

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233885**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415493**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **23.12.2015**

(54)

**Sposób i zestaw do identyfikacji nicienia *Merlinius brevidens*,
szkodnika zbóż i traw, metodą Real Time PCR**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

03.07.2017 BUP 14/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.12.2019 WUP 12/19

(73) Uprawniony z patentu:

**MUZEUM I INSTYTUT ZOOLOGII POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WIESŁAW BOGDANOWICZ, Warszawa, PL
EWA DMOWSKA, Warszawa, PL
ŁUKASZ FLIS, Łatowicz, PL
ALEKSANDRA GRALAK, Łuków, PL
KATARZYNA KOWALEWSKA, Warszawa, PL
TADEUSZ MALEWSKI, Warszawa, PL
ROBERT TURLEJ, Warszawa, PL
KATARZYNA WIŚNIEWSKA, Warszawa, PL
OLGA WIŚNIEWSKA, Warszawa, PL**

PL 233885 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób i zestaw do identyfikacji nicienia *Merlinium brevidens*, szkodnika zbóż i traw, metodą Real Time PCR.

Identyfikacja gatunków nicieni oparta jest na analizie cech morfologicznych i morfometrycznych, w tym diagnozowane są m.in.: zabarwienie samicy na poszczególnych etapach rozwojowych, kształt cysty, długość i kształt guzów szytletu, długość larwy inwazyjnej, wzór na płytce perinealnej. Jest to jednak analiza bardzo pracochłonna i czasochłonna. Wymaga dużo wiedzy i doświadczenia w pracy z materiałem biologicznym. Ponadto, istnieje możliwość nachodzenia na siebie wymiarów różnych gatunków. Metody opartej na analizie cech morfologicznych i morfometrycznych nie można zastosować do identyfikacji młodocianych osobników, u których cechy morfologiczne nie są jeszcze wykształcone.

Obecnie w diagnostyce nematologicznej coraz częściej stosowane są techniki oparte na analizie kwasów nukleinowych, w tym wykorzystujące łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Podstawą techniki PCR jest powielenie fragmentu/ów DNA, specyficznego dla określonego organizmu, do poziomu umożliwiającego jego szybką i prostą detekcję przy użyciu elektroforezy. Uzyskuje się to stosując krótkie jednoniciowe oligonukleotydy (12–40 nukleotydów), tzw. startery, specyficzne dla powielanego fragmentu DNA oraz enzym – termostabilną polimerazę, która umożliwia powielenieżądanego fragmentu w cyklicznej, trzyetapowej reakcji, złożonej z denaturacji, wiązania starterów oraz syntezy DNA. Zazwyczaj po około 30 cyklach reakcji uzyskuje się ponad milion kopii powielanego fragmentu DNA, co pozwala zidentyfikować go techniką elektroforezy żelowej.

Udoskonaleniem łańcuchowej reakcji polimerazy jest Real Time PCR, to jest reakcji PCR z pomiarem ilości powielonego fragmentu w każdym cyklu reakcji. Do pomiaru ilości powielonego fragmentu wykorzystuje się fluorochromy (barwniki fluorescencyjne), np.: SYBR Green 1, SYTO9, Eva Green, SYBR Gold, których fluorescencja jest proporcjonalna do ilości powielonego fragmentu. Identyfikację powstałych produktów przeprowadza się poprzez pomiar wielkości fluorescencji oraz analizę krzywej topnienia produktów reakcji bez elektroforezy. Czulość reakcji Real Time PCR jest znacznie większa niż tradycyjnego PCR, a brak elektroforezy skraca czas analizy. Wadą Real Time PCR z barwnikami fluorescencyjnymi (podobnie jak tradycyjnego PCR) jest ograniczona specyficzność reakcji. W większości przypadków reakcja PCR zachodzi nie tylko w przypadku 100% identyczności sekwencji starterów do sekwencji matrycy lecz również gdy 1–2 nukleotydy są nieidentyczne. Ta właściwość tradycyjnego PCR i Real Time PCR z barwnikami fluorescencyjnymi wymaga precyzyjnego ustawienia parametrów termicznych reakcji. Ponadto, barwniki fluorescencyjne wiążą się z każdym dwuniciowym fragmentem DNA, powstałym również w wyniku amplifikacji starterów (produkty primer-primer, primer-dimer), co wymaga również starannego doboru odpowiedniego stężenia starterów.

Alternatywą dla barwników fluorescencyjnych są sondy DNA znakowane fluorescencyjnie. Są to krótkie odcinki DNA, komplementarne do poszukiwanej sekwencji, które po przyłączeniu do DNA podczas reakcji PCR emitują fluorescencję o określonej długości fali. Obecnie znanych jest kilka rodzajów sond, np.: TaqMan, FRET, molecular beacons, czy scorpions. Specyficzność reakcji Real Time PCR ze znakowanymi sondami jest znacznie wyższa niż z barwnikami fluorescencyjnymi. W odróżnieniu od starterów niedopasowanie jednego nukleotydu w sekwencji sondy prowadzi przeważnie do braku reakcji lub bardzo istotnego zmniejszenia wydajności, co jest łatwe do stwierdzenia podczas monitorowania przebiegu reakcji lub analizy wyników reakcji.

Dotychczas najczęściej stosowaną metodą molekularnej identyfikacji nicieni było PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych wykorzystuje enzymy restrykcyjne, które tną nić DNA w specyficznym dla siebie miejscu. Różnice w długości pociętych fragmentów DNA świadczą o zmienności. Powers T O, Szalanski AL, Mullin PG, Harris TS, Bertoldi T i Griesbach JA. Identification of Seed Gall Nematodes of Agronomic and Regulatory Concern with PCR-RFLP of ITS 11. Journal of Nematology 33(4):191–194. 2001 analizowali tą metodą 18 populacji należących do rodzaju *Anguina*. Do identyfikacji stosowali siedem enzymów restrykcyjnych Alu I, Bsr I, Eco RI, Hae III, Hha I, Hinf I, and Taq I dzięki którym udało im się zidentyfikować gatunki.

Cbjvh Umarao, Sharma Amita, Rao S.B. w swojej publikacji z 2009 roku RAPD-PCR Analysis of Genetic Similarity Between Males and Females of *Anguina tritici*. Indian Journal of Nematology, 2009 39(1): 90–97 zastosowali metodę RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA (metoda losowej amplifikacji polimorficznego DNA). Metoda ta wykorzystuje tylko jeden krótki (około 10–20 nukleotydów) starter, przebiega w niższej temperaturze (około 35°C), ale jednocześnie wymaga zwiększonej

ilości cykli w stosunku do standardowego PCR – aż 40-50. W wyniku analizy elektroforetycznej uzyskuje się różnej długości prążki, których układ jest charakterystyczny dla osobnika i stanowi coś w rodzaju odcisku palca (fingerprint).

W pracach Wendt KR, Vrain TC & Webster JM (1993). Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology* 25, 555–563 oraz Marek M, Zouhar M, Rysanek P & Havranek P (2005). Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia* 42, 49–56 zostały opisane startery i enzymy restrykcyjne do identyfikacji *Ditylenchus dipsaci*.

Molekularne metody identyfikacji *Merlinius brevidens* nie zostały dotychczas opisane. Celem wynalazku jest dostarczenie metody molekularnej identyfikacji nicienia *Merlinius brevidens* z dużą czułością i specyficznością oraz dostarczenie nowych sekwencji nukleotydowych starterów i sondy, mających zastosowanie w sposobie wykrywania nicieni techniką PCR, zwłaszcza Real Time PCR, niezależnie od rodzaju prób badanych, ich pochodzenia i przeznaczenia oraz stadium rozwoju. Powyższe cele zrealizowano w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób identyfikacji nicienia *Merlinius brevidens* w próbce gleby, obejmujący następujące etapy:

- dostarczenie próbki gleby zawierające nicienie do identyfikacji;
- wypłukanie nicieni z gleby;
- izolację DNA;
- przeprowadzenie reakcji PCR, zwłaszcza Real Time PCR, z zastosowaniem pary starterów 3' i 5' oraz sondy;
- porównanie krzywej amplifikacji badanej próby z krzywymi amplifikacji próby zerowej oraz kontroli negatywnej,

przy czym do identyfikacji *Merlinius brevidens* w reakcji PCR, zwłaszcza Real Time PCR, stosuje się właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę:

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Merlinius brevidens</i>	Merbfv	AGGTGGAACGGATA GAG	Merbrv	CAGGGCAAACAGTCT TAG	Merbs	CTTGTATTGAGCCGCTC TGGTT

Przedmiotem wynalazku jest również zestaw do identyfikacji nicienia *Merlinius brevidens* metodą PCR, zwłaszcza Real – Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku startery 3' i 5' oraz sondę:

Gatunek	5' starter		3' starter		Sonda	
	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja	Nazwa	Sekwencja
<i>Merlinius brevidens</i>	Merbfv	AGGTGGAACGGATA GAG	Merbrv	CAGGGCAAACAGTCT TAG	Merbs	CTTGTATTGAGCCGCTC TGGTT

Mieszanina reakcyjna zawiera bufor, termostabilną Taq polimerazę, jony magnezu, startery i sondę. Stężenie starterów w mieszaninie reakcyjnej wynosi 1–2 μ M, sondy 50–100 nM, jonów magnezu 2–5 mM. Reakcję prowadzi się przy temperaturze przyłączania starterów 55–60°C, w objętości mieszaniny reakcyjnej 10–20 μ l, przy zastosowaniu od 35 do 40 cykli reakcji. Identyfikacji produktów dokonuje się poprzez porównanie krzywych amplifikacji badanej próby z krzywymi amplifikacji próby zerowej. Fig. 1 przedstawia krzywe amplifikacji dla *Merlinius microdorus*.

Poniżej podano przykład identyfikacji *Merlinius brevidens*. Każdorazowo identycznym warunkom izolacji i amplifikacji poddawano próbę zerową (dejonizowana H₂O wolna od nukleaz) oraz próbę ujemną. Materiałem dla próby ujemnej było DNA gatunku nicienia należącego do tego samego rodzaju co badany.

P r z y k ł a d

Identyfikacja nicienia *Merlinius brevidens*.

DNA izolowano przy użyciu komercyjnych zestawów do izolacji DNA NucleoSpin Tissue XS firmy Macherey-Nagel. W reakcji użyto starterów i sondy o następujących sekwencjach:

Starter/sonda	Sekwencja
Merbfv	AGGTGGAAACGGATAGAG
Merbrv	CAGGGCAAACAGTCTTAG
Merbs	CTTGTATTTCAGCCGCTCTGGTT

Reakcję Real Time PCR przeprowadzano w mieszaninie o objętości 20 μ l w aparacie RotorGene 6000 firmy Qiagen przy użyciu odczynników z zestawu LuminoCt qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich) w następujących ilościach:

- H₂O wolna od nukleaz do objętości 20 μ l,
- 2 μ l 10,0 μ M każdego ze starterów Merbfv i Merbrv,
- 1 μ l 4,0 μ M sondy Merbs znakowanej na końcu 5' barwnikiem JOE, a 3'-końcu wygaszaczem HBQ1,
- 10 μ l 2X LuminoCt qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich),
- 2 μ l DNA.

Mieszaninę reakcyjną umieszczano w próbówce o objętości 20 μ l, umieszczano w rotorze termocyklera RotorGene 6000 i przeprowadzano reakcję amplifikacji w 40 20 cyklach w następujących warunkach:

Etap		Temperatura [°C]	Czas [s]	Pomiar fluorescencji
Pre-inkubacja		95	180	-
Amplifikacja	denaturacja	95	30	-
	przyłączanie	55	30	pojedynczy
	synteza	72	30	-
Chłodzenie		40	20	-

Kontrolę negatywną stanowiło DNA nicienia *Merlinius microdorus* (2 μ l DNA). Krzywe amplifikacji uzyskane w wyniku przeprowadzonej analizy przedstawiono na Fig. 1

Rozwiązanie według wynalazku pozwala na wykrycie nicienia w glebie w przeciągu kilku godzin, uwzględniając w tym etapy przygotowania prób, izolacji DNA oraz reakcji Real Time PCR. Metodę według wynalazku, można zastosować do identyfikacji wyżej wymienionego gatunku nicienia niezależnie od rodzaju prób badanych, ich pochodzenia i przeznaczenia oraz stadium rozwoju.

Proponowany zestaw pozwala identyfikować wyżej wymieniony gatunek nicienia w reakcji Real Time PCR, która jest znacznie czulsza i szybsza od innych metod PCR. Zastosowanie w reakcji Real Time PCR sond znacznie zwiększa specyficzność reakcji w stosunku do reakcji Real Time PCR z barwnikami fluorescencyjnymi.

Wykaz sekwencji starterów i sond

Nr startera/sondy	Nazwa	Sekwencja
Nr 1	Merbfv	AGGTGGAAACGGATAGAG
Nr 2	Merbrv	CAGGGCAAACAGTCTTAG
Nr 3	Merbs	CTTGTATTTCAGCCGCTCTGGTT

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób identyfikacji nicienia *Merlinius brevidens* w próbce gleb, obejmujący następujące etapy:
 - a) dostarczenie próbki gleby zawierające nicienie do identyfikacji;
 - b) wyłukanie nicieni z gleby;
 - c) izolację DNA;
 - d) przeprowadzenie reakcji PCR, zwłaszcza Real Time PCR, z zastosowaniem pary starterów 3' i 5' oraz sondy;
 - e) porównanie krzywej amplifikacji badanej próby z krzywymi amplifikacji próby zerowej oraz kontroli negatywnej,**znamienny tym**, że do identyfikacji gatunku *Merlinius brevidens* w reakcji PCR, zwłaszcza Real Time PCR, stosuje się właściwe dla danego gatunku starter 5' (nr 1) i 3' (nr 2) oraz sondę nr 3.
2. Zestaw do identyfikacji nicienia *Merlinius brevidens* metodą PCR, zwłaszcza Real Time PCR, zawierający właściwe dla danego gatunku starter 5' (nr 1) i 3' (nr 2) oraz sondę nr 3.

Rysunek

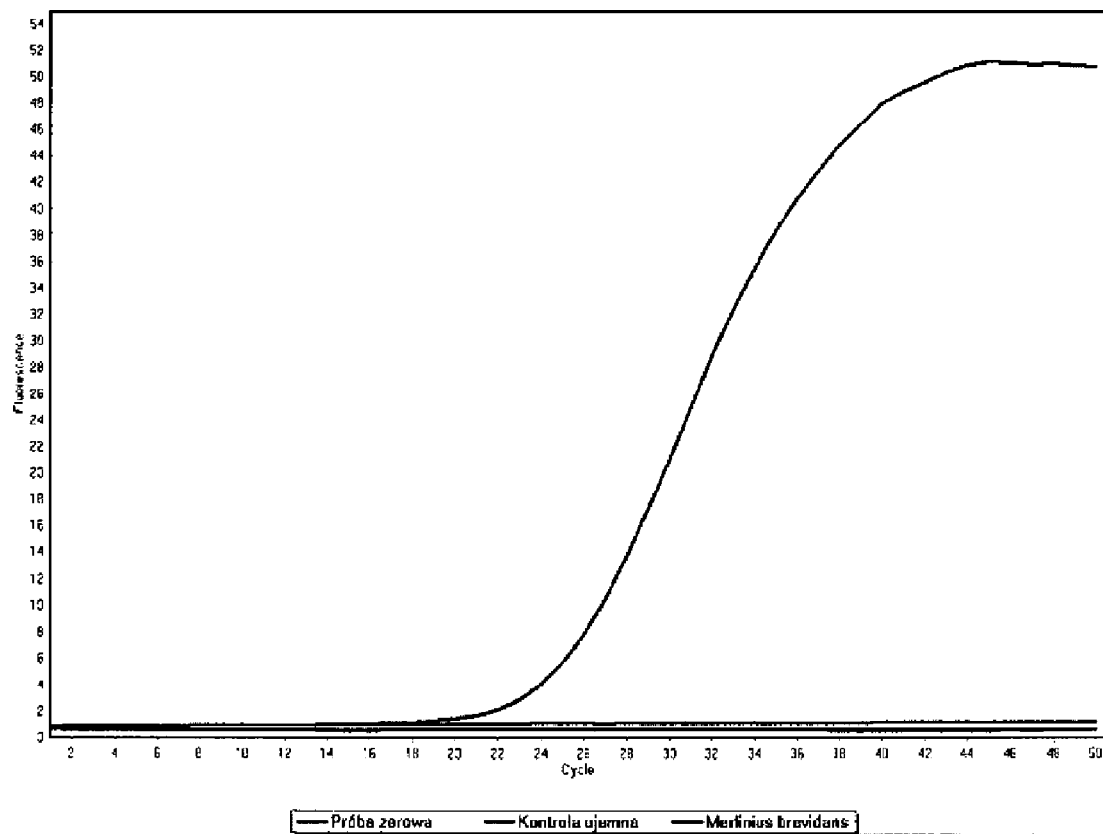


Fig. 1