

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237729**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419159**

(22) Data zgłoszenia: **18.10.2016**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/682 (2018.01)

(54) **Sondy typu Looped UVEx Probe oraz ich zastosowanie do wykrywania patogenów przenoszonych przez kleszcze z wykorzystaniem zoptymalizowanej reakcji PCR**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.04.2018 BUP 09/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
17.05.2021 WUP 10/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

GRZEGORZ WĘGRZYN, Gdańsk, PL

BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK, Gdańsk, PL

SYLWIA BLOCH, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 237729 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sonda typu Looped UVEx Probe do wykrywania materiału genetycznego przenoszonego przez kleszcze, który jest amplifikowany podczas reakcji PCR (Polymerase Chain Reaction) przez polimerazę *Taq* DNA typu „Hot Start”. Wynalazek dotyczy również zastosowania sond do wykrywania patogenów przenoszonych przez kleszcze z wykorzystaniem zoptymalizowanej reakcji PCR. W szczególności zastosowanie wraz z parą odpowiednio dobranych starterów w zoptymalizowanej reakcji PCR z *Taq* polimerazą DNA typu „Hot Start”. Wynalazek znajduje zastosowanie w diagnostyce patogenów przenoszonych przez kleszcze.

Dotychczas znany jest z opisu patentowego PL218839 B1 sposób wykrywania i diagnostyki enterokrwotocznych *Escherichia coli* (EHEC) poprzez detekcję sygnału, pochodzącego z sond, przy użyciu transiluminatora, emitującego promieniowanie UV. Znana jest również sonda do wykrywania enterokrwotocznych *Escherichia coli* (EHEC), sekwencje do amplifikacji fragmentu genu kodującego toksynę Shiga oraz zastosowanie sond i sekwencji.

Znany jest również z opisu PL220906 B1 sposób wizualnego wykrywania i diagnostyki mikroorganizmów poprzez detekcję sygnału pochodzącego z sond z zastosowaniem transiluminatora. W pierwszym etapie przygotowuje się i przeprowadza w próbówce reakcję łańcuchową polimerazy PCR z wykorzystaniem DNA o aktywności 5'-3' egzonukleazy przy użyciu znakowanej fluorescencyjnie sondy, zawierającej na jednym z końców cząsteczkę fluorescencji wzbudzaną promieniowaniem UV, a na drugim końcu cząsteczkę wygaszającą fluorescencję, przy czym sondę stanowi krótki fragment DNA, komplementarny do DNA mikroorganizmu. W drugim etapie dokonuje się detekcji fluorescencyjnego sygnału pochodzącego z sondy bezpośrednio w próbówce reakcyjnej, przy wykorzystaniu zwłaszcza transiluminatora lub lampy będących źródłem promieniowania UV, zwłaszcza o długości 312 nm i prowadzi się obserwację gołym okiem zielonożółtego świecenia roztworu w próbówce, które jest widoczne tylko w przypadku gdy znakowana sonda ulegnie degradacji, a tym samym gdy do próbówki wprowadzone zostanie DNA komplementarnie do zaprojektowanej sondy.

Sonda typu Looped UVEx Probe jest to dowolnej długości oligonukleotyd DNA, specjalnie zaprojektowany, tak by w zakresie temperatur 4–24°C posiadał zdolność do zwinięcia się (z ang. folding) i tworzenia struktur drugorzędowych, w tym przynajmniej jednej wypętlonej struktury, w wyniku czego, w tym zakresie temperatur, graniczna wartość ΔG (= dG) dla sondy, obliczona z użyciem programu Mfold (dostępnego na stronie [www.http://unafold.rna.albany.edu](http://unafold.rna.albany.edu)) będzie większa bądź równa -8,36 kcal/mol oraz mniejsza bądź równa niż -1,14 kcal/mol, a odległość w linii prostej pomiędzy znajdującym się na końcu 5' znacznikiem (reporterem) fluorescencyjnym (UV-F), a zlokalizowanym na końcu 3' wygaszaczem fluorescencji (W), nie przekroczy 25 nukleotydów. Dzięki takim właściwościom, stosowane w reakcji PCR sondy typu Looped UVEx Probe mogą być dłuższe niż typowe, liniowe sondy TaqMan (20–25 nt), a wygaszacz fluorescencji nadal będzie spełniał swoją rolę tj. wystarczająco hamował sygnał fluorescencji emitowany ze znacznika znajdującego się na końcu 5' niezdegradowanej sondy. Z przeprowadzanych doświadczeń wynika, iż sondy typu Looped UVEx Probe o wartościach $-1,14 \geq \Delta G \geq -8,36$ kcal/mol mogą być z powodzeniem stosowane w zoptymalizowanej reakcji PCR z etapem chłodzenia próby w 4°C, dla której przedstawione w Tabeli nr 1 warunki zostały specjalnie opracowane i są uniwersalne dla wszystkich wymienionych w niniejszym zgłoszeniu przykładów zastosowań. Wykorzystanie w reakcji PCR sondy typu Looped UVEx Probe stwarza m.in. możliwość detekcji powstałego produktu bezpośrednio w próbówce poreakcyjnej, wskutek jej naświetlenia światłem UV.

Kolejną charakterystyczną cechą sond typu Looped UVEx Probe jest znajdujący się na końcu 5' sondy znacznik fluorescencyjny (UV-F), tzw. reporter, który w zamian lub oprócz właściwości emisji sygnału po wzbudzeniu światłem widzialnym w zakresie 400–700 nm lub w zakresie bliskiej podczerwieni (700–1000 nm), musi posiadać zdolność emisji sygnału fluorescencyjnego po wzbudzeniu światłem UV (o długości fali poniżej 400 nm). Niezwykle istotny jest również dobór wygaszacza (W), który w warunkach naświetlania światłem UV hamuje sygnał fluorescencji znajdującego się na 5' końcu sondy reportera i co równie ważne, nie wysyła własnego sygnału fluorescencji, bądź którego własny sygnał fluorescencji, a co za tym idzie także intensywność fluorescencji tła reakcji są wystarczająco niskie i nie dające widzialnego gołym okiem zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej z kontroli negatywnej (bez udziału matrycowego DNA), podczas minimum 4-minutowego naświetlania światłem UV.

Głównym problemem dotyczącym patogenów przenoszonych przez kleszcze jest zjawisko koinfekcji, czyli infekcji wieloma patogenami jednocześnie. Niejednokrotnie dowiedziono, iż borelioza jako jednostka chorobowa coraz częściej występuje wraz z innymi koinfekcjami odkleszczowymi. Wskutek

ugryzienia przez kleszcza, pacjenci poza różnymi gatunkami bakterii z rodzaju *Borrelia*, mogą zostać zainfekowani patogenami z rodzaju *Babesia*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, czy też takimi gatunkami jak np. *Anaplasma phagocytophilum* albo *Coxiella burnetii*. Opublikowano, że prawie 66% pacjentów z chorobą z Lyme wykazuje dowody serologiczne koinfekcji *Babesia microti*. Sama borelioza wcześniej rozpoznana na etapie rumienia daje duże szanse na wyzdrowienie – przy zastosowaniu odpowiednio długiego leczenia i przy pomocy odpowiednich dawek antybiotyków. Badania wskazują, iż obecność koinfekcji powoduje dużo cięższy kliniczny przebieg choroby ze zwiększoną ilością uszkodzonych narządów oraz większą trudnością pozbycia się patogenów. Znacznie wydłuża się czas dochodzenia pacjenta do zdrowia. Zarówno infekcja patogenami *Babesia*, jak i *Borrelia* ma działania immunosupresyjne, zatem współistnienie obu infekcji bardzo osłabia układ odpornościowy. Koinfekcje mogą ponadto ułatwiać powstawanie uszkodzeń wywołanych przez krętki w stawach, sercu i nerwach. Istnieją różnice w klinicznym obrazie u pacjenta z koinfekcjami w porównaniu z sytuacją, gdy każda infekcja występuje pojedynczo. Mogą wystąpić różne i nietypowe objawy, utrudniające rozpoznanie choroby. Leczenie w przypadku koinfekcji często wymaga wprowadzania zmian w standardowych zaleceniach. Terapie skuteczne w przypadku pojedynczej infekcji, często nie dają oczekiwanych rezultatów w przypadku koinfekcji. W przypadku pacjentów z boreliozą zainfekowanych dodatkowo patogenami z grupy *Babesia* lub *Bartonella*, często typowa terapia antybiotykowa, stosowana w leczeniu tej choroby, jest po prostu nieskuteczna. Pojawiają się również spostrzeżenia, iż być może wcale nie mamy do czynienia z tzw. „przewlekłą boreliozą”, a jedynie „niedoleczoną” z powodu współistniejących, jednak często niezdiagnozowanych koinfekcji. W obliczu takiego problemu, niezwykle istotne jest odpowiednie zdiagnozowanie wszystkich przeniesionych przez kleszcza patogenów i wymaga to zastosowania czułego, ale przede wszystkim specyficznego narzędzia diagnostycznego, które pozwoli jednoznacznie zidentyfikować poszczególne grupy patogenów.

Specyficzność zestawu testowego jest tu nie lada wyzwaniem ze względu na fakt, iż niektóre grupy patogenów odkleszczowych są ze sobą blisko spokrewnione, poza tym nie można wykluczyć, iż organizm pacjenta nie jest zainfekowany innymi, nie przenoszonymi przez kleszcze ale blisko spokrewnionymi patogennymi mikroorganizmami. Szczególnie trudna w tego typu przypadkach jest identyfikacja patogenów w oparciu o sekwencje 16S (18S) rRNA, które charakteryzują się małą zmiennością i których stopień zróżnicowania rośnie wraz ze wzrostem dystansu filogenetycznego pomiędzy badanymi mikroorganizmami.

Wynalazek dotyczy sondy typu Looped UVEx Probe do wykrywania materiału genetycznego przenoszonego przez kleszcze, który jest amplifikowany podczas reakcji PCR przez polimerazę *Taq* DNA typu „Hot Start”, który cechuje się tym, że sonda jest oligonukleotydem dowolnej długości, który ulega zwinięciu w zakresie temperatur 4–24°C i tworzy struktury drugorzędowe, w tym wypętlenie, przyjmując wartości graniczne ΔG (dG) z zakresu $-1,14 \geq \Delta G \geq -8,36$ kcal/mol. Odległość w linii prostej między reporterem fluorescencyjnym (UV-F) a wygaszaczem fluorescencji (Q) w zwiniętej sondzie nie przekracza 25 nukleotydów (nt). Istotne jest również to, że sonda zawiera sekwencję nukleotydową 1 o nazwie S_Ap i/lub 2 o nazwie S_Bb i/lub 3 o nazwie S_B1 i/lub 4 o nazwie S_Br i/lub 5 o nazwie S_Cb i/lub 6 o nazwie S_Mf i/lub 7 o nazwie S_Mp i/lub 8 o nazwie S_Rc. Sekwencje pokazano w wykazie sekwencji.

Korzystnie, wartość graniczna ΔG dla sondy jest większa lub równa -8,36 kcal/mol i jest mniejsza lub równa -1,14 kcal/mol.

Korzystnie, reporterem fluorescencyjnym (UV-F), jest: AttoRho6G, AttoRho13, Atto520, AttoRho14, Atto495, Atto390, lub 6FAM.

Korzystnie, wygaszaczem fluorescencji (Q) jest Eclipse, BBQ650, lub BHQ3.

Wynalazek dotyczy zastosowania sondy zdefiniowanej powyżej do wykrywania patogenów przenoszonych przez kleszcze z wykorzystaniem zoptymalizowanej reakcji PCR.

Korzystnie, wykrywanie przeprowadzane jest w reakcji PCR ze starterami przednimi i wstecznymi odpowiednio określonymi przez sekwencje 9 i 10 dla sondy o sekwencji 1 lub przez sekwencje 11 i 12 dla sondy o sekwencji 2 lub przez sekwencje 13 i 14 dla sondy o sekwencji 3 lub przez sekwencje 15 i 16 dla sondy o sekwencji 4 lub przez sekwencje 17 i 18 dla sondy o sekwencji 5 lub przez sekwencje 19 i 20 dla sondy o sekwencji 6 lub przez sekwencje 21 i 22 dla sondy o sekwencji 7 lub przez sekwencje 23 i 24 dla sondy o sekwencji 8.

Wynalazek dotyczy sond oraz zastosowanie sond do wykrywania patogenów, przenoszonych przez kleszcze. Istotne są według wynalazku takie cechy jak temperatura związania sond, wartości dG jak i określone sekwencje sond i starterów. Dzięki temu możliwe jest skuteczne wykrycie patogenów

przenoszonych przez kleszcze w sposób czuły ale i jednocześnie specyficzny, zaś dopracowane parametry sond umożliwiają tworzenie się struktur drugorzędowych zmniejszających dystans pomiędzy reporterem fluorescencyjnym a wygaszaczem fluorescencji, w zakresie temperatur 4–24°C.

Sekwencje sond i starterów podano na wykazie a dodatkowo sondy z podaniem numeru sekwencji zestawiono w Tabeli 2. Sekwencje starterów forward i reverse podano na wykazie sekwencji a dodatkowo zestawiono w Tabeli 2 podając numer sekwencji z wykazu sekwencji.

Przykładowe patogeny przenoszone przez kleszcze przedstawione są w Tabeli 3.

Reakcje PCR przeprowadzono w przykładzie zgodnie z warunkami opisanymi w Tabeli nr 1 i w obecności komplementarnego fragmentu matrycowego DNA ulegnie degradacji przez polimerazę DNA, emitując sygnał fluorescencyjny, widoczny podczas 4-minutowego naświetlania mieszaniny poreakcyjnej w probówce światłem UV.

Temperatura topnienia wygenerowana za pomocą programu Primer3 utrzymuje się na poziomie $70 \pm 3^\circ\text{C}$.

Para starterów gdzie temperatura topnienia każdego ze starterów (forward i reverse) utrzymuje się na poziomie $60 \pm 3^\circ\text{C}$.

Para starterów gdzie w reakcji PCR przeprowadzonej zgodnie z warunkami opisanymi w Tabeli nr 1 i zastrz. 2 i w obecności komplementarnego fragmentu matrycowego DNA umożliwia amplifikację ograniczonego przez te startery fragmentu DNA.

Sposób wykrywania patogenów przenoszonych przez kleszcze gdzie występująca w zwiniętej formie sonda typu Looped UVEx Probe podczas przygotowywania reakcji PCR w lodzce, ulega linearyzacji podczas etapów wstępnej i cyklicznej denaturacji DNA w 95°C , a następnie hybrydyzacji z komplementarnym fragmentem w matrycowym DNA podczas wspólnego etapu dla przyłączenia (annealingu) i wydłużania (elongacji) starterów, przeprowadzanego w 60°C przez 60 sekund; podczas tego etapu sparowana i związana z matrycowym DNA sonda typu Looped UVEx Probe jest degradowana przez *Taq* polimerazę DNA typu „Hot Start”, co powoduje rozdzielenie cząsteczek znacznika i wygaszacza oraz uwolnienie znacznika spod hamującego wpływu wygaszacza, ilość rozdzielonych cząsteczek, a tym samym uwolnionych cząsteczek znacznika wzrasta w każdym kolejnym cyklu z docelowych 39 cykli i zależy od początkowej ilości matrycowego DNA w mieszaninie reakcyjnej;

- cząsteczki sondy, które nie uległy degradacji ze względu na niewielką początkową ilość matrycowego DNA (poniżej poziomu detekcji) lub zupełny brak matrycowego DNA w reakcji, ulegają zwinięciu i tworzą struktury drugorzędowe, w tym wypętlenia podczas ostatniego etapu schładzania próbki w temperaturze 4°C przeprowadzanego przez minimum 3 minuty, zgodnie z opisem w Tabeli nr 1;

- po zakończeniu reakcji PCR, schłodzone próbki z mieszaniną poreakcyjną umieszczane są w pobliżu źródła światła UV < 400 nm (np. na transiluminatorze UV), naświetlane przez maksymalnie 4 minuty i analizowane oraz fotografowane;

- podczas tej analizy wzbudzone światłem UV cząsteczki znaczników, uwolnione spod działania cząsteczek wygaszaczy, emitują sygnał fluorescencyjny, co skutkuje pojawieniem się zabarwienia bezbarwnej dotąd mieszaniny poreakcyjnej w probówce, przy czym kolor zabarwienia zależy od zastosowanego znacznika UV-F;

- w przypadku prób bez matrycowego DNA lub tych z początkową ilością DNA poniżej poziomu detekcji, sondy nie ulegają degradacji w ogóle lub w bardzo niewielkiej ilości;

- podczas ostatniego etapu chłodzenia próby w temp. 4°C , zlinearyzowane w trakcie reakcji PCR, aczkolwiek niezdegradowane sondy ulegają ponownemu zwinięciu i wypętleniu wskutek czego, cząsteczki znacznika fluorescencyjnego znajdują się ponownie w bliskiej odległości (do 25 nt) i pod hamującym wpływem wygaszacza;

- w konsekwencji tego, emitowany sygnał fluorescencji tła reakcji utrzymuje się na niskim poziomie i nie dochodzi do pojawienia się dostrzegalnego gołym okiem zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej.

Niewątpliwą zaletą sond Looped UVEx w porównaniu z poprzednio stosowanymi, liniowymi sondami typu TaqMan, jest możliwość zaprojektowania dłuższych sond, przy jednoczesnym zachowaniu bliskiej odległości (do 25 nukleotydów) pomiędzy wzbudzającym światłem UV znacznikiem fluorescencyjnym, a hamującym jego fluorescencję wygaszaczem, w zakresie temperatur 4–24°C. W takich warunkach, bliski kontakt znacznika UV-F i odpowiedniego wygaszacza hamuje emisję sygnału fluorescencyjnego z reportera, jeśli podczas reakcji PCR nie doszło do degradacji sondy przez *Taq* polimerazę DNA.

W celu lepszego zrozumienia wynalazku rozwiązanie zostało przedstawione na rysunku, gdzie:

Fig. 1 – przedstawia schemat sondy typu Looped UVEx Probe w formie zwiniętej i niezdegradowanej.

Fig. 2 – przedstawia schemat przebiegu reakcji PCR z sondą typu Looped UVEx Probe oraz procesu detekcji powstałego w reakcji produktu w świetle UV, po uprzednim schłodzeniu mieszaniny poreakcyjnej w temp. 4°C. Zastosowana w reakcji sonda typu Looped UVEx Probe jest sondą DNA dowolnej długości, jednak wykazującą zdolność tworzenia w zakresie temperatur 4–24°C minimum jednej wypętlonej struktury, której obecność powoduje skrócenie odległości pomiędzy wzbudzanym światłem UV znacznikiem fluorescencyjnym (UV-F na końcu 5') oraz odpowiednio dobranym wygaszaczem fluorescencji (W na końcu 3'), do maksymalnie 25 nukleotydów, a tym samym hamuje emisję sygnału fluorescencyjnego w przypadku, gdy w reakcji nie ma docelowego DNA (-DNA) i nie dochodzi do degradacji sondy przez polimerazę. Sygnał fluorescencyjny widoczny w postaci zmiany zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej w probówce naświetlonej promieniowaniem UV, jest dostrzegalny „gołym okiem” tylko w przypadku obecności w mieszaninie reakcyjnej docelowego DNA i jego efektywnej amplifikacji (+DNA).

Fig. 3 – przedstawia porównanie fluorescencji tła reakcji, emitowanej przez sondę typu Looped UVEx Probe (S_Mp), w mieszaninie poreakcyjnej z kontroli negatywnej (-DNA), naświetlanej światłem UV, po jej uprzednim schłodzeniu w temp. 4°C podczas ostatniego etapu reakcji PCR (puste kwadraty) i bez etapu chłodzenia w temp. 4°C (wypełnione kwadraty). Pomiaru fluorescencji dokonano z wykorzystaniem czytnika płytek przy dł. fali 495 nm/520 nm. Wprowadzenie etapu chłodzenia próby w temp. 4°C skutkuje obniżeniem poziomu fluorescencji tła reakcji.

Fig. 4 – przedstawia porównanie fluorescencji tła reakcji, emitowanej przez sondę tox1probe znaną z opisów patentowych nr PL218839 B1 i PL220906 B1 oraz dwie sondy typu Looped UVEx Probe z niniejszego zgłoszenia (S_Rc oraz S_Mp), w schłodzonych w temp. 4°C mieszaninach poreakcyjnych z kontroli negatywnych (-DNA), naświetlanych światłem UV przez określoną długość czasu. Pomiaru fluorescencji dokonano z wykorzystaniem czytnika płytek przy dł. fali 495 nm/520 nm. Graniczne wartości ΔG dla sondy tox1probe obliczone z wykorzystaniem programu Mfold wynoszą -1,55 w temp. 4°C oraz 0,98 w temp. 24°C.

Sonda tox1probe nie należy do sond typu Looped UVEx Probe. Z porównania wynika, iż sondy typu Looped UVEx Probe charakteryzują się zarówno niższym początkowym poziomem fluorescencji (czas 0), jak i niższym wzrostem fluorescencji w kolejnych minutach naświetlania światłem UV. W konsekwencji, sondy typu Looped UVEx Probe wypadają korzystniej w porównaniu z sondą tox1probe pod względem poziomu fluorescencji tła reakcji.

Fig. 5 – (panele A-F) przedstawia przykłady sond typu Looped UVEx Probe zdolnych do formowania wypętlonych struktur w zakresie temperatur 4–24°C o granicznych wartościach ΔG mieszczących się w przedziale $-1,14 \geq \Delta G \geq -8,36$. Dla każdej sondy w nawiasach podana została liczba nukleotydów rozdzielających znacznik od wygaszacza (całkowita/po zwinięciu liczona w linii prostej) oraz graniczna wartość ΔG (kcal/mol) wyliczona za pomocą programu Mfold.

Fig. 6 – przedstawia analizę czułości zoptymalizowanej reakcji PCR z zestawami sond typu Looped UVEx Probe oraz starterów zaprojektowanych w celu amplifikacji DNA pochodzącego od wybranych grup patogenów przenoszonych przez kleszcze (Panele A-H). Detekcji powstałych w reakcji produktów dokonano z wykorzystaniem I. elektroforezy DNA w żelu agarozowym, II. obserwacji w świetle UV zmiany zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej w probówce z bezbarwnej na pomarańczowo-żółtą w przypadku amplifikacji docelowego produktu oraz III. zbadania poziomu emitowanej z uwolnionego znacznika fluorescencji, z użyciem czytnika płytek. W niniejszym doświadczeniu wykorzystano sondy wyznakowane na końcu 5' znacznikiem AttoRho6G oraz wygaszaczem Eclipse na końcu 3'. Prezentowane wyniki pomiaru intensywności fluorescencji emitowanej z uwolnionego znacznika AttoRho6G uzyskano po 30-krotnym rozcieńczeniu próby, dokonując pomiaru, przy dł. fali równej 534 nm (wzbudzenie) oraz 559 nm (emisja).

Fig. 7 – Przetestowane kombinacje dostępnych na rynku znaczników fluorescencyjnych oraz wygaszaczy sygnału fluorescencyjnego, zastosowane do wyznakowania sond typu Looped UVEx Probe. Reakcje PCR przeprowadzono zgodnie z warunkami opisanymi w Tabeli nr 1 z wykorzystaniem zestawu starterów i sondy nr 4 (*Borrelia* spp.) Zaprezentowano zdjęcia wykonane po 4-minutowym naświetlaniu mieszanin poreakcyjnych w probówkach, światłem UV (302 nm), pochodzącym z transilluminatora UV. W przeciwieństwie do prób kontrolnych (-) wykonanych bez matrycowego DNA, próby badane (+) zawierały matrycowe DNA, w postaci genomowego DNA wyizolowanego z bakterii *Borrelia burgdorferi*. Materiał genetyczny został pozyskany z kolekcji ATCC (nr kat. 35210D).

Fig. 8A-H – Analiza specyficzności poszczególnych zestawów testowych z wykorzystaniem materiału genetycznego pozyskanego ze szczepów referencyjnych przeprowadzona za pomocą reakcji

PCR z analizą obecności produktów PCR w świetle UV oraz z użyciem elektroforezy DNA w żelu agarozowym.

A – Analiza specyficzności zestawu testowego *Anaplasma phagocytophilum*

B – Analiza specyficzności zestawu testowego *Babesia* spp.

C – Analiza specyficzności zestawu testowego *Bartonella* spp.

D – Analiza specyficzności zestawu testowego *Borrelia* spp.

E – Analiza specyficzności zestawu testowego *Coxiella burnetii*

F – Analiza specyficzności zestawu testowego *Mycoplasma fermentans*

G – Analiza specyficzności zestawu testowego *Mycoplasma pneumoniae*

H – Analiza specyficzności zestawu testowego *Rickettsia* spp.

Sondy typu Looped UVEx Probe oraz ich zastosowanie w specjalnie zoptymalizowanej reakcji PCR wraz z alternatywnym w stosunku do elektroforezy DNA w żelu agarozowym, sposobem detekcji powstałego podczas reakcji PCR produktu, z użyciem światła UV zobrazowano na Fig. 2. Sposób ten, polega na obserwacji zabarwienia, uprzednio schłodzonej w temp. 4°C, mieszaniny poreakcyjnej w próbówce, które pod wpływem światła UV pojawia się tylko w przypadku obecności w analizowanej próbce zamplifikowanego, docelowego fragmentu DNA. Kolor zabarwienia, zależy od przyłączonego do końca 5' sondy znacznika fluorescencyjnego i przykładowo znacznik AttoRho6G daje żółto-pomarańczowe zabarwienie mieszaniny, podczas gdy AttoRho13 różowe – Fig. 7.

Zarówno obecność, jak i brak docelowego produktu w mieszaninie poreakcyjnej są łatwe do zidentyfikowania, gdyż w przeciwieństwie do zabarwionej próby pozytywnej (+DNA), negatywna próba kontrolna (-DNA), w której nie doszło do amplifikacji ze względu na brak docelowego DNA, pozostaje bezbarwna podczas naświetlania światłem UV. Istotną zmianą w porównaniu z opisami patentowymi nr PL218839 B1 i PL220906 B1 jest wprowadzenie dodatkowego, minimum 3-minutowego etapu chłodzenia próby w temp. 4°C. Sondy typu Looped UVEx Probe zastosowane w reakcji PCR z etapem chłodzenia charakteryzują się niższym poziomem fluorescencji tła reakcji, czyli fluorescencji emitowanej przez sondę, która nie uległa degradacji przez polimerazę w reakcji PCR, Fig. 3 i Fig. 4. Zmiana ta korzystnie wpływa na odczyt zmiany zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej, klasyfikację prób DNA+ oraz prób DNA-, a także na maksymalny czas naświetlania światłem UV, który wydłużono do 4 minut. W tym czasie wzrost poziomu fluorescencji tła reakcji z użyciem sond typu Looped UVEx Probe (S_Rc oraz S_Mp) nie przekracza 10%, podczas gdy intensywność fluorescencji tła reakcji z wykorzystaniem sondy tox1probe z opisów patentowych nr PL218839 B1 i PL220906 B1 wzrasta o 25% już w 2 minucie naświetlania światłem UV – Fig. 4. Wydłużenie czasu naświetlania badanej próby światłem UV do 4 minut jest korzystne w przypadku reakcji PCR z niewielką początkową ilością matrycowego DNA (rzędu kilku pikogram [pg] i niższych), gdzie emitowany sygnał fluorescencyjny wykrywany w postaci zmiany zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej jest niewidoczny lub słabo widoczny w pierwszych sekundach naświetlania światłem UV i wymaga dłuższego czasu naświetlania. Poza tym, niski i stabilny poziom fluorescencji tła reakcji w czasie naświetlania światłem UV ma szczególne znaczenie w przypadku prób/kontroli negatywnych, w których to spodziewany poziom fluorescencji tła reakcji nie może być dostrzegalny „gołym okiem” w trakcie wykonywania odczytu.

W trakcie reakcji PCR, do degradacji sondy typu Looped UVEx Probe dochodzi pod wpływem aktywności 5' egzonukleazy polimerazy *Taq* jedynie w obecności docelowego fragmentu DNA, który ulega amplifikacji w kolejnych cyklach reakcji. Wówczas to, występująca w zwiniętej formie sonda typu Looped UVEx Probe (podczas przygotowywania reakcji PCR próbki trzymane są na lodzie) ulega linearyzacji podczas etapów denaturacji DNA, a następnie hybrydyzacji z komplementarnym fragmentem w matrycowym DNA.

Podczas wspólnego etapu dla przyłączenia (annealingu) i wydłużania (elongacji) starterów, sparowana i związana z matrycowym DNA sonda jest degradowana przez polimerazę *Taq*, co powoduje rozdzielanie cząsteczek znacznika i wygaszacza oraz uwolnienie znacznika spod hamującego wpływu wygaszacza. Ilość rozdzielonych cząsteczek, a tym samym uwolnionych cząsteczek znacznika wzrasta w każdym cyklu i zależy od początkowej ilości matrycowego DNA w mieszaninie reakcyjnej. Cząsteczki sondy, które nie uległy degradacji ze względu na niewielką początkową ilość matrycowego DNA (poniżej poziomu detekcji) lub zupełny brak matrycowego DNA w reakcji (-DNA), ulegają zwinięciu i tworzą struktury drugorzędowe, w tym wypętlania, podczas ostatniego etapu schładzania próbki w temperaturze 4°C (Tabela nr 1). Po zakończeniu reakcji PCR, schłodzone próbki z mieszaniną poreakcyjną umieszczane są w pobliżu źródła światła UV (np. na transiluminatorze UV), naświetlane i obserwowane oraz fotografowane. Podczas takiej analizy wzbudzone światłem UV cząsteczki znaczników, uwolnione

spod działania cząsteczek wygaszaczy, emitują sygnał fluorescencyjny, który obserwujemy poprzez pojawienie się zabarwienia bezbarwnej dotąd mieszaniny poreakcyjnej w probówce. W przypadku prób bez matrycowego DNA lub tych z początkową ilością DNA poniżej poziomu detekcji, sondy nie ulegają degradacji w ogóle lub w bardzo niewielkiej ilości, w związku z czym nie obserwujemy pojawienia się zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej podczas analizy w świetle UV. Brak zabarwienia mieszaniny wynika z faktu, iż podczas ostatniego etapu chłodzenia próby w temp. 4°C, zlinearyzowane w trakcie reakcji PCR, aczkolwiek niezdegradowane sondy ulegają ponownemu zwinięciu i wypętleniu wskutek czego, cząsteczki znacznika fluorescencyjnego znajdują się ponownie w bliskiej odległości (do 25 nt) i pod hamującym wpływem wygaszacza. W rezultacie, pomimo wzbudzenia sondy światłem UV, nie dochodzi do emisji sygnału fluorescencyjnego ponad poziom fluorescencji tła reakcji, który to utrzymywany jest na niskim poziomie i nie dochodzi do pojawienia się widocznego zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej. Ze względu na fakt, iż podczas analizy w świetle UV przeprowadzanej w temperaturze pokojowej probówka z mieszaniną poreakcyjną może zostać ogrzana do temperatury pokojowej, istotne jest by sondy typu Looped UVEx Probe wykazywały zdolność tworzenia struktur drugorzędowych i wypętleni, zarówno w temperaturze 4°C, jak i 24°C (Fig. 1 i 5).

Ważne jest by wyznaczone dla tego typu sond wartości graniczne ΔG były mniejsze, bądź równe -1,14 kcal/mol i większe bądź równe -8,36 kcal/mol (zgodnie z wynikami przedstawionymi na Fig. 5). Zastosowanie w reakcji PCR sond w tym zakresie wartości ΔG skutkuje uzyskaniem niskiego i stabilnego poziomu fluorescencji tła reakcji. Co równie istotne, przy wartościach $-1,14 \geq \Delta G \geq -8,36$ tworzące się w niższych temperaturach struktury drugorzędowe i wypętlenia ulegają rozpleceniu podczas etapów denaturacji a następnie hybrydyzacji z docelowym fragmentem DNA podczas wspólnego etapu przyłączania i wydłużania starterów w ramach opracowanej reakcji PCR (Tabela nr 1). Ze względu na zmiany poziomu fluorescencji tła reakcji przekraczające 10% po 4 minucie naświetlania światłem UV (Fig. 4) oraz w obawie przed nadmiernym ogrzaniem próbki, jak i ze względu na możliwość degradacji DNA w probówce (w tym także degradacji sond) podczas zbyt długo trwającego etapu naświetlania promieniowaniem UV, określony został bezpieczny czas naświetlania probówki z mieszaniną poreakcyjną światłem UV z transiluminatora, który to wynosi maksymalnie 4 minuty. Istotne jest aby w tym przedziale czasowym wykonany został odczyt wyników w świetle UV i ewentualne zdjęcia aparatem fotograficznym, w celu zachowania obserwowanych wyników. Przed wykonaniem odczytu w świetle UV, probówki z mieszaninami poreakcyjnymi można przechowywać w temperaturze 4°C przez dłuższy czas np. 10 minut, 60 minut, przez noc. Schemat zmodyfikowanej techniki PCR z użyciem sondy typu Looped UVEx Probe znajduje się na Fig. 2.

Dodatkową zaletą zastosowania sondy typu Looped UVEx Probe w zoptymalizowanej reakcji PCR jest możliwość przeprowadzenia na jednej mieszaninie poreakcyjnej nie jednej, a trzech różnych sposobów detekcji powstającego w reakcji produktu. Oprócz standardowo wykonywanej po reakcji PCR elektroforezy DNA w żelu agarozowym, możliwe jest również przeprowadzenie wspomnianej powyżej analizy w świetle UV oraz wykonanie odczytu emitowanego sygnału fluorescencji z wykorzystaniem czytnika mikropłytek (Fig. 6). W ostatnim przypadku, mieszaninę poreakcyjną rozcieńcza się przeznaczoną do reakcji PCR wodą 30 razy i dokonuje pomiaru przy określonej długości fali wzbudzenia i emisji. Wybór długości fali zależy od możliwości czytnika, ale przede wszystkim od właściwości zastosowanego znacznika i jego zakresu widma absorpcji oraz fluorescencji.

Co istotne, sygnał fluorescencyjny może zostać wzbudzony przy długości fali z zakresu promieniowania UV ale z także w szerokim zakresie długości fal poza światłem UV.

Każdą z tych trzech analiz można wykonać niezależnie, aczkolwiek zastosowanie w reakcji PCR sondy typu Looped UVEx Probe jest niezbędne do wykonania odczytu fluorescencji za pomocą czytnika płytek oraz do przeprowadzenia analizy w świetle UV. Niewątpliwymi zaletami sposobu detekcji z wykorzystaniem światła UV są: bardzo krótki czas potrzebny na wykonanie analizy (do 4 minut), brak konieczności zakupu zaawansowanego technicznie i drogiego sprzętu, czy też zatrudnienia wykwalifikowanych pracowników do jego obsługi, a także fakt, iż zarówno sama reakcja amplifikacji docelowego fragmentu DNA, jak i detekcja powstałego produktu odbywają się w jednej zamkniętej probówce (bez konieczności przenoszenia mieszaniny), skutkiem czego nie ma ryzyka zanieczyszczenia badanej próby po zakończeniu reakcji. Co istotne jednak, wszystkie trzy analizy można wykonywać równolegle i stosować jako wzajemne uzupełnienie w celu uzyskania potwierdzonych i wiarygodnych wyników. Takie podejście jest niezwykle istotne w diagnostyce patogennych mikroorganizmów, m.in. tych przenoszonych przez kleszcze, gdzie zarówno czułość, jak i specyficzność wybranej metody mają wpływ na wynik końcowy, a tym samym na postawioną diagnozę i zalecone leczenie.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, nie stanowiące jego ograniczenia.

Przykład:

Przykłady wykorzystania sond typu Looped UVEx Probe o granicznych wartościach $-1,14 \geq \Delta G \geq -8,36$ (Fig. 1) w zoptymalizowanej reakcji PCR zostały przedstawione na Fig. 6 i w Tabelach nr 2 i Fig. 8. Są to przykłady wykorzystania sond typu Looped UVEx Probe w wykrywaniu materiału genetycznego pochodzącego od patogenów przenoszonych przez kleszcze. Doświadczenia wykonano na ośmiu zaprojektowanych zestawach sond i starterów ukierunkowanych na wykrywanie i amplifikację DNA następujących patogenów: 1. *Anaplasma phagocytophilum*, 2. *Babesia* spp., 3. *Bartonella* spp., 4. *Borrelia* spp., 5. *Coxiella burnetii*, 6. *Mycoplasma fermentans*, 7. *Mycoplasma pneumoniae* oraz 8. *Rickettsia* spp. Sondy i startery zostały zaprojektowane do sekwencji genów kodujących 16S rRNA (lub 18S rRNA w przypadku *Babesia*), a ich sekwencje zostały przedstawione w Tabeli nr 2. Zestawy z końcówką „spp.” w nazwie, zostały zaprojektowane tak, by wykrywać więcej niż jeden gatunek z danego rodzaju patogennych mikroorganizmów. Wymienione zestawy sond i starterów przetestowano w reakcji PCR o zoptymalizowanych warunkach (Tabela nr 1), korzystając z referencyjnych próbek DNA (Tabela nr 3), pozyskanych z różnych kolekcji oraz ośrodków naukowych wymienionych. Sondy zaprojektowano tak, aby temperatury topnienia dla wszystkich sond ustalić na poziomie $70 \pm 3^\circ\text{C}$, z kolei wszystkie startery tak, aby ich temperatury topnienia oscylowały na poziomie $60 \pm 3^\circ\text{C}$. Dzięki tak dobranym parametrom możliwe było ustalenie dla wszystkich analizowanych zestawów, zoptymalizowanych i uniwersalnych warunków reakcji PCR. W odróżnieniu od klasycznej metody PCR, program zoptymalizowanej reakcji PCR z sondą typu Looped UVEx Probe zakłada przeprowadzenie etapu annealingu (przyłączania starterów) i elongacji (wydłużania starterów) w tym samym momencie, w temperaturze optymalnej dla etapu annealingu, równej 60°C , zwiększenie liczby cykli ponad standardowe 36 do 39 w celu poprawy czułości oraz wprowadzenie dodatkowego, koniecznego etapu chłodzenia próby przez minimum 3 minuty w 4°C , w celu umożliwienia niezdegradowanym sondom zwinienia się w struktury drugorzędowe (Tabela nr 1). Ze względu na brak typowego etapu elongacji w temperaturze optymalnej dla polimerazy, przy jednoczesnym zwiększeniu ilości cykli, istotne jest przeanalizowanie zakresu temperatur w jakich działa wybrana polimeraza i zalecane jest zwiększenie standardowo dodawanej liczby jednostek polimerazy do minimum 2,5 U. W opisanych powyżej oraz zebranych w Tabeli nr 1 warunkach reakcji PCR przetestowano z powodzeniem dwie różne *Taq* polimerazy DNA typu „Hot Start”: polimerazę SuperHot *Taq* firmy Bioron GmbH oraz polimerazę *TaqNovaHS* firmy Bliirt S.A. Istnieje możliwość wykorzystania innych *Taq* polimeraz DNA typu „Hot Start” w tym celu.

Analiza czułości zoptymalizowanej techniki PCR z wykorzystaniem zaprojektowanych zestawów sond i starterów (Tabela nr 2) wykazała, iż zastosowanie sond typu Looped UVEx Probe, korzystnie wpływa na czułość metody i umożliwia wykrycie niewielkich początkowych ilości DNA, w granicach 0,02 pg (Fig. 6). Związane jest to z obniżeniem poziomu fluorescencji tła reakcji, a tym samym możliwością wydłużenia czasu naświetlenia światłem UV, zwiększeniem liczby cykli z 28 opisanych poprzednio (patenty nr PL218839 B1 i PL220906 B1) do 39 oraz możliwością wykonania potrójnej detekcji powstających produktów. Stosowanie dużej liczby cykli (> 36) w klasycznych testach PCR nie jest wskazane ze względu na duże ryzyko pojawienia się niespecyficznych produktów, które zaburzają, a często także uniemożliwiają odczyt wyników elektroforezy DNA w żelu agarozowym. Takim przykładem może być wynik uzyskany dla zestawu *Babesia* spp. (Fig. 6, panel B). Wskutek pojawienia się zbyt wielu niespecyficznych produktów w reakcji z początkowym DNA, równym 2 pg (Fig. 6, panel B), nie można na podstawie zdjęć z elektroforezy DNA w żelu agarozowym, jednoznacznie stwierdzić, czy docelowy produkt faktycznie powstał w tej reakcji. Takie ograniczenia nie dotyczą jednak reakcji PCR z sondą typu Looped UVEx Probe, gdyż tu dodatkowe zabezpieczenie prawidłowego odczytu stanowi możliwość zastosowania innego sposobu detekcji, uzależnionego od obecności sondy w reakcji. Możliwość wykonania dodatkowej analizy, poprzez krótką obserwację w świetle UV zmiany zabarwienia mieszaniny poreakcyjnej w probówce, z bezbarwnej na pomarańczowo-żółtą lub poprzez wykorzystanie czytnika płytek i wykonanie odczytu poziomu fluorescencji przy długości fali 559 nm, pozwoliły jednoznacznie potwierdzić obecność produktu w prezentowanym przypadku (Fig. 6, panel B).

Przewaga pierwszej analizy nad drugą wynika z krótszego czasu potrzebnego na jej wykonanie, zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia próby po zakończonej reakcji, poza tym braku konieczności zastosowania drogiego sprzętu, takiego jak czytnik płytek oraz wykwalifikowanej w obsłudze tego sprzętu kadry.

Specyficzność reakcji PCR, a tym samym liczba różnych powstających w reakcji produktów, zależą z jednej strony od jakości użytego DNA i stopnia jego zdegradowania, z drugiej zaś strony od obecności

w próbie cząsteczek DNA o wysokim stopniu podobieństwa w danym obszarze sekwencji, ale pochodzących od innego, obcego organizmu. Dowiedziono, iż w przypadku patogenów przenoszonych przez kleszcze, dużym problemem jest niespecyficzność opracowanych testów PCR. Opisano przypadki, w których testując próbę na obecność DNA pochodzącego z bakterii *Anaplasma phagocytophilum* uzyskiwano wyniki fałszywie pozytywne w próbach zawierających DNA pochodzące od innych także przenoszonych przez kleszcze bakterii: *Rickettsia rickettsii* oraz *Bartonella henselae*. Poza tym, niespecyficzne produkty mogą pojawić się również na skutek obecności w organizmie pacjenta innych, blisko spokrewnionych ale nieprzenoszonych przez kleszcze, patogenów. W klasycznej reakcji PCR z detekcją produktów za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym nie ma możliwości rozróżnienia prążków właściwego od niespecyficznego, jeśli są zbliżone wielkościami. Możliwość taką daje jednak zastosowanie w reakcji PCR sondy typu Looped UVEx Probe. Analiza specyficzności zaprojektowanych zestawów sond i starterów przeprowadzona na materiale referencyjnym pozyskanym od rozpatrywanych patogenów przenoszonych przez kleszcze, a także od kilku dodatkowo wybranych, blisko spokrewnionych mikroorganizmów (Tabela nr 3) wykazała, iż zastosowanie sond typu Looped UVEx Probe oraz możliwość wykonania detekcji produktu w świetle UV, poprawia specyficzność testów PCR i zmniejsza ryzyko otrzymania wyników fałszywie pozytywnych. W przeciwieństwie do trudności z interpretacją wyników prezentowanych na zdjęciach żeli agarozowych, detekcja w świetle UV pozwala jednoznacznie potwierdzić obecność lub stwierdzić brak specyficznego produktu. Poparciem dla tych słów są wyniki przedstawione w Fig. 8. W przypadku zestawu *Anaplasma phagocytophilum* (Fig. 8A) zaprojektowanego do identyfikacji DNA tegoż właśnie gatunku bakterii, prążek na podobnej wysokości zaobserwowano w próbie 18, czyli w obecności DNA wyizolowanego z *Mycoplasma pirum*.

Zgodnie z założeniami, analiza w świetle UV nie wykazała obecności właściwego produktu w próbie 18 i nie potwierdziła wyniku elektroforezy DNA. Analogiczne sytuacje zaobserwowano w przypadku zestawu *Babesia* spp. i prób nr 8 oraz 19 (Fig. 8B), zestawu *Borrelia* spp. i prób nr 13, 24, 25, oraz 26 (Fig. 8D), czy też zestawu *Mycoplasma pneumoniae* oraz prób nr 8 i 18 (Fig. 8H). Analiza mieszanin poreakcyjnych w świetle UV pozwoliła wykluczyć wszystkie fałszywie pozytywne wyniki uzyskane podczas elektroforezy DNA w żelu agarozowym. Wyniki te dowodzą, iż zastosowanie w testach PCR sond typu Looped UVEx Probe znacząco poprawia specyficzność tej metody i zmniejsza ryzyko popełnienia błędu nawet w sytuacji pojawienia się niespecyficznego produktu o wielkości bardzo zbliżonej do właściwego produktu (Fig. 8H próby 18 i 19). Niewątpliwie, zastosowanie sond Looped UVEx Probe w testach PCR może dostarczyć wielu korzyści w dziedzinie diagnostyki molekularnej patogennych mikroorganizmów, co istotne jednak, korzyści z zastosowania tego typu sond w reakcji PCR mogą pojawić się wszędzie tam, gdzie mamy do czynienia z problemem niespecyficznych produktów w reakcji PCR.

Literatura:

- Ram S, Singh RL, Shanker R. In silico comparison of real-time PCR probes for detection of pathogens In Silico Biol. 2008;8(3-4):251–9.
- Nejman-Faleńczyk B, Bloch S, Januszkiewicz A, Węgrzyn A, Węgrzyn G. A simple and rapid procedure for the detection of genes encoding Shiga toxins and other specific DNA sequences. Toxins (Basel). 2015 Nov 13;7(11):4745–57.
- Jiang Y, Ke C, Mieczkowski PA, Marszalek PE. Detecting ultraviolet damage in single DNA molecules by atomic force microscopy. Biophys J. 2007 Sep 1;93(5):1758–67. Epub 2007 May 4.
- Burrascano JJ Jr. Diagnostic Hints And Treatment Guidelines For Lyme And Other Tick Borne Illnesses, 2005 MANAGING LYME DISEASE, 15th edition.
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, Lindgren E. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. In: Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases Vol. 2009, Article ID 593232.
- Nicolson GL. Diagnosis and Therapy of Chronic Systemic Co-infections in Lyme Disease and Other Tick-Borne Infectious Diseases, Townsend Letter 2007 April; 93–98.
- Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria, Clinical Microbiology and Infectious Diseases, vol. 2004 17(4).
- Fazekas AJ, Steeves R, Newmaster SG. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. BioTechniques 2010, 48, 277–285.
- Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. 2012, 63, e3998.
- Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 717–722.
- Qurollo BA, Riggins D, Comyn A, Zewde MT, Breitschwerdt EB. Development and validation of a sensitive and specific sodB-based quantitative PCR assay for molecular detection of *Ehrlichia* species. J. Clin. Microbiol. 2014, 52, 4030–4032.

Wykaz sekwencji nukleotydowych:

Sekwencja 1

5' CAGGGTTAAGCCCTGGCGTTTCACCTT 3'

Sekwencja 2

5' AAAGTTAGGGGCTCGAAGACGATCAGATACC 3'

Sekwencja 3

5' ACGCCCAGTAAATGCGAACAACGCTAGC 3'

Sekwencja 4

5' CAGTCTTGACCCAGAAGTTCGCCTTCGCC 3'

Sekwencja 5

5' TAACGCGTTAAGTTCTCCGCCTGGGG 3'

Sekwencja 6

5' CTA ACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 3'

Sekwencja 7

5' TTTGGGAAGAATGACTTTAGCAGGTAACGGC 3'

Sekwencja 8

5' AAAGCAATTCCGAGGTAAAGCCCCGAG 3'

Sekwencja 9

5' TATTCCGCTATCCTCTCCCGG 3'

Sekwencja 10

5' CAATTATTGGGCGTAAAGGGCAT 3'

Sekwencja 11

5' GTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGT 3'

Sekwencja 12

5' TGATTTCTCTCAAGTTGCTGAAGG 3'

Sekwencja 13

5' CCTGGGATTTACCTCTGACTTAAAT 3'

Sekwencja 14

5' CAGCAGTGGGGAATATTGGACAA 3'

Sekwencja 15

5' GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCT 3'

Sekwencja 16

5' GGATTATTGGGCGTAAAGGGTGA 3'

Sekwencja 17

5' ACTAGCTGTTGGGAAGTTCAC 3'

Sekwencja 18

5' GCACCAAATCATCTCTGACAAG 3'

Sekwencja 19

5' GAAAAGACAGAATAGGAAATGATTTTGTGTT 3'

Sekwencja 20

5' GCTAACCTCTACACAACTCTAGCC 3'

Sekwencja 21

5' TGTGTGAACGATGAAGGTCTTTAA 3'

Sekwencja 22

5' AAACCTCCCTACCACACTCTAGATTA 3'

Sekwencja 23

5' CACTAAGAATTCCATCATCCCCTACTA 3'

Sekwencja 24

5' AGCAAGGAAGATAATGACGTTACTTG 3'

Zastrzeżenia patentowe

1. Sonda typu Looped UVEx Probe do wykrywania materiału genetycznego przenoszonego przez kleszcze, który jest amplifikowany podczas reakcji PCR przez polimerazę *Taq* DNA typu „Hot Start”, **znamienna tym**, że sonda jest oligonukleotydem dowolnej długości, który ulega zwinięciu w zakresie temperatur 4–24°C i tworzy struktury drugorzędowe, w tym wypętlenie, przyjmując wartości graniczne ΔG (dG) z zakresu $-1,14 \geq \Delta G \geq -8,36$ kcal/mol, przy czym odległość w linii prostej między reporterem fluorescencyjnym (UV-F) a wygaszaczem fluorescencji (Q) w zwiniętej sondzie nie przekracza 25 nukleotydów (nt), podczas gdy sonda zawiera sekwencję 1 i/lub 2 i/lub 3 i/lub 4 i/lub 5 i/lub 6 i/lub 7 i/lub 8.
2. Sonda według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że wartość graniczna ΔG dla sondy jest większa lub równa -8,36 kcal/mol i jest mniejsza lub równa -1,14 kcal/mol.
3. Sonda według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że reporterem fluorescencyjnym (UV-F), jest: AttoRho6G, AttoRho13, Atto520, AttoRho14, Atto495, Atto390, lub 6FAM.
4. Sonda według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że wygaszaczem fluorescencji (Q) jest Eclipse, BBQ650, lub BHQ3.
5. Zastosowanie sondy zdefiniowanej w zastrzeżeniach 1–4 do wykrywania patogenów przenoszonych przez kleszcze z wykorzystaniem zoptymalizowanej reakcji PCR.
6. Zastosowanie według zastrzeżenia 5, w którym wykrywanie przeprowadzane jest w reakcji PCR ze starterami przednimi i wstecznymi odpowiednio określonymi przez sekwencje 9 i 10 dla sondy o sekwencji 1 lub przez sekwencje 11 i 12 dla sondy o sekwencji 2 lub przez sekwencje 13 i 14 dla sondy o sekwencji 3 lub przez sekwencje 15 i 16 dla sondy o sekwencji 4 lub przez sekwencje 17 i 18 dla sondy o sekwencji 5 lub przez sekwencje 19 i 20 dla sondy o sekwencji 6 lub przez sekwencje 21 i 22 dla sondy o sekwencji 7 lub przez sekwencje 23 i 24 dla sondy o sekwencji 8.

Tabele:

T a b e l a 1

Warunki reakcji PCR zoptymalizowane dla sond typu Looped UVEx Probe.
Wykaz składników reakcji (część A) oraz warunki programu (część B).

A. Zestawienie komponentów reakcji

	Składnik reakcji	Stężenie końcowe
1	H ₂ O	Do przyjętej objętości , np 25ul
2	Sonda typu Loop UVEx probe	140 nM
3	DNA (matryca)	Minimalna przetestowana ilość to 0.002 pg na reakcję
2	10x stężony bufor reakcyjny (np. NH ₄ Reaction Buffer z firmy Bioron: 160mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1% Tween 20)	1 x stężony
3	MgCl ₂	6 mM
4	dNTPs	145 μM każdy
5	Forward starter	1 μM
6	Reverse starter	1 μM
7	Hot Start <i>Taq</i> DNA Polimeraza (e.g. SuperHot <i>Taq</i> firmy Bioron)	2,5 U

B. Warunki programu:

	Nazwa etapu	Temp. [°C]	Czas [sek]	Liczba cykli
1	Denaturacja wstępna	95	120	1
2	Denaturacja co cykl	95	15	39
3	Annealing i elongacja	60	60	
4	Chłodzenie próbki	4	minimum 180	1

Tabela 2

Przykłady zestawów sond typu Looped UVEx Probe oraz odpowiednio dobranych starterów zastosowanych w reakcji PCR w celu amplifikacji i identyfikacji DNA pochodzącego od patogenów przenoszonych przez kleszcze.

Lp	Nazwa zestawu	Rodzaj komponentu	Nazwa komponentu	Numer sekwencji zgodnie z wykazem	Wielkość produktu [pz]
1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Forward primer	F_Ap	9	120
		Reverse primer	R_Ap	10	
		Probe	S_Ap	1	
2	<i>Babesia</i> spp	Forward primer	F_Bb	11	198
		Reverse primer	R_Bb	12	
		Probe	S_Bb	2	
3	<i>Bartonella</i> spp	Forward primer	F_Bl	13	240
		Reverse primer	R_Bl	14	
		Probe	S_Bl	3	
4	<i>Borrelia</i> spp	Forward primer	F_Br	15	240
		Reverse primer	R_Br	16	
		Probe	S_Br	4	
5	<i>Coxiella burnetii</i>	Forward primer	F_Cb	17	202
		Reverse primer	R_Cb	18	
		Probe	S_Cb	5	
6	<i>Mycoplasma fermentans</i>	Forward primer	F_Mf	19	222
		Reverse primer	R_Mf	20	
		Probe	S_Mf	6	
7	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Forward primer	F_Mp	21	272
		Reverse primer	R_Mp	22	
		Probe	S_Mp	7	
8	<i>Rickettsia</i> spp	Forward primer	F_Rc	23	220
		Reverse primer	R_Rc	24	
		Probe	S_Rc	8	

T a b e l a 3

Lista szczepów referencyjnych, których DNA wykorzystano do przetestowania ośmiu zaprojektowanych zestawów sond i starterów

Lp	Nazwa referencyjnego mikroorganizmu	Pochodzenie (numer katalogowy)
1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	#1
2	<i>Babesia microti</i>	ATCC (30221D)
3	<i>Babesia canis</i>	#2
4	<i>Bartonella bacilliformis</i>	ATCC (35685D)
5	<i>Bartonella birtlesii</i>	DSMZ (21463)
6	<i>Bartonella capreoli</i>	DSMZ (21569)
7	<i>Bartonella elizabethae</i>	ATCC (49927D2)
8	<i>Bartonella henselae</i>	ATCC
9	<i>Bartonella schoenbuchensis</i>	DSMZ (13525)
10	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ATCC
11	<i>Borrelia spielmanii</i>	#3
12	<i>Coxiella burnetii</i>	#4
13	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC
14	<i>Mycoplasma arginini</i>	ATCC
15	<i>Mycoplasma fermentans</i>	ATCC
16	<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC
17	<i>Mycoplasma orale</i>	ATCC
18	<i>Mycoplasma pirum</i>	ATCC
19	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC
20	<i>Mycoplasma salivarium</i>	ATCC
21	<i>Rickettsia buchneri</i>	DSMZ (29016)
22	<i>Rickettsia helvetica</i>	#1
23	<i>Rickettsia monacensis</i>	DSMZ (29017)
24	<i>Spirochaeta aurantia</i>	DSMZ (1902)
25	<i>Spirochaeta litoralis</i>	DSMZ (2029)
26	<i>Spirochaeta isovalerica</i>	DSMZ (2461)
27	<i>Toxoplasma gondii</i>	ATCC

#1. Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii - Krajowy Ośrodek Medycyny Tropikalnej, Gdynia, Polska

#2. Zakład Parazytologii, Uniwersytet Warszawski, Polska

#3. Institute of Pathology Charité - Universitätsmedizin Berlin, Niemcy

#4. Cell Biology of Bacterial Infections, CBPS, Montpellier, Francja

ATCC - Kolekcja ATCC LGC Standards

DSMZ - Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

Wszystkie wykorzystane w analizach próbki DNA zostały potwierdzone poprzez sekwencjonowanie.

Rysunki

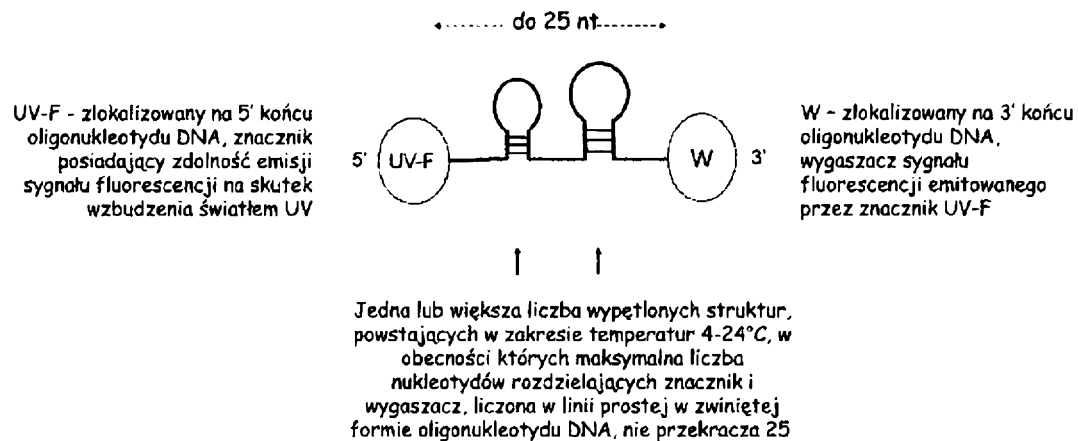


Fig. 1

PCR z sondą typu
Looped UVEx Probe

Linearyzacja sondy i
hybrydizacja do matrycy

Degradacja sondy podczas
etapu wydłużania starterów
przez polimerazę Taq i
rozdzielenie części
znacznika i wygaszacza

Chłodzenie prób w temp. 4°C w
ostatnim etapie reakcji PCR i
ponowne „związanie się”
niezdegradowanych sond

Wzbudzenie uwolnionego
znacznika UV-F światłem UV i
emisja sygnału
fluorescencyjnego

Analiza obecności produktu
PCR na podstawie obserwacji
schłodzonej próbki z
mieszaniną poroakcyjną w
światle UV

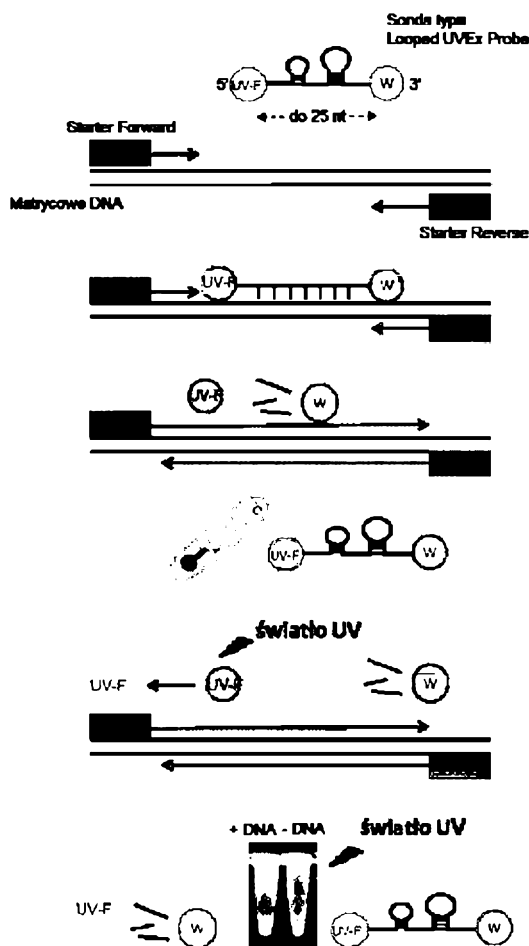


Fig. 2

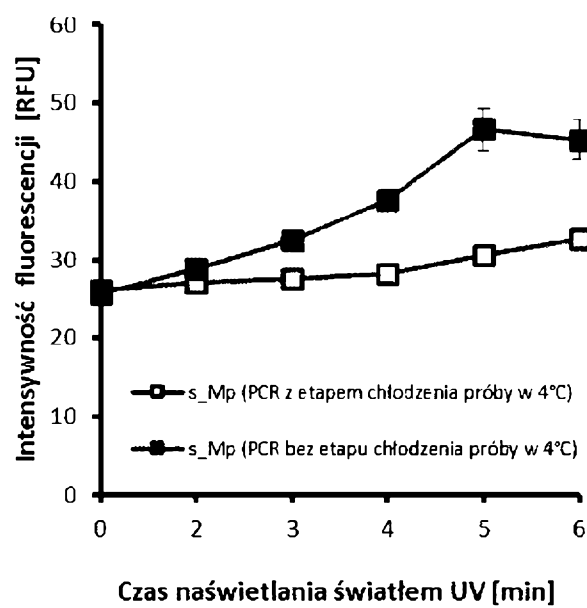


Fig. 3

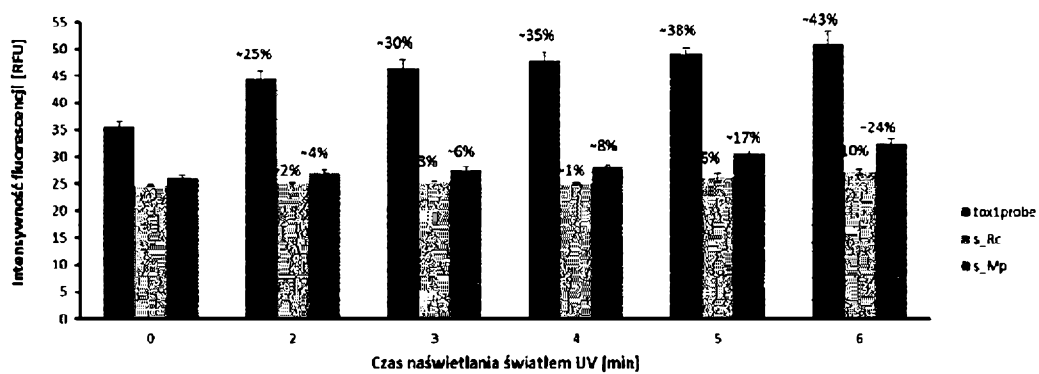


Fig. 4

A	Sonda S_Ap	
	Temperatura 4°C, (27 / 9, $\Delta G = -8.36$)	Temperatura 24°C, (27/14, $\Delta G = -5.98$)

Fig. 5, panel A

B	Sonda S_Bb	
	Temperatura 4°C (31/23, ΔG = -3.96)	Temperatura 24°C (31/25, ΔG = -2.07)
	5' A A A G T T T A G G G G G 10 G G C T T A T T C A G A T T A C 30 C 3'	5' A A A G T T T A G G G G G 10 G G C T T A T T C A G A T T A 30 C 3' C

Fig. 5, panel B

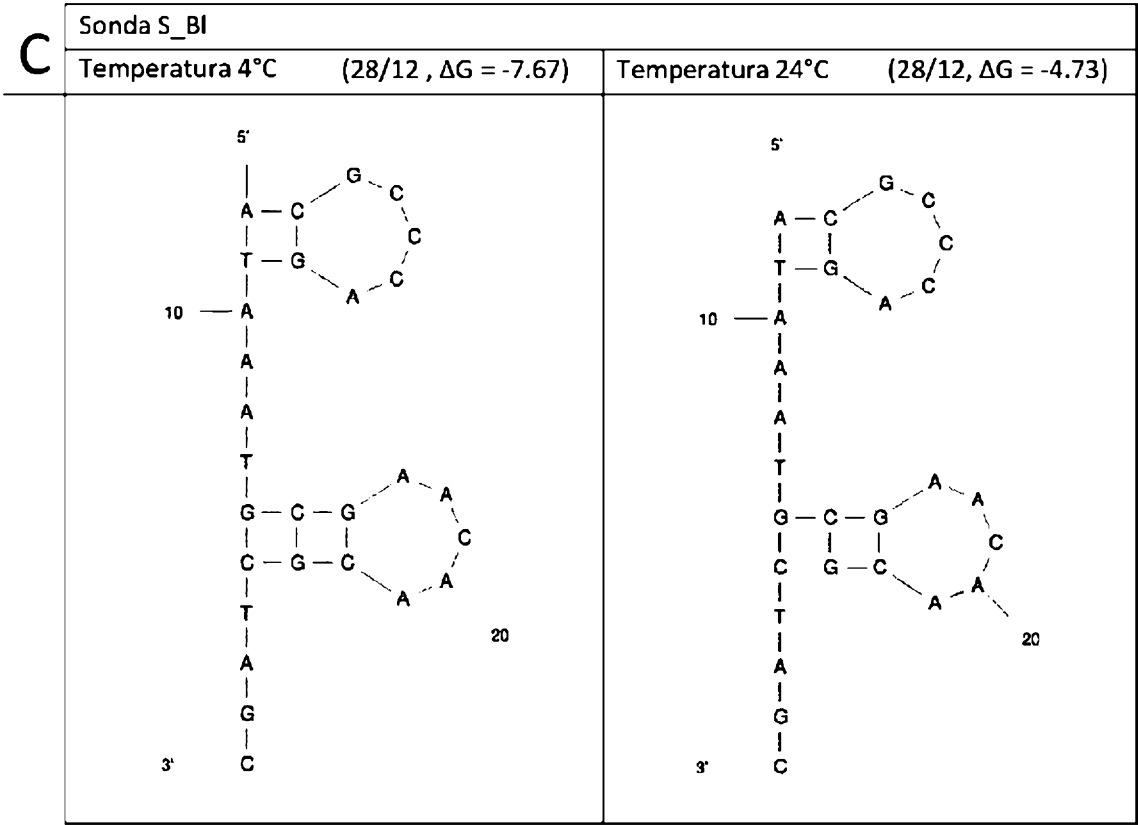


Fig. 5, panel C

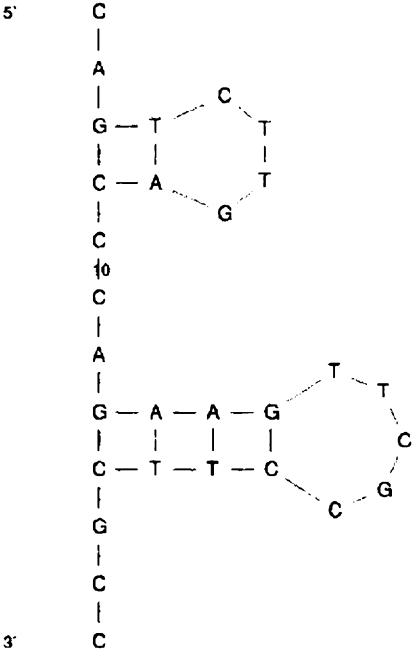
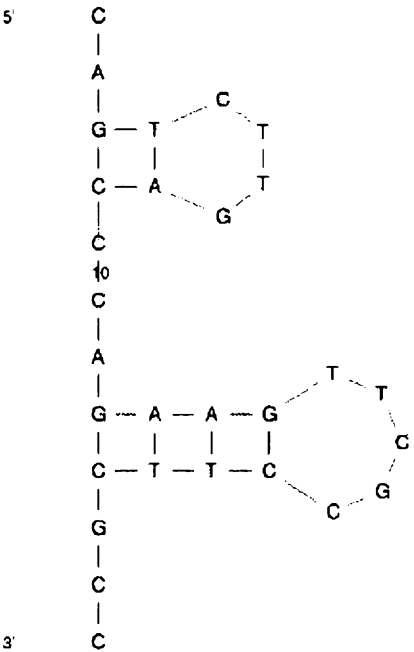
D	Sonda S_Br	
	Temperatura 4°C (29/12, ΔG = -7.59)	Temperatura 24°C (29/12, ΔG = -4.28)
		

Fig. 5, panel D

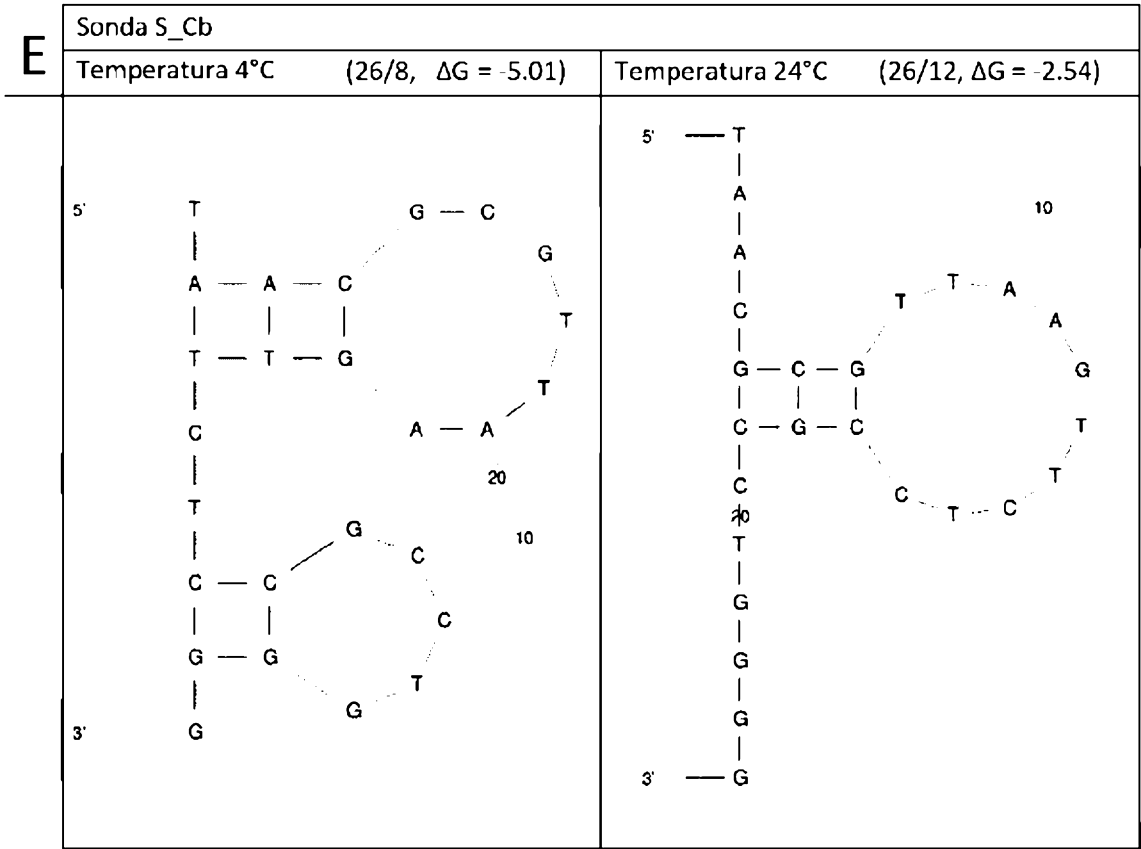


Fig. 5, panel E

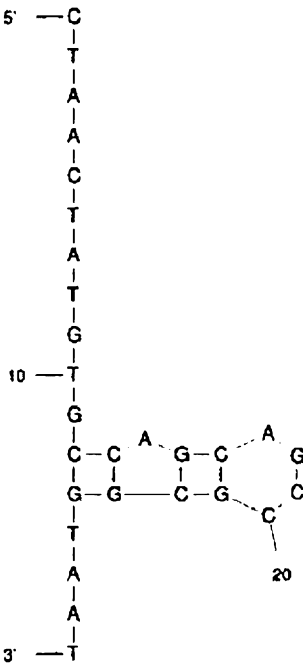
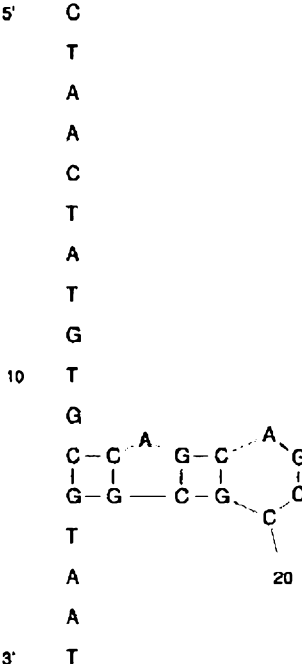
F	Sonda S_Mf	
	Temperatura 4°C (28/17, ΔG = -4.81)	Temperatura 24°C (28/17, ΔG = -2.27)
		

Fig. 5, panel F

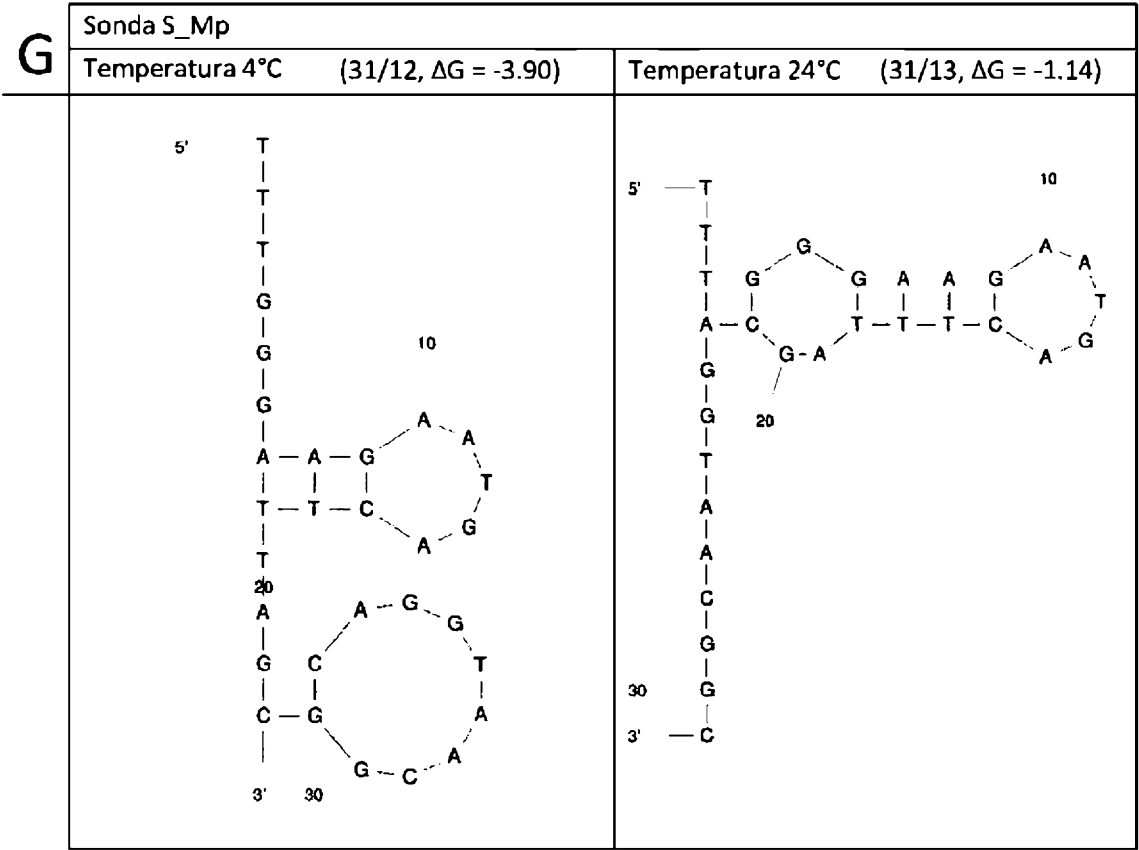


Fig. 5, panel G

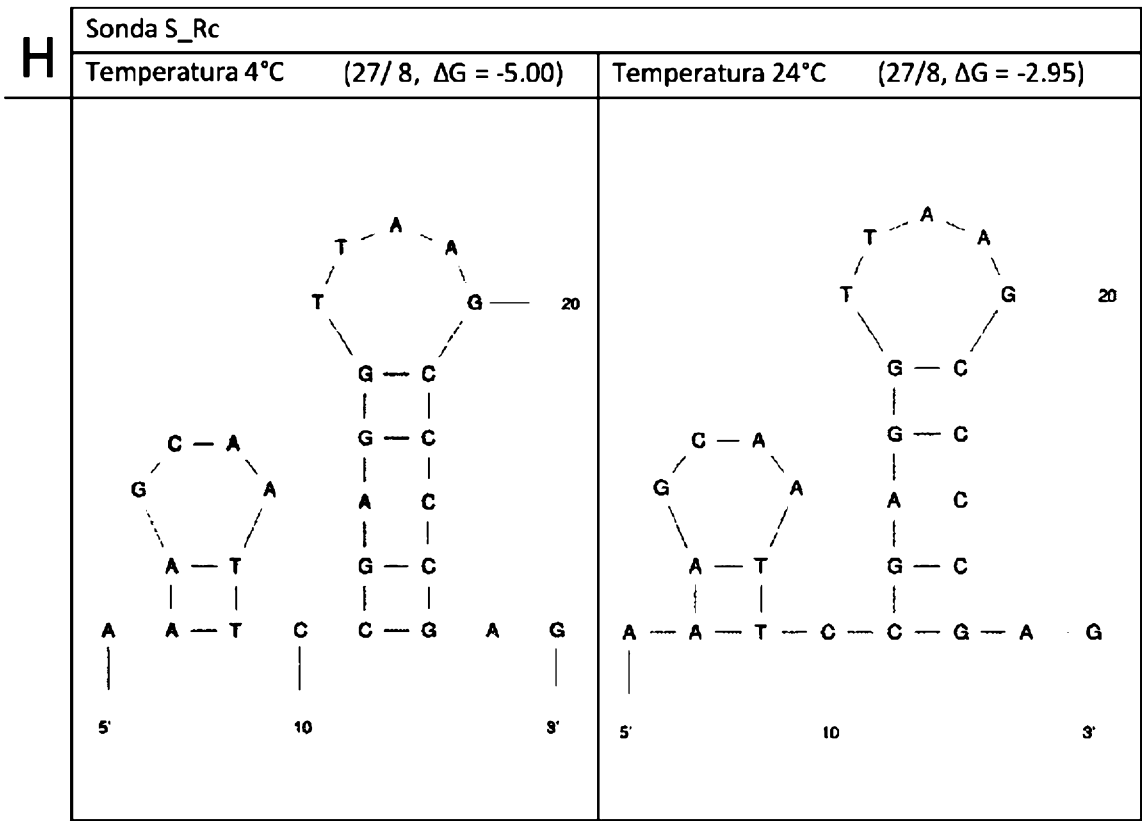


Fig. 5, panel H

A. Zestaw *Anaplasma phagocytophilum*

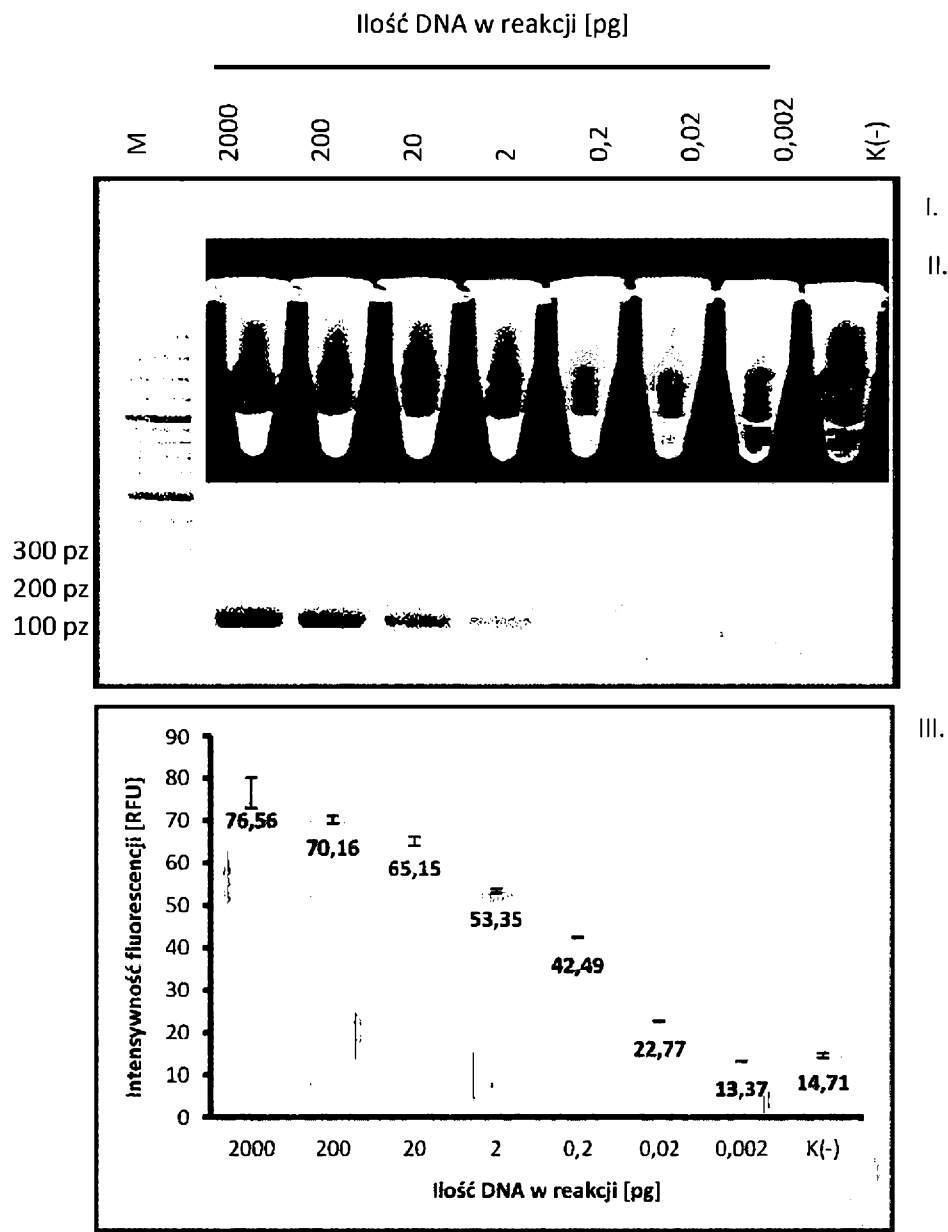


Fig. 6, panel A

B. Zestaw *Babesia* spp

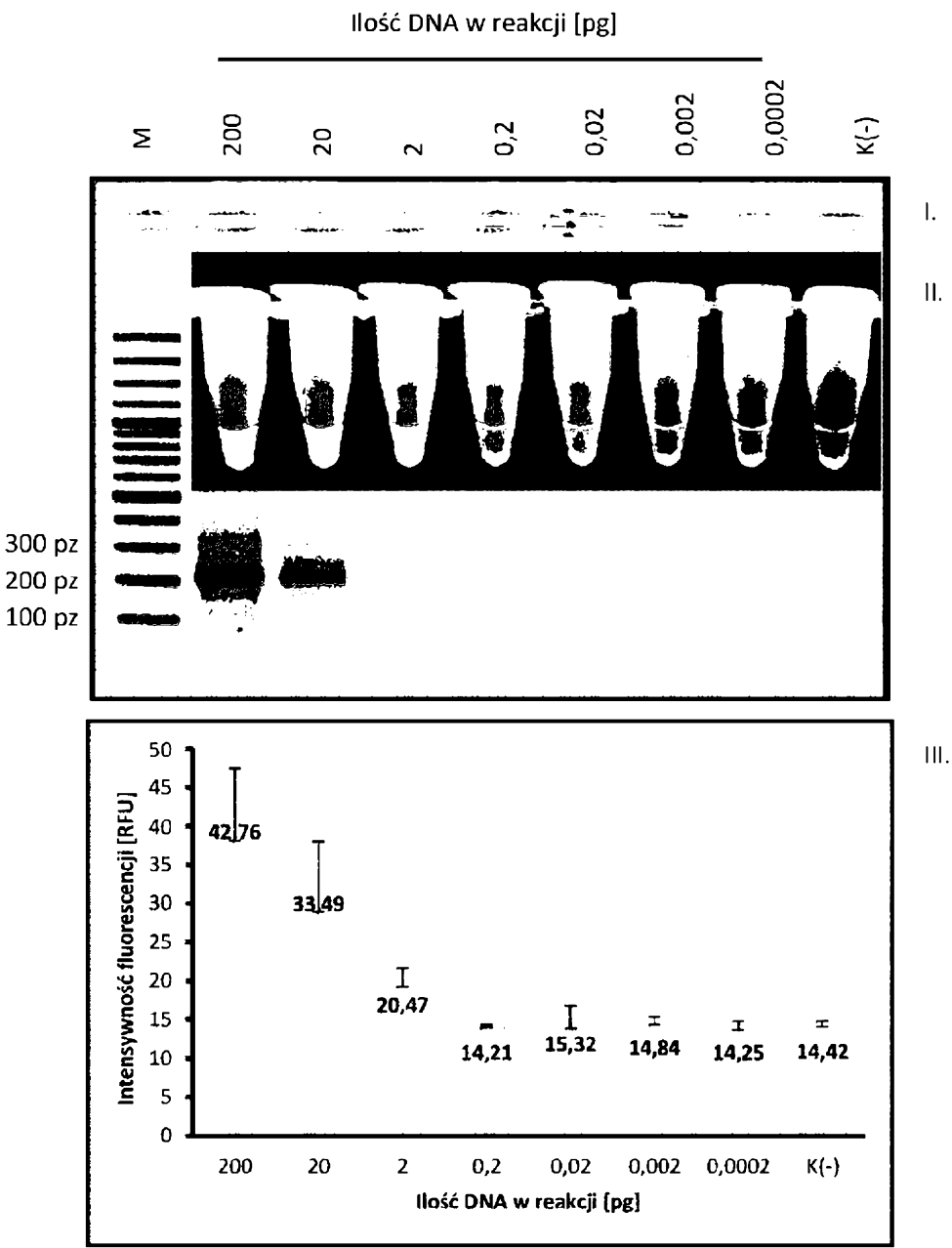


Fig. 6, panel B

C. Zestaw *Bartonella* spp

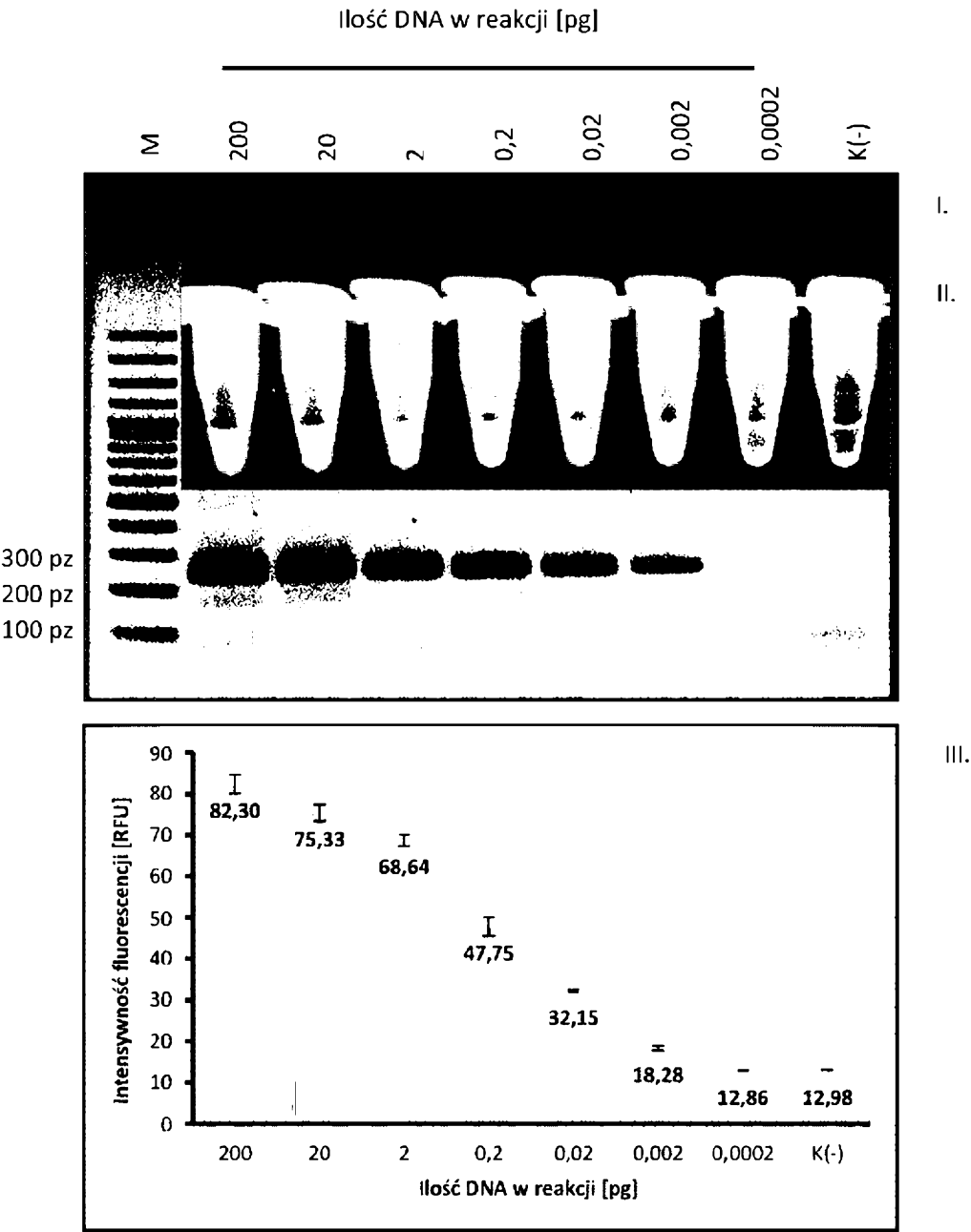


Fig. 6, panel C

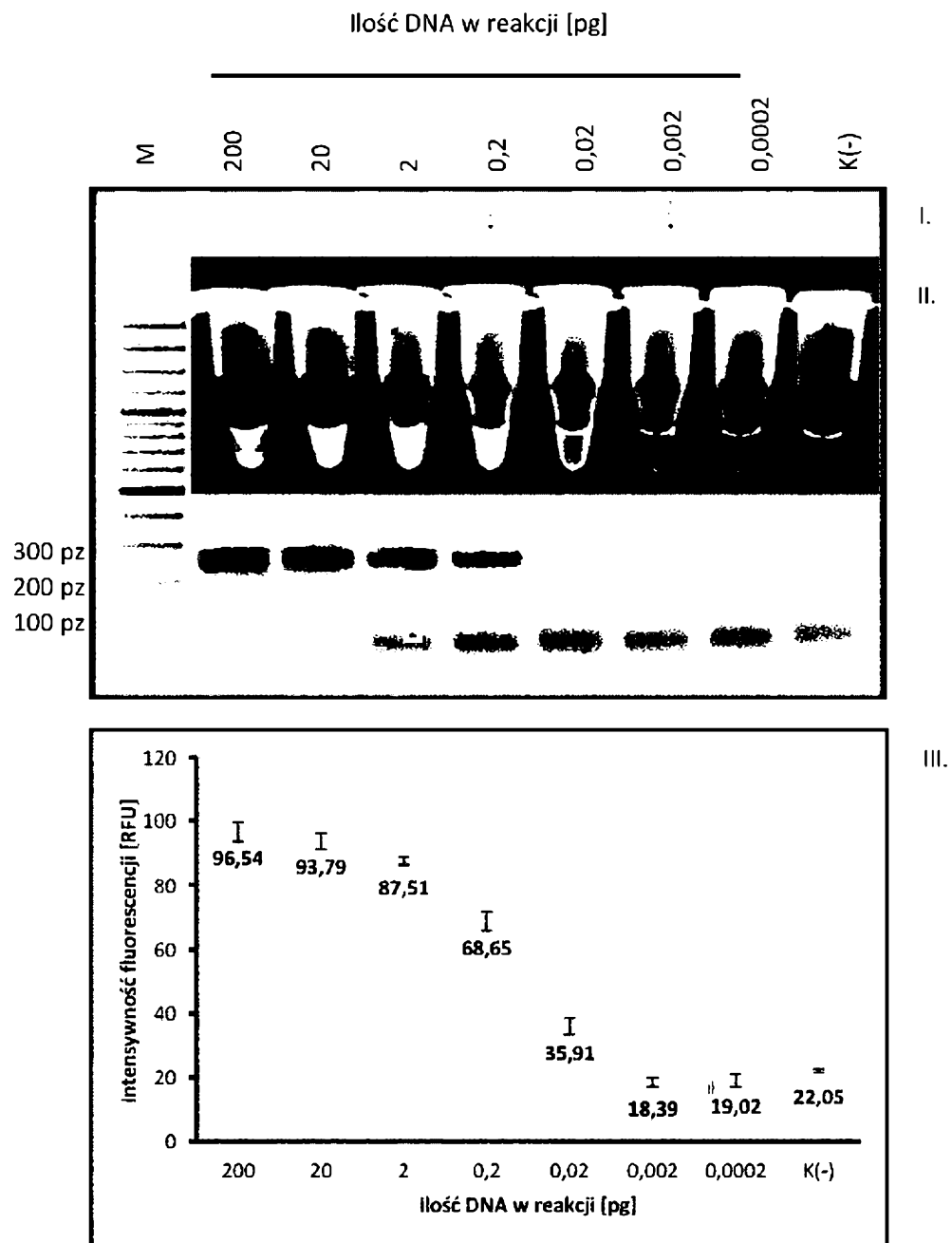
D. Zestaw *Borrelia* spp

Fig. 6, panel D

E. Zestaw *Coxiella burnetii*

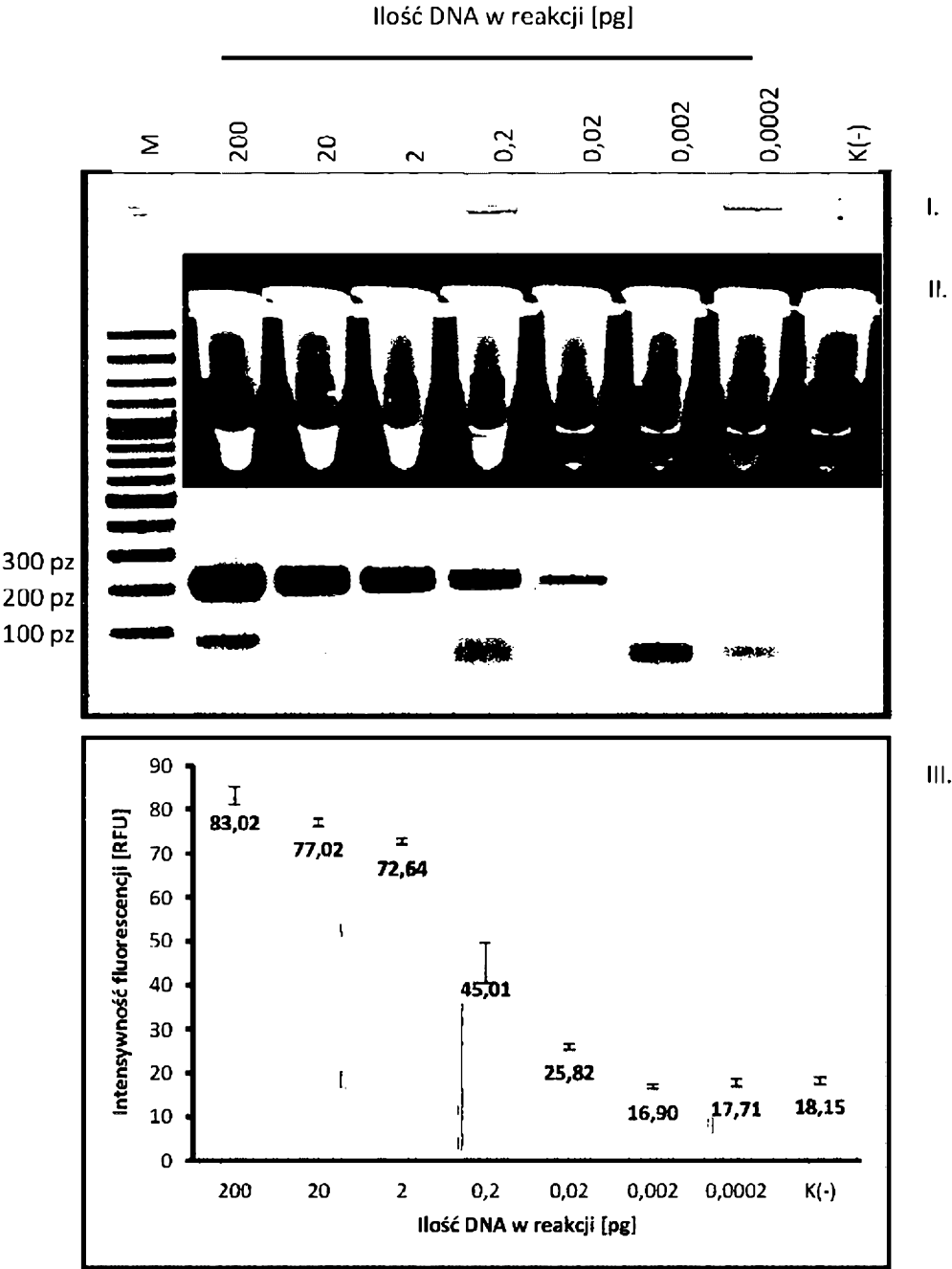
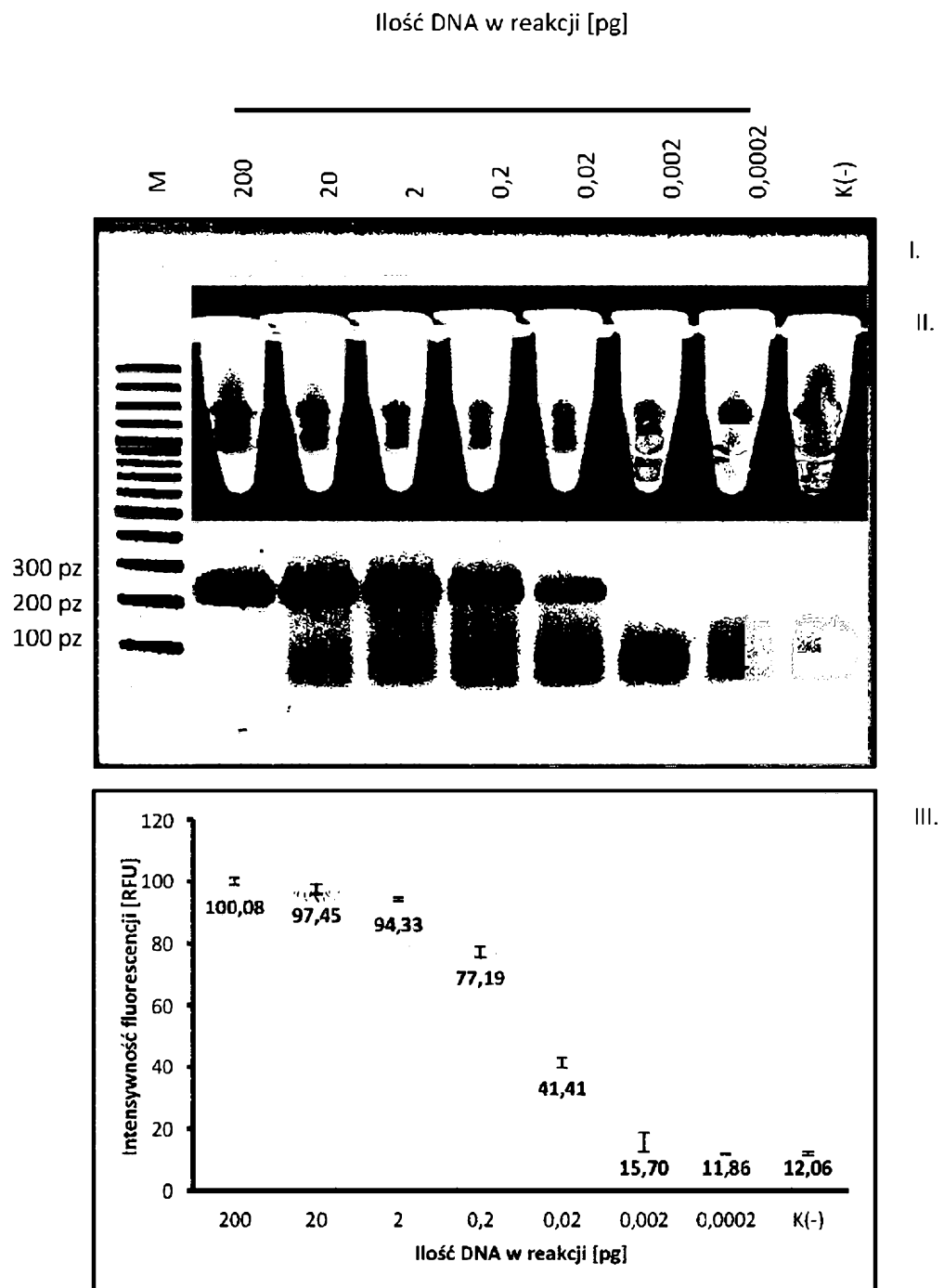


Fig. 6, panel E

F. Zestaw *Mycoplasma fermentans***Fig. 6, panel F**

G. Zestaw *Mycoplasma pneumoniae*

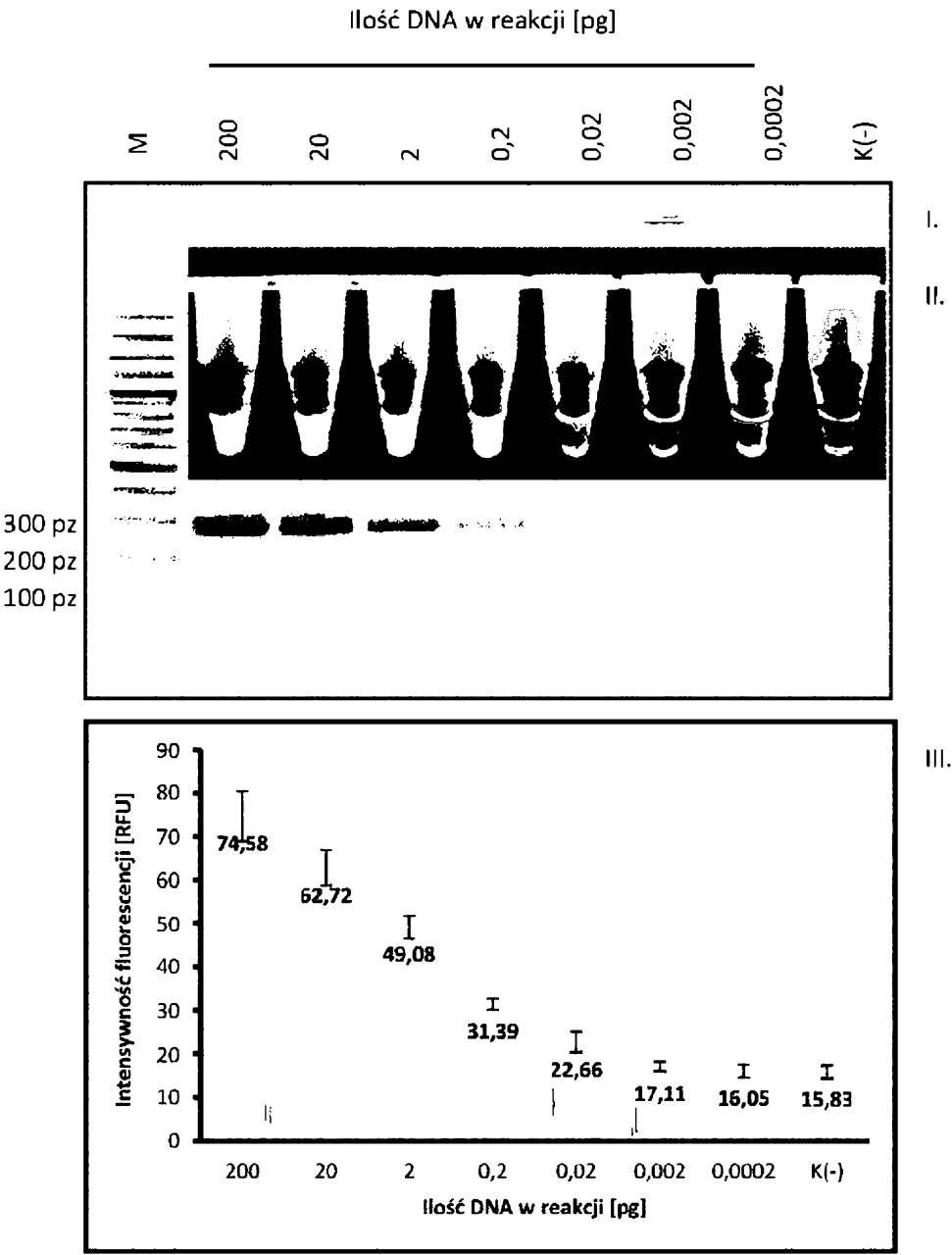


Fig. 6, panel G

H. Zestaw *Rickettsia* spp

Ilość DNA w reakcji [pg]

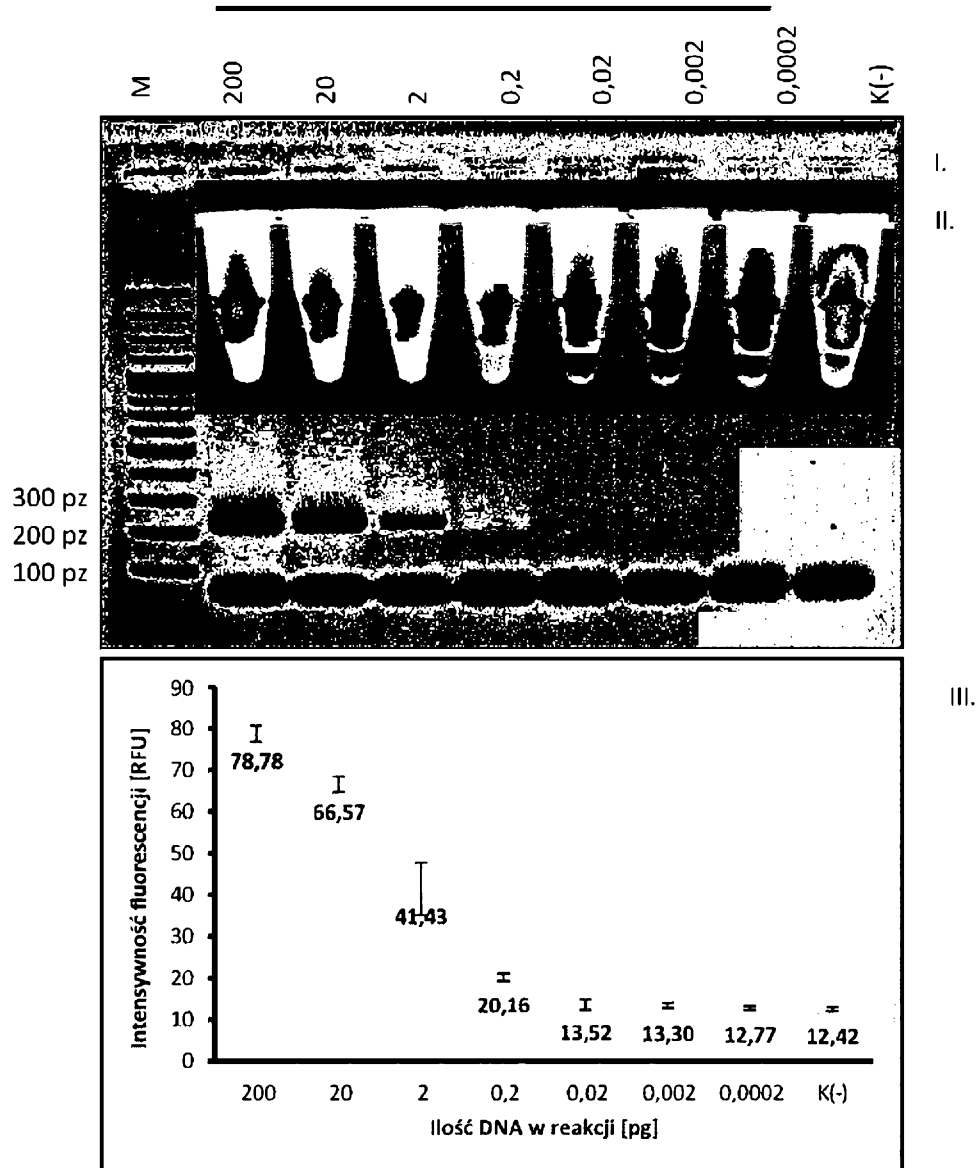


Fig. 6, panel H

Fig. 7

Zestawy znaczników i wygaszaczy użytych do wyznakowania sond typu Loop UVEx Probe							
	1	2	3	4	5	6	7
Znacznik fluorescencyjny (koniec 5')	AttoRho6G	AttoRho13	Atto520	AttoRho14	Atto495	Atto390	6FAM
Wygaszcz fluorescencji (koniec 3')	Eclipse	BBQ650	Eclipse	BHQ3	BHQ1	Eclipse	BHQ1
Wizualizacja fluorescencji znacznika w świetle UV po zakończeniu reakcji PCR							

fig. 8A

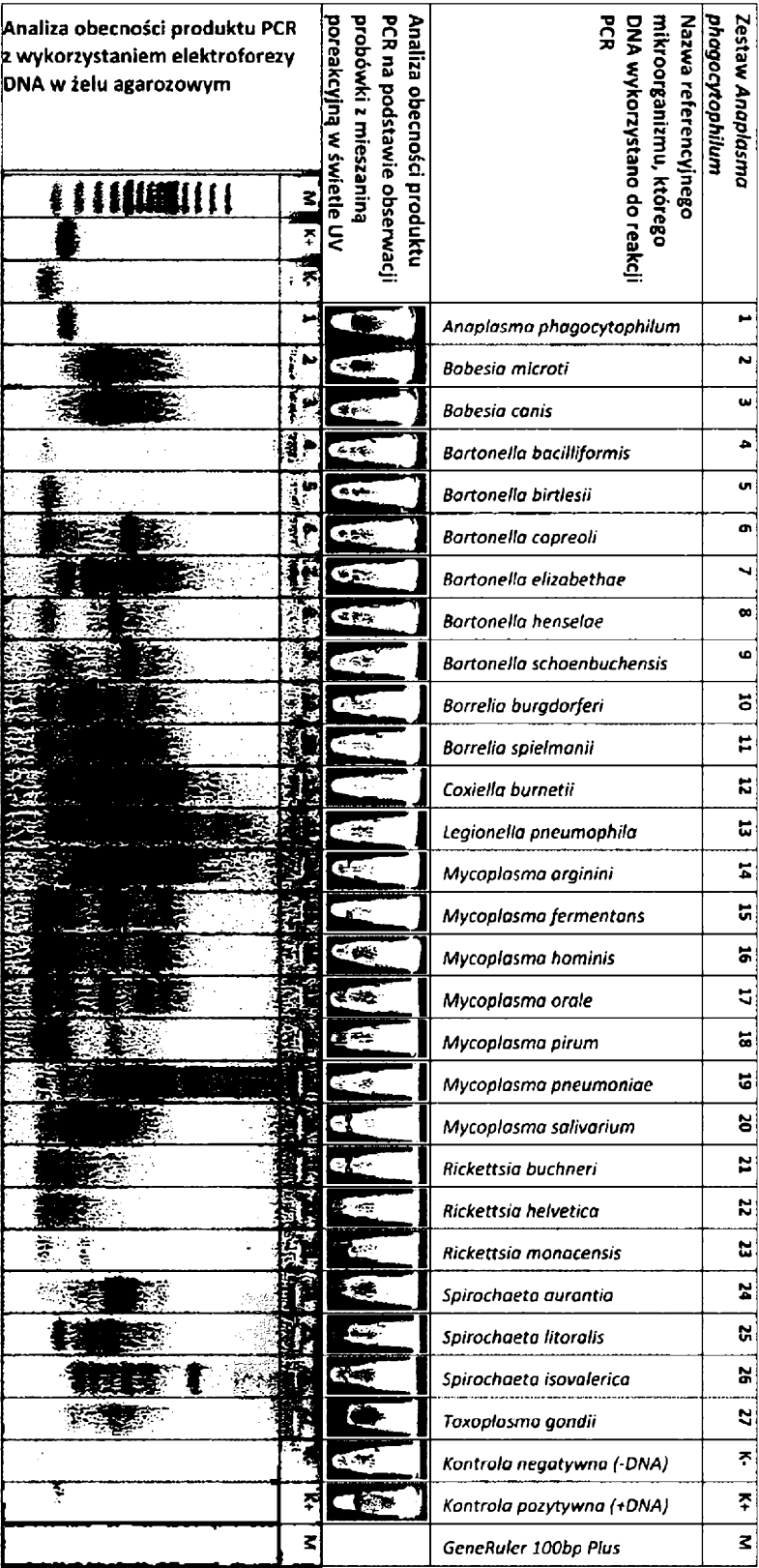


Fig. 8B

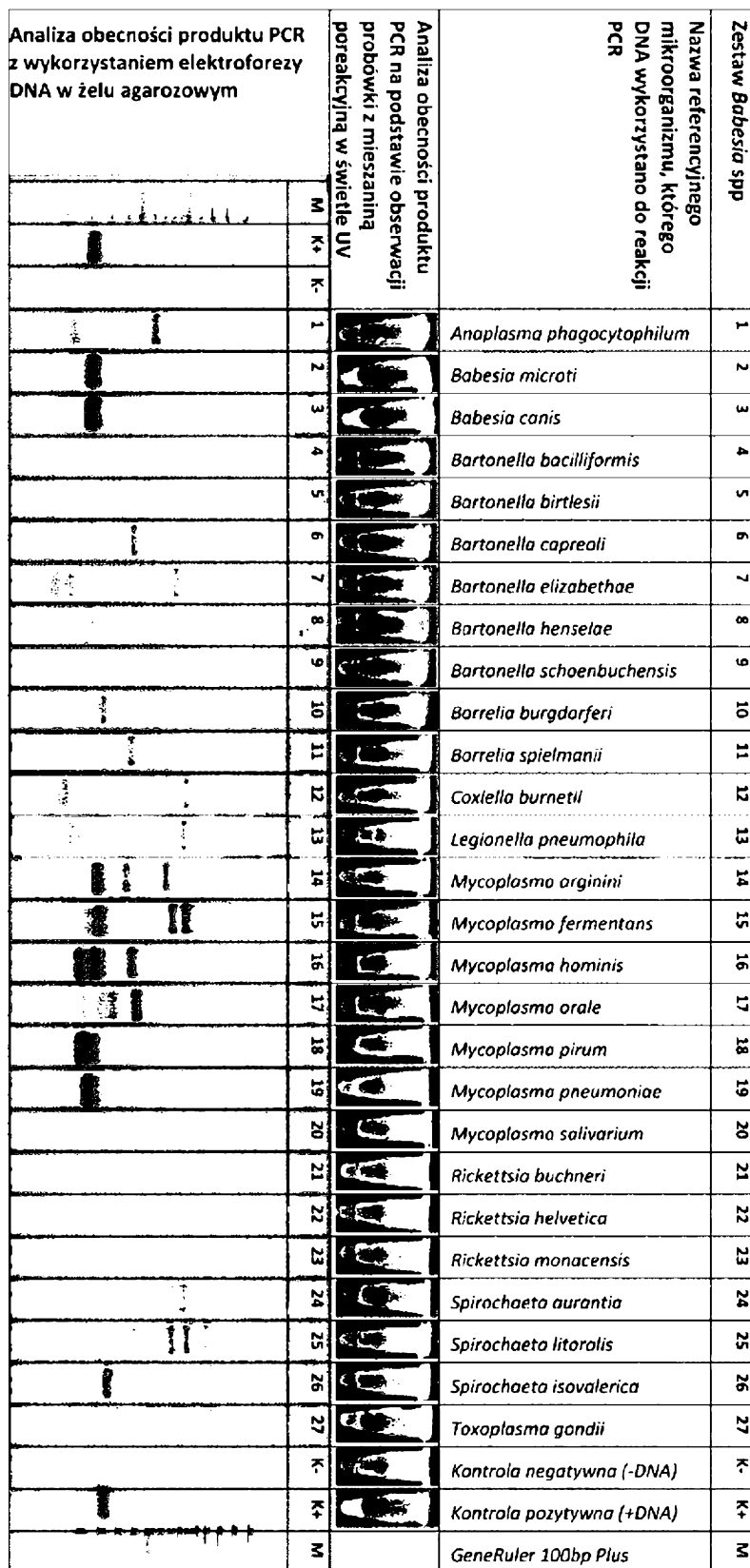


Fig. 8C

Zestaw <i>Bartonella</i> spp	Nazwa referencyjnego mikroorganizmu, którego DNA wykorzystano do reakcji PCR	Analiza obecności produktu PCR na podstawie obserwacji próbówki z mieszaniną poreakcyjną w świetle UV			Analiza obecności produktu PCR z wykorzystaniem elektroforezy DNA w żelu agarozowym
		M	K+	K-	
1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>				
2	<i>Babesia microti</i>				
3	<i>Babesia canis</i>				
4	<i>Bartonella bacilliformis</i>				
5	<i>Bartonella birtlesii</i>				
6	<i>Bartonella capreoli</i>				
7	<i>Bartonella elizabethae</i>				
8	<i>Bartonella henselae</i>				
9	<i>Bartonella schoenbuchensis</i>				
10	<i>Borrelia burgdorferi</i>				
11	<i>Borrelia spielmanii</i>				
12	<i>Coxiella burnetii</i>				
13	<i>Legionella pneumophila</i>				
14	<i>Mycoplasma arginini</i>				
15	<i>Mycoplasma fermentans</i>				
16	<i>Mycoplasma hominis</i>				
17	<i>Mycoplasma orale</i>				
18	<i>Mycoplasma pirum</i>				
19	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>				
20	<i>Mycoplasma salivarium</i>				
21	<i>Rickettsia buchneri</i>				
22	<i>Rickettsia helvetica</i>				
23	<i>Rickettsia monacensis</i>				
24	<i>Spirochaeta aurantia</i>				
25	<i>Spirochaeta litoralis</i>				
26	<i>Spirochaeta isavalerica</i>				
27	<i>Toxoplasma gondii</i>				
K-	Kontrola negatywna (-DNA)				
K+	Kontrola pozytywna (+DNA)				
M	GeneRuler 100bp Plus				

Fig. 8D

Zestaw <i>Borrelia</i> spp		Nazwa referencyjnego mikroorganizmu, którego DNA poddano analizie	
1	2	3	4
1	2	3	4
3	3	3	4
4	4	4	5
5	5	5	6
6	6	6	7
7	7	7	8
8	8	8	9
9	9	9	10
10	10	10	11
11	11	11	12
12	12	12	13
13	13	13	14
14	14	14	15
15	15	15	16
16	16	16	17
17	17	17	18
18	18	18	19
19	19	19	20
20	20	20	21
21	21	21	22
22	22	22	23
23	23	23	24
24	24	24	25
25	25	25	26
26	26	26	27
K-	K-	K-	K-
K+	K+	K+	K+
M	M	M	M
GeneRuler 100bp Plus			

Analiza obecności produktu PCR z wykorzystaniem elektroforezy DNA w żelu agarozowym

Analiza obecności produktu PCR na podstawie obserwacji próbki z mieszaniną pociętych w świetle UV

M K+ K- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 K- K+ M

Fig. 8E

Zestaw <i>Coxiella burnetii</i>		Nazwa referencyjnego mikroorganizmu, którego DNA poddano analizie	Analiza obecności produktu PCR na podstawie obserwacji próbówki z mieszaniną poreakcyjną w świetle UV	Analiza obecności produktu PCR z wykorzystaniem elektroforezy DNA w żelu agarozowym	
1	2			M	K
1	2	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			
2	3	<i>Babesia microti</i>			
3	4	<i>Babesia canis</i>			
4	5	<i>Bartonella bacilliformis</i>			
5	6	<i>Bartonella birtlesii</i>			
6	7	<i>Bartonella capreoli</i>			
7	8	<i>Bartonella elizabethae</i>			
8	9	<i>Bartonella henselae</i>			
9	10	<i>Bartonella schoenbuchensis</i>			
10	11	<i>Borrelia burgdorferi</i>			
11	12	<i>Borrelia spielmanii</i>			
12	13	<i>Coxiella burnetii</i>			
13	14	<i>Legionella pneumophila</i>			
14	15	<i>Mycoplasma arginini</i>			
15	16	<i>Mycoplasma fermentans</i>			
16	17	<i>Mycoplasma hominis</i>			
17	18	<i>Mycoplasma orale</i>			
18	19	<i>Mycoplasma pirum</i>			
19	20	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>			
20	21	<i>Mycoplasma salivarium</i>			
21	22	<i>Rickettsia buchneri</i>			
22	23	<i>Rickettsia helvetica</i>			
23	24	<i>Rickettsia monacensis</i>			
24	25	<i>Spirochaeta aurantia</i>			
25	26	<i>Spirochaeta litoralis</i>			
26	27	<i>Spirochaeta isovalerica</i>			
27	K-	<i>Toxoplasma gondii</i>			
K-	K+	Kontrola negatywna (-DNA)			
K+	M	Kontrola pozytywna (+DNA)			
M		GeneRuler 100bp Plus			

Fig. 8F

Zestaw <i>Mycoplasma fermentans</i>	Nazwa referencyjnego mikroorganizmu, którego DNA poddano analizie	Analiza obecności produktu PCR na podstawie obserwacji próbówki z mieszaniną poreakcyjną w świetle UV		Analiza obecności produktu PCR z wykorzystaniem elektroforezy DNA w żelu agarozowym	
				M	K+
1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>				
2	<i>Babesia microti</i>				
3	<i>Babesia canis</i>				
4	<i>Bartonella bacilliformis</i>				
5	<i>Bartonella birtlesii</i>				
6	<i>Bartonella capreoli</i>				
7	<i>Bartonella elizabethae</i>				
8	<i>Bartonella henselae</i>				
9	<i>Bartonella schoenbuchensis</i>				
10	<i>Borrelia burgdorferi</i>				
11	<i>Borrelia spielmanii</i>				
12	<i>Coxiella burnetii</i>				
13	<i>Legionella pneumophila</i>				
14	<i>Mycoplasma arginini</i>				
15	<i>Mycoplasma fermentans</i>				
16	<i>Mycoplasma hominis</i>				
17	<i>Mycoplasma orale</i>				
18	<i>Mycoplasma pirum</i>				
19	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>				
20	<i>Mycoplasma salivarium</i>				
21	<i>Rickettsia buchneri</i>				
22	<i>Rickettsia helvetica</i>				
23	<i>Rickettsia monacensis</i>				
24	<i>Spirochaeta aurantia</i>				
25	<i>Spirochaeta litoralis</i>				
26	<i>Spirochaeta isovaleric</i>				
27	<i>Toxoplasma gondii</i>				
K-	Kontrola negatywna (-DNA)				
K+	Kontrola pozytywna (+DNA)				
M	GeneRuler 100bp Plus				

Fig. 8C

Zestaw <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nazwa referencyjnego mikroorganizmu, którego DNA poddano analizie	Analiza obecności produktu PCR na podstawie obserwacji próbówki z mieszaniną p reakcyjną w świetle UV		Analiza obecności produktu PCR z wykorzystaniem elektroforezy DNA w żelu agarozowym	
		M	K+	K-	M
1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>				
2	<i>Babesia microti</i>				
3	<i>Babesia canis</i>				
4	<i>Bartonella bacilliformis</i>				
5	<i>Bartonella birtlesii</i>				
6	<i>Bartonella capreoli</i>				
7	<i>Bartonella elizabethae</i>				
8	<i>Bartonella henselae</i>				
9	<i>Bartonella schoenbuchensis</i>				
10	<i>Borrelia burgdorferi</i>				
11	<i>Borrelia spielmanii</i>				
12	<i>Coxiella burnetii</i>				
13	<i>Legionella pneumophila</i>				
14	<i>Mycoplasma arginini</i>				
15	<i>Mycoplasma fermentans</i>				
16	<i>Mycoplasma hominis</i>				
17	<i>Mycoplasma orale</i>				
18	<i>Mycoplasma pirum</i>				
19	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>				
20	<i>Mycoplasma salivarium</i>				
21	<i>Rickettsia buchneri</i>				
22	<i>Rickettsia helvetica</i>				
23	<i>Rickettsia monacensis</i>				
24	<i>Spirochaeta aurantia</i>				
25	<i>Spirochaeta litoralis</i>				
26	<i>Spirochaeta isovaleric</i>				
27	<i>Toxoplasma gondii</i>				
K-	Kontrola negatywna (-DNA)				
K+	Kontrola pozytywna (+DNA)				
M	GeneRuler 100bp Plus				

Fig. 8H

Zestaw <i>Rickettsia</i> spp	Nazwa referencyjnego mikroorganizmu, którego DNA poddano analizie	Analiza obecności produktu PCR na podstawie obserwacji próbki z mieszaniną porównawczą w świetle UV		Analiza obecności produktu PCR z wykorzystaniem elektroforezy DNA w żelu agarozowym	
		M	K+	K-	M
1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>				
2	<i>Babesia microti</i>				
3	<i>Babesia canis</i>				
4	<i>Bartonella bacilliformis</i>				
5	<i>Bartonella birtlesii</i>				
6	<i>Bartonella capreoli</i>				
7	<i>Bartonella elizabethae</i>				
8	<i>Bartonella henselae</i>				
9	<i>Bartonella schoenbuchensis</i>				
10	<i>Borrelia burgdorferi</i>				
11	<i>Borrelia spielmanii</i>				
12	<i>Coxiella burnetii</i>				
13	<i>Legionella pneumophila</i>				
14	<i>Mycoplasma arginini</i>				
15	<i>Mycoplasma fermentans</i>				
16	<i>Mycoplasma hominis</i>				
17	<i>Mycoplasma orale</i>				
18	<i>Mycoplasma pirum</i>				
19	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>				
20	<i>Mycoplasma salivarium</i>				
21	<i>Rickettsia buchneri</i>				
22	<i>Rickettsia helvetica</i>				
23	<i>Rickettsia monacensis</i>				
24	<i>Spirachaeta aurantia</i>				
25	<i>Spirachaeta litoralis</i>				
26	<i>Spirachaeta isovaleric</i>				
27	<i>Toxoplasma gondii</i>				
K-	Kontrola negatywna (-DNA)				
K+	Kontrola pozytywna (+DNA)				
M	GeneRuler 100bp Plus				