

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

VYUŽITÍ MULTIPLEXNÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE PRO AUTENTIZACI VYBRANÝCH DRUHŮ HMYZU



**Eliška Čermáková, Agáta Čermáková, Jakub Vašek, Karolína Táborová,
Kamila Zdeňková a Pavel Vejl**

Praha 2025

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) Ministerstva zemědělství České republiky č. QK23020101 s názvem „Komplexní laboratorní strategie pro identifikaci druhů hmyzu určeného k lidské spotřebě a produkci zpracované živočišné bílkoviny, autentikace potravin na jeho bázi“.

Autorský kolektiv:

Ing. Eliška Čermáková, Ph.D.¹, Ing. Agáta Čermáková², Ing. Jakub Vašek, Ph.D. ²,
Bc. Karolína Táborová¹, Ing. Kamila Zdeňková, Ph.D.¹, doc. Dr. Ing. Pavel Vejl²

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, FPBT, Ústav biochemie a mikrobiologie,
Technická 3, 166 28 Praha

² Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra genetiky a šlechtění,
Kamýcká 129, 165 00 Praha

Oponenti:

1) Odborník z daného oboru: Ing. Veronika Kýrová, Ph.D.

2) Pracovník státní správy: MVDr. Jana Horňáčková

© VŠCHT Praha, 2025

ISBN 978-80-7592-313-4

OBSAH

1.	CÍL METODIKY.....	4
2.	SOUČASNÝ STAV SLEDOVANÉ PROBLEMATIKY.....	6
3.	VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	7
3.1	Princip metody PCR.....	7
3.2	Pracovní postup	8
3.2.1	Schematické znázornění metodiky	8
3.2.2	Izolace DNA ze vzorků	8
3.2.3	Kvalitativní a kvantitativní stanovení izolované DNA	11
3.2.4	Provedení druhově specifické PCR.....	15
3.3	Analýza dat.....	22
3.3.1	Vyhodnocení PCR	22
3.3.2	Vyhodnocení qPCR	23
3.4	Pracovní charakteristiky metody.....	24
3.4.1	Výtěžnost izolace DNA.....	24
3.4.2	Specifická, citlivost a účinnost PCR metody	24
3.4.3	Analýza rizik	25
4.	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	27
5.	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	28
6.	EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	29
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	31
8.	SEZNAM ZDROJŮ OBRÁZKŮ.....	32
9.	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE.....	33
10.	PŘÍLOHY.....	35

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je vývoj souboru metod pro autentizaci komerčně významných druhů hmyzu, schválených Evropskou komisí jako krmivo a potravinová novinka, pomocí analýzy DNA. Konkrétně je předkládaná metodika zaměřena na možnost detekce a identifikace DNA těchto druhů hmyzu:

- cvrček domácí (*Acheta domestica*), cvrček dvojskvrnný (*Gryllus bimaculatus*), cvrček krátkokřídý (*Grylloides sigillatus*), cvrček locorojo (*Gryllus locorojo*)¹,
- moucha bráněnka (*Hermetia illucens*),
- potemník brazilský (*Zophobas morio*), potemník moučný (*Tenebrio molitor*), potemník stájový (*Alphitobius diaperinus*),
- saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*), saranče všežravá (*Schistocerca gregaria*),
- šváb argentinský (*Blattella germanica*), šváb diskovitý (*Blaberus discoidalis*), šváb turkistánský (*Shelfordella tartara*).

Vyjmenované druhy se na českém trhu vyskytují především tepelně oprašované, rozemleté na hmyzí moučku nebo jako složka potravinových výrobků či krmiv. Stávají se tak snadno falšovanou komoditou. Dalším cílem proto bylo otestovat navržené protokoly na

¹ Podle článku 3 odstavce 6 nařízení (ES) č. 1069/2009 (nařízení (EU) 2017/893) je v EU povoleno využívat jako krmivo tři druhy cvrčků: cvrčka domácího (*Acheta domestica*), cvrčka banánového (*Gryllus assimilis*) a cvrčka krátkokřídleho (*Grylloides sigillatus*). Žádné jiné zástupce rodu *Gryllus* k 1. 8. 2025 směrnice EU neuvádí. V této souvislosti je nezbytné zmínit studii Weissmana et al. (2012), která upozorňuje na možné chybné taxonomické zařazení jednoho z druhů cvrčků introdukovaných do Evropy. Jedná se o druh *Gryllus locorojo*, který je v Evropě chybně označován jako *Gryllus assimilis*. Weissman et al. (2012) hypotézu o této záměně podkládá řadou důkazů, včetně molekulárně-genetických analýz. V této certifikované metodice se přikláníme k jeho závěrům, a to na základě námi provedených molekulárních analýz několika chovů „cvrčka banánového“ v České republice. Molekulární analýza jednoznačně potvrdila, že všechny analyzované chovy „cvrčka banánového“ vykazovaly 100% sekvenční identitu s *Gryllus locorojo*. Analýza byla provedena stejně jako ve studii Weissman et al. (2012) na základě sekvenace části genu pro 16S ribozomální RNA (viz. Příloha I).

1. Weissman, D. B.; Gray, D. A.; Pham, H. T.; Tijssen, P., Billions and billions sold: pet-feeder crickets (Orthoptera: Gryllidae), commercial cricket farms, an epizootic densovirus, and government regulations make for a potential disaster. *Zootaxa* **2012**, 3504 (1), 67-88.

modelových jedno- i více druhových vzorcích a komerčně dostupných výrobcích. Navržená metodika je založena na metodě polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje detekci specifických markerů (krátkých úseků DNA) pro vybraný živočišný druh.

2. SOUČASNÝ STAV SLEDOVANÉ PROBLEMATIKY

Rostoucí poptávka po udržitelných a výživných potravinách vedla k rozšíření produktů obsahujících hmyz na evropském trhu. Uvádění hmyzu a výrobků z něj na trh podléhá přísné legislativě; podle nařízení 2015/2283 je hmyz v EU považován za potraviny nového typu. K počátku roku 2025 byly jako potravina nového typu dosud schváleny čtyři druhy hmyzu: cvrček domácí (*Acheta domestica*), potemník moučný (*Tenebrio molitor*), potemník stájový (*Alphitobius diaperinus*) a saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*). Regulováno je i přidávání hmyzích bílkovin do krmiv pro zvířata²⁻⁴.

S rostoucím počtem produktů na bázi hmyzu narůstá riziko falšování a klamání spotřebitele. Zpracování hmyzu do formy moučky znemožňuje konzumentovi vizuálně identifikovat jeho přítomnost ve výrobku^{5, 6}. Takové suroviny proto zvyšují zranitelnost trhu s jedlým hmyzem vůči falšování, například záměně druhů, používání nepovoleného nebo volně chyceného (nechovaného farmově) hmyzu, náhradě části hmyzí suroviny jinou, obvykle levnější složkou (například rostlinným proteinem), případně nedodržení správných chovatelských postupů^{3, 4, 7}. Jelikož jsou produkty obsahující hmyz na evropském trhu stále dostupnější, je nezbytné vyvinout spolehlivé metody pro autentizaci použitých surovin. Jako perspektivní a efektivní metoda pro odlišení hmyzích druhů se jeví PCR, a to v tradičním end-point provedení zahrnujícím post-PCR detekci prostřednictvím horizontální agarózové elektroforézy, tak i kvantitativní PCR detekující fluorescenci amplifikovaných produktů v reálném čase (qPCR). V minulosti byla metoda PCR úspěšně použita pro detekci, identifikaci a/nebo kvantifikaci DNA mnoha živočišných druhů, včetně analýzy potravin a potravinářských surovin^{8,9}.

K odlišení jednotlivých živočišných druhů se používají krátké, specifické úseky nukleových kyselin nacházejících se v jádře či mitochondriích buňky. Relativně vysoká míra mutací v mitochondriální DNA (mtDNA) ve srovnání s genomovou (gDNA) umožňuje odlišit i blízce příbuzné druhy^{5, 6}. Nevýhodou však může být proměnlivé množství počtu molekul mtDNA v jednotlivých buňkách či tkáních, popřípadě vývojovém stádiu organismu. Naopak gDNA, vyskytující se v buňkách v konstantním množství, má potenciál pro kvantitativní analýzy⁹.

V předkládané metodice jsou pro autentizaci vybraných druhů hmyzu použity úseky jaderné DNA.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 PRINCIP METODY PCR

Molekulárně-biologická metoda PCR slouží k amplifikaci specifických sekvencí DNA charakteristických pro cílový organismus. Detekce amplifikovaných produktů (amplikonů) se provádí elektroforézou na agarózovém gelu, kde dochází k jejich separaci na základě délky, nebo pomocí záznamu fluorescenčního signálu v reálném čase, což umožňuje průběžné sledování amplifikační reakce. Kvantitativní PCR (qPCR) využívá k detekci fluorescenční barvivo přidané do reakční směsi; intenzita naměřené fluorescence umožňuje nejen detekci, ale i kvantitativní stanovení počáteční koncentrace cílové DNA ve vzorku. V obou případech, tedy PCR i qPCR, je také možné využít tzv. mnohonásobného (multiplex) uspořádání, kdy je současně detekováno více cílů v jedné reakci. Toho je dosaženo použitím několika párů primerů, z nichž každý je specifický pro jinou cílovou sekvenci DNA. Nespornou výhodou takového uspořádání je finanční i časová úspora ve srovnání se singletovou PCR.

Při použití multiplexních systémů v PCR musí být délky jednotlivých amplikonů dostatečně rozdílné, aby bylo možné jejich odlišení na agarózovém gelu. Minimální rozdíl v počtu bází závisí například na hustotě gelu či velikosti fragmentů. Limitující může být také citlivost metody. Při qPCR je amplifikace DNA monitorována prostřednictvím fluoroforu přidaného do reakční směsi, například s využitím fluorescenčně značených syntetických oligonukleotidů (sond) komplementárních k části amplifikovaného úseku. Přístroj zaznamenává závislost hodnoty fluorescence na teplotním cyklu, což může být použito pro kvalitativní i kvantitativní analýzy. Díky detekci fluorescenčního signálu je qPCR citlivější než PCR. Velikost produktů v mnohonásobné qPCR (mqPCR) může být shodná, diskriminační je fluorescenční barvivo. Pro odlišení jednotlivých produktů se tak při mqPCR obvykle využívají specifické sondy značené fluorofory, které emitují záření různých vlnových délek¹⁰⁻¹².

3.2 PRACOVNÍ POSTUP

3.2.1 Schematické znázornění metodiky

Analýza DNA v potravinách pomocí PCR je komplexním postupem, který je složen z více navazujících kroků. Na Obr. 1 je znázorněno pracovní schéma pro detekci jedlých a krmných druhů hmyzu. Pracovní postup molekulárně-biologické analýzy vzorku hmyzu zahrnuje především přípravné kroky, jako je evidence, homogenizace a vážení vzorku; dále izolaci DNA a stanovení její kvality a kvantity, ředění DNA na požadovanou koncentraci; provedení PCR a vyhodnocení získaných výsledků.



Obr. 1: Schéma postupu práce multiplexní PCR detekce jedlého a krmného hmyzu

3.2.2 Izolace DNA ze vzorků




Reprezentativní vzorek je podchlazen tekutým dusíkem a homogenizován laboratorním nožovým mlýnkem (A11 Basic Analytical mill, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Germany), případně tyčovým mixérem. Mezi jednotlivými vzorky je mlýnek vždy umyt vodou a alkoholem (methanolem, ethanolem). Takto připravené vzorky jsou rozváženy do mikrozkušavek dle zvoleného izolačního protokolu (viz. dále) a uchovávány v lednici (4 °C), popř. v mrazicím boxu (-20 °C), až do dalšího kroku analýzy – izolace DNA.

DNA ze vzorků hmyzu či potravinových výrobků je možné extrahovat pomocí silikátových kolonek, magnetických kuliček nebo chloroformem v kombinaci s kationtovým surfaktantem (Obr. 2). V prvním uvedeném případě byl, v rámci experimentů provedených při přípravě této metodiky, použit NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Německo) a/nebo DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, USA). NucleoSpin® Tissue Kit byl vhodný zejména pro izolaci DNA z referenčních zástupců entomologicky určených druhů hmyzu; postupováno

bylo dle pokynů výrobce (včetně přídavku RNasy). DNeasy mericon Food Kit byl použit pro analýzu potravin; jeví se jako účinný i pro vzorky obsahující kakao či čokoládu. Pro izolaci DNA bylo postupováno dle standardního protokolu od výrobce, kdy izolace začínala ze čtyř biologických replikátů o navážce 200 mg. Zahrnuty byly pouze tyto modifikace: i) do lyzačního pufru byl přidán polyvinyl pyrrolidon 10 (Duchefa Biochemie, Holandsko), tak aby jeho koncentrace v lyzačním pufru byla 4 %; ii) doba lýze byla prodloužena z 30 na 45 minut. V obou případech bylo izolováno dostatečné množství kvalitní DNA pro navazující kroky analýzy.

Extrakce DNA s využitím magnetických částic byla provedena s pomocí izolátoru croBee® NA16 Nucleic Acid Extraction System (Gene Proof, Česká republika). Ke 200 mg homogenizovaného vzorku byl přidán 1 ml extrakčního pufru (20 g·l⁻¹ CTAB; 1,4M NaCl; 100mM Tris; 20mM EDTA; pH upraveno na 8,0) přehřátého na 65 °C a 20 µl proteinasy K o koncentraci 20 mg·ml⁻¹, směs byla promíchána pomocí vibrační třepačky (vortexu) a poté inkubována přes noc při teplotě 37 °C. Takto připravený vzorek byl centrifugován 15 minut při 14 000 x g. Supernatant (400 µl) byl přenesen do nové mikrozkušavky (vzorková zkumavka croBEE kitu) a spolu s příslušnou kazetou obsahující potřebné roztoky pro izolaci DNA byl vložen do automatického izolátoru dle pokynů výrobce. Pro izolaci byl zvolen protokol 201 a eluční objem 100 µl.

Poslední ověřený protokol, tedy použití CTAB pufru v kombinaci s chloroformovou extrakcí, je tradičním přístupem pro izolaci DNA. Ke 200 mg homogenizovaného vzorku je přidáno 650 µl extrakčního pufru (20 g·l⁻¹ CTAB; 1,4M NaCl; 100mM Tris; 20mM EDTA; pH upraveno na 8,0) a 20 µl proteinasy K (koncentrace 20 mg·ml⁻¹). Směs je inkubována přes noc při 37 °C (popř. 1 hod při 65 °C) za stálého míchání a poté centrifugována při 12 000 x g 10 minut. Supernatant (650 µl) je přenesen do nové mikrozkušavky obsahující 550 µl chloroformu, promíchán a centrifugován (12 000 x g 10 min). Po centrifugaci je převedeno 630 µl vodné fáze obsahující DNA do nové mikrozkušavky obsahující 1260 µl precipitačního pufru (5 g·l⁻¹ CTAB; 40mM NaCl). Roztok je inkubován při laboratorní teplotě po dobu 60 minut a poté centrifugován (12 000 x g 10 min). Supernatant je odstraněn a vzniklý

	 Komerční kolonkový kit <i>Rychlá rutinní analýza</i>	 croBEE® NA16 <i>Automatizace extrakce</i>	 CTAB + chloroform <i>Tradiční, levný přístup</i>
Obecný princip	<ul style="list-style-type: none"> • selektivní sorpce DNA na silikátové částice v prostředí chaotropních solí • extrakce na pevné fázi 	<ul style="list-style-type: none"> • vazba DNA k povrchově modifikovaným magnetickým částicím (v přítomnosti PEG, solí) • extrakce na pevné fázi 	<ul style="list-style-type: none"> • kationtový detergent (CTAB) zajišťuje buněčnou lyzi • komplex CTAB-DNA je rozpustný při vysoké koncentraci solí • organická extrakce (chloroform); DNA následně srážena alkoholem
Výtěžnost a kvalita DNA	<ul style="list-style-type: none"> • u degradovaných nebo komplexních matric může být nižší výtěžnost • omezená kapacita vazby DNA na koloně • standardizace kitů - reprodukovatelná čistota DNA 	<ul style="list-style-type: none"> • u komplexních matric může být nižší výtěžnost • doporučené zařazení extra lyzačního kroku (např. pro rozbití kutikuly) • simultánní izolace nukleových kyselin - nutný přídavek RNAsy • metoda šetrná k DNA (nízké riziko fragmentace) 	<ul style="list-style-type: none"> • vysoký výtěžek i z degradovaných či komplexních matric, z kutikul • čistota DNA proměnlivá (nutná RNAsa a čistící kroky) • vysoký potenciál pro odstranění kontaminantů (např. polysacharidů, melaninu, lipidů, proteinů, RNA), pokud se důkladně dodrží postup
Náročnost provedení	<ul style="list-style-type: none"> • rychlé (30 – 100 min), snadno proveditelné • omezená možnost automatizace • vyšší cena (komerční kit) 	<ul style="list-style-type: none"> • rychlá metoda (lýze buněk + 60 min izolace) • flexibilní objem vzorku • automatizace procesu extrakce DNA • vyšší cena (izolátor, kazety s chemikáliemi) 	<ul style="list-style-type: none"> • pracný, časově náročnější protokol (> 3 h) • vysoká flexibilita - vhodné pro různé typy tkání, snadno upravitelný protokol pro odlišné vstupní množství vzorku • použití toxických chemikálií (chloroform) • nízká cena na vzorek

Obr. 2: Porovnání testovaných metod extrakce DNA. Z komerčních kitů využívajících silikátové kolonky byly vybrány NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Německo) a DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, USA)

precipitát rozpuštěn v 700 μ l 1,2 M roztoku NaCl. Po přidání 700 μ l chloroformu a důkladném protřepání je provedena centrifugace (12 000 x g 10 min). Vodná fáze obsahující nukleové kyseliny je přenesena do nové mikrozkušavky. K této frakci je přidáno 400 μ l isopropanolu, směs je promíchána a inkubována při laboratorní teplotě 20 minut. Následnou centrifugací vzniká peleta DNA, která je promyta 500 μ l 70% ethanolu. Po opětovné centrifugaci a odstranění supernatantu je peleta DNA inkubována 20 minut při teplotě 37 °C kvůli vysušení zbytků ethanolu. Peleta je poté resuspendována ve 100 μ l vody zbavené nukleas (NFW).

3.2.3 Kvalitativní a kvantitativní stanovení izolované DNA

Kontrola integrity a čistoty izolované DNA ze vzorku je prováděna pomocí horizontální agarózové elektroforézy; kvantita izolované DNA je stanovována fluorimetricky, případně spektrofotometricky. Amplifikovatelnost izolované DNA byla ověřena s pomocí univerzálních primerů (Tab. I).

3.2.3.1 Stanovení kvality izolované DNA pomocí horizontální agarózové elektroforézy

Za účelem ověření kvality a integrity DNA bylo nanášeno 10 μ l izolátu smíchaného s 2 μ l nanášecího barviva (Blue/Orange Loading Dye, 6x) do 1% agarózového gelu v prostředí TBE pufru (1x). Pro porovnání velikostí izolovaných nukleových kyselin (NK) je použit hmotnostní standard (Lambda DNA/HindIII) – směs fragmentů o známé délce, tzv. marker. Ke zviditelnění NK bylo k agarózové suspenzi přidáno interkalační barvivo Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe, Německo); k vizualizaci je využito UV záření a dokumentace je provedena pomocí digitálního fotodokumentačního přístroje.

Během elektroforézy dochází k separaci molekul NK na základě jejich délky a konformace. V ideálním případě je nedegradovaná genomová DNA eukaryotních organismů viditelná jako ostrý pruh (band) o délce větší než 23 kbp, zatímco RNA se zobrazuje jako dva bandy (28S:18S v poměru přibližně 2:1) obvykle kratší než 6 kbp. V případě degradace NK dochází k rozostření těchto bandů a vzniká tzv. smír, který svědčí o přítomnosti fragmentů různých délek.

V souvislosti s analýzou potravinářských výrobků je třeba zdůraznit, že fragmentace DNA je běžným jevem v závislosti na typu suroviny a použité technologii zpracování. Intaktní vysokomolekulární DNA se u takových vzorků zpravidla nevyskytuje. Elektroforetická analýza proto slouží pouze k orientačnímu posouzení míry fragmentace celkové DNA ve vzorku a nelze z ní vyvozovat závěry o kvalitě DNA konkrétních složek (např. hmyzí DNA) – elektroforeogram poskytuje pouze souhrnný obraz extrahované nukleové kyseliny ze všech přítomných složek.

3.2.3.2 Fluorimetrické stanovení kvantity DNA

Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA v izolátu je odvozeno z Lambert-Beerova zákona. Vztah pro výpočet koncentrace vyjadřuje rovnice (1):

$$I_f = I_0 * Q_f * (1 - 10^{-\varepsilon * c * l}) \quad \text{rovnice (1),}$$

kde I_f značí intenzitu fluorescence a I_0 původní intenzitu fluorescence, Q_f kvantový výtěžek fluorescence, ε absorpční koeficient, c koncentraci a l délku kyvety.

Pro každou látku jsou charakteristické dvě vlnové délky – excitační a emisní, díky čemuž lze fluorimetrii využít pro stanovení koncentrace měřené látky i v komplexních směsích. Oproti často používané spektrofotometrii je fluorimetrie selektivnější metodou.

V předkládané metodice bylo měření koncentrace DNA provedeno s využitím fluorimetru Quantus (Promega, USA) a kitu QuantiFluor® dsDNA System (Promega, USA). Postupováno bylo dle pokynů výrobce.

3.2.3.3 Spektrofotometrické stanovení kvantity DNA

Spektrofotometrická kvantifikace NK vychází z Lambert-Beerova zákona, přičemž je založena na měření poklesu intenzity elektromagnetického záření procházejícího vzorkem. NK absorbují ultrafialové (UV) záření díky přítomnosti aromatických bází (adenin, guanin, cytosin, thymin/uracil); molekuly DNA silně absorbují elektromagnetické záření vlnové délky 260 nm, bílkoviny při 280 nm. Pokles intenzity je tedy tím větší, čím je roztok

koncentrovanější. Samotné stanovení koncentrace na základě absorbance při 260 nm však není specifické, protože při této vlnové délce mohou absorbovat i jiné látky. Proto jsou proměřovány také vlnové délky 230 nm, kde mají absorpční maximum například organické kontaminanty, zejména fenol, nebo polysacharidy, a 320 nm, při níž je měřena absorbance pozadí, která se odečítá od všech naměřených hodnot. Vypočtením poměru absorbancí při uvedených vlnových délkách (230, 260, 280 nm) je možné stanovit čistotu DNA; žádaný poměr A260/A280 pro DNA je roven 1,8 (čisté proteiny mají poměr roven 0,6; čisté RNA odpovídá poměr 2,0), poměr A260/A230 by měl být pro čistou DNA v rozmezí 2,0 - 2,2.

Při vyhodnocení naměřených dat je nutné mít na paměti, že při extrakci DNA z potravin se získává DNA ze všech rostlinných i živočišných složek výrobku. Výsledná výtěžnost DNA u vícesložkových potravin tak neodráží množství hmyzí DNA ve vzorku a nemá přímou vypovídací hodnotu ve vztahu k její detekovatelnosti; hmyzí DNA často představuje pouze malý podíl celkové DNA.

3.2.3.4 *Ověření amplifikovatelnosti DNA s využitím univerzální PCR*

Univerzální PCR byla navržena za účelem vyloučení falešně negativních výsledků amplifikace. Navrženy byly dva systémy kontrol:

- i) interní kontrola (IC), kdy je do reakce přidán synteticky připravený úsek DNA a k němu komplementární oligonukleotidy;
- ii) systém detekující rostlinnou či živočišnou DNA pomocí univerzálních primerů.

Vzhledem k tomu, že většina vícesložkových potravin s obsahem hmyzu zároveň zahrnuje i suroviny rostlinného původu, doporučujeme pro druhý kontrolní systém založený na univerzálních primerech využít primery Universal-Act komplementární ke genomové DNA rostlin (část genu pro aktin - *Act*, upraveno dle Laube et al.¹³) nebo Universal-PsbA cílené na část genu pro protein D1 - *PsbA* v chloroplastové DNA. Pro PCR s využitím Universal-PsbA a Universal-Act bylo dodrženo doporučené složení SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad, USA), koncentrace každého primeru v reakci byla 250 nM. Teplotní cyklus

byl shodný s modulem F (viz. Tab. IV). S pomocí primerů Universal-PsbA byla detekována rostlinná DNA z krmiva hmyzu i u vyláčených jedinců.

Pro ověření amplifikovatelnosti DNA u masných výrobků, např. sekaná nebo burger s přídavkem hmyzu, byl v rámci přípravy metodiky verifikován také protokol podle Laube et al.¹⁴ detekující část genu pro myostatin (*My*) u savců a drůbeže.

Sekvence všech použitých oligonukleotidů jsou uvedené v Tab. I; sekvence syntetické DNA přidávané do reakce při využití IC je převzata z práce Zdeňková et al.¹⁵. Složení reakční směsi a teplotní profil reakce v případě použití IC rovněž odpovídají podmínkám popsaným Zdeňkovou et al.¹⁵.

Tab. I: Oligonukleotidy použité pro ověření amplifikovatelnosti izolované DNA

Název - gen	Sekvence (směr: 5´-3´)		Délka produktu (bp)
IC	Forward	ACAAC TTTCCCCGAGAAGC	196
	Reverse	ACAACATCACAGTTTAAGTTTTGC	
	Sonda	Cy5 - TGCTCTCTATGACAGCTGTCTCGTC	
Universal-PsbA	Forward	ATTCCTGAGGAGGTTCTACCMCG	104
	Reverse	ATTYCCVGCCACCAAGCRAA	
Universal-Act	Forward	CAAGCAGCATGAAGATCAAGGT	~103
	Reverse	CACATCTGTTGGAAAGTGCTGAG	
Universal-My	Forward	TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT	97
	Reverse	ATACCAGTGCCTGGGTTTCAT	

Výsledky amplifikace u obou kontrolních systémů umožňují stanovit přítomnost inhibitorů, například melaninu nebo polyfenolů, které mohou bránit průběhu PCR. Použití univerzálních primerů navíc slouží jako kontrola kvality analyzované DNA - pomáhá odlišit, zda absence amplikonu (popř. fluorescenčního signálu) u druhově specifické PCR není způsobena enormní degradací DNA v potravíně, respektive analyzovaném vzorku. V tomto případě je důležité, aby velikost amplikonu definovaná univerzálními primery byla shodná nebo větší než velikost cílového markeru detekovaného druhově specifickou PCR.

3.2.4 Provedení druhově specifické PCR

Pro potřeby confirmace a/nebo vyloučení vybraných druhů hmyzu metodou PCR bylo připraveno 7 multiplexních modulů, přičemž:

- **moduly A – E** jsou navrženy pro PCR s koncovou detekcí na agarózovém gelu (end-point PCR) a kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR) s analýzou křivek tání,
- **moduly F – G** jsou navrženy pro kvantitativní PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR) v uspořádání s fluorescenčně značenou sondou, což umožňuje kvantifikovat DNA cílového druhu.

Přehled využití modulů A – G pro stanovení jednotlivých druhů hmyzu je uveden na Obr. 3. Sekvence oligonukleotidů použitých v jednotlivých modulech jsou uvedeny v Tab. II a III. Pro amplifikaci jednotlivých druhů hmyzu byly vybrány specifické úseky genomové DNA. Složení reakčních směsí a teplotní profily jsou uvedeny v Tab. IV. Reakční podmínky pro PCR byly navrženy a optimalizovány při vypracování metodiky.

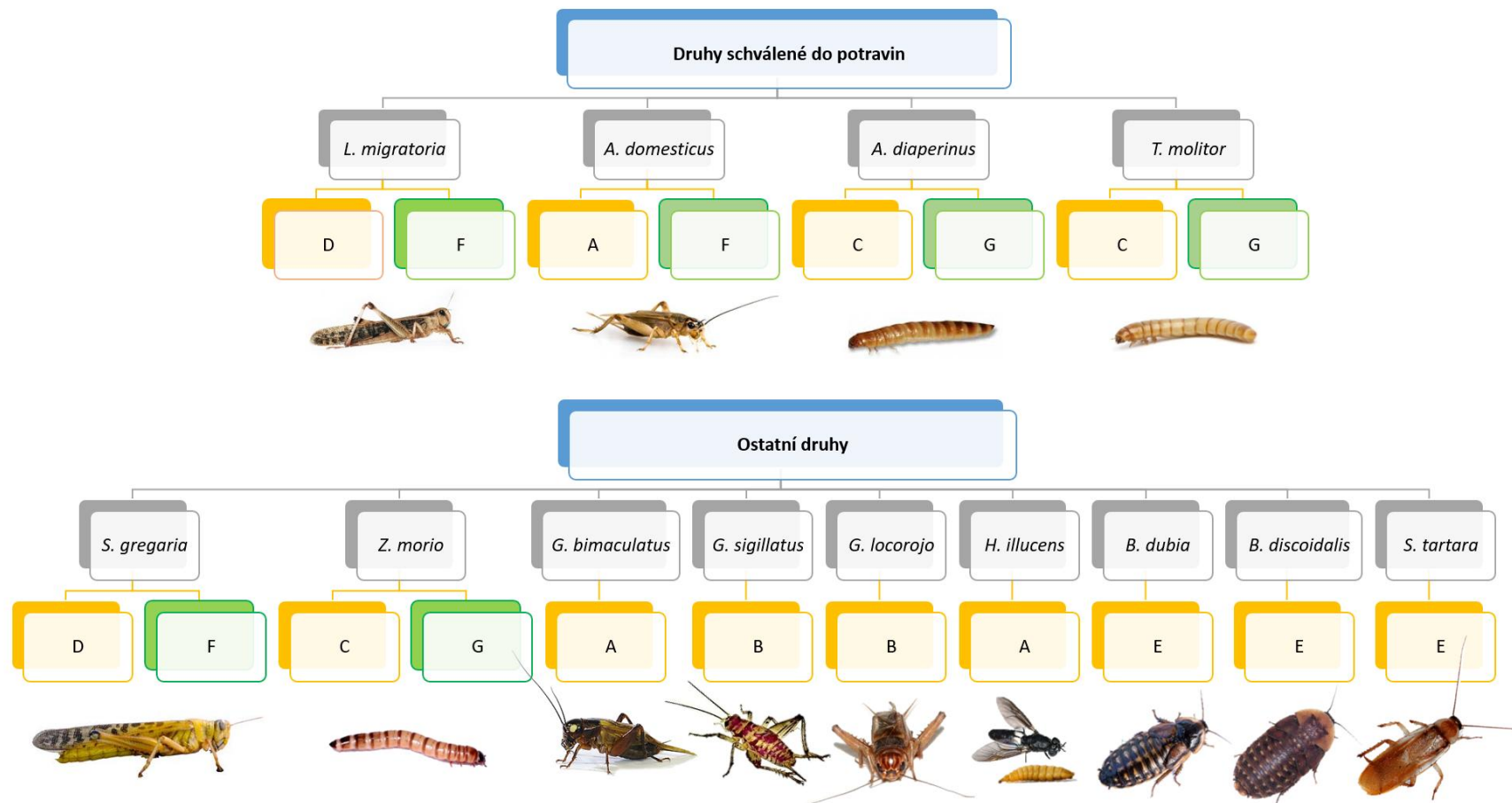
Pro ověření správného průběhu amplifikace byly do PCR, kromě analyzovaných vzorků, zahrnuty tyto druhy kontrol:

- **pozitivní kontrola** – s přidavkem cílové DNA pro daný modul,
- **negativní kontrola** – s přidavkem jiné než cílové DNA pro daný modul,
- **beztemplátová kontrola** – bez přidavku DNA do reakce.

Pozitivní a beztemplátová kontrola by měly být součástí každé analýzy vzorků, aby bylo verifikováno správné provedení PCR a minimalizováno riziko zisku falešných výsledků.

Pro ověření specifity nově navržených PCR markerů byla dále provedena analýza těchto necílových biologických druhů: bourec morušový (*Bombyx mori*), bzučivka zelená (*Lucilia sericata*), šváb (*Blaberus giganteus*), zavíječ voskový (*Galleria mellonella*), člověk moudrý (*Homo sapiens*), prase domácí (*Sus domesticus*), skot domácí (*Bos taurus*), kachna domácí (*Anas platyrhynchos*), krocan domácí (*Meleagris gallopavo*), kur domácí (*Gallus*

gallus), kapr obecný (*Cyprinus carpio*), hrách setý (*Pisum sativum*), jabloň domácí (*Malus domestica*), ječmen setý (*Hordeum vulgare*), kukuřice setá (*Zea mays*), lilek brambor (*Solanum tuberosum*), mrkev obecná (*Daucus carota*), oves setý (*Avena sativa*), pšenice obecná (*Triticum aestivum*), rýže setá (*Oryza sativa*) a sója luštinatá (*Glycine max*).



Obr. 3: Schematický přehled PCR detekce vybraných druhů hmyzu s využitím modulů A – F. Oranžové podbarvení modulů (A - E) značí metodu end-point PCR, případně qPCR s analýzou křivek tání; zelené podbarvení modulů (F, G) značí metodu qPCR s využitím sond

Tab. II: Sekvence primerů využitých pro multiplexní PCR (modul A-E) a očekávané délky produktů ampliconů

Modul	Detekovaný druh hmyzu	Gen**	Sekvence (směr: 5'-3')		Délka produktu (bp)	Tm (°C)
			Forward primer	Reverse primer		
A	<i>A. domesticus</i>	<i>dhr</i>	AACTGAATCCATGATGTGTGTACCCA	TCACCATACTGTAGCATAGCGAGGA	128	79
	<i>G. bimaculatus</i>	<i>dhr</i>	CTAGTGCCTTAGTGCGTGGGGA	CTATTTTCGGGACCATAAGCAGCGT	91	80
	<i>H. illucens*</i>	<i>pdc6</i>	TGTA AACGACGCCAGTTCAGGATTCGGTGC TCTGTGGAA	CAGGAAACAGCTATGACCCGTCAGTGCAGTTT TCAGCTCGTT	151	83
B	<i>G. locorojo / G. assimilis</i>	<i>jhe</i>	GCACGCTCCTCTTCCTTGCTAT	TGCAAATACGGGTGAGAAAGTACG	72	78
	<i>G. sigilatus</i>	<i>MyD88</i>	AGTTTTGTACCTGGGTGTGTTCAAGA	ACACACACAATACACAACATTTACAGAAGT	160	78
C	<i>T. molitor</i>	<i>cad1</i>	ATGGCTGTCTTGTGTTAGGAGTTG	ATTGTCAACTTGCTGGATTACGAA	97	82,5
	<i>Z. morio</i>	<i>cad1</i>	AAAATCAAAAGGGGCTAACCTACC	CAACAATCCAGTTTTCTGGTCAAG	140	81,5
	<i>A. diaperinus</i>	<i>cad1</i>	CCAAGTGACTCTCATTCAGGA	AGTTCACCTAAGTCAGCAGTGTTC	117	80
D	<i>L. migratoria</i>	<i>spir</i>	ACCCAGGGTAATATTGTGTAAGTGG	TTAGTTGTCAGCCTTCAATTTTCTAAA	100	78
	<i>S. gregaria</i>	<i>spir</i>	GAGATAATTGTTGAAGAGTACACAATCA	GATCAAAGTGGCAAATTTG	244	79,5
E	<i>B. dubia</i>	N	GAAGGGTAGGTGACAAGTGAGGCT	CAAGGTGCTTCATGGGGTCGTTT	129	83
	<i>S. tartara</i>	N	ATCACTAGCCGTACCCGTGAGTTC	ACGAATGTTTCTGGATTAACGTCG	96	78
	<i>B. discoidalis</i>	N	CGGCAGTTGTTACTCATTGAGGC	ACTCGAAAACAAGAAGGCAGGCG	187	83,5

*Podtržené části primerů značí M13 konce. **Jaderný gen pro: receptor pro diuretický hormon (*dhr*); protein 6 programované buněčné smrti (*pdc6*); receptor pro esterázu juvenilního hormonu (*jhe*), protein primární odpovědi při myeloidní diferenciaci (*MyD88*); kadherin (*cad1*); aktin-nukleární protein Spire (*spir*). N = neanotovaná sekvence (SRR7609482; SRR17333418; pro *B. discoidalis* byl použit náhodný druhově specifický fragment DNA).

Tab. III: Sekvence primerů a sond využitých pro multiplex qPCR (modul F-G)

Modul	Detekovaný druh hmyzu	Gen*	Sekvence (směr: 5'-3')		
			Forward primer	Reverse primer	Fluorofor - Sonda
F	<i>L. migratoria</i>	N	ACCCAGGGTAATATTGTGTAAGTGG	TTAGTTGTCAGCCTTCAATTTTCTAAA	HEX - CCCAATCATTCTCTATCATCCCAAGCATG
	<i>S. gregaria</i>	<i>spir</i>	GAGATAATTGTTGAAGAGTACACAATCA	GATCAAAGTGTGGCAAAGTATTTG	FAM - TGCAACAGAGAGATTCAGGCACTTTGC
	<i>A. domesticus</i>	N	AACTGAATCCATGATGTGTGTACCCA	TCACCATACTGTAGCATAGCGAG	ROX - CGCGGATTTTAAAACAGAAAATTTGAGA ACGCATTG
G	<i>A. diaperinus</i>	<i>cad1</i>	CCAAGTGAAGTCTCATCATTGAGGA	AGTTCACCTAAGTCAGCAGTGTTTTTC	Cy5 – CATACCAGAGATCACTACGAAAGATGGC TCTA
	<i>T. molitor</i>	<i>cad1</i>	ATGGCTGTCTTGTGTTAGGAGTTG	ATTGTCAACTTGCTGGATTACGAA	FAM - TGGCCACAAGCACGCTGTCC
	<i>Z. morio</i>	<i>cad1</i>	AAAATCAAAGGGGCTAACCTACC	CAACAATCCAGTTTTCTGGTCAAG	HEX - CGGACAAAGACCTTCTGATGACCTACC

* Jaderný gen pro aktin-nukleární protein Spire (*spir*) a kadherin (*cad1*); N = neanotovaná sekvence (náhodný druhově specifický fragment DNA).

Tab. IV: Přehled doporučeného složení reakčních směsí a teplotních cyklů pro jednotlivé moduly. Uvedené podmínky platí pro cykly, na nichž byly ověřeny: CFX Connect Real-Time PCR (Bio-Rad, USA) pro moduly A – E, QuantStudio 5 (Applied Biosystems, USA) pro moduly F-G

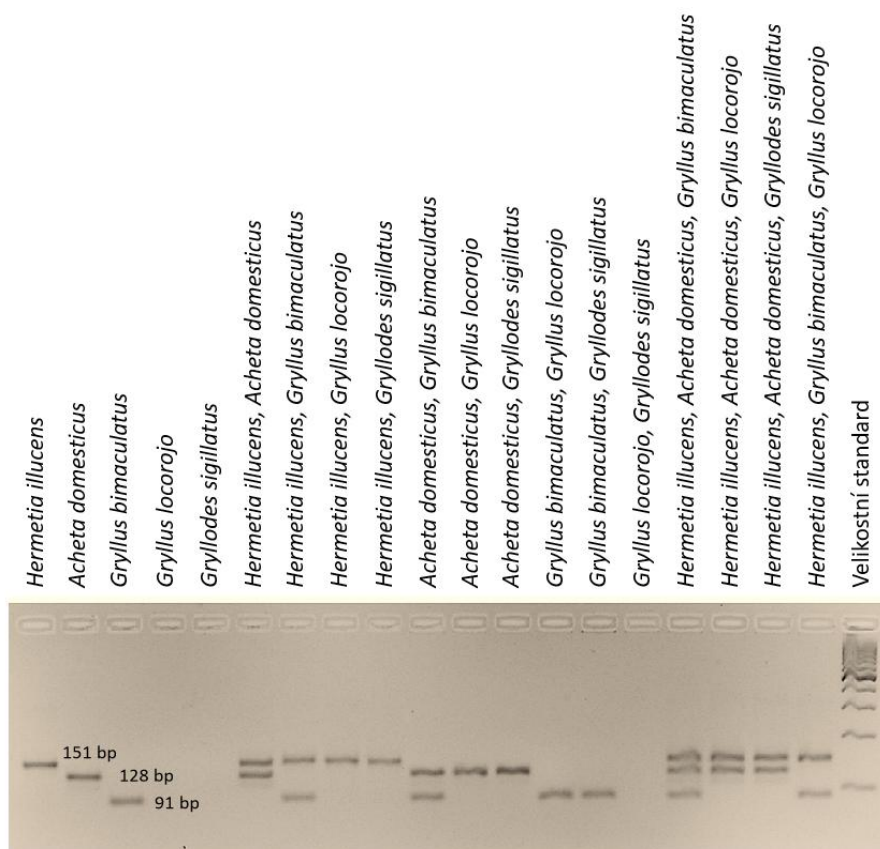
Modul	Detekovaný druh	Složení reakční směsi	Teplotní profil
A	<i>A. domesticus</i> , <i>G. bimaculatus</i> , <i>H. illucens</i>	<ul style="list-style-type: none"> SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix: 1x Primery: Ado: 0,2 μM Gbi: 0,15 μM Hi: 0,125 μM DNA: 40 ng NFW: do celkového objemu 10 μl 	<ul style="list-style-type: none"> Počáteční denaturace: 98 °C - 180 s 30 amplifikačních cyklů: 98 °C - 15 s, 68 °C - 25 s Pro analýzu teploty tání (T_m) byla teplota zvyšována z 65 na 95 °C v přírůstcích po 0,5 °C/s.
B	<i>G. locorojo</i> , <i>G. sigilatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix: 1x Primery: Gas: 0,25 μM Gsi: 0,075 μM DNA: 40 ng NFW: do celkového objemu 10 μl 	<ul style="list-style-type: none"> Počáteční denaturace: 98 °C - 180 s 30 amplifikačních cyklů: 98 °C - 15 s, 62 °C - 25 s Pro analýzu T_m byla teplota zvyšována z 65 na 95 °C v přírůstcích po 0,5 °C/s.
C	<i>A. diaperinus</i> , <i>T. molitor</i> , <i>Z. morio</i>	<ul style="list-style-type: none"> SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix: 1x Primery: každý 0,25 μM DNA: 40 ng NFW: do celkového objemu 10 μl 	<ul style="list-style-type: none"> Počáteční denaturace: 98 °C - 180 s 30 amplifikačních cyklů: 98 °C - 15 s, 65 °C - 25 s Pro analýzu T_m byla teplota zvyšována z 65 na 95 °C v přírůstcích po 0,5 °C/s.

D	<i>L. migratoria</i> , <i>S. gregaria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix: 1x • Primery: každý 0,25 μM • DNA: 40 ng • NFW: do celkového objemu 10 μl 	<ul style="list-style-type: none"> • Počáteční denaturace: 98 °C - 180 s 30 amplifikačních cyklů: 98 °C - 15 s, 65 °C - 35 s • Pro analýzu T_m byla teplota zvyšována z 65 na 95 °C v přírůstcích po 0,5 °C/s.
E	<i>B. dubia</i> , <i>S. tartara</i> , <i>B. discoidalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix: 1x • Primery: každý 0,25 μM • DNA: 40 ng • NFW: do celkového objemu 10 μl 	<ul style="list-style-type: none"> • Počáteční denaturace: 98 °C - 180 s 30 amplifikačních cyklů: 98 °C - 15 s, 68 °C - 35 s • Pro analýzu T_m byla teplota zvyšována z 65 na 95 °C v přírůstcích po 0,5 °C/s.
F	<i>L. migratoria</i> , <i>S. gregaria</i> , <i>A. domesticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • SensiFAST Probe No-ROX Kit (Bioline): 1x, • Primery: 0,25 μM každý, • Sondy: 0,20 μM každá, • DNA: doporučeno 50 ng, • NFW: do celkového objemu 20 μl 	<ul style="list-style-type: none"> • Počáteční denaturace: 95 °C - 3 min, 30 amplifikačních cyklů: 95 °C - 15 s, 60 °C - 45 s • Snímání fluorescence po každém cyklu
G	<i>A. diaperinus</i> , <i>T. molitor</i> , <i>Z. morio</i>	<ul style="list-style-type: none"> • SensiFAST Probe No-ROX Kit (Bioline): 1x, • Primery: 0,25 μM každý, • Sondy: 0,20 μM každá, • DNA: doporučeno 50 ng, • NFW: do celkového objemu 20 μl 	<ul style="list-style-type: none"> • Počáteční denaturace: 95 °C - 5 min, 30 amplifikačních cyklů: 95 °C - 10 s, 62 °C - 40 s • Snímání fluorescence po každém cyklu.

3.3 ANALÝZA DAT

3.3.1 Vyhodnocení PCR

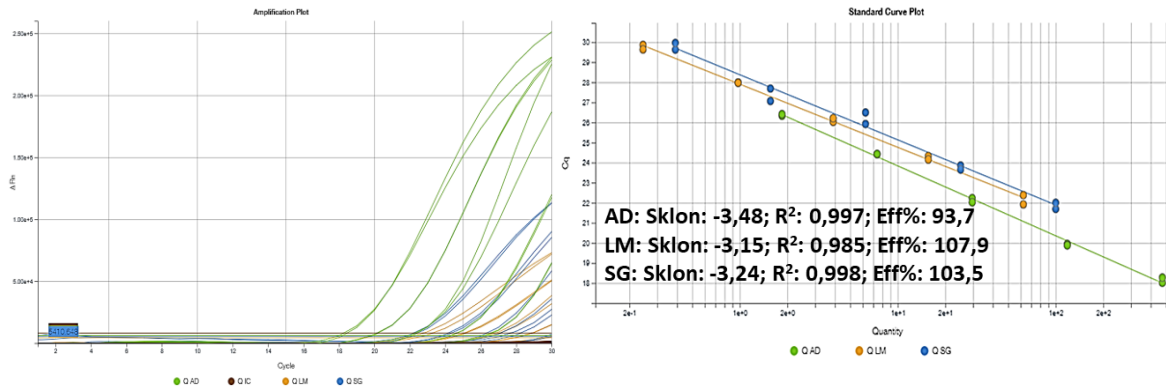
Metoda PCR poskytuje kvalitativní stanovení druhů ve vzorku. Potvrzuje tedy přítomnost nebo absenci výše vyjmenovaných druhů hmyzu. Úspěšnost amplifikace cílového úseku DNA je u tradiční (end-point) PCR ověřena elektroforeticky na agarózovém gelu, kdy jsou elektroforeticky rozdělené PCR produkty podle velikosti. Velikost amplifikovaných fragmentů je porovnávána s velikostním standardem (markerem) a očekávanou velikostí produktů (viz. Obr. 4). Přítomnost specifických pruhů (bandů) odpovídající očekávané délce potvrzuje úspěšnou amplifikaci cílové DNA. Naopak nepřítomnost těchto pruhů nebo nespecifické amplifikace (více pruhů či jiná než očekávaná velikost) je vyhodnocena jako negativní nebo nespecifická reakce. V případě positivity negativní či beztemplátové kontroly nebo negativity pozitivních kontrol je nutné analýzu opakovat. Pro vyhodnocení jsou používány minimálně dvě nezávislé analýzy (paralely) zahrnující izolaci DNA i PCR amplifikaci vzorku.



Obr. 4: Ukázka výsledků end-point PCR – test modulu A na vzorcích obsahujících různé druhy hmyzu

3.3.2 Vyhodnocení qPCR

U kvantitativní qPCR je detekován fluorescenční signál, což umožňuje záznam amplifikační křivky (Obr. 5). Získaná data jsou analyzována pomocí tzv. prahových hodnot (Ct – threshold cycle). Ct hodnoty jsou automaticky stanoveny softwarovým nástrojem zařízení; jejich nastavení je zkontrolováno pracovníkem a případně upraveno. Nižší Ct hodnota značí vyšší množství výchozí cílové DNA. Vzorky s Ct nad stanovenou mezní hodnotou ($Ct > 30$) jsou považovány za negativní nebo mimo detekční limit metody. Kvantitativní stanovení je možné provést s využitím standardní křivky vytvořené z ředění cílové DNA známé koncentrace. Efektivita amplifikace (E) a korelační koeficient (R^2) musí být vyhodnoceny pro kontrolu kvality měření, přičemž je vyžadováno E v rozsahu 90 – 110 % a $R^2 \geq 0,98$. Stejně jako u PCR s koncovou detekcí na agarózovém gelu i zde platí, že v případě positivity negativní či beztemplátové kontroly nebo negativy pozitivních kontrol je nutné analýzu opakovat. Analýzu je doporučeno provádět alespoň ve dvou nezávislých stanoveních.



Obr. 5: Ukázka výsledků mqPCR sarančat a cvrčka domácího. Vlevo: identifikace dvou druhů sarančat a cvrčka domácího s využitím fluorescenčních sond. Vpravo: ukázka kalibračních křivek. Zelené křivky = *A. domesticus*, oranžové = *L. migratoria*, modré = *S. gregaria*

3.4 PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY METODY

3.4.1 Výtěžnost izolace DNA

Kvalita DNA ovlivňuje účinnost PCR i následnou analýzu. Kvalitu DNA lze stanovit na základě délky fragmentů, tj. míry jejího poškození, čistoty a (ne)přítomnosti inhibitorů reakce. K degradaci DNA, tedy jejímu rozpadu na menší fragmenty, může docházet například vlivem vyšších teplot, pH, mechanického poškození nebo působením enzymů či chemikálií¹⁶. V důsledku degradace může dojít ke snížení počtu amplifikovatelných molekul.

3.4.2 Specifita, citlivost a účinnost PCR metody

Metoda PCR umožňuje amplifikaci úseku DNA specifického pro cílový živočišný druh. Selektivita metody je určena rozlišovací schopností použitých oligonukleotidů (primerů, popř. sond). Primery a sondy použité v předkládané metodice byly nejprve ověřené *in silico* analýzou v dostupných databázích (NCBI, ENA, UniProt). Následně byla specifita navržených oligonukleotidů ověřena i experimentálně, a to s využitím DNA izolované z rostlinných a živočišných druhů běžně využívaných v potravinářském a krmivářském průmyslu a ze směsných vzorků obsahujících cílovou i necílovou DNA (modelové směsi i reálné potravinové výrobky).

Pro jednotlivé moduly PCR byly stanoveny limity detekce (LOD), tedy nejnižší koncentrace nebo množství analytu, které lze za uvedených podmínek spolehlivě detekovat. V případě modulů A-G bylo pro jednosložkové výrobky (např. smažený a grilovaný celý hmyz, 100% hmyzí moučka) stanoveno LOD na 20 ng DNA v reakci, pro vícesložkové výrobky (deklarovaný obsah hmyzí složky obvykle 3 – 5 %) pak 80 ng celkové DNA. Pro modul F byl proveden odhad limitu detekce s DNA z jedinců hmyzu, kdy pro *L. migratoria* byla stanovena hodnota 0,24 ng v reakci (přibližně 40 kopií HGE), pro *S. gregaria* 0,39 ng v reakci (přibližně 40 kopií HGE) a pro *A. domesticus* 0,19 ng v reakci (přibližně 100 kopií HGE). Pro modul G pak bylo stanoveno LOD na 1,56 ng DNA v reakci (tj. přibližně 5570 kopií HGE pro *A. diaperinus* a *T. molitor*; 2600 kopií pro *Z. morio*). V případě potřeby nižšího LOD je u modulu G možné navýšit počet amplifikačních cyklů na 35; v tomto případě je limitní hodnota stanovena na

0,39 ng DNA v reakci. Hodnoty velikostí HGE (syn. C-hodnota) byly přebrány z Animal Genome Size Database (Release 2.0)¹⁷ a nebo vypočteny na základě velikosti genomu uvedených v databázi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Výpočty byly prováděny s následujícími hodnotami: *L. migratoria* – 6,27 pg/HGE; *S. gregaria* – 8,96 pg/HGE; *A. domesticus* – 2 pg/HGE; *A. diaperinus* – 0,28 pg/HGE; *T. molitor* – 0,28 pg/HGE; *Z. morio* – 0,60 pg/HGE.

Efektivita amplifikace v qPCR byla u obou modulů (F, G) v požadovaném rozmezí 90 – 110 %, hodnoty koeficientu determinace (R^2) byly vyšší než 0,98.

Výrobky obsahující kakao, čokoládu, kávu fermentovaný černý čaj a některé koření, jako je například skořice, mohou významně inhibovat aktivitu DNA polymeráz a ovlivnit tak citlivost a účinnost navržených PCR metod.

3.4.3 Analýza rizik

V průběhu vývoje a optimalizace metody byly identifikovány části pracovního postupu, které mohou mít vliv na výsledek stanovení metodou PCR. Jedná se o operace související s přípravou vzorku pro izolaci DNA i samotnou amplifikaci.

3.4.3.1 Izolace DNA

Shledaná rizika:

- Před izolací DNA je nutné provést homogenizaci testovaného vzorku, která může zvyšovat riziko kontaminace.
- Izolaci DNA je nutné provádět z takového množství homogenizovaného vzorku, které je stanoveno izolačním protokolem. Komerční kity často požadují jen velmi malé množství a může tak dojít k situaci, že analyzovaný vzorek není reprezentativní.

Návrh opatření:

- Teoretické riziko křížové kontaminace vzorků lze snížit použitím špiček s filtrem a důslednou dekontaminací pracovních prostor i nástrojů 1% roztokem Sava a/nebo alkoholem, např. 96% ethanolem.

- Problém s homogenizací lze vyřešit použitím odlišných přístupů – např. homogenizace tekutým dusíkem a podrcení tloučkem vs. homogenizace kuchyňským mixérem. Aby se předešlo problémům s nevhodným množstvím vzorku, bylo do metodiky zařazeno více ověřených izolačních protokolů.

3.4.3.2 PCR

Shledaná rizika:

- Riziko kontaminace laboratoře v důsledku analýzy PCR produktů na agarózovém gelu.
- Přítomnost inhibitorů ve vzorku může vést ke snížení účinnosti, popř. úplnému potlačení amplifikace.

Návrh opatření:

- Teoretické riziko křížové kontaminace vzorků lze snížit prostorovým oddělením pracovních činností (izolace DNA, PCR, elektroforéza), použitím špiček s filtrem a důslednou dekontaminací pracovních prostor i nástrojů 1% roztokem Sava a/nebo 96% ethanolem.
- Zařazení univerzálních primerů a/nebo interní kontroly pro kontrolu amplifikovatelnosti DNA.

3.4.3.3 qPCR

Shledaná rizika:

- Přítomnost inhibitorů ve vzorku může vést k pozdnímu růstu fluorescence amplifikační křivky, případně jejímu úplnému potlačení.

Návrh opatření:

- Teoretické riziko křížové kontaminace vzorků lze snížit použitím špiček s filtrem a důslednou dekontaminací pracovních prostor i nástrojů 1% roztokem Sava a/nebo 96% ethanolem.

- Důsledná kontrola kvality DNA před samotnou amplifikací. Pokud je potřeba, DNA naředit.
- Zařazení univerzálních primerů pro kontrolu amplifikovatelnosti DNA.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Kontrola kvality potravin je, s ohledem na způsob jejich zpracování, složitým procesem. Dnes běžně používané techniky založené na analýze proteinů jsou limitovány často nevratným stupněm denaturace u tepelně ošetřených potravin. Slibným přístupem je tak molekulárně-genetická analýza využívající relativně stabilní biomakromolekulu DNA, která je schopná renaturace při snížení teploty po tepelném ošetření provedeném v rámci technologického postupu. Výhodou analýzy DNA je také fakt, že se jedná o molekulu přítomnou ve většině buněk živočišného organismu a analýza je tak nezávislá na typu tkáně ve vzorku. Zároveň je DNA díky své termostabilitě vhodnou molekulou pro analýzu tepelně či mechanicky opracovaných vzorků, a tedy i komerčně prodávaných výrobků (průmyslově zpracovaných surovin). Stabilita DNA je prokázána i za teplot nižších než $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dlouhodobě lze takto tedy uchovávat vzorky i izolovanou DNA. Zároveň je možné analyzovat vzorky hmyzu po lyofilizaci.

Další výhodou použití PCR je nepochybně snadnost a rychlost provedení reakce. Celý postup byl navržen tak, aby využil komerčně dostupné technologie jak pro samotnou izolaci DNA, tak i PCR. S výhodou mohou být i požadavky na malé množství vzorku, nízké reakční objemy (10 až 25 μl) a cenově dostupné termocyklery obsahující nejčastěji stojan pro 96 simultánně probíhajících reakcí.

Pokud je nám známo, byla dosud identifikace DNA jedlých a krmných druhů hmyzu prováděna nejčastěji metodami PCR nebo qPCR s využitím TaqMan sondy, přičemž jako cílové sekvence byly obvykle voleny úseky mitochondriálních (mt) genů¹⁸. Rozvoj metod detekujících úsek jaderného genu umožňuje v porovnání s mtDNA provádět přesnou kvantifikaci zastoupení cílové DNA v reakci, a tak i stanovit množství detekovaného organismu v analyzovaném vzorku. Metodika je zaměřená na multiplexní analýzu genomové

DNA, což je originální přístup. Novost této metody spočívá rovněž v použití multiplexních analýz, které usnadňují, urychlují a zlevňují rozbor vzorku tím, že umožňují autentizaci více živočišných druhů v jedné reakci.

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta pro účely projektu MZe NAZV č. QK23020101: „Komplexní laboratorní strategie pro identifikaci druhů hmyzu určeného k lidské spotřebě a produkci zpracované živočišné bílkoviny, autentikace potravin na jeho bázi“, který vznikl na základě potřeb státní správy. Cílem projektu bylo zavedení vhodného nástroje pro provádění úředních kontrol, zejména orgány státního dozoru nad bezpečností, jakostí a řádným označováním potravin. Metodika je založena na principu metody PCR a navrhuje specifické primery pro vybrané druhy hmyzu. Rozšiřuje tak možnosti kontrolních orgánů pro detekci hmyzu v potravinách a ověřovat složení výrobků při podezření na jejich falšování.

Výše popsaný postup umožňuje provedení metodiky v laboratoři, která disponuje běžným laboratorním vybavením, kam se dnes řadí i přístroje na provádění PCR. Metodika tak může nalézt uplatnění i mezi vědeckými a akademickými pracovníky, kteří se zabývají kvalitou potravin, a u dalších státních či soukromých laboratořích, které provádějí analýzy potravin a/nebo krmiv se zaměřením na analýzu hmyzu. Aplikace vyvinutých PCR protokolů významně přispěje k odlišení těchto druhů hmyzu: potěmník moučný (*Tenebrio molitor*), potěmník stájový (*Alphitobius diaperinus*), potěmník brazilský (*Zophobas morio*), saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*), saranče všežravá (*Schistocerca gregaria*), cvrček domácí (*Acheta domestica*), cvrček dvojskvrnný (*Gryllus bimaculatus*), cvrček krátkokřídý (*Gryllodes sigillatus*), cvrček locorojo (*Gryllus locorojo*; v Evropě často zaměněný za *Gryllus assimilis*), moucha bráněnka (*Hermetia illucens*), šváb argentinský (*Blattella germanica*), šváb diskovitý (*Blaberus discoidalis*) a šváb turkistánský (*Shelfordella tartara*).

Parametry a pracovní charakteristiky uvedené metody jsou vhodné pro získání rychlé kvalitativní informace o přítomnosti uvedených druhů; protokoly qPCR pak skýtají potenciál i pro jejich kvantifikaci.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Výsledky metodiky umožňují ověřování pravosti vybraných druhů jedlého a krmného hmyzu, což může sloužit nejen ke kontrole trhu, ale také ochraně životního prostředí a biodiverzity. V souladu s doporučením Rady vlády pro výzkum jsou poznatky, které metodika přináší, poskytovány všem oprávněným osobám zdarma. Předkládaná certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu QK23020101.

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře, která rutinně provádí měření pomocí metody PCR, lze řádově odhadnout na nižší tisíce korun českých. Nezbytné výdaje zahrnují syntézu oligonukleotidů (primery, sondy) a zakoupení reakční směsi (mastermixu) pro PCR. Další náklady pak jsou spojeny s koncovou detekcí na agarózovém gelu, kdy je potřeba zahrnout do celkové částky také agarosu, markery, interkalační barvivo a pufrý. Izolace DNA je založena na komerčně dostupném kitu či automatickém izolátoru, který může být rutinně využíván v laboratoři.

Ekonomický přínos pro kontrolní orgány či laboratoře, je obtížné vyčíslit. Lze však s jistotou hovořit o přínosu společenském, který spočívá v efektivnější kontrole trhu s potravinami, ochraně spotřebitelů před falšovanými potravinami a zvýšením jejich důvěry v produkty dostupné na českém trhu. Pro laboratoře lze ekonomický přínos spatřit v multiplexním uspořádání PCR, které zefektivňuje práci z hlediska času nezbytného pro analýzu vzorku (detekce více cílů najednou, a tím snížení celkového počtu provedených analýz) i ceny za reakci (např. úspora mastermixu). Výhodou je také fakt, že počet vzorků výrazně nemění cenu za analýzu a není tak třeba čekat na naplnění kapacity přístroje. Analýza s využitím PCR je v porovnání například se sekvenačními přístupy rychlá, avšak navržená metodika detekuje pouze to, na co je cílená. Pro detekci jiných než vyjmenovaných druhů by bylo nezbytné navrhnout další oligonukleotidy. Metodika umožňuje jak potvrzení, popř. vyvrácení, přítomnosti deklarovaného hmyzu, tak i průkaz hmyzu, který na etiketě uváděn není (v případě druhů, pro které jsou v metodice navrženy specifické primery).

qPCR umožní významnou úsporu nákladů a času, které jsou nyní potřebné pro komplexní analýzu a následnou identifikaci získaných izolátů pomocí sekvenování nebo

jiných metod. V porovnání s PCR je pak výhodou detekce fluorescenčního signálu v reálném čase, což zkracuje dobu nezbytnou pro analýzu. Výhodou metody PCR obecně je dále fakt, že není potřeba obsáhlá bioinformatická analýza, což ušetří čas pro analýzu získaných dat. Vyhodnocení výsledků zvládne i dobře proškolený pracovník. Na rozdíl od metabolomických analýz by výsledky neměly být ovlivněny podmínkami chovu hmyzu.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Weissman, D. B.; Gray, D. A.; Pham, H. T.; Tijssen, P., Billions and billions sold: pet-feeder crickets (Orthoptera: Gryllidae), commercial cricket farms, an epizootic densovirus, and government regulations make for a potential disaster. *Zootaxa* **2012**, *3504* (1), 67-88.
2. Fuso, A.; Leni, G.; Prandi, B.; Lolli, V.; Caligiani, A., Novel foods/feeds and novel frauds: The case of edible insects. *Trends in Food Science & Technology* **2024**, 104457.
3. Spatola, G.; Giusti, A.; Mancini, S.; Tinacci, L.; Nuvoloni, R.; Fratini, F.; Di Iacovo, F.; Armani, A., Assessment of the information to consumers on insects-based products (Novel Food) sold by e-commerce in the light of the EU legislation: when labelling compliance becomes a matter of accuracy. *Food Control* **2024**, *162*, 110440.
4. Poma, G.; Cuykx, M.; Da Silva, K. M.; Iturraspe, E.; van Nuijs, A. L.; van Huis, A.; Covaci, A., Edible insects in the metabolomics era. First steps towards the implementation of entometabolomics in food systems. *Trends in Food Science & Technology* **2022**, *119*, 371-377.
5. Lockley, A.; Bardsley, R., DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, *11* (2), 67-77.
6. Zeman, J., Mitochondriální poruchy energetického metabolismu. *Postgraduální medicína* **2002**, *5* (3).
7. Baiano, A., Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. *Trends in Food Science & Technology* **2020**, *100*, 35-50.
8. Kang, T. S., Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: a review. *Trends Food Sci Technol* **2019**, *91*.
9. Cermakova, E.; Lencova, S.; Mukherjee, S.; Horka, P.; Vobruba, S.; Demnerova, K.; Zdenkova, K., Identification of Fish Species and Targeted Genetic Modifications Based on DNA Analysis: State of the Art. *Foods* **2023**, *12* (1), 228.
10. Laube, I.; Zagon, J.; Spiegelberg, A.; Butschke, A.; Kroh, L. W.; Broll, H., Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods. *International journal of food science & technology* **2007**, *42* (1), 9-17.
11. Iwobi, A.; Sebah, D.; Spielmann, G.; Maggipinto, M.; Schrempp, M.; Kraemer, I.; Gerdes, L.; Busch, U.; Huber, I., A multiplex real-time PCR method for the quantitative determination of equine (horse) fractions in meat products. *Food Control* **2017**, *74*, 89-97.
12. Ali, M. E.; Razzak, M. A.; Hamid, S. B. A., Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects—a review. *Food Analytical Methods* **2014**, *7*, 1933-1949.
13. Laube, I.; Hird, H.; Brodmann, P.; Ullmann, S.; Schöne-Michling, M.; Chisholm, J.; Broll, H., Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry* **2010**, *118* (4), 979-986.
14. Laube, I.; Spiegelberg, A.; Butschke, A.; Zagon, J.; Schauzu, M.; Kroh, L.; Broll, H., Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. *International journal of food science & technology* **2003**, *38* (2), 111-118.
15. Zdeňková, K.; Mukherjee, S.; Marin, M. A. L.; Horká, P.; Kýrová, V.; Potůčková, M.; Čermáková, E., Interlaboratory study on real-time PCR detection and quantification of

- the European anglerfish, pike, and seabream parvalbumin gene. *European Food Research and Technology* **2024**, 250 (11), 2821-2835.
16. Anklam, E.; Gadani, F.; Heinze, P.; Pijnenburg, H.; Van Den Eede, G., Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology* **2002**, 214, 3-26.
 17. Gregory, T. R. Animal Genome Size Database. <https://www.genomesize.com> (accessed 29. 5.).
 18. Zdeňková, K.; Čermáková, E.; Vejl, P.; Čermáková, A.; Vašek, J., Analytical Methods for the Identification of Edible and Feed Insects: Focus on DNA-Based Techniques. *Foods* **2025**, 14 (11), 2002.
 19. Messing, J., New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* **1983**, 101.

8. SEZNAM ZDROJŮ OBRÁZKŮ

Obrázek DNA (Obr. 1) – QGEN [online], 2025. Dostupné z www.qgen.cz, 20. 5. 2025.

Obrázek zkumavky a PCR cyklu (Obr. 2) – BioRender [online], 2025. Dostupné z www.biorender.com, 20. 5. 2025.

Fotografie *A. domesticus* – Rodinná farma Bušanovice [online], 2025. Dostupné z www.farmabusanovice.cz, 20. 5. 2025.

Fotografie *B. discoidalis* – Autor: J. Dvořák. Insecta.pro [online], 2025. Dostupné z <https://insecta.pro/gallery/79348>, 20. 5. 2025.

Fotografie *B. dubia* – Chov Zvířat [online], 2025. Dostupné z <https://www.chovzvirat.cz>, 20. 5. 2025.

Fotografie *G. bimaculatus* – Extavour Lab: The *G. bimaculatus* Genome [online], 2025. Dostupné z <https://gbimaculatusgenome.bio.edu.pl>, 20. 5. 2025.

Fotografie *G. sigillatus* – BugGuide [online], 2025. Dostupné z <https://bugguide.net/>, 20. 5. 2025.

Fotografie *G. locorojo* – převzato z práce Weissman et al.¹

Fotografie *H. illucens* (dospělec) – Autor: T. Klejdysz. iStockphoto LP [online], 2025. Dostupné z www.istockphoto.com, 20. 5. 2025.

Fotografie *L. migratoria* – Zvěrokruh [online], 2025. Dostupné z www.zverokruh-shop.cz, 20. 5. 2025.

Fotografie *S. gregaria* – Autor: Amada 44. Wikimedia Commons [online], 2025. Dostupné z <https://commons.wikimedia.org>, 20. 5. 2025.

Fotografie *S. tartara* – Misterklop [online], 2025. Dostupné z <https://misterklop.ru>, 20. 5. 2025.

Ostatní obrázky a fotografie byly vytvořeny autorským kolektivem této metodiky.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

Publikace

Vejl, P.; Čermáková, A.; Melounová, M.; Čílová, D.; Zdeňková, K.; Čermáková, E.; Vašek, J., Detection and Quantification of House Crickets (*Acheta domesticus*) in the Gut of Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) Larvae Fed Diets Containing Cricket Flour: A Comparison of qPCR and ddPCR Sensitivity. *Insects* **2025**, *16*(8), 776.

Zdeňková, K.; Čermáková, E.; Vejl, P.; Čermáková, A.; Vašek, J., Analytical Methods for the Identification of Edible and Feed Insects: Focus on DNA-Based Techniques. *Foods* **2025**, *14* (11), 2002.

Závěrečné práce

Rusnák, V.: Molekulárně genetická identifikace brouků čeledi *Tenebrionidae* v potravinách a krmivech vyráběných z faremně chovaného hmyzu, 2025, ČZU v Praze.

Táborová, K.: Multiplexní qPCR detekce *Locusta migratoria* a *Schistocerca gregaria*, 2025, VŠCHT Praha.

Watziková, K.: Detekce vybraných druhů potěmníků v potravinách pomocí metody qPCR, 2025, VŠCHT Praha.

Aktivní účast na sympoziích, konferencích či vědeckých setkáních:

Vašek, J.; Čermáková, A.; Zdeňková, K.; Čermáková, E.; Vejl, P.: Využití masivního paralelního sekvenování pro identifikaci jedlého hmyzu v potravinách. *Konference RANK*, Pardubice, 19. - 20. března 2025. (Přednáška)

Vejl, P.; Čermáková, A.; Vašek, J.; Melounová, M.; Čílová, D.; Zdeňková, K.; Čermáková, E.; Šebelová, K.; Hajšlová, J.: Multiplexové end-point PCR markery určené pro autentizaci potravin a krmiv obsahujících faremně chované druhy hmyzu. *Konference RANK*, Pardubice, 19. - 20. března 2025. (Přednáška)

Čermáková, A.; Vejl, P.; Vašek, J.; Melounová, M.; Čílová, D.; Zdeňková, K.; Čermáková, E.; Šebelová, K.; Hajšlová, J.: Určení kontaminujícího druhu hmyzu pomocí technik NGS a end-point PCR – případová studie u těstovin s deklarovaným obsahem cvrčka domácího (*Acheta domesticus*). *Konference RANK*, Pardubice, 19. - 20. března 2025. (Poster)

Čermáková, E.; Watziková, K.; Čermáková, A.; Zdeňková, K.; Vejl, P.: Detekce a kvantifikace DNA moučných červů (*Tenebrio molitor*) v potravinách. *Konference RANK*, Pardubice, 19. - 20. března 2025. (Poster)

Zdeňková, K.; Čermáková, E.; Žák, P.; Táborová, K.; Čermáková, A.; Vašek, J.; Vejl, P.: Multiplexní mqPCR pro detekci *Locusta migratoria* a *Schistocerca gregaria*. *Konference RANK*, Pardubice, 19. - 20. března 2025. (Poster)

Vašek, J.; Vejl, P.; Zdeňková, K.; Čermáková, A.; Čermáková, E.; Čílová, D.; Melounová, M.; Kouřimská, L.; Šebelová, K.; Hajšlová, J.: Vývoj molekulárně-genetických metod pro identifikaci jedlého hmyzu v potravinách. *53. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin CzechFoodChem*, Praha, 18. - 20. 5. 2025. (Přednáška)

10. PŘÍLOHY

Příloha I: Části ampliconů genu pro 16S ribozomální RNA u *Gryllus assimilis* a *Gryllus locorojo* s charakteristickými druhově specifickými polymorfismy.

Příloha II: Přehled sekvenačních markerů a reakčních podmínek použitých při přípravě metodiky.

Příloha I: Části ampliconů genu pro 16S ribozomální RNA u *Gryllus assimilis* a *Gryllus locorojo* s charakteristickými druhově specifickými polymorfismy.

Pro identifikaci druhů *Gryllus assimilis* a *Gryllus locorojo* byl využit 541 bp dlouhý úsek mitochondriálního genu pro 16S ribozomální RNA. Sekvence použitých primerů byly následující (u primerů jsou označeny podtrženě M13 adaptory):

- 16S_Cricket_F 5'-TGTAACGACGGCCAGTTDATWTGAAGTCGTGCCTGCCCAM-3'
- 16S_Cricket_R 5'-CAGGAAACAGCTATGACCACTCAGATCAYGTAAGAWTTYAATGGTCG-3'.

Molekulární analýza jednoznačně potvrdila, že všechny analyzované chovy „cvrčka banánového“ vykazovaly 100% sekvenční identitu s *Gryllus locorojo* (Obr. 6). Z těchto důvodů je v metodice používané vědecké pojmenování *Gryllus locorojo* a nikoliv *Gryllus assimilis*. Sekvence ampliconu je uložena v NCBI pod čísly PV983669.1 a PV973162.1.

Obr. 6: Části ampliconů genu pro 16S ribozomální RNA u *Gryllus assimilis* a *Gryllus locorojo* s charakteristickými druhově specifickými polymorfismy.

Gryllus assimilis, NCBI (MK446431.1)	I G A G T C A A A A A G C T T A A A T A T T A A C A G G G G A C G A G A A G A C C C T A T A G A T C T T A A T A T T A T T A T T A A A A T G T A T G T T T A G A G G T A T T T A A T A T A T T T T A
Gryllus locorojo, NCBI (OQ379913.1) T A A A . T G A G
Chov 1, CZ T A A . T G A G
Chov 2, CZ T A A . T G A G
Chov 3, CZ T A A . T G A G
Chov 4, CZ T A A . T G A G
Chov 5, CZ T A A . T G A G
Chov 6, CZ T A A . T G A G
Chov 7, CZ T A A . T G A G

Příloha II: Přehled sekvenačních markerů a reakčních podmínek použitých při přípravě metodiky.

Pro všechny 4 druhy hmyzu, respektive markery, byly použity jednotné reakční podmínky.

Složení amplifikační reakce o objemu 10 μ l zahrnuje:

- DNA: 20 ng,
- FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Švýcarsko): 1x
- Primer F: 0,25 μ M
- Primer R: 0,25 μ M.

Sekvence použitých oligonukleotidů jsou uvedeny v Tab. V.

Teplotní profil reakce je následující: úvodní denaturace při 95 °C po dobu 600 s, následovaná 38 cykly denaturace při 95 °C po dobu 20 s, hybridizace primerů při 69 °C po dobu 20 s a prodloužení při 72 °C po dobu 20 s, s rychlostí přechodu mezi jednotlivými kroky 5 °C/s. Pro analýzu teploty tání (T_m) byla teplota zvyšována z 65,0 na 95,0 °C v přírůstcích po 0,5 °C/s. Pro amplifikaci byl použit CFX Connect Real-Time PCR (Bio-Rad, USA).

Tab. V: Sekvence oligonukleotidů použitých pro sekvenování vybraných markerů.

Detekovaný druh hmyzu	Cílový gen*	Sekvenační marker				Kód sekvence ampliconu uložené v NCBI
		Název	Sekvence (směr: 5´-3´)**	Délka produktu (bp)	Tm (°C)	
<i>A. domesticus</i>	<i>ampd</i>	Ad_Ampd_F	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> TTGATAAGGATGTCCCTGCCCCAG	141	78,5	PV719365.1
		Ad_Ampd_R	CAGGAAACAGCTATGACCAAGTGGTTCAATACAGTCAAGTTCGCA			
<i>T. molitor</i>	<i>MyD88</i>	Tm_MyD88_F	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> ATGAAGTTCTGCGTGAAAGACCGC	146	82,5	PV719347.1
		Tm_MyD88_R	CAGGAAACAGCTATGACCTCCGAGAGGATGACGATCAAA CGG			
<i>A. diaperinus</i>	<i>AdAce1</i>	Alp_Ache_F3	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> TACGGACTGGGAACATGTGAA CGA	138	79,5	PV987409.1
		Alp_Ache_R3	CAGGAAACAGCTATGACCTCTGCGAAGTCGTTAGTGGGACAA			
<i>H. illucens</i>	<i>pdc6</i>	Hi_Pcd_F1	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> TCAGGATTTTCGGTGCTCTGTGGA A	151	84	PV987410.1
		Hi_Pcd_R1	CAGGAAACAGCTATGACCCGTCAGTGCAGTTTTTCAGCTCGTT			

* *ampd* = jaderný gen pro AMP deaminázu, *MyD88* = jaderný gen pro protein primární odpovědi při myeloidní diferenciaci, *AdAce1* = jaderný gen pro acetylcholinesterázu, *pdc6* = jaderný gen pro protein 6 programované buněčné smrti.

** U primerů jsou podtržením označeny sekvence pro M13 adaptory (převzato z práce Messing¹⁹). Velikosti ampliconů jsou včetně těchto M13 adaptorů.

Prohlášení předkladatele metodiky

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z oblasti průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Předkladatel souhlasí s uveřejněním práce na webových stránkách certifikačního orgánu i s uveřejněním metodiky na webových stránkách MZe.

Jména autorů: Eliška Čermáková, Agáta Čermáková, Jakub Vašek, Karolína Táborová, Kamila Zdeňková a Pavel Vejl

Název certifikované metodiky: VYUŽITÍ MULTIPLEXNÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE PRO AUTENTIZACI VYBRANÝCH DRUHŮ HMYZU

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Oponenti: Ing. Veronika Kýrová, Ph.D.
MVDr. Jana Horňáčková

Rok vydání: 2025

Počet stran: 40

Elektronická verze publikace ve formátu PDF.