

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 245564 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439154**

(22) Data zgłoszenia: **2021.10.07**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.11 BUP 15/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.09.02 WUP 36/2024**

(51) MKP:

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

- | |
|---|
| (73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Lublin, PL |
| (72) Twórca(-y) wynalazku:
BEATA HORECKA, Lublin, PL
MAREK KOWALCZYK, Jawidz, PL
GRZEGORZ BORSUK, Prawiedniki, PL |
| (74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Magdalena Tarała, Lublin, PL |

(54) Tytuł:

Zestaw dwóch par starterów oligonukleotydowych do jednoczesnego wykrywania i różnicowania patogenów *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* pszczoły miodnej oraz sposób wykrywania tych patogenów

PL 245564 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zestaw dwóch par starterów oligonukleotydowych do jednoczesnego wykrywania oraz różnicowania mikrosporydiów *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy, a także sposób wykrywania obecności tych patogenów w pszczołach miodnych (*Apis mellifera*) oraz próbach środowiskowych.

Ochrona populacji pszczoły miodnej jest szczególnie istotna ze względu na pandemiczny, przewlekły charakter zakażeń oraz znaczne straty powodowane przez te patogeny, prowadzące do zamierania całych rodzin pszczelek. Obserwowane są zarówno zakażenia jednym z wymienionych patogenów, jak również infekcje mieszane. Metody molekularne charakteryzują się dużą specyficznością i czułością, identyfikują mikroorganizmy poprzez wykrycie obecności ich materiału genetycznego w pszczołach nie wykazujących jeszcze objawów chorobowych. Wczesne wykrycie infekcji umożliwia podjęcie szybszych i skuteczniejszych działań oraz zapobiega intensywnemu rozprzestrzenianiu się zakażenia, co jest bardzo istotne ze względu na dużą liczebność i ścisłą współegzystencję pszczoł w obrębie jednej rodziny pszczelek. *Vairimorpha (Nosema) ceranae* jest uznawany za patogen o wyższej wirulencji niż *Vairimorpha (Nosema) apis*, dlatego właściwa identyfikacja zakażenia do gatunku jest bardzo ważna, gdyż wpływa na sposób leczenia pszczoł.

Identyfikowane patogeny *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* należą do grupy mikrosporydiów – wewnątrzkomórkowych mikroorganizmów eukariotycznych, które są blisko spokrewnione z grzybami. Dotychczas określone były one jako *Nosema apis* oraz *Nosema ceranae*, ale ich pozycja taksonomiczna została w ostatnim czasie zredefiniowana (Tokarev YS, Huang W-F, Solter LF, Malyshev JM, Becnel JJ, Vossbrinck CR. 2020. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. J Invertebr Pathol. 169: 107279). Jedną z najczęściej stosowanych molekularnych metod identyfikacji patogenów *V. apis* i *V. ceranae* opartą na dwóch reakcjach PCR jest metoda wykorzystująca dwie pary gatunkowo-specyficznych starterów 321APIS-FOR/321APIS-REV dające produkt o długości 321 pz w obecności DNA *Vairimorpha (Nosema) apis* oraz 218MITOC-FOR/218MITOC-REV dające produkt o długości 218–219 pz dla *Vairimorpha (Nosema) ceranae*, (Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M, 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl Environ Microbiol. 73(20): 6331–8). Były one stosowane zarówno w celu stwierdzenia obecności *V. apis* i/lub *V. ceranae*, jak również w analizach udziału ilościowego obu patogenów w badanych próbach. Z przeprowadzonych badań wynika jednak, że w przypadku pary 321APIS-FOR/321APIS-REV występują trudności z optymalizacją reakcji PCR, co w rezultacie uniemożliwia skuteczną identyfikację *N. apis*.

W identyfikacji omawianych patogenów stosowano także dwie inne pary starterów: *N. apis*-sense i *N. apis*-antisense umożliwiające uzyskanie ampliconu o długości 269 pz dla *Vairimorpha (Nosema) apis* oraz *N. ceranae*-sense i *N. ceranae*-antisense flankujące fragment o długości 250 pz dla *Vairimorpha (Nosema) ceranae* (Chen Y, Evans JD, Zhou L, Boncristiani H, Kimura K, Xiao T, Litkowski AM, Pettis JS. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. J Invertebr Pathol. 101(3): 204–209). Jednak bardzo zbliżona długość produktów PCR uzyskiwanych za pomocą obu par starterów może znacząco obniżyć skuteczność właściwej identyfikacji gatunkowej patogenu.

Ze względu na istniejące ww. trudności, związane z przeprowadzeniem reakcji PCR, czy też skuteczną identyfikacją patogenu, nadal istnieje potrzeba poszukiwania starterów oligonukleotydowych, które rozwiązywałyby wyżej wskazane problemy.

Istotę wynalazku stanowi zestaw dwóch par starterów oligonukleotydowych do wykrywania i różnicowania patogenów *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* pszczoły miodnej o sekwencjach – pierwsza para: nr 1 i 2 oraz druga para: nr 3 i 4, przedstawionych na liście sekwencji.

Istotą sposobu wykrywania i różnicowania patogenów *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* pszczoły miodnej, w którym w reakcji PCR z zastosowaniem zestawu dwóch par starterów jednocześnie dochodzi do amplifikacji określonych, specyficznych gatunkowo fragmentów DNA, po czym dokonuje się detekcji powstałego produktu/produktów jest to, że stosuje się zestaw dwóch par starterów oligonukleotydowych o sekwencjach – pierwsza para: nr 1 i 2 oraz druga para: nr 3 i 4, przedstawionych na liście sekwencji.

W wyniku reakcji PCR z zastosowaniem zestawu par starterów oligonukleotydowych według wynalazku dochodzi do amplifikacji określonego specyficznego dla danego gatunku fragmentu DNA patogenu *Vairimorpha (Nosema) apis* i/lub *Vairimorpha (Nosema) ceranae*. Następnie dokonuje się detekcji otrzymanych produktów amplifikacji poprzez rozdział elektroforetyczny. Zastosowanie wyżej wymienionych par starterów do przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy przebiegającej w ściśle określonych według wynalazku warunkach umożliwia amplifikację fragmentów DNA o długościach ok. 200 oraz ok. 400 par zasad. Istotna różnica w długości otrzymywanych produktów PCR umożliwia jednoznaczną identyfikację patogenów, rozróżnienie obecności *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* oraz wykrycie infekcji mieszanych. Zaletą opracowanego, systemu identyfikacji jest, fakt, że został on zwalidowany na dużej liczbie próbek (ok. 2000). W szczególności na korzyść niniejszej metody przemawia jej walidacja również na próbach środowiskowych o stwierdzonej obecności patogenów i zróżnicowanym poziomie infekcji *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* oraz próbach niezakażonych.

Wynalazek przedstawiony na przykładzie wykonania i na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia sekwencję nukleotydową fragmentu DNA *Vairimorpha (Nosema) apis* amplifikowanego w reakcji PCR przeprowadzonej z zastosowaniem pary starterów oligonukleotydowych nr 1 i 2 (AmVairA-F i AmVairA-R);

Fig. 2 przedstawia sekwencję nukleotydową fragmentu DNA *Vairimorpha (Nosema) ceranae* amplifikowanego w reakcji PCR przeprowadzonej z zastosowaniem pary starterów oligonukleotydowych nr 3 i 4 (AmVairC-F i AmVairC-R);

Fig. 3 przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji przeprowadzonej w obecności par starterów nr 1 i 2 (nr studzienki/prążka 1–7) oraz starterów nr 3 i 4 (nr studzienki/prążka 8–14): nr studzienki/prążka 1, 8 – kontrola negatywna (woda dejonizowana), nr studzienki/prążka 2–3, 9–10 – próby izolowane z pszczoł zdrowych, nr studzienki/prążka 4–7, 11–14 – próby izolowane z pszczoł porażonych patogenem *Vairimorpha (Nosema) apis* i/lub *Vairimorpha (Nosema) ceranae*;

Fig. 4 przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji przeprowadzonej w jednoczesnej obecności zestawu dwóch par starterów nr 1, 2 oraz nr 3 i 4: M – marker wielkości, nr studzienki/prążka, 1–3 – próby izolowane z pszczoł porażonych – stwierdzona obecność infekcji mieszanej *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae*, nr studzienki/prążka 4–5 – próby izolowane z pszczoł: porażonych – stwierdzona obecność infekcji wyłącznie *Vairimorpha (Nosema) apis*, nr studzienki/prążka 6 – kontrola negatywna (woda dejonizowana).

Materiał biologiczny wykorzystywany w procesie identyfikacji stanowiły rozdrobnione fragmenty tkanek pszczoły miodnej pozyskane na dowolnym etapie rozwojowym oraz z dowolnej części ciała osobnika. DNA uzyskane w wyniku przeprowadzenia procedury izolacji stosowane jest jako matryca do amplifikacji. PCR przeprowadza się w mieszaninie reakcyjnej o następującym składzie: woda dejonizowana, standardowy master mix do reakcji PCR zawierający w składzie polimerazę Taq DNA, kofaktor enzymu – jony Mg^{2+} , dNTP oraz bufor, matrycowe DNA oraz dwie pary specyficznych starterów oligonukleotydowych (0,5 μM): AmVairA-F/AmVairA-R i AmVairC-F/AmVairC-R. Amplifikację przeprowadza się z zastosowaniem następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja – 95–98°C przez 5 minut, następnie 35–40 cykli: denaturacja – 95–98°C przez 30 sekund, annealing – 53–58°C przez 30–45 sekund, elongacja – 72°C przez: 1 minutę, ostatni etap reakcji stanowi końcowa elongacja w 72°C przez 5 minut, lub innego profilu termicznego umożliwiającego uzyskanie powielania DNA z oligonukleotydowymi starterami stanowiącymi przedmiot wynalazku. Sekwencja zamplifikowanych fragmentów DNA przedstawiona jest na Fig. 1 i Fig. 2.

Obecność oczekiwanego produktu o długości około 200 i/lub 400 par zasad potwierdza się poprzez zastosowanie dowolnej metody rozdziału i identyfikacji fragmentów kwasów nukleinowych. Sposób stwierdzania, obecności materiału genetycznego mikrosporydiów *Vairimorpha (Nosema) apis* i/lub *Vairimorpha (Nosema) ceranae* w badanej próbce według wynalazku ilustruje zamieszczony poniżej przykład.

A. Izolacja DNA z fragmentów tkanek pszczoły miodnej.

Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu dedykowanego do śladów biologicznych (Sherlock AX, A&A Biotechnology), umożliwiającego ekstrakcję DNA *Vairimorpha (Nosema)* nawet przy zakażeniu, o niskiej intensywności (niewielkiej zawartości DNA patogenu w próbce). Fragmenty tkanki pszczoły rozdrabniano mechanicznie za pomocą narzędzi chirurgicznych. Otrzymane w ten sposób homogenaty przenoszono do probówek 2 ml typu Eppendorf i dodawano 300 μl wody jałowej, 300 μl roztworu lizującego, 20 μl proteinazy K oraz 20 μl DTT. Mieszaniny po dokładnym

zworteksovaniu inkubowano w temperaturze 50°C do całkowitego strawienia tkanki. Lizaty przenoszono na kolumny filtracyjne a następnie selektywne kolumny oczyszczające. Związane na membranie kolumny oczyszczającej DNA płukano dwukrotnie dodając po 600 µl buforu płuczającego a następnie wirując. W kolejnych etapach dokonano elucji dodając dwukrotnie po 350 µl buforu elucyjnego, inkubując próby w temperaturze pokojowej a następnie wirując. Uzyskany po dwukrotnym wirowaniu (1 min., 8 000 RPM) supernatant przenoszono do nowych probówek. Następnie dodawano po 5 µl wzmacniacza precypitacji oraz 600 µl izopropanolu. Całość mieszano i wirowano 10 min przy 10 000 RPM. Ostrożnie usunięto supernatanty, uważając aby nie usunąć niebieskich osadów DNA a następnie dodano po 500 µl 70% etanolu, całość wymieszano i wirowano 5 min przy 10 000 RPM. Następnie usunięto supernatanty, a osady DNA wysuszono przez odwrócenie probówek przez 10 min w temperaturze pokojowej. Osady zawieszono w buforze TE. Dla określenia stężenia i jakości wyizolowanego DNA przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy użyciu spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf).

B. Przygotowanie prób do amplifikacji.

DNA wyizolowane według powyższej procedury wykorzystano jako matrycę dla reakcji PCR. Do każdej probówki o pojemności 0,2 ml dodano od 20 do 30 ng DNA. PCR przeprowadzono w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: wodę dejonizowaną, standardowy master mix PCR Mix Plus (A&A Biotechnology) uwzględniający optymalne stężenie polimerazy DNA Taq, bufor PCR, MgCl₂, mieszaninę wolnych nukleotydów i stabilizatory wyłapujące inhibitory reakcji polimeryzacji oraz barwnik ułatwiający obserwację elektroforezy, dwie pary specyficznych starterów oligonukleotydowych (0,5 µM). Amplifikację prowadzono w termocyklerze LabCycler (Sensoquest) stosując następujący profil termiczny: wstępna denaturacja – 95–98°C przez 5 minut, następnie 35–40 cykli: denaturacja – 95–98°C przez 30 sekund, annealing – 53–58°C przez 30–45 sekund, elongacja – 72°C przez 1 minutę, ostatni etap reakcji stanowiła końcowa elongacja w 72°C przez 5 minut.

Wyniki amplifikacji wizualizowano za pomocą elektroforezy agarozowej.

Produkty reakcji PCR rozdzielano na 2% żelu agarozowym w obecności barwnika do wizualizacji DNA SimplySafe (EURx) w buforze TBE, przy napięciu 90 V, w czasie 2 godzin. Otrzymane wzory rozdziałów obserwowano w świetle UV i archiwizowano przy pomocy programu Scion Image.

Uzyskany dla badanego materiału wynik identyfikacji z zastosowaniem oligonukleotydów i metody stanowiącej przedmiot wynalazku przedstawia Fig. 3 i Fig. 4.

Lista sekwencji

Sekwencja nr 1

AmVairA-F: 5'-GAGACGGCTACTAAGTCTAAGGATTG-3'

Sekwencja nr 2

AmVairA-R: 5'-CATCTCATATCACATCGTCGGCATA-3'

Sekwencja nr 3

AmVairC-F: 5'-CTGCACGCGCAATACAATAGATA-3'

Sekwencja nr 4

AmVairC-R: 5'-CAGCAACCATGTTACGACTTATATC-3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Zestaw dwóch par starterów oligonukleotydowych do jednoczesnego wykrywania i różnicowania patogenów *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* pszczoły miodnej o sekwencjach – pierwsza para nr 1 i 2 oraz druga para: nr 3 i 4, umieszczonych na liście sekwencji.
2. Sposób wykrywania i różnicowania patogenów *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* pszczoły miodnej, w którym w reakcji PCR z zastosowaniem zestawu dwóch par starterów jednocześnie dochodzi do amplifikacji określonych, specyficznych gatunkowo fragmentów DNA, po czym dokonuje się detekcji powstałego produktu/produktów, **znamienny tym**, że zestaw dwóch par starterów stanowią startery oligonukleotydowe jak określono w zastrz. 1.

Rysunki

>1
 GTGGCGACTTGACTATGGATTTTATCTGAGGCAGTTATGGGAAGTAATATTATATTGTTTCATATTTTAAA
 AGTATATGAGGTGATTAATTGGAGGGCAATCAAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTGTTCGAAGAGTGT
 GTATGATGATTGATGCAGTTAAAAAGTCCGTAGTTTATTTTAAAAAGCAATATGAGGTGTAAGTGTATA
 GTTGGGAGAAAGATGAAATGTGACGACCCTGACTGGACAAACAGAAGCGAAAGCTGTACACTTGTATGTAT
 TTTTGAACAAGGACGTAAGCTGGAGGACCGAAAATGATTAAATACCATTGTAGTTCAGCAGTA

Fig.1

>2
 GCAATATTTTGTAAAGAGATATTTGAACTTGGAATTGCTAGTAAATTTTATTAATAAGTAGAATTGAA
 TGTGTCCCTGTTCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTATCTAAGATGATATATGTTGTGAAATTAGTGAA
 AACTACTTAACAATATGTATTAGATCTGATATAAGTCGTAACATGGTTG

Fig.2

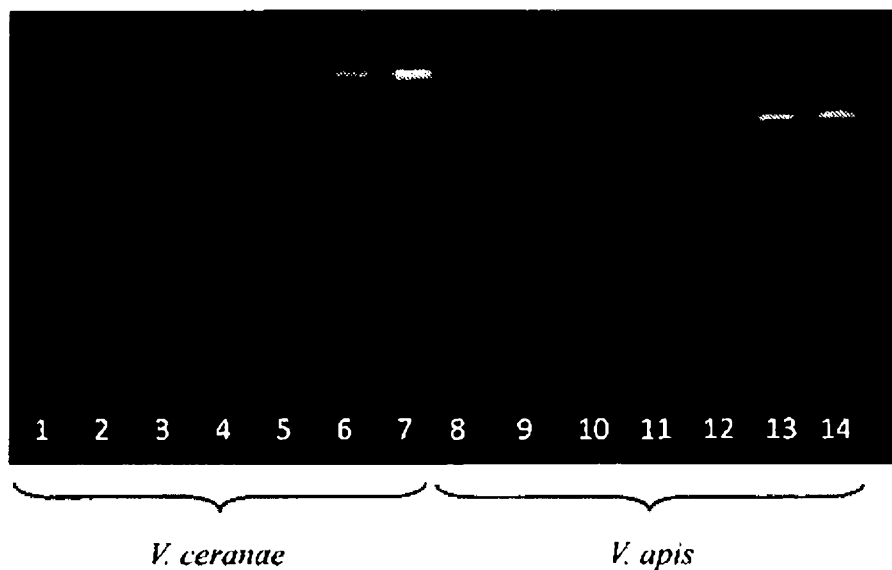
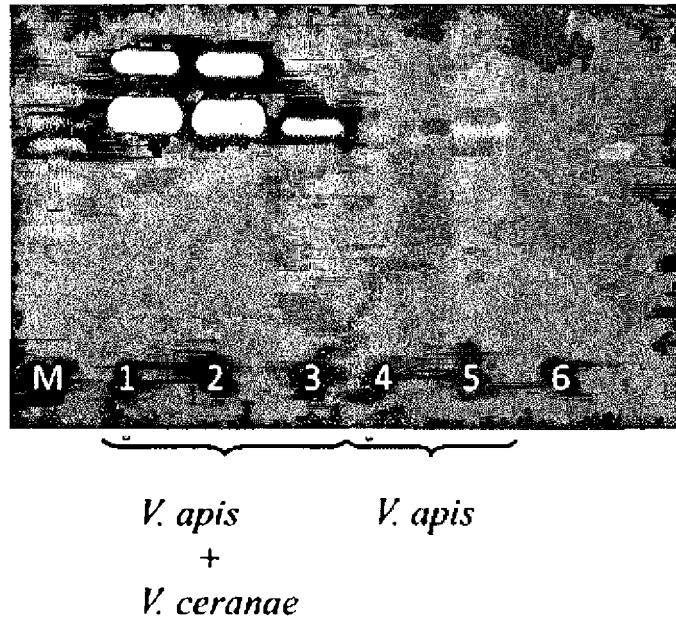


Fig.3

**Fig.4**