou MOL-PCR, a cílí na jejich specifické geny, zejména virulentní faktory. Při vytvoření sady oligonukleotidů byla brána v úvahu prevalence jednotlivých druhů v bazénových vzorcích mléka.

45

Sada oligonukleotidů obsahuje následující oligonukleotidy pro detekci kvasinek a prototék ve vzorcích potravin či vzorcích odebraných z těla zvířat. Jednotlivé specifické oligonukleotidy pro MOL-PCR (tzv. MOLigo) jsou složeny z následujících částí:

50 MOLigo 1 (M1): specifická sekvence 2 (S2) + přední komplementární primer (Fw) - 3';

MOLigo 2 (M2): 5' Reverzní komplementární primer (Rv) + TAG sekvence + specifická sekvence 1 (S1).

55 Tato struktura je schematicky znázorněna na Obr. 1.

Fw primer univerzální komplementární sekvence pro všechny cíle je:

5' TCTCACTTCTTACTACCGCG 3' (SEQ ID NO. 1). Rv primer univerzální komplementární sekvence pro všechny cíle je: 5' ACTCGTAGGGAATAAACCGT 3' (SEQ ID NO. 2).

5

V seznamu oligonukleotidů jsou sekvence komplementárních primerů označeny tučným písmem, a sekvence TAG podtržením. Je rovněž uveden název organismu, pro jehož detekci je daná dvojice oligonukleotidů určena, a cílový specifický gen.

10 *Detekce Candida albicans (gen lag1):*

C. albicans_M1_1:

PHO-CCACACGAAAACCCAATTCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 3),

15

C. albicans_M2_1:

ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTGTCATCA
TCTTCACTTGGTGTT (SEQ ID NO. 4);

detekce Candida tropicalis (gen ctrg):

20

C. tropicalis_M1_1:

PHO-AGTGTTTGGCTTGGAGTTACCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 5),

25

C. tropicalis_M2_1:

ACTCGTAGGGAATAAACCGTTGAGTAAGTTTGTATGTTTAAGTAATGTGT
TGTGTTTTACGCCAATA (SEQ ID NO. 6);

detekce Kluyveromyces marxianus (gen ura3):

30

K. marxianus_M1_1:

PHO-TGGTAGAGGTCTTTTCGCATCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 7),

35

K. marxianus_M2_1:

ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGAGGTGG
ATCAGACATCATTATTGT (SEQ ID NO. 8);

detekce Candida inconspicua (gen igs):

40

C. inconspicua_M1_1:

PHO-GGAATTTAATTTTCGCGTGGGCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 9),

45

C. inconspicua_M2_1:

ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTTAGTTATGATGAATATTGTGTATGGA
GATTCCTGGGCGAA (SEQ ID NO. 10);

detekce Pichia kudriavzevii (gen PkZFP1):

50

P. kudriavzevii_M1_1:

PHO-TACCCAGAAGTTGTCAGATTTAGCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 11),

P. kudriavzevii_M2_1:

**ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTGTGTTATTTGTTTGTAAAGTATATGATG
GCACAAATTGTCTTGC (SEQ ID NO. 12);**

detekce Pichia fermentans (gen atp2):

5

P. fermentans_M1_1:
PHO-ACCTGCTTTCGTTGACCAATCCATCTCACTTCTTACTACC GCG (SEQ ID
NO. 13),

10

P. fermentans_M2_1:
**ACTCGTAGGGAATAAACCGTAAAGAATTAGTATGATAGATGA
GAAGAGAAGACCAATTCACCAAGACCC (SEQ ID NO. 14);**

detekce Yarrowia lipolytica (gen der11):

15

Y. lipolytica_M1_1:
PHO-GACCAGACCTCTGCTTCTGCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO.
15),

20

Y. lipolytica_M2_1:
**ACTCGTAGGGAATAAACCGTGATTGATATTTGAATGTTTGTGTTG
CGAGTGGCTCACCTACGAGTTT (SEQ ID NO. 16);**

detekce Prototheca blaschkeae (gen cytB):

25

P. blaschkeae_M1_2:
PHO-GTTATATGCACGCAAATGGAGCATCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID
NO. 17),

30

P. blaschkeae_M2_2:
**ACTCGTAGGGAATAAACCGTTATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGT
CGTAGAAGGCGGTTGGTTTTTAC (SEQ ID NO. 18);**

detekce Prototheca bovis (zopfii) (gen accD):

35

P. bovis_M1_1:
PHO-GTACGTGTTGGTAGAAGACAAATTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID
NO. 19),

40

P. bovis_M2_1:
**ACTCGTAGGGAATAAACCGTAGTAAGTGTTAGATAGTATTGAATTTGAC
GATGATCCTAGTTATGGT (SEQ ID NO. 20);**

detekce Prototheca ciferrii (zopfii) (gen atp6):

45

P. ciferrii_M1_2:
PHO-AAGTCAAGTCAATAAATACAGATAAATTCTCACTTCTTACTACC GCG
(SEQ ID NO. 21),

50

P. ciferrii_M2_2:
**ACTCGTAGGGAATAAACCGTGTGATTGAATAGTAGATTGTTTAAAAG
AAGCTATAGTCAAACGT (SEQ ID NO. 22);**

kde PHO značí fosfátovou skupinu umožňující ligaci.

55

Sada může dále obsahovat vnitřní amplifikační kontrolu mající následující sekvence oligonukleotidů: *vnitřní amplifikační kontrola*:

IAC_M1: PHO-ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG
(SEQ ID NO. 23),

IAC_M2:
ACTCGTAGGGAATAAACCGTATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACACA
CGCAATCACCAC (SEQ ID NO. 24);

kde PHO značí fosfátovou skupinu umožňující ligaci.

IAC kontrolní sekvence v plasmidu 5'-3':

CGCTTCCGTCAAACCCCTAAACCGGATGATAGACCTCACCTCCCCGCCCAATACTGA
AATCTCATTAATACGCATACCCCACTATACACACGCAATCACCACATTAGCACAA
TGAATAATCATCGTACGGGAGAAAACATTCTAAACCC (SEQ ID NO. 25).

Sada oligonukleotidů podle technického řešení je určena pro MOL-PCR detekci a identifikaci zástupců kvasinek a prototék, které jsou významné buď z hlediska klinického onemocnění (zejména mastitid) nebo mají vliv na technologické vlastnosti mléka. Pomocí navržených specifických oligonukleotidových sekvencí lze pomocí MOL-PCR simultánně detekovat 7 druhů kvasinek – *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida inconspicua*, *Pichia kudriavzevii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia fermentans* a 3 druhů prototék – *Prototheca blaschkeae*, *Prototheca bovis* (dříve *Prototheca zopffii* genotyp 2) a *Prototheca ciferrii* (dříve *Prototheca zopffii* genotyp 1). Kvalitativní detekce probíhá odečtením fluorescenčního signálu vzorku od negativní kontroly.

Cílové sekvence genů

>XM_712847.1 *Candida albicans* SC5314 sfingosin N-acyltransferasa (LAG1), část mRNA

ATGTCATCGTCATCATCTTCACTTGGTGTTCACACGAAAACCCAATTCGTCATC
GTTCTTCATCTGTTGGTAGAATAGACGTTGGTGACACATCTGCATCTTTATCAACCAT
GCCAACCACGAGGTCTCTGAGAAGAAGATCTATTGCCAGATTGAAAGAATTACAAG
ACAATCAACTACAGATTCAGCAATTGTTTCATAAATTATATGTTGGGTTTLAGAGAATT
AACTTATAGACACACTTGGATTATTCCTTTGATTGTTTTACTCATGGCTTTTGGTACAT
ATTATCTTTCATCACCTTCAGGAAAAGTTCATCAAGTATTAGAAGATATGATTATTC
ATCTTATCATATCCCTGGTACTGATCAATATGGTAAAGGAGGTAACGATTTCAAATTT
GTTGGATTTTATGCTATTTTTTCACTTTTTTGAGAGAATTCATGATGTGTTGTGTTTT
ACGTCCAATTAGTGTTTGGTTTGGTATTAAAAAAGAAGCCAAACAGAAGAGATTTTT
AGAACAACCTTATGCCATGTTTTATTATGGTATTACTGGTCCATTTGGTTTATGGATT
ATGAGAAGATTACCATTATGGTATTTTAATACCACTCAATTTTATATAAATTATCCAC
ACAAGACTCATGATATTTATTTCAAATTTATTATCTTGGTCAAGCAGCATTTTGGGT
CCAACAATCAGTAGTTTTAATTTTACAATTGGAAAAACCAAGAAAAGATTTCAAAGA
ATTAGTCTTGCATCATATTACTATAGCGTTGATTTGGTGTCTTATAGATTCCATT
TCACTTGGATGGGATTGGCTGTTTATATTACTATGGATATATCTGATTTCTTTTTGGC
ATTATCGAAAACCTTGAATTATTTGGAATCTCCCATTACCGGTCCATTTTTCGTTATA
TTTTATTGGCGTTTGGATTTATTTGAGACATTATATCAATTTACAAATATTATGGTCGG
TTTTAACTGAATTCAGAACCGTTGGTGATTTTCAATTTGAATTTGGATCACTCAACAATA
TAAATGTTGGATCTCACAGCCAATCACTTTTTTCTTGATTTTTGCCTTACAATTAGTCA
ACTTTTATTGGTTAGTATTGATTTTCAGAATTTTATACAGATATGTTTTCACTGGGGTT
AGTAAAGATGAAAGAAGTGATGATGAAGATGAAGATGAAGATAGTGAAGATTCTGC
TGATGAAAAGAAAAGGAACAATAG (SEQ ID NO. 26)

>XM_002546151.1 *Candida tropicalis* MYA-3404 longevity-assurance protein 1 (CTRG_00979),
část mRNA

5 ATGACTTCGTCTTCTTCATCACTTGCTCCTCCCCTGGATAAATCCATTCGTCATCGTTC
TTCATCTGTTGGAAGAATTGACGTCGGTGACACAGCATCCCGATCATTTC AACCAT
GCCAACCCTAGATCTCTGAGAAGAAGGTCTATTGCTAGATTACAGGAATTACAAGA
CAAATCTACTACCGATTCAGCTATTGTACATAAATTAATTGTTGGATTACAGAGAGTTA
ACCTATAGACACACTTGGATTGGCCATTCATTGTATTATGTGTCATGGTTGGTACTT
ATTTAGTTTCATCACCTACCGGACAAATCCACCAAATCTTGGGAGACATGATAATTC
10 CATCTTACCATATTCCTGGTACTGACCAATATGCTAAAGGTGCCAATGACTTTAAATT
TGTTGGTTTCTATGCTATTTTCTTTACATTCTTGAGAGAATTCATGAT**TGTGTTGTT**
TTACGCCCAATAAGTGTGGCTGGAGTTACCAAAGAAGCTAAACAAAAGAGA
TTTTTGGAAACAAACCTATGCTATGTTTTATTATGGTATGACCGGTCCATTTGGTTTAT
GGATCATGAGCAGATTACCATTATGGTACTTTGAAACTACCCCATTTTATGAACAT
15 (SEQ ID NO. 27)

>KX453285.1 *Kluyveromyces marxianus* kmen IIPE453 gen orotidin-5'-fosfát dekarboxylasy
(Ura3), úplné cds

20 ATGTGCGACTAAGAGTTACTCGGAAAGAGCAGCTGCTCATAGAAGTCCAGTTGCTGCC
AAGCTTTTAAACTTGATGGAAGAGAAGAAGTCAAACCTTATGTGCTTCTCTTGATGTT
CGTAAAACAGCAGAGTTGTTAAGATTAGTTGAGGTTTTGGGTCCATATATCTGTCTAT
TGAAGACACATGTAGATATCTTGGAGGATTTTCAGCTTTGAGAATACCATTGTGCCGT
TGAAGCAATTAGCAGAGAAACACAAGTTTTTGTATTTGAAGACAGGAAGTTGCCG
25 ACATTGGGAACACTGTAAATTACAATACACGTCTGGTGTATACCGTATCGCCGAAT
GGTCTGATATACCAATGCACACGGTGTGACTGGTGCGGGCATTGTTGCTGGTTTGA
AGCAAGGTGCCGAGGAAGTTACAAAAGAACCTAGAGGGTTGTTAATGCTTGCCGAG
TTATCGTCCAAGGGGTCTCTAGCGCACGGTGAATACACTCGTGGGACCGTGGA AATT
GCCAAGAGTGATAAGGACTTTGTTATTGGATTTATTGCTCAAACGATATGGGTGGA
30 AGAGAAGAGGGCTACGATTGGTTGATCATGACGCCAGGTGTTGGTCTTGATGACAAA
GGTGTATGCTTTGGGACAACAATACAGAACTGTGGATGAAGTTGTTGCC**GGTGGATC**
AGACATCATTATTGTTGGTAGAGGCTTTTTCGCAAAGGGAAGAGATCCTGTAGTG
GAAGGTGAGAGATACAGAAAGGCGGGATGGGACGCTTACTTGAAGAGAGTAGGCA
GATCCGCTTAA (SEQ ID NO. 28)

35 >AB179649.1 *Candida inconspicua* DNA, region intergenového spaceru (IGS) 1, kmen: CBS180

GCTTCGGCGCGAAAGTTTGTTCACAGGTGTGGGAGAGGTTTCGAACGAGCAGGAC
GGCAGTCCTGCGATGTGAGATTTACTGGACTCGAGCAGGGCGTAGTCCTGCGAGTGA
40 TCCTTTACTGGGCGTGGGAGTTTTTGTGATTTACTGGGCGTGGGAGGATCTCAGATTT
ACTGGGCGTGGAGATCCACTGCTCGAAGGAATTTACGTTTCGCGTGGGAAAAGATATT
TTTTGACCCCAAGGGCGGATTACTGGGCGT**GGAGATTC**ACTGGGCGAAGGAATTT
ATTTTCGCGTGGGCCCAGGTTTTTTTTTGGTTTCGCCAGGAGAGATTTCTGTGAATAA
AATATTGCTGGGCAAATTTACTCTGCGCGGGCGAGGTGAAATTTTTGGGCGGTCTG
45 ACTGGGCGTGGGAAAGCTGCTGGGCGAGGTAATTTTTTGTTCGAGGGGATTCACTG
GGAAATGCTGCGCGGGGTGGGGAAAAAATTCCTGGGCAAGAAAAA (SEQ ID NO. 29)

>LC510271.1 *Pichia kudriavzevii* N77-4 PkZFP1 gen pro zinc finger protein, úplné cds

50 ATGGCTGTGAAATTCACCAACACTTCTTCAAGGGACAGACAGGTGACACCTACTTTG
GATGATGGCACAAAT**TGCTT**GCTACCCAGAAGTT**GTCAGATTTAGC**CAGCACGG
GCTCATCAAAGTCAATCTAAGCTCTGTGTTAATAATGTTACCCAGAAAGATAGTGAT
GACTCCACATCAAACCTTAGAGTTATTTCAAACCTATCTTCTCCTTGATAACTTCAG
TTTCAAATTACCAAAGCCGTTTACATGTTAATGAAAGGGAAGATTCATACATTTGTC
55 ACTATAACAAAGGTTTATATGATCCTAGAATATTGAAAACGGTAGACCCCTCCAGT

GTATCTTAGATGGATCAAAAAATAATGTTTTTATGACCGATAAAATGTCCAATTTTT
 TAAAGCAGCAAATTTAAATGAGAAAATATCGATAGTTGATCGTTCATTCTTGTTGA
 TTCAAATTTAAAAAATACACCTGAATTCTACAGTAAACTTGATAACATTGAAATTAC
 CAATTCTCAATATTATCAAGAATATCTTTACGATGACCCAATTTATGCTAATACTT
 5 GAAAATAATAGAAGTTTTGAATCGACAAGCTACGAATTAGATTCTGTGATATCTAAT
 TCCAACCTCAAGAATACATACTATGGAAGAGGATAATGGGACAATAAACCCCTATTTTT
 TTCCACCATACTCCCT (SEQ ID NO. 30)

>CP061017.1:294318-294788 *Yarrowia lipolytica* kmen DSM 3286 chromozom F

10 TCGAAAAGTCCCCTCGAGTCGACAAGGTCATTGACGTTGGTGTCAAGGCCTCGGAAG
 ACAAGACCGCCTACCCCAACATTGCCATTGCTGCTGCTGAGAAGGTGGCCTCCGGCG
 AGGCCGACCGAGCCATTCTCATCTGTGGTACCGGTCTTGGTGTCCCATCTCCGCCA
 ACAAGGTGGCCGGTGTTCGAGCCGTGACTGCACATGACTCCTTCTCCGTCGAGCGAT
 15 CCATTCTTTCCAACAACGCCAGATTCTCTGCATGGGCCAGCGGGTGGTTGGAATCG
 AGCTTGCTCGACGCTGGTGGCCGAGTGGCTCACCTACGAGTTTGACCAGACCTC
 TGCTTCTGCCGCCAAGGTTGCCGATATTGAGACCTACGAGAAGAAGCACATTGCTG
 CCTAA (SEQ ID NO. 31)

20 >DQ447215.1 *Pichia fermentans* gen mitochondriální F-ATPasy, beta podjednotky (atp2), část
 cds; jaderný gen pro mitochondriální produkt

GTCAACCTGTAAACGACACTGGTGTCCAATCTCTGTCCCAGTTGGTAGAGGTACTCT
 TGGTAGAATCTTGAACGTCCTGGTGACCCAGTYGATGAAAGAGGTCCTGTTCGAMT
 25 GTAAGGAGAGAAGACCAATTCACCAAGACCCACCTGCTTTCGTTGACCAATCCA
 CTGAAGCTGAAGTTTTGGAAACCGGTATTAAGGTTGTCGATTTATTAGCACCTTACG
 CTAGAGGTGGTAAGATTGGTTTGTTCGGTGGTGTGGTGTCCGTAAGACCGTTTTT
 CCAAGAATTGATTAACAATGTTGCTAAGGCCACCGTGGTTTCTCCGTTTTCACTGGT
 GTCGGTGAAGAACCAGAGAAGGTAACGATTTATACAGAGAAATGAAGGAAACCGG
 30 TGTTATTAACCTTGAAGGTGAATCTAAGGTCGCCCTCGTTTTTCGGTCAAATGAACGA
 ACCACCAGGAGCAAGAGCTAGAGTTGCTCTTACTGGTTTGACCATTGCTGAATACTT
 CAGAGATGAAGAAGGTCAAGATGTCTTGTCTTTTATTGACAACATTTTCAGATTAC
 CCAAGCAGGTTCCGAAGTGTCTGCTTTGTTAGGTAGAATTCCWCTGCCGTTGGTTA
 CCAACCAACCTTAGCAACCGATATGGGTTTGTACAAGAAAGAATTACCACCACCAA
 35 GAAGGGTTCCGTCACCTCCGTCCAAGCTGTTTACGTCCCAGCTGATGATTTACTGAC
 CCTGCACCAGCAACCACTTTCGCCACTTGGATGCTACCACCGTCTTGTCTAGAGGT
 ATTTCCGAATTAGGTATTTACCCAGCTGTGATCCATTAGATTCTAAGTCTAGATTAT
 TGGATGTGCTGTTGTTCGGTCAAGAACATTATACCGTTGCAACYCAAGTCCAAGAAA
 CTTTACAAGCTTACAAGTCCTTACAAGATATCATTGCTATTTTGGGTATGGACGAATT
 40 ATCTGAACAAGATAAGCTTACTGTTGAAAGAGCAAGAAAGATCC (SEQ ID NO. 32)

>MH389245.1 *Prototheca blaschkeae*, gen cytochromu b, část cds; mitochondriální

ACGTAGAAGGCGGTTGGTTTTTACGTTATATGCACGCAAATGGAGCAAGTATGT
 45 TCTTTATTGTTGTATATTCTCATATGTTTAGAGGTTTATATTTTTCAAGTTATTCTAGT
 CCACGTGAATTAACATGGATTGCTGGTGTAGCTATTTTATTATTAATGATTATTACTG
 CATTCAATTGGTTACGTTTTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGTGCTACAGTAAT
 TACTAGTTTAGCTAGTGTCTATTCTGTAGTTGGTAATAGTATTGTAACCTGGTTATGG
 GGAGGTTTCTCTATTGACAATGCGACGTTAAATCGTTTTTTTAGTTTACATTATTTATT
 50 ACCTTTCGTAATTGCAGGTTTATCAATTGTACATATTGCAGCATTACATCAATATGGT
 TCAAATAACCCATTAGGTATTAATTCAAAAACGGATAAAAATTTCTTTTTATCCTTATT
 TTTATGTAAAAGATTTATTCGGATGGAC (SEQ ID NO. 33)

>MF197536.1:15122-15721 Prototheca zopfii kmen SAG 2021 plastid, plný genom

TTAAAATTTGACGATGATCCTAGTTATGGTGTACGTGTTGGTAGAAGACAAATA
 ATGTACCAAAACCAAGAAGGTGCTGTAAGTGGACTTGCTTTTATAAATAAAAAACCT
 5 GTTGCTATTGCTATAATGGATTTTAATTATTTAGGTGGTAGTATGGGATCAGTAATTG
 GTGAACAAATTACTCGTTTAATTGAACATGCTACAAAAAATGATATTAATTTAATTA
 TTTTTGTGCTTCAGGTGGTGCAAGAATGCAAGAAAGTTCATTAAGTTAATGCAAA
 TGGGTAAAGTATCTGCTGCATTAATATTTATCAAAAAAATTAATCTTTTATATAT
 TTCTGTATGTACTTCTCCTACAACAGGTGGAGTTACTGCTAGTTTTGCAATGTTAGGA
 10 GACTTTATTTTTGCGGAACCAGGAGCTATTATCGCTTTTGCCGGAAGAAGAGTTGTTT
 CAGAAACATTAATGAAGAATTTCCAGAAGGATATCAAACACTAGTGAATATCTTTTAA
 GAAATGGTCAATTAGATGCAATTGTTGATAGATTTCACTTTAAATCAATGGTAAATT
 GGGTTTACAAATTTTCCGTTTCAGCTAGA (SEQ ID NO. 34)

15 >MF197533.1:12877-14160 Prototheca zopfii kmen SAG 2063 mitochondrie, plný genom

GTTATATACTTCTTATATAAAGAAGCTATAGTCAAACGTAAGTCAAGTCAATAAAT
 ACAGATAAATATTACTCAATAAAAACTACAAAGTTAGAATTAATGAGAGGATTATG
 TTACGAAGTATCAAGACTATATATACAAATAAATACTTGAGAAACAGAGAATGAGAA
 20 GTATATAAGAAGTATATACGGAGTATATGAGAGGGGGTAGGCGAAGCCATTGGTAC
 AGTTTAATAAATATATAAAAAGTATATGTTATTATTTTATAGTCAAATTATTTAATT
 TAAATAAAACGGATTTTTTTAGTTATTGATTTTTAATTTTCATTGTTAGCATAGAGTAA
 ACTGTGATTAAGTATTAATTTTCTTTTTATATATGTTTTATTATAAAAACTAAAA
 GGTATTGTTAAAGTTAGTTTTAGATAGGGTTAAGAAAATAATAATTTAATATTTTT
 25 GTTTGATTAAATAGTTCTAATATATTAGTGTATT (SEQ ID NO. 35)

Objasnění výkresů

30 Obr. 1 schematicky znázorňuje složení jednotlivých specifických oligonukleotidů: Pho = fosfátová skupina umožňující ligaci; černě = specifická část sekvence pro zachycovaný cíl; šedě = vazebná sekvence pro univerzální forward (Fw) a reverse (Rw=Rv) PCR primery; TAG = sekvence pro detekci, například komplementární k anti-TAGu na mikrosférách.

35

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1 Postup MOL-PCR detekce kvasinek a prototék

40 Oligonukleotidové sekvence oligonukleotidů pro MOL-PCR popsané v nároku 1 byly syntetizovány na zakázku firmou Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika).

Prvním krokem MOL-PCR je ligace, kdy dochází k hybridizaci jednotlivých specifických oligonukleotidů (MOLigo 1 a 2) s cílovou sekvencí a k jejich následnému enzymatickému spojení.
 45 Oligonukleotidy pro MOL-PCR (tzv. MOLigo) jsou složeny ze dvou částí, které je nutno spojit za pomoci ligace v 1 celek:

Ke 22,5 µl reakční směsi pro ligaci (Tabulka 1), která obsahuje ligázu, pufr, specifické oligonukleotidy (jejichž sekvence jsou uvedeny v Podstatě technického řešení), UNG (uracil N-glykosylázu), IAC plasmid (obsahující sekvenci vnitřní kontroly uvedenou v Podstatě technického řešení) a vodu se přidá 2,5 µl izolované DNA ze vzorku. Pozitivní kontrola IAC (interní amplifikační kontrola) slouží pro ověření správnosti průběhu všech kroků MOL-PCR. Součástí multiplexu je i negativní kontrola, kdy je místo vzorku DNA přidána do reakce PCR voda. Ligační protokol je uveden v Tabulce 2.

55

Tabulka 1: Složení ligační směsi

Složka	Koncentrace	1 reakce (μl)
Hifi Taq DNA Ligase buffer	10 ×	2,5
Hifi Taq DNA Ligase	1×	0,5
<i>C. tropicalis</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>C. tropicalis</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>C. albicans</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>C. albicans</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>K. marxianus</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>K. marxianus</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>C. inconspicua</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>C. inconspicua</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. kudriavzevii</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. kudriavzevii</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>Y. lipolytica</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>Y. lipolytica</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. fermentans</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. fermentans</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. bovis</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. bovis</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. ciferrii</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. ciferrii</i> _M2_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. blaschkeae</i> _M1_1	(100 μM)	0,0185
<i>P. blaschkeae</i> _M2_2	(100 μM)	0,0185
IAC (vakovlk) – M1	(100 μM)	0,0185
IAC (vakovlk) – M2	(100 μM)	0,0185
H ₂ O	-	18,8
UNG	1 U/μl	0,2
Plasmid IAC 10 ⁴ /μL	-	0,1

Tabulka 2: Ligační protokol

5

Přístroj: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)

1 cyklus	Úvodní denaturace	95 °C (10 min)
20 cyklů	Denaturace	95 °C (30 s)
	Ligace	59 °C (1 min)
	Uchování ^a	10 °C

^a uchování do dalšího zpracování; nutno zpracovat během jednoho dne.

10

Druhým krokem je PCR reakce. PCR reakční směs (Tabulka 3) obsahuje master mix Luna (NeB, USA), univerzální primery (Fw a Rv) a PCR vodu. K 18 μl této směsi se následně přidá 6 μl ligačního produktu a reakce probíhá podle PCR protokolu (Tabulka 4).

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi

Složka	1 reakce
Luna [®] Universal qPCR Master Mix (NeB)	12 µl
Fw primer (uni FW: 5'– CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA – 3', (SEQ ID NO. 36) (10 pmol/ µl)	0,15 µl
Rv primer (5'–BODIPY-TMRX-ACTCGTAGGGAATAAACCGT–3', (SEQ ID NO.37) (10 pmol/ µl)	0,6 µl
PCR H ₂ O	5,25 µl

Tabulka 4: PCR protokol

5

Přístroj: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)

1 cyklus	Úvodní denaturace	95 °C (2 min)
40 cyklů	Denaturace	95 °C (15 s)
	Annealing	60 °C (15 s)
	Elongace	72 °C (15 s)
	Uchování ^a	10 °C

^a uchování do dalšího zpracování

10

Třetím krokem je hybridizace na magnetické mikrosféry. Hybridizační směs (Tabulka 5) se skládá z MES (2-N-morfolinoethansulfonová kyselina), (Sigma-Aldrich, katalogové číslo M2933, pH 4,5), NaCl, TE (Tris/EDTA) pufru (Sigma-Aldrich, katalogové číslo T9285, pH 8) a magnetických mikrosfér (Luminex, Austin, TX, USA) obsahující anti-TAGy, které jsou komplementární k TAG sekvenci na Moligo sondách a jsou tak podstatné pro diferenciaci cíle při detekci. Seznam anti-TAG sekvencí je dostupný od výrobce (Luminex, Austin, TX, USA) a mikrosféry lze potáhnout anti-TAGy v laboratoři dle návodu výrobce (Luminex, Austin, TX, USA). K 5 µl této směsi se pak přidá 10 µl PCR produktu a reakce běží podle hybridizačního protokolu (Tabulka 7). Po skončení hybridizace se ke každému vzorku přidá 45 µl analyzačního pufru pH 8 (Tabulka 6).
Vzorky jsou takto připraveny pro analýzu pomocí přístroje MagPix.

15

20

Tabulka 5: Složení hybridizační směsi

Složka	Cíl	Mikrosféra (anti-TAG) *	1 reakce (µl)
MES (0,1 M)	-	-	2,50
NaCl (5 M)	-	-	0,80
TE pufr (1x)	-	-	1,38
Mikrosféry:	<i>C. tropicalis</i>	34_koule (anti-TAG 65)	0,05
	<i>C. albicans</i>	61_koule (anti-TAG 61)	0,02
	<i>K. marxianus</i>	20_koule (anti-TAG 66)	0,04
	<i>C. inconspicua</i>	15_koule (anti-TAG 45)	0,01
	<i>P. kudriavzevii</i>	19_koule (anti-TAG 19)	0,03
	<i>Y. lipolytica</i>	22_koule (anti-TAG 22)	0,03
	<i>P. fermentans</i>	56_koule (anti-TAG 76)	0,03
	<i>P. bovis</i>	38_koule (anti-TAG 38)	0,03
	<i>P. blaschkeae</i>	33_koule (anti-TAG 33)	0,08
	<i>P. ciferrii</i>	46_koule (anti-TAG 46)	0,03
	IAC vakovlk	36_koule (anti-TAG 14)	0,02

25

Hybridizační směs je stabilní při teplotě -20 ± 4 °C až 12 měsíců.

* Sekvence (5'-3') použitých anti-TAG oligonukleotidů na mikrosférách (reverzní komplement), amin-substituované na 5' konci:

anti-TAG 65	TACTTAAACATACAAACTTACTCA (SEQ ID NO. 38)
5 anti-TAG 61	AATCTCTACAATTTCTCTCTAATA (SEQ ID NO. 39)
anti-TAG 66	TCTTACTAATTTCAATACTCTTAC (SEQ ID NO. 40)
anti-TAG 45	TACACAATATTCATCATAACTAAC (SEQ ID NO. 41)
anti-TAG 19	ATACTTTACAAACAAATAACACAC (SEQ ID NO. 42)
anti-TAG 22	CAAACAAACATTCAAATATCAATC (SEQ ID NO. 43)
10 anti-TAG 76	TCTCATCTATCATACTAATTCTTT (SEQ ID NO. 44)
anti-TAG 38	ATTCAATACTATCTAACACTTACT (SEQ ID NO. 45)
anti-TAG 33	ACTACTTATTCTCAAACCTCTAATA (SEQ ID NO. 46)
anti-TAG 46	TTAAACAATCTACTATTCAATCAC (SEQ ID NO. 47)

15 Protokol pro potahování kuliček:

Z originálního balení mikrosfér se přenese 400 μ l kuliček do Eppendorf LowBind zkumavek a nechá sestát na magnetickém separátoru 1 min. Odstraní se supernatant a resuspenduje se pelet ve 45 μ l 0,1 M MES pufru. K takto aktivovaným mikrosférám se přidá 2 μ l 100 μ M anti-TAG sekvence. (Pozn.: Vždy párovat jeden set kuliček s jedním setem anti-TAG sekvence!). Přidá se 20 2,5 μ l EDC o koncentraci 10 mg/ml a ihned se zvortexuje. Dále proběhne inkubace 30 min, poté se přidá opět 2,5 μ l EDC o koncentraci 10 mg/ml a opět se inkubuje 30 min. Takto spárované mikrosféry se promyjí 1 ml 0,02% Tween-20. Vloží se na magnetický separátor a po 1 min se odstraní supernatant. Pelet se rozpustí v 1 ml 0,1% SDS a na 1 min se vloží na magnetický separátor. 25 Po odstranění supernatantu se pelet resuspenduje v 80 μ l TE pufru (pH 8,0). Potážené kuličky se uchovávají v lednici při 4 °C a v temnu.

Tabulka 6: Složení analyzačního pufru

Chemikálie	Finální koncentrace	Množství
1 M Tris-Cl	10 mM	2,5 ml
0.5 M EDTA	0,1mM	50 μ l
5 M NaCl	90 mM	4,5 ml
Tween 20	0,02 %	50 μ l
H ₂ O		242,9 ml

30

Tabulka 7: Hybridizační protokol

Přístroj: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA)

1 cyklus	Úvodní denaturace	96 °C (90 s)
1 cyklus	Hybridizace	37 C (30 min)

35

Vyhodnocení:

Výsledky analýzy jsou vyhodnoceny kvalitativně v přístroji MagPix (Bio-Plex MAGPIX, Bio-Rad, Kalifornie, USA). Vždy je vyhodnocen fluorescenční signál pomocí softwaru xPONENT verze 4.2 pro MAGPIX (Luminex, Austin, TX, USA). Vzorky, které vykazují fluorescenční intenzitu (MFI) ≥ 100 a zároveň mají poměr signál: pozadí (signal to noise - SN) ≥ 3 jsou vyhodnoceny jako pozitivní. 40

Příklad 2 *Specificita oligonukleotidů*

Specificita oligonukleotidů byla primárně kontrolována in silico pomocí online nástroje T-Coffee pro srovnání vícero sekvencí mezi sebou (<https://tcoffee.crg.eu/apps/tcoffee/do:procoffee>) a online databázi Nucleotide BLAST v databázi NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tyto sekvence byly podrobeny testům specificity i v laboratorních podmínkách. Specificita se skládala z testů inkluzivní a exkluzivní. Test inkluzivní spočíval v ověření, že navržené sekvence byly specifické pro jednotlivé cíle. Byla tedy izolována DNA pomocí kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Microprep kit (Zymo Research, USA), která byla pro každý druh použita v množství 12,5 ng/reakci a byla dále testována podle protokolu sepsaného výše. Všechny navržené sondy byly specifické pro dané druhy až na sekvence *Prototheca blaschkeae*, která zachycuje zároveň i *Prototheca ciferrii*. Tyto dva druhy však lze dobře rozlišit na základě vysoké specificity *Prototheca ciferrii*.

Pro testy exkluzivní byly vybrány další druhy, které se mohou vyskytovat v mléce nebo jsou blízké fylogeneticky příbuzné, a to z kmene Ascomycota (*Candida parapsilosis*, *Candida pseudoglaebosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Magnusiomyces clavatus*, *Prillingera fragicola*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Yamad. mexicana*), ze třídy Hyphomycetes (*Cutaneotrichosporon curvatum*, *Trichosporon caseorum*), z oddělení Chlorophyta (*Auxenochlorella protothecoides*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus armatus*, *Euglena longa*, *Limnospira maxima*, *Ochromonas danica*, *Parachlorella beijerinckii*, *Parachlorella Kessleri*, *Pseudochlorella pring*, *Pseudochloris wilhelmii*, *Raphidocelis subcapitata*, *Scenedesmus armatus*, *Scenedesmus obligus*) a kmene Chordata (*Bos taurus*). Z těchto druhů byla rovněž izolována DNA pomocí kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Microprep kit (Zymo Research, USA), která byla pro každý druh v množství 12,5 ng/reakci dále testována výše uvedeným protokolem. Žádná z Moligo sond nezaznamenala amplifikaci těchto uvedených druhů, tudíž výsledky vykazaly 100% specificitu Moligo sond vůči těmto druhům.

Příklad 3 *Testování oligonukleotidů na vzorcích*

Technické řešení předkládá specifické sekvence vybraných kvasinek a prototék. Tyto sekvence byly použity ve standardním protokolu pro MOL-PCR, který obsahuje systém kontrol a vyhodnocení. Funkčnost specifických sond byla ověřena na izolované DNA z různých kvasinek a zelených řas a na 93 reálných vzorcích získaných z mléčných farem. Vzorky mléka (V = 10 ml) byly centrifugováním zpracovány na mléčné pelety. Z mléčné pelety byla izolována DNA (Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Microprep kit od Zymo Research (USA), která byla dále použita pro analýzu pomocí multiplexní PCR s detekcí MagPix (viz uvedený protokol výše). U těchto vzorků byla zjištěna přítomnost kvasinek a prototék ve 13 %. Nejčastěji byla detekována *C. inconspicua*, *P. kudriavzevii* a *K. marxianus*. Dále byly detekovány *P. blaschkeae*, *P. bovis* či *C. albicans*.

Průmyslová využitelnost

Metodika byla vyvinuta pro monitoring výskytu nebakteriálních původců mastitidy (kvasinek a prototék) a aplikována pro jejich detekci v matrici mléka dojného skotu. Tuto metodiku však mohou uplatnit i diagnostické laboratoře zabývající se závažnými kvasinkovými či prototékovými onemocněními zvířat i lidí. Metodiku lze uplatnit pro široké spektrum vzorků DNA pocházejících z klinických a veterinárních vzorků či z prostředí. Uživatelé mohou metodiku využít k posouzení nutnosti zavedení preventivních a kontrolních opatření.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada oligonukleotidů pro detekci kvasinek a prototék ve vzorcích potravin či vzorcích odebraných z těla zvířat, **vyznačující se tím**, že obsahuje oligonukleotidy:

- 5 C. albicans_M1_1:
PHO-CCACACGAAAACCCAATTCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 3),
C. albicans_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
TATTAGAGAGAAATTGTAGAGATTGTCATCA TCTTCACTTGGTGTT (SEQ ID NO. 4);
- 10 C. tropicalis_M1_1:
PHO-AGTGTTTGGCTTGGAGTTACCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 5),
C. tropicalis_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
TGAGTAAGTTTGTATGTTTAAAGTAATGTGT TGTGTTTACGCCAATA (SEQ ID NO. 6);
- 15 K. marxianus_M1_1:
PHO-TGGTAGAGGTCTTTTCGCATCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 7),
K. marxianus_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
GTAAGAGTATTGAAATTAGTAAGAGGTGG ATCAGACATCATTATTGT (SEQ ID NO. 8);
- 20 C. inconspicua_M1_1:
PHO-GGAATTTATTTTCGCGTGGGCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 9),
C. inconspicua_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
GTTAGTTATGATGAATATTGTGTATGGA GATTCACTGGGCGAA (SEQ ID NO. 10);
- 25 P. kudriavzevii_M1_1:
PHO-
TACCCAGAAGTTGTCAGATTTAGCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 11),
P. kudriavzevii_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
GTGTGTTATTTGTTTGTAAAGTATATGATG GCACAAATTGTCTTGC (SEQ ID NO. 12);
- 30 P. fermentans_M1_1:
PHO-
ACCTGCTTTCGTTGACCAATCCATCTCACTTCTTACTACC GCG (SEQ ID NO. 13),
P. fermentans_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
AAAGAATTAGTATGATAGATGA _ GAAGAGAAGACCAATTCACCAAGACCC (SEQ ID N
O. 14);
- 35 Y. lipolytica_M1_1:
PHO-GACCAGACCTCTGCTTCTGCTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 15),
40 Y. lipolytica_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
GATTGATATTTGAATGTTTGTG _CGAGTGGCTCACCTACGAGTTT (SEQ ID NO. 16);
- P. blashkeae_M1_2:
PHO-
45 GTTATATGCACGCAAATGGAGCATCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 17),
P. blashkeae_M2_2:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
TATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGT _CGTAGAAGGCGGTTGGTTTTTAC (SEQ ID NO. 18
);
- 50 P. bovis_M1_1:
PHO-
GTACGTGTTGGTAGAAGACAAATTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 19),
P. bovis_M2_1:
ACTCGTAGGGAATAAACCGT
55 AGTAAGTGTTAGATAGTATTGAATTTGAC GATGATCCTAGTTATGGT (SEQ ID NO. 20);

P. ciferrii_M1_2:

PHO-

AAGTCAAGTCAATAAATACAGATAAATTCTCACTTCTTACTACC GCG (SEQ ID NO. 21),

5 P. ciferrii_M2_2:

ACTCGTAGGGAATAAACCGT

GTGATTGAATAGTAGATTGTTTAAAAG AAGCTATAGTCAAACGT (SEQ ID NO. 22);

kde PHO značí fosfátovou skupinu umožňující ligaci.

10 2. Sada podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje oligonukleotidy vnitřní amplifikační kontroly:

IAC_M1: PHO-

ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG (SEQ ID NO. 23),

IAC_M2:

ACTCGTAGGGAATAAACCGT

15 ATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTTATACACA CGCAATCACCAC (SEQ ID NO. 24)

a plasmid vnitřní amplifikační kontroly obsahující sekvenci:

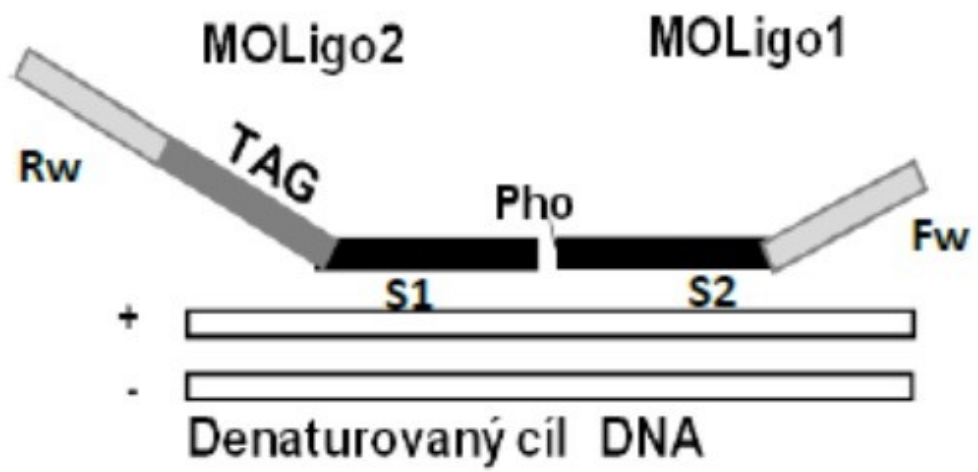
CGCTTCCGTCAAACCCCTAAACCGGATGATAGACCTCACCTCCCCGCCCAATACTGAA

ATTCATTAATACGCATACCCCCACTATACACACGCAATCACCACATTAGCACAAT

GAATAATCATCGTACGGGAGAAAACATTCTAAACCC (SEQ ID NO. 25).

20

1 výkres



Obr. 1