

(19)



(10) **LT IP1511 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP1511** (51) Int. Cl. (2006): **C12Q 1/68**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 02**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **803302, 1991 12 04, US**
5011068, 1992 01 31, SU

(71) Pareiškėjas:
**E.I. Du Pont de Nemours and Company, 1007 Market Street, Wilmington,
Delaware 19898, US**

(72) Išradėjas:
Mark Anton JENSEN, US
Neil Alexander STRAUS, CA

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
**Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis“,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:
Mikroorganizmų identifikacijos būdas

(57) Referatas:
—

TIK⁵

MIKROORGANIZMŲ IDENTIFIKACIJOS BŪDAS

Sis išradimas skirtas mikroorganizmų identifikacijos sričiai, panaudojant DNR amplifikaciją. Konkrečiau, sis išradimas skirtas prokariotinių organizmų rūšių identifikacijai, kuri pagrįsta produktu, gautu amplifikuojant specifinius geno rajonus, būdingus tam organizmui, charakteristika. Be to, atsitiktinių geno sričių amplifikacijos ir specifinių geno sričių amplifikacijos būdu yra identifikuojama rūšis, serotipas ir mikroorganizmų kamienas.

Pastaruoju metu spaudoje pasirodė daug įtartinos literatūros ir nuorodų, priklausančių mikroorganizmų, tokių kaip bakterijos, identifikacijos sričiai. Šioje medžiagoje daug dėmesio skiriama mikroorganizmų identifikacijos ir klasifikacijos metodų tobulinimui atsitiktinumų pagrindu. Tai yra, tyrinėtojas naudoja technologiją tam tikro dominančio mikroorganizmo arba ligos sukėlėjo išskyrimui. Kitose nuorodose nagrinėjamas sudėtingas išskyrimas, panaudojant įvairius specifinius pradmenis arba sujungus juos ir atidžiai kontroliuojant eksperimento apribojimus. Kaip paaiškės iš aprašymo, šių trūkumų galima išvengti.

PCT publikacijoje WO 89/10414 (Wallace ir kt.) atskleidžiamas naujų genetinių markerių sukūrimo būdas ir sudėtingų genetinių markerių nustatymas. Genominės DNR pavyzdys yra amplifikuojamas, ir nustatoma amplifikuoto fragmento pasikeitimų seka.

Tada amplifikuoti fragmentai yra nustatomi. Šioje publikacijoje yra išdėstyta bendra koncepcija, kurioje nurodoma, kad polinukleotidinė tikslinė seka, įskaitant daugybę polimorfinių lokusų, yra amplifikuojama, o susidaręs produktas analizuojamas, siekiant nustatyti, yra ar nėra tikslinė seka, turinti specifinę lokuso charakteristiką. Tačiau Wallace ir kt., identifikuodami mikroorganizmus, nesusikoncentruoja ties amplifikacija tarpiniu rajonu, išsisklaidžiusių tarp labiausiai konservatyvių rDNR sekų. Nuorodoje šis priartėjimas netaikomas tiek vienam, tiek viso genomo atsitiktiniams rajonams.

EP O 332 435 nurodomas būdas, kaip nustatyti vieną ar daugiau nukleotidinės sekos variantų. Nukleotido rūgšties pavyzdys kontaktuoja su diagnostiniu pradmeniu, kuris, iš esmės, yra komplementarinis tikslinės bazinės sekos daliai. Pailgėjimas būna ten, kur galinis pradmenų nukleotidas yra komplementarus skirtingam arba normaliam tikslinės bazinės sekos nukleotidui. Nustatomas pailgėjimo produktas, jeigu jis yra. Šis traktavimas netaikomas tarpinių rajonų, išsidėsčiusių tarp konservatyvių rDNR sekų, amplifikacijai bei sekos analizei, kaip šiuo metu manoma.

Williams ir kt. straipsniuose "DNR polimorfizmai, amplifikuojami atsitiktiniais pradmenimis, yra naudojami kaip genetiniai markeriai" ("DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", Nucleic Acid Research, Vol. 18, No. 22, p. 6531-6535) ir "Pirštų atspaudų genomai, naudojami PCR su atsitiktiniais pradmenimis" ("Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers", Nucleic Acid Research, Vol. 18, No. 24, p. 7213-7218) nurodomas atsitiktinių pradmenų panaudojimas

amplifikacijos reakcijoje, siekiant gauti genomines DNR, paimtos iš skirtingų šaltinių, įskaitant ir bakterijas, amplifikacijos produktų charakteringus pavyzdžius. Pagal Williams ir kt. priartėjimui, panaudojami nedideli pradmenys santykinai griežtomis sąlygomis. Polimorfizmais vadinami Reti Amplifikuoti Polimorfiniai DNR - markeriai (arba RAPD markeriai), jie yra naudingi, nustatant įvairių rūšių genetinius žemėlapius. Welsh ir kt. aprašė metodiką, kurioje nurodyta, kaip panaudoti prailgintus pradmenis amplifikacijos procese, kuriame ne tokios griežtos sąlygos pirminėse stadijose ir griežtos sąlygos vėlesniuose cikluose. Abiem atvejais bakteriniai kamienai yra identifikuojami, lyginant atsitiktinių pradmenų genominius atspaudus su išankstiniais pavyzdžiais.

Pagal Williams ir kt. ir Welsh ir kt. aprašytus būdus panaudojami atsitiktiniai pradmenys, kurių amplifikacijos ciklas yra, santykinai, aukštas. Šiomis sąlygomis vykstant amplifikacijai, susidaro didelis kiekis antrinių amplifikacijos produktų ir vyksta nespecifinė DNR sintezė. Šie amplifikacijos produktai atskiriami elektroforezės būdu, ir susidaręs pavyzdys analizuojamas ir lyginamas su pavyzdžio atpažinimo duomenimis.

Amplifikacijos metu, panaudojant vieną atsitiktinį pradenį, kaip aprašo Williams ir kt. ir Welsh ir kt., galima gauti atsitiktinio produkto pavyzdį, turintį bendrus rūšies elementus ir išskirtinius elementus, būdingus tos rūšies kamienui. Tačiau, vieno arba dviejų atsitiktinių pradmenų panaudojimas yra netinkamas plačiam mikroorganizmų spektrui. Taigi, skirtingoms mikroorganizmų rūšims gali būti reikalingas kitas atsitiktinių

pradmenų rinkinys, norint gauti bendrus rūšies elementus ir išskirtinius elementus, būdingus kamienui. Siame išradime aprašyta Williams ir kt. ir Welsh ir kt. metodika patobulinta tuo, kad nežinomo mikroorganizmo atrankai nereikia panaudoti visą seriją galimų pradmenų arba preliminarinę tariamą identifikaciją.

Pranzūzijos Patente Nr. 2 636 075 nurodoma, kaip aptikti bakterijas, mieles, parazitus ir kitus eukariotinius mikroorganizmus, pavyzdžiui, maisto produktuose. Ribosominė RNR, jeigu ji yra, ekstrahuojama iš produkto ir perduodama į DNR grįžtamosios transkriptazės pagalba. DNR grandinė yra perduodama komplementarinei grandinei pradmens pagalba ir tada amplifikuojama, dalyvaujant vienam arba daugiau pradmenų, kurie apibrėžia nustatomą seką. Amplifikuota seka nustatoma elektroforezės akrilamido gelyje būdu arba hibridizacijos būdu, panaudojant žymeklius, kurie dalinai padengia amplifikuojamą rajoną.

Vilgalys ir kt., straipsnyje "Greita genetinė identifikacija ir fermentiškai amplifikuotos ribosominės DNR, išskirtos iš kelių *Cryptococcus* species rūšių, žemėlapių sudarymas" ("Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species", *Journal of Bacteriology*, Aug. 1990, p. 4238-4246) aprašo supaprastintą metodiką, pagal kurią atliekamas restrikcijos nurašymas ir žemėlapių sudarymas, būtinas identifikuojant giminingas patogeninių grybų rūšis. Po priartėjimo, kuriame panaudojama polimerazinės grandinės reakcija (žr. žemiau), amplifikuojant žinomą ribosominės DNR rajoną, vyksta restrikcija ir elektroforetinis atskyrimas.

Pagal identifikacijos būdą, aprašytą Pranzūzijos Patente Nr. 2 636 075 ir Vilgalys ir kt., panaudojama daug fermentinio veikimo stadijų, reikalaujančių tarpinių produktų valymo. Siuose metoduose yra daugybė fermentinio veikimo stadijų, be to, būtina pašalinti tarpinius produktus, todėl jie brangiai kainuoja ir reikalauja daug darbo.

Mullis ir kt., JAV Patente Nr. 4 683 195 ir Mullis JAV Patente Nr. 4 683 202 atskleidžia polimerazinės grandinės reakcijas (vadinama PCR metodu), kurios gali būti panaudojamos, amplifikuojant bet kurią specifinę nukleininės rūgšties segmentą. Pagal šiuos analitinius būdus, polimorfizmai buvo nustatomi, amplifikuojant tiriamo genomo pasirinktus tikslinius DNR segmentus.

Šių metodų trūkumas yra toks, kad pakankamas bazių, esančių abiejuose specifinio segmento galuose, skaičius turi būti gana tiksliai žinomas, norint sukonstruoti du oligonukleotidų pradmenis, kuriuos galima hibridinti su skirtingomis tikslinio segmento grandinėmis. Reikia daug pastangų, siekiant gauti tikslinių genomų reikalingos sekos informaciją, kuri būtina, konstruojant reikalingus pradmenis.

Šio išradimo tikslas - mikrobu genties ir rūšies identifikacijos genų lygyje būdas, kuris pasiekiamas, nustatant fragmentų, išsidėsčiusių tarp labiausiai konservatyvių rDNR sekų, ilgio ir skaičiaus pasikeitimus. Šie fragmentai vadinami ribosominės sekos (RS) fragmentais. Kitas išradimo tikslas yra mikrobu identifikacijos būdas, panaudojant tinkamas polimerazinės grandinės reakcijas. Dar kitas šio išradimo tikslas yra tas, kad

amplifikacija, esanti mikrobu identifikacijos pagrindu, vyksta panaudojant tiksliai vienintelę nukleininės rūgšties seką porą. Norint pasiekti šį tikslą, ankčiau minėtų RS fragmentų pasikeitimai yra ocharakterizuojami, amplifikuojant kintamas sekas (tokias, kaip tarpinių rajonų), išsidėsčiusias tarp rajonų, kuriuose yra labiausiai konservatyvios sekos (tokios, kaip rDNR sekos). Šios DNR sekos gali būti išsidėsčiusios kintamų sekų kraštuose arba gali susisiekti su kintamomis sekomis. Dar vienas šio išradimo tikslas - mikrobu identifikacija pagal serotipą ir kamieną yra pasiekama modifikacijos dėka, kurios metu papildomai amplifikuojamos papildomos atsitiktinės mikrobino genomo sritys, derinant su kintamų sričių, išsidėsčiusių tarp labiausiai konservatyvių rDNR sekų, amplifikacija.

Šio išradimo ypatumai tokie, kad galima suderinti ir su kitomis įvairiomis metodikomis, kurios plačiai naudojamos mikrobiologinės ir molekulinės biologijos tyrimuose, tačiau vienujomis neapsiribojant, be to, galima panaudoti elektroforezę, dažymą (kai naudojamas etidijaus bromidas) arba spektrofotometrinius metodus.

Šio išradimo privalumas yra tas, kad siekiant gauti visų mikroorganizmų rūšių amplifikacijos produktus, panaudojama viena ir ta pati pradmenų pora. Kadangi šių pradmenų seka prokariotiniuose organizmuose yra labai konservatyvi, tai šie pradmenys paprastai ir yra naudojami. Amplifikuojant šią vieną pradmenų porą, gaunami produktai, kuriuos gamina žinomo genetinio lokuso, ocharakteringo tai rūšiai, konservatyvios sekos. Vykstant atsitiktinei amplifikacijai, gaminasi papildomi produktai, kurie panaudojami mikrobu identifikacijai rūšies viduje.

Taip sutaupomos lėšos ir laikas, nes nereikalinga atranka ir išankstinė identifikacija.

Dar vienas šio išradimo privalumas, kad pagal šį būdą, elektroforezės metu atskiriant reakcijos produktus, gaunamas pavyzdys, kuriame yra minimalus antrinių ir nespecifinių amplifikacijos produktų skaičius. Šie pavyzdžiai panaudojami, analizuojant ir sulyginant bendrą seką su baziniais etaloniniais duomenimis pagal JAV Patentą Nr. 4 885 697.

Dar vienas šio išradimo privalumas tas, kad panaudojama tik vienintelė fermentinio veikimo stadija, nevalant produkto prieš atskyrimą elektroforezės būdu. Šis būdas nereikalauja daug darbo ir sutaupomas laikas.

Šie ir kiti išradimo tikslai, ypatumai ir privalumai taps suprantamesni, susipažinus su šiuo išradimo aprašymu.

Šiame išradime aprašytas mikroorganizmų rūšies identifikacijos būdas. Šis būdas sudaro:

a) mikroorganizmų genomo DNR išskyrimas, kai minėtos DNR sudėtyje yra įvairios sekos, išsidėsčiusios tarp labai konservatyvių sekų;

b) minėtų kintamų sekų amplifikacija, tuo būdu gaunant fragmentus, ypatingai besiskiriančius dydžiu ir skaičiumi; ir

c) minėtų fragmentų pagal dydį atskyrimas ir minėtų fragmentų pasiskirstymo analizavimas, tuo būdu nustatant mikroorganizmų rūšis.

Veliau aprašomas mikroorganizmo rūšies, serotipo ir kamieno identifikacijos metodas, susidedantis iš:

a) mikroorganizmų genomo DNR išskyrimo, kai minėta genomo DNR susideda iš kintamų sekų, išsidėsčiusių tarp labai konservatyvių sekų ir papildomai iš viso genomo pasirinktų rajonų;

b) minėtų kintamų sekų amplifikacijos, tuo būdu, gaunant fragmentus, ypač besiskiriančius dydžiu ir skaičiumi;

c) minėtų pasirinktų rajonų amplifikacijos, tuo būdu gaunant Atsitiktinius genomo (AG) (Arbitrary Genomic -AG) fragmentus, ypač besiskiriančius dydžiu ir skaičiumi;

d) minėtų fragmentų ir minėtų AG fragmentų atskyrimo pagal dydį ir minėtų fragmentų bei AG fragmentų pasiskirstymo analizavimu, tuo būdu nustatant mikroorganizmų rūšį, serotipą ir kamieną.

Sie metodai naudingi, ypač nustatant rūšis, serotipą ir kamieną bakterijų, gyvenančių maisto produktuose.

Labiau priimtinas variantas, kai labai konservatyviomis sekomis yra labai konservatyvios rDNR sekos. Taigi, šie fragmentai yra RS fragmentai.

Pagal tinkamesnį čia nurodytų metodų variantą, išskyrimo stadiją (a) sudaro ląstelės lizis ir deproteinizacija. Vėliau amplifikacijos stadiją (b) sudaro, mažiausiai, vienos poros oligonukleotidinių pradmenų prijungimas prie labai konservatyvių rDNR sekų. Nukleino rūgšties polimerazė ir nukleotido trifosfatai yra įvedami į pradmenis, tinkamus kintamų sekų, išsidėsčiusių tarp labai konservatyvių rDNR sekų, amplifikacijai. Arba oligonukleotidiniai pradmenys yra prijungiami prie anksčiau minėtų sekų ir prie daugelio atsitiktinių rajonų, užtikrinant atsitiktinių rajonų tinkamą amplifikaciją.

1 Pav. schematiškai pavaizduotas bakterijų rRNR genetinis lokusas. Šiame lokuse yra konservatyvūs sekos rajonai, kuriuose atsiranda pradmenys amplifikacijai, ir tarpiniai rajonai tarp šių pradmenų saitų.

2 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų keturioms *Listeria* gentims, įskaitant *Listeria monocytogenes*, schema.

3 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų keturioms *Salmonella* genties serotipams, įskaitant *Salmonella typhimurim*, schema.

4 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų penkioms *Staphylococcus* genties rūšims, įskaitant *Staphylococcus aureus*, schema.

5 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų penkiems *Escherichia* genties rūšims, įskaitant *Escherichia coli*, schema.

6 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų aštuonioms papildomoms rūšims, parinktoms iš keturių genčių, dominančių dėl patogeniškumo, schema. Tai šios rūšys: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* ir *Yersinia enterocolitica*.

7 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų tiek iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų, tiek per visą genomą pasirinktų rajonų trims *Listeria* genties rūšims, įskaitant *Listeria monocytogenes*, schema.

8 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų tiek iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų, tiek per visą genomą pasirinktų rajonų trims *Salmonella* genties serotipams, įskaitant *Salmonella typhimurium*, schema.

9 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų tiek iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų, tiek per visą genomą pasirinktų rajonų trims *Staphylococcus* genties rūšims, įskaitant *Staphylococcus aureus*, schema.

10 Pav. pavaizduotas amplifikacijos produktų, gautų tiek iš rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų, tiek per visą genomą pasirinktų rajonų keturiems *Escherichia coli* ir dviems *Citrobacter freundii* kamienams, schema.

Aprašytas išradime būdas naudingas, identifikuojant įvairius mikroorganizmus. Nurodomas tipiškas, bet nebaigtas mikroorganizmų sąrašas, įtraukiant tiek gentį, tiek rūšį ir serotipą, kuriuos galima nustatyti pagal nurodytus būdus. Tai *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella newport*, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus scuri*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia blattae*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* ir *Yersinia enterocolitica*. Šis sąrašas gali būti anksčiau vizualiai nustatytų produktų duomenų pagrindu pagal

kuriuos, juos palyginus su elektroforezės būdu pagal šį išradimą nustatytais fragmentų produktais, galima identifikuoti mikroorganizmų rūšis (ir serotipą bei kamieną, jeigu yra).

Specialistui aišku, kad šį metodą galima pritaikyti mikroorganizmų identifikacijai bet kokiomis aplinkybėmis. Taigi, tiksliausia šiame išradime aprašyta būda panaudoti mikroorganizmų identifikacijai maisto produktuose. Be to, pagal išradimą galima identifikuoti mikroorganizmus, sukeliančius infekciją žmonėms, gyvuliams ir augalams.

Pagal šį išradimą prokariotinių organizmų identifikacija pagrįsta produktu, gautu amplifikuojant tarpinius rajonus, esančius tarp rRNR genetinio lokuso 16S ir 23S rajonų, charakteristika. rRNR genetinis lokusas yra genetinis vienetas, kuris randamas prokariotinėse ląstelėse. Žymi nukleininės rūgšties sekos dalis, sudaranti šį genetinį lokusą, yra bendra visiems prokariotiniams organizmams. (1 Pav. pavaizduota šitokio lokuso bendra schema). Šio genetinio lokuso 16S, 23S ir 5S rajonų visiškas panašumas panaudojamas kaip raktas skirtingų prokariotų rūšių klasifikacijai. Buvo parodyta, kad genus, koduojančius rRNR 16S rajoną, sudaro labai konservatyvių sekų rajonai, išsidėstę tarp mažai konservatyvių sekų rajonų. Taip pat buvo parodyta, kad 23S ribosominės RNR rajonas, nors ir mažiau charakterizuotas, bet yra tokios pat struktūros, kaip ir 16S rajonas.

16S, 23S ir 5S genu sekos yra atskirtos tarpiniais vienetais. Šie tarpiniai vienetai (taip pat vadinami tarpiniais rajonais) atskleidžia prokariotinių organizmų genties ir rūšies lygyje žymius sekos ir jos ilgio pasikeitimus. Duotos rūšies vieno

genomo ribose dažnai pasireiškia daugybė rRNR genetinių lokusų. Tarpiniai rajonai šio lokuso ribose taip pat žymiai skiriasi ilgiu ir seka. Buvo parodyta, kad 16S rajono konservatyvios sekos gali būti panaudojamos kaip saitai nekonservatyvių sekų, esančių 16S rajono ribose, amplifikacijai, nustatant jų nukleotidinę sudėtį. Panašiai galima tikėtis, kad 16S ir 23S rDNR 3' ir 5' galų konservatyvūs rajonai, atitinkamai gali būti panaudoti kaip pradmenų saitai amplifikacijai tarpinių vienetų, esančių tarp šių dviejų konservatyvių rajonų. Galima tikėtis, kad dėl tokių tarpinių rajonų amplifikacijos bus gaunami fragmentai, kurių dydis ir skaičius charakterizuos prokariotų duotas rūšis.

Buvo nustatyta rRNR genetinio lokuso 16S rajono seka plačiam bakterijų spektrui. Šios sekos duomenys kartu surinkti, yra pateikiami Dams ir kt. straipsnyje "Ribosominės RNR sekos mažų subvienetų duomenų rinkinys" ("Compilation of small ribosomal subunit RNR sequences", Nucleic Acids Research, Vol. 16, supplement, p. r87). Šios sekos duomenys buvo nagrinėjami, identifikuojant labai konservatyvią 16S rajono seką, kuri tiesiogiai liečiasi su tarpiniu rajonu. Pasirinkta seka buvo GAAGTCGTAACAAGG, kuri bus žymima P1. Ši seka yra labai konservatyviame rajone, apie 30-40 bazių toliau nuo tarpinio rajono.

Žymiai mažiau duomenų turima sekai, kuri yra 23S rajone. Gutell ir kt. straipsnyje "RNR sekų didelių subvienetų struktūrinės formos pavidalu duomenų rinkinys" ("A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format", Nucleic Acids Research, Vol. 16, supplement, p. r175) pateikia nedidelį 23S sekų rinkinį, susidedantį iš 5 bakterijų ir 4 augalų chloroplasto sekų. Kitas pasirinktas pradmuo atitinka tarp

pateiktų bakterijos sekų labiausiai konservatyvią seką, kuri yra tuoju pat už tarpinio rajono. Pasirinkta seka buvo CAAGGCATCCACCGT, kuri bus žymima P2. Ši konservatyvi seka, remiantis penkiais bakteriniais pavyzdžiais, buvo išsidėsčiusi apie 20 bazių toliau nuo tarpinio rajono. Tas faktas, kad ši seka taip pat atitinka augalo chloroplasto sekos tam pačiame rajone 13 bazių iš 15 (87 % panašumas) rodo, kad būtent ši seka yra stabili evoliucijos eigoje ir, matomai, liks konservatyvi plačiam bakterijų spektrui.

Abiejuose 16S ir 23S rajonuose pradmenų ilgis buvo limituotas iki 17 bazių (tikslingiau panaudoti 15-17 bazių), nes ilgesni pradmenys gali patekti į mažiau konservatyvios sekos rajonus. Pradmenys, kurie perdengia nekonservatyvius visose bakterijose rajonus, labiau skiriasi amplifikacijos efektyvumu. Todėl sunku nustatyti vienintelį pradmenų rinkinį ir amplifikacijos sąlygas visiems bakterinio genomo DNR pavyzdžiams. Įmanoma, kad kai kurios sekos, nesančios ribosominiuose tarpiniuose rajonuose, gali būti amplifikuojamos pradmenų rinkiniais P1 ir P2. Atsirasti šitam tipui tikimybė yra reta, bet netarpinių rajonų amplifikacija netgi sugriežtintomis sąlygomis negali būti reguliuojama. Sitokia amplifikacija nesumažina metodo vertės ir, matomai, suteiks papildomą informaciją mikroorganizmų diferenciacijai ne tik tai rūšies lygyje. Bet kokie amplifikacijos fragmentai, gauti griežtomis sąlygomis, amplifikuojant pradmenis P1 ir P2, bus vadinami RS fragmentais. Siuo pavadinimu norima pabrėžti, kad sekos šitiems pradmenims yra paimtos iš labai konservatyvių rRNR sekų, iš krašto susiliečiančių su ribosominiais tarpiniais rajonais.

Dažnai reikia identifikuoti patogenines rūšis ne tik rūšies lygyje, bet nustatyti serotipą ir kamieną. Ši informacija vertinga, pavyzdžiui, identifikuojant maisto produktų užterštumo šaltinį ir sekant epidemijos plitimą. Nors pavyzdžiuose, gautuose amplifikuojant rRNR genetinio lokuso tarpinius rajonus, yra pakankamai informacijos nustatyti rūšis, tačiau ne visada juose yra pakankamai informacijos serotipo ir kamieno nustatymui. Ribosominės RNR genai sudaro tiksliai 1 % bendro prokariotinio genomo. Norint identifikuoti rūšis pagal serotipą ir kamieną, mums reikia surinkti papildomą informaciją apie sričių, išsidėsčiusių už rRNR genų ribos, genomo sudėtį.

Williams ir kt. pademonstravo atsitiktinės amplifikacijos fragmentų gavimo metodiką. Pagal šį būdą aprašomas mažų oligonukleotidų panaudojimas, t.y. apytikriai, 10 bazių atsitiktinės sudėties DNR amplifikacijos reakcijoje. Trumpi pradmenys panaudojami, siekiant nustatyti komplementarines ir grįžtamas komplementarines sekas pradmenis atžvilgiu atstumu per visą genomą, kuris yra pakankamai mažas, kad įvyktų DNR amplifikacija. Gauti amplifikacijos metu fragmentai vadinami atsitiktiniais amplifikaciniais polimorfiniais DNR (AAPD) (Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) markeriais. Šitie AAPD markeriai parodo pasiskirstymo dydį, kuris yra jautrus amplifikacijos metu panaudojamos genominės DNR sudėties ribotiems skirtumams.

Šiame išradime pateikiamas tiriamo mikroorganizmo genomo atsitiktinės amplifikacijos fragmentų gavimo būdas, derinant jį su rRNR genetinio lokuso tarpinių rajonų amplifikacijos produktu gavimu. Tariamų rDNR tarpinių rajonų amplifikacija pasiekama,

panaudojant 15-17 bazių pradmenis ir kylant prisijungimo temperatūrai iki 72°C (tinkamesnė iki 55°C temperatūra) ir trukmė 1-20 min. (tinkamesnis laikas 2-10 min), amplifikacijos reakcijos. Mikrobu diferenciacija pagal serotipą ir kamieną pasiekama, sumažinant pradmenų, naudojamų amplifikacijai, dydį, išlaikant konservatyvius sekos elementus. Sumažinant pradmenų ilgį iki 11 bazių (tiksliau panaudoti 10-12 bazių), esant prijungimo temperatūrai 43-46°C, per 1-10 min (tiksliau, kad saveika tęstusi 5-10 min), panaudojus vieną porą pradmenų, iš genomo DNR galima gauti tiek RS fragmentus, tiek AAPD markerius. Kadangi AAPD markeriai gaunami, amplifikuojant atsitiktines genomo sekas, jie bus vadinami AG fragmentais. Jungtinė RS ir AG fragmentų amplifikacija bus vadinama RS/AG amplifikacija. Amplifikacijos reakcijoje gauti RS fragmentai pakankamai individualūs, todėl mikroorganizmus galima identifikuoti pagal rūšį. Papildomai gaunami AG fragmentai suteikia pakankamai papildomą informaciją, todėl galima mikroorganizmus identifikuoti pagal serotipą ir kamieną.

Labai svarbus šio išradimo bruožas, kad kiekviename RS/AG amplifikacijos pavyzdyje yra RS fragmentai, kuriuos galima panaudoti, amplifikuojant rūšis. Tai reiškia, kad skirtingų tam tikros rūšies kamienų pavyzdžiuose bus bendri elementai, kurie rodo, kad kamienai gauti iš bendros rūšies. Jeigu pasitaiko kamienas, kurio nėra baziniuose duomenyse, kamieno rūšis dar gali būti nustatyta, nes pateiktuose baziniuose duomenyse yra šios rūšies RS fragmentai. Norint išlaikyti pradmenį, naudojamą RS/AG pavyzdžių gavimui, konservatyviai priginti, 11 bazių

pradmenys, panaudojami amplifikacijos reakcijoje, yra pradmenų sekos iš 15 bazių priešrinkiniu. Seka, parinkta 16S rajonui, susiliečiančiam su tarpiniu rajonu, buvo GAAGTCGTAAC, ji bus žymima P3. Seka, parinkta 23S rajonui, kuri yra už tarpinio rajono, buvo AAGGCATCCAC, ji bus žymima P4.

Žinoma, kad vidumolekulinė hibridizacija pagrindinai tenka genetiniam rDNR lokusui. Susidariusi antrinė struktūra dažnai apsunkina pradmenų amplifikaciją hibridizacijos saituose. Norint sustiprinti fragmentų, esančių rDNR rajono ribose, amplifikaciją, reikia modifikuoti temperatūrinį, paprastai naudojamą, profilį. Principinė modifikacija – tai pakankamai prailgintas prijungimo laikas. Reikia 7 minučių, norint gauti RS fragmentus iš P1 ir P2. Norint gauti tiek RS, tiek AG fragmentus per vieną reakciją iš P3 ir P4, reikia 8 minučių. Abiem atvejais amplifikacija vyksta griežtomis sąlygomis, sumažėjus amplifikacijos ciklo skaičiui. Amplifikacijos griežtomis sąlygomis reakcija vyksta aukštesnėje prijungimo temperatūroje, kai formuojasi atgaminami produktai. Pradmenų rinkinio P1 ir P2 maksimali temperatūra, prie kurios prasideda atgaminamo produkto formavimas, buvo 55°C. Pradmenų rinkinio P3 ir P4 maksimali temperatūra, prie kurios prasideda atgaminimo produkto formavimas, buvo 43°C. Panaudojant maksimalią prijungimo temperatūrą, susiformuoja tiksliai labiausiai stabilios hibridizacijos struktūros, ir srityje, supančioje pradmenų saitus, susidaro minimalus antrinių struktūrų kiekis.

Ilgas prijungimo laikas amplifikacijos reakcijai reikalingas dėl dviejų priežasčių. Pirmiausia, polimerazei pakanka laiko surasti eilę hibridintų pradmenų saitų, dėl ko padidėja kiek-

vieno amplifikacijos ciklo bendras efektyvumas. Antra, amplifikacijos iniciacijos saitai priklauso nuo prijungimo saitų, kurie formuoja labiausiai stabilų dvigubą pradmenį, o ne nuo tų saitų, kurie yra labiausiai prieinami. Dėl šios priežasties pagerėja pavyzdžio atgaminimas, nes amplifikacijos saitai pagrįsti konkurencijos pagrindu pradmens hibridinimo metu, tik labiau pusiausvyros, negu kinetinėmis sąlygomis.

Kadangi santykinė pusiausvyra yra žymiai mažiau jautresnė nedideliems temperatūros ir joninės jėgos pasikeitimams, negu santykinė priėjimo prie specifinio DNR saito kinetika, galutinio rezultato pavyzdys yra mažiau jautrus mažiems joninės jėgos ir temperatūros pasikeitimams. Padidinant amplifikacijos proceso efektyvumą, pasidaro įmanomas RS amplifikacijos atgaminimas, o o pavyzdys lengvai prijungiamas per 25 amplifikacijos ciklus, o RS/AG amplifikacijai – per 28 amplifikacijos ciklus.

Kaip nurodo Williams ir kt. ir Welsh ir kt. pagal atsitiktinių pradmenų panaudojimo metodiką reikalingas didelis amplifikacijos ciklų skaičius, atitinkamai, 45 ir 32-42. Panaudojant tiek daug amplifikacijos ciklų, dažnai susidaro antriniai amplifikacijos produktai, ir vyksta nespecifinė DNR sintezė. Produktas, sudarantis pagrindą, kuriame yra didelis skaičius tokių antrinių amplifikacijos produktų bei nespecifinės DNR, gali griežtai apriboti pavyzdžio sugebėjimą atpažinti duomenis, palyginus su produktu, kurio pagrindas – žinomi baziniai duomenys. Panaudojant mažiau amplifikacijos ciklų, kai prijungimo laikas 7-8 minutės, susidaro daug mažiau sudėtinio produkto, kuriame yra žymiai sumažintas nespecifinės DNR fonas. Kai amplifikacijos RS arba RS/AG produktai atskiriami elektroforezės būdu, gautas

pavyzdys gali būti lengvai išanalizuotas ir paveikiamas, panaudojant tuos pavyzdžio atpažinimo tipų duomenis, kurie lyginami su baziniais duomenimis.

Bendri metodai

DNR paruošimas

Bakterinės ląstelės yra nusodinamos centrifuguojant ir tada vėl suspenduojamos lizuojančiame buferyje (10 mM tris-HCl, 10 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0). Ląstelės suskaldomos fermentais lizuojančiame buferyje, susidedančiame iš 25 vienetų lizostafino, 30 mg N-acetilmuramidazės, 400 mg achromopeptidazės ir 600 mg lizocimo; bendras lizuojančio buferio tūris 306 ml. Skilimas vyksta 30–45 min. 37°C temperatūroje. Lizatas yra ekstrahuojamas chloroformu/fenolu, tada nusodinamos etanolu. DNR vėl ištirpinama tris/EDTA buferyje, ir galutinė koncentracija nustatoma spektrofometru.

DNR amplifikacija

Amplifikacijos reakcija bendrais bruožais aprašoma Mullis ir kt. JAV Patente 4 683 195 ir Mullis JAV Patente 4 965 188, kurių duomenimis remiamasi. JAV Patentas 4 683 195 yra svarbus tuo, kad nagrinėjamas pagrindinis PCR priartėjimas, o JAV Patentas 4 965 188 svarbus dėl termofilinių polimerazių.

Nukleininės rūgšties amplifikacijai specifinės matricos sąlygos aprašomos M.A.Innis ir D.H.Gelfand "PCR technika, Metodika ir pritaikymo vadovas" ("PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications", M.A.Innis, D.H.Gelfand, J.-J.Sninsky and T.J.White, eds. pp. 3-12, Academic Press, 1989), kurių duomenimis remiamasi.

138

Mullis nurodo bet kokios norimos specifinės nukleininės rūgšties sekos, esančios nukleino rūgštyje arba mišinyje, amplifikacijos būdą. Mullis metoda sudaro nukleininės rūgšties atskirų komplementarinių grandinių veikimas dviejų oligonukleotidinių pradmenų moliniu pertekliumi, prailginant pradmenis, kad susidarytų komplementarinių pradmenų prailginimo produktai, kurie veiktų kaip matricos, sintetinant norimą nukleininės rūgšties seką. Mullis pradmenys yra parenkami, kad būtų pakankamai komplementarūs kiekvienos specifinės amplifikuojamos sekos skirtingoms grandinėms. Reakcijos stadijos gali vykti palaipsniui arba lygiagrečiai ir pakartota, kiek norima kartu (šiuo išradime amplifikacija pakartota, mažiausiai, du kartus).

Pagal šį išradimą genomo DNR yra išskiriama, lizuoiant ląsteles arba jas deproteinizuojant. RS fragmentų amplifikacija (ir atsitiktinių genominių rajonų, jeigu tokie yra) sudaro bent vienos poros oligonukleotidų prijungimas prie labai konservatyvios rDNR sekos (ir prie daugelio atsitiktinių rajonų, jeigu jie yra). Pagal šį būdą į pradmenis yra įvedama nukleininės rūgšties polimerazė ir nukleotido trifosfatas. RS fragmentų amplifikacijai turi būti tinkamos sąlygos (ir atsitiktiniams rajonams, jeigu jie yra).

Tinkamesnės nukleininė rūgščių polimerazės yra DNR polimerazės, ypač termostabilios. Tinkami nukleozidų trifosfatai yra dezoksiribonukleininės rūgšties trifosfatai.

Kad būtų galima identifikuoti mikroorganizmus pagal amplifikacijos produktų pavyzdį, gautą iš šio organizmo genomo, pavyzdyje turėtų būti visų šio organizmo rūšių bendri elementai,

derinant juos su elementais, būdingais skirtingiems šios rūšies kamienams. Šitokiu būdu galima identifikuoti naujo kamieno rūši, kurio nėra baziniuose duomenyse, bet tik tuo atveju, kai baziniuose duomenyse yra įtraukti bendri rūšies elementai. Jeigu tos pačios rūšies skirtingi kamienai gamina visiškai skirtingus pavyzdžius, neturinčius bendrų elementų, tada nežinomo kamieno rūši nebus galima identifikuoti, remiantis tokiais pavyzdžiais.

RS fragmentų amplifikacija

Prieš amplifikaciją DNR pavyzdžiai yra praskiedžiami iki 20 ng/ml koncentracijos. Bakterinio genomo DNR 1,25 ml alikvotos sumaišoma su 2,5 ml 10X reakcinio buferio, 1 ml dezoksiribonukleotidinio trifosfato mišinio (po 5 mM kiekvieno), po 1,25 ml kiekvieno iš dviejų 15-bazių oligonukleotido pradmenų (P1 ir P2 50 ng/ml koncentracijos) ir 42 ml dejonizuoto vandens (Pradmenys gaunami iš Research Genetics ir toliau naudojami jų nevalant. Galima naudoti ir kitus pradmenis, gautus iš kitų šaltinių ir atliekančius tą pačią funkciją). Šis mišinys yra kaitinamas 5 min. 94°C temperatūroje, ir į mišinį pridedama 1,3 vienetai termofilinės DNR polimerazės. Tinkamos polimerazės yra Tag polimerazė, išskirta iš Thermus Aquaticus YT1 pagal Cetus Corporation valymo metodiką, ir taip pat tinkama metodika pagal Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT. Galima atlikti 25 amplifikacijos ciklus, panaudojant automatini cikliui temperatūros pasikeitimo prietaisą. Ciklo charakteristika yra ši: 1 min 94°C temperatūroje (denatūracijos stadija); 2 min. pasiekti 55°C; 7 min pasiekti 55°C (prisijungimo stadija);

2 min. pasiekti 72°C ir 2 min. - 72°C (sintezės stadija). Ciklo pabaigoje papildomai išlaikoma 7 min. 72°C temperatūroje, kad įvyktų dalinė polimerizacija. Tada, užbaigiant ciklo programą, pridedama 1 ml EDTA (0,5M) nutraukti reakciją, ir produktai saugojami 4°C temperatūroje.

RS fragmentų ir atsitiktinių genomo
rajonų amplifikacija (RS/AG)

Prieš amplifikaciją DNR pavyzdžiai praskiedžiami iki 20 ng/ml koncentracijos. Bakterinio genomo DNR 2,5 ml alikvuotos sumaišoma su 5 ml 10X reakcinio buferio, 2 ml dezoksiribonukleotido trifosfato (dNTP) mišinio (po 5 mM kiekvieno), po 2,5 ml kiekvieno iš dviejų 11-bazių oligonukleotido pradmenų (P3 ir P4 50 ng/ml koncentracijos) ir 34 ml dejonizuoto vandens (Pradmenys gaunami iš Research Genetics ir toliau naudojami jų nevalant). Šis mišinys yra kaitinamas 94°C temperatūroje, ir išlaikomas 5 minutes, į mišinį pridedama 2,0 vienetai termofilinės DNR polimerazės. Tinkamos polimerazės yra Tag polimerazė, o termostabili DNR polimerazė išskirta iš Thermus Aquaticus YT1 pagal Cetus Corporation valymo metodiką, ir taip pat tinkama metodika pagal Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT. Galima atlikti 28 amplifikacijos ciklus, panaudojant automatinį ciklinį temperatūros pasikeitimo prietaisą. Ciklo charakteristika yra ši: 0,5 min 94°C temperatūroje (denatūracijos stadija); 2,75 min. temperatūrai nukristi iki 43°C; 8 min - 43°C temperatūroje (prisijungimo stadija); 3,5 min. pasiekti 72°C ir 2 min. - 72°C (sintezės stadija). Ciklo pabaigoje papildomai išlaikoma 7 min. 72°C temperatūroje, kad įvyktų dalinė polimerizacija.

Tada, užbaigiant temperatūrinio ciklo programą, pridedama 1 ml EDTA (0,5M) nutraukti reakciją, ir produktai saugojami 4°C temperatūroje.

Amplifikacijos produktų elektroforezė

Paimama 5 ml alikvuotos reakcinio mišinio ir sumaišoma su 2 ml prisotinto buferio (15 % fikolio ir 0,25 % ksilol-cianolo). Mišiniu yra pakraunamas 4 % akrilamido/bis gelis (29/1) ir atskiriama elektroforeze. Gelis yra nudažomas etidijaus bromidu ir fotografuojami ultravioletiniu transiliuminatoriumi, AG fragmentų stebėjimams gali būti pasirenkami ir kiti būdai. Vienas toks populiarus būdas - tai fluorescuojančio deoksinukleotido panaudojimas amplifikacijoje. Dar galimas kitas būdas - spektroskopija.

Pavyzdžiai

Pav. 2-6 gauti pagal metodiką, aprašytą skyriuje "Tarpinių rDNR rajonų amplifikacija", vykstant nurodytų genomo DNR pavyzdžių, išskirtų iš bakterijų, amplifikacijos reakcijai. Pav. 7-10 gauti pagal metodiką, aprašytą skyriuje "Tarpinių rDNR rajonų ir atsitiktinių genomo rajonų amplifikacija", vykstant genomo DNR pavyzdžių, išskirtų iš nurodytų bakterijų, amplifikacijos reakcijai. Amplifikacijos produktai buvo atskirti akrilamido gelyje ir nudažyti etidijaus bromidu.

RS fragmentų amplifikacijai buvo parinktos bakterijos, priklausančios aštuonioms skirtingoms gentims. Buvo parinktos įvairios *Listeria* ir *Staphylococcus* genties rūšys, įvairūs genties

Salmonella serotipai, tai yra, priklausančios patogeniniams mikroorganizmams ir kurių identifikacija bei charakteristika ypač svarbūs. Penkios *Escherichia* genties rūšys buvo nagrinėjamos ir dar papildomai paimtos aštuonios rūšys iš keturių genčių, dominančių savo patogeniškumu. Fragmentų pavyzdžiai pagal dydį, susidare šių bakterijų amplifikacijos reakcijose ir elektroforezės būdu išskirti, parodyti pav. 2-6.

Bakterijos iš penkių skirtingų genčių buvo parinktos sudėinei RS ir AG fragmentų (RS/AG) amplifikacijai. Įvairūs serotipai ir kamienai buvo parinkti iš *Listeria* ir *Staphylococcus* genčių. Įvairūs serotipai buvo parinkti iš *Salmonella* genties. Buvo nagrinėjami keturi kamienai iš *Escherichia* genties ir du kamienai iš *Citrobacter freundii*. Fragmentų pavyzdžiai pagal dydį, susidare šių bakterijų amplifikacijos reakcijose ir elektroforezės būdu išskirti, parodyti pav. 7-10. Fragmentai, kurie yra bendri kiekvieno kamieno tiek RS, tiek RS/AG amplifikacijai, parodyti rodyklėmis pav. 7-10.

Kiekviena piešinyje juostos, kuriose yra bakterinės DNR amplifikacija, yra sunumeruotos, o kamieno numeris, atitinkantis juosta, pateiktas paaiškinime prie piešinio. Nesumeruotose juostose yra laiko žymekliai, kurie naudojami amplifikacijos produktų įvertinimui. Laiko žymeklių dydžiai yra šie: 228, 412, 693, 1331 ir 2306 bazių poros (bp). Fragmentų, gautų vykstant amplifikacijai, dydžiai skaičiuojami pagal šių fragmentų padėti laiko žymeklių atžvilgiu. Šių amplifikacijos produktų dydžių skaičiavimo paklaida sudaro maždaug 2 %.

1 PAVYZDYS

Pav. 2 parodytas RS fragmentų amplifikacijos pavyzdys keturioms genties *Listeria* rūšims. Juostose 1-4 parodyti keturių *Listeria monocytogenes* genties pavyzdžiai. *Listeria monocytogenes* visi keturi kamienai rodo tą pačią fragmentų porą prie 355 ir 625 bp. Likusių *Listeria* rūšių klasifikacija yra šitokia: juostos 5 ir 6, *Listeria welshimeri*, kurios fragmentai yra prie 355 ir 640 bp; juostos 7 ir 8, *Listeria innocua*, kurių fragmentai yra prie 355 ir 655 bp; juostos 9 ir 10, *Listeria ivanovii*, kurių fragmentai yra prie 380 ir 605 bp. Nėra fragmentų, kurių dydžiai būtų bendri visoms *Listeria* rūšims.

2 PAVYZDYS

Pav. 3 pavaizduotas *Salmonella* genties keturių serotipų RS fragmentų amplifikacijos pavyzdys. Juostose 1-4 parodyti keturių *Salmonella typhimurium* kamienų pavyzdžiai. Visi keturi *Salmonella typhimurium* kamienai rodo fragmentų prisitvirtinimą prie 480, 650 ir 675 bp. Likusių *Salmonella* serotipų charakteristika yra šitokia: juostos 5 ir 6, abu *Salmonella enteritidis* rodo bendrus fragmentus prie 480, 600 ir 650 bp; juostos 7 ir 8, *Salmonella newport* kamienai rodo bendrus fragmentus prie 480 570 ir 610 bp ir *Salmonella newport* 707 taip pat rodo papildomą fragmentą prie 510 bp; juostos 9 ir 10, abu *Salmonella infantis* kamienai rodo bendrą fragmentą prie 495, 560, 630 ir 655 bp. Tačiau visi tirti serotipai turi specifinius pagal dydį produktus.

3 PAVYZDYS

Pav. 4 pavaizduoti *Staphylococcus* genties penkių rūšių RS fragmentų amplifikacijos pavyzdžiai. Juostose 1-8 pavaizduoti *Staphylococcus aureus* aštuonių kamienų pavyzdžiai. Juostose 1-3 pavaizduoti visų kamienų bendri pavyzdžiai, kurių fragmentai turi 425, 465, 565 ir 705 bp. Likusiose penkiuose kamienuose, pavaizduotuose juostose 4-8, yra serija skirtingų pavyzdžių, turinčių tiksliai keletą bendrų elementų, t.y., fragmentai 485, 570 ir 620 bp gali būti randami tik trijuose iš penkių kamienų. Tačiau kitokio dydžio fragmentų, bendrų daugiau dviem iš penkių kamienų, nepastebėta. Likusios *Staphylococcus* rūšys pavaizduotos juostose 9-16. Šių rūšių charakteristika yra ši: juostos 9 ir 10, abu *Staphylococcus scutri* kamienai rodo bendrus fragmentus prie 445, 445 ir 535 bp ir *Staphylococcus scutri* 868 taip pat rodo papildomą bangą ties 530 bp; juostos 11 ir 12, *Staphylococcus warneri*, kurių fragmentai yra ties 455, 505, 525 ir 545 bp; juostos 13 ir 14, *Staphylococcus saprophyticus*, kurių fragmentai yra ties 470, 550 ir 640 bp; juostos 15 ir 16, abu *Staphylococcus epidermidis* kamienai rodo bendrus fragmentus prie 390 ir 590 bp, kartu su *Staphylococcus epidermidis* 796, rodančiu papildomą fragmentą ties 520 bp, ir *Staphylococcus epidermidis* 788, rodančiu du papildomus fragmentus ties 440 ir 490 bp. Svyravimai rūšies viduje RS fragmentų amplifikacijos pavyzdžiuose yra žymiai didesni *Staphylococcus aureus* negu kitose tiriamose *Staphylococcus* rūšyse.

Nurodytas atvejas yra kaip tik tas, kai pavyzdžio, gauto RS fragmentų amplifikacijos metu, informacija padeda identifikuoti mikroorganizmus rūšies viduje. Visos kitos *Staphylococcus* rūšys, skirtingai negu *Staphylococcus aureus*, buvo charakterizuotos pagal vieną būdingą fragmentą, kuris gaunamas žymiai didesniu kiekiu, negu kiti amplifikacijos produktai. Šie charakteringi fragmentai yra tokie: *S.scuturi* 345 bp, *S.warneri* 505 bp, *S.saprophyticus* 470 bp ir *S.epidermidis* 390 bp. *Staphylococcus* genties pavyzdžiuose pasikeitimai geno viduje yra žymiai didesni negu gentyse *Salmonella* ir *Listeria*.

4 PAVYZDYS

Pav. 5 pavaizduotas *Escherichia* genties penkių rūšių RS fragmentų amplifikacijos pavyzdys. Juostose 1-4 parodyti keturių *Escherichia coli* kamienų pavyzdžiai. Visi keturi *Escherichia coli* kamienai rodo tą pačią 480 ir 530 bp fragmentų porą. Keturių papildomų *Escherichia* rūšių pavieniai pavyzdžiai parodyti juostose 5-8. Nei vienoje šių rūšių nėra bendrų su *Escherichia coli* fragmentų, nors *Escherichia fergusonii* juostoje 6 matosi panašaus dydžio fragmentas, nesutampantis su 495 ir 550 bp fragmentais. Nerasta tokių fragmentų, kurių dydžiai būtų bendri visoms *Escherichia* rūšims.

5 PAVYZDYS

Pav. 6 pavaizduotas keturių genčių aštuonių papildomų rūšių, susijusių su patogeniškumu, RS fragmentų amplifikacijos pavyzdys. Juostose 1-4 parodyti dviejų *Citrobacter* rūšių pavyzdžiai.

Dviejų *C. freundii* kamienų, pavaizduotų juostose 1 ir 2 pavyzdžiai, identiški su 315, 490 ir 615 bp. Juostose 3 ir 4 pavaizduotų *C. diversus* pavyzdžiai taip pat identiški 460 ir 615 bp fragmentams. Juostose 5–10 parodyti trijų *Enterobacter* rūšių pavyzdžiai. Dviejų *E. aerogenes* kamienų pavyzdžiai, parodyti juostose 5 ir 6, yra panašūs su bendru 465 bp fragmentu. Kiti du 280 ir 590 bp fragmentai yra *E. aerogenes* 62 kamieno. Panašus fragmentų pavyzdys yra ir *E. aerogenes* 167, tik tai kiekvienas iš jų 10 bazių ilgesnis. Juostose 7 ir 8 pavaizduotų dviejų *E. agglomerans* kamienų pavyzdžiai yra identiški 450, 475 ir 580 bp fragmentai. Juostose 11–14 parodyti dviejų *Proteus* rūšių pavyzdžiai. Juostose 11 ir 12 pavaizduotų dviejų *P. mirabilis* kamienų pavyzdžiai yra identiški 505, 665 ir 850 bp fragmentams. Juostose 15 ir 16 parodyti dviejų *Yersinia enterocolitica* pavyzdžiai. Abu kamieniai turi 745 ir 815 bp fragmentų porą.

6 PAVYZDYS

Pav. 7 pavaizduotas *Listeria* genties trijų rūšių RS ir AG fragmentų amplifikacijos pavyzdžiai. Juostose 1–4 parodyti keturių *Listeria monocytogenes* kamienų pavyzdžiai. Visi keturi *L. monocytogenes* kamieniai turi tą pačią 355 ir 625 bp fragmentų porą, kuri yra tokia pati, kaip ir RS fragmentų, nustatytų 2 pav. tokiems pat *Listeria monocytogenes* kamienams. Likę pavyzdyje komponentai – tai atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas. Šių komponentų pagalba galima išskirti tris iš keturių *L. monocytogenes* kamienų. *L. monocytogenes* 891 ir 899 kamieniai išskiria tuos pačius amplifikacijos produktus. Likusių *Listeria* rūšių klasifikacija yra ši: juostose 5 ir 6 *L. welshimeri* rodo tą

pačią bendrą 355 ir 640 bp fragmentų porą, kuri yra tokia pati, kaip ir RS fragmentų, parodytų 2 pav. tokiems pat *L. welshimeri* kamienams. Likę pavyzdyje komponentai – tai atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas ir gali būti panaudojami, norint parodyti dviejų *L. welshimeri* kamienų skirtumą. Juostose 7 ir 8 *L. innocua* rodo bendrą 355 ir 655 bp fragmentų porą, kuri yra tokia pati, kaip ir RS fragmentų, parodytų 2 pav. tokiems pat *L. innocua* kamienams. Likę pavyzdyje komponentai – tai atsitiktinis genomo amplifikacijų rezultatas ir gali būti panaudojamas dviejų *L. innocua* kamienų skirtumo nustatymui.

7 PAVYZDYS

Pav. 8 pavaizduotas *Salmonella* genties trijų serotipų RS ir AG fragmentų amplifikacijos pavyzdžiai. Juostose 1–4 parodyti keturių *Salmonella typhimurim* kamienų pavyzdžiai. Visi keturi *S. typhimurim* kamienai rodo panašų 480, 650 ir 675 bp fragmentų rinkinį, kuris yra toks pat, kaip ir RS fragmentų, parodytų 3 pav. tokiems pat *S. typhimurim* kamienams. Likę pavyzdyje komponentai – tai atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas. Šių komponentų pagalba galima išskirti *S. typhimurim* 590 iš kitų trijų kamienų. Likusių *Salmonella* serotipų klasifikacija yra ši: juostose 5 ir 6 abu *S. infantis* kamienai rodo bendrus 490, 560 630 ir 655 bp fragmentus, kurie yra tokie pat, kaip ir RS fragmentai, parodyti 3 pav. tokių pat kamienų amplifikacijai. Papildomi fragmentai, kurie gaunami, vykstant atsitiktinėms genomo amplifikacijoms, rodo panašius abiems *S. infantis* kamienams pavyzdžius. Juostose 7 ir 8 abu *S. enteritidis* kamienai rodo bendrus 480, 600 ir 650 bp fragmentus, kurie yra tokie

pat, kaip ir RS fragmentai, parodyti 3 pav. tų pačių kamienų amplifikacijoms. Papildomi fragmentai, kurie gauti, vykstant atsitiktinėms genomo amplifikacijoms, gali būti panaudoti šių kamienų skirtumo nustatymui. Visi RS/AG pavyzdžiai, gauti *Salmonella* genotipais, buvo labai panašūs. Tačiau individualūs *Salmonella* serotipai gali būti išskirti, remiantis nevienodu produkto dydžiu, vykstant RS/AG amplifikacijoms.

8 PAVYZDYS

Pav. 9 pavaizduotas *Staphylococcus* genties trijų rūšių RS ir AG fragmentų amplifikacijos pavyzdys. Juostose 1-4 parodyti keturių *Staphylococcus aureus* kamienų pavyzdžiai. Juostoje 1 parodyti kamieno 807 fragmentai 425, 465, 565 ir 705 bp, kurie yra tokie pat, kaip ir RS fragmentai, parodyti 4 pav. tam pačiam kamienui. Likę pavyzdyje komponentai yra atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas. Juostose 2 ir 3 abu *Staphylococcus aureus* 1098 ir 1097 kamienai rodo bendrus 565 ir 605 bp fragmentus, be to, kamienas 1098 rodo papildomą 505 bp fragmentą ir kamienas 1097 rodo papildomą 525 bp fragmentą. Visi šie fragmentai yra tie patys, kaip ir RS fragmentai, pavaizduoti 4 pav. tam pačiam kamienui. Likę pavyzdyje komponentai yra atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas ir gali būti panaudojami, norint lengviau atskirti du *Staphylococcus aureus* kamienus. Juostoje 4 pavaizduoti kamieno 795 fragmentai 470, 515, 656 ir 610 bp yra tokie pat, kaip ir RS fragmentai, kuriuos stebime 4 pav. tame pačiame kamienne. Likę pavyzdyje komponentai yra atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas. Likusios *Staphylococcus* rūšys yra pavaizduotos juostose 5-8. Abu *S. warneri* 793 ir 797

kamienai, pavaizduoti juostose 5 ir 6, rodo esant fragmentus, kurie savo dydžiu atitinka RS fragmentus, parodytus 4 pav. *S. warneri* kamienui. Papildomi fragmentai, kurie yra atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas, gali būti panaudojami šių kamienų skirtumo nustatymui. Abu *S. epidermidis* 788 ir 796 kamienai, pavaizduoti juostose 7 ir 8, rodo esant fragmentus, pagal dydį atitinkančius RS fragmentus, parodytus 4 pav. Papildomi fragmentai, kurie yra atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas, gali būti panaudojami šių kamienų skirtumo nustatymui.

9 PAVYZDYS

Pav. 10 pavaizduotas *Escherichia* genties keturių kamienų RS ir AG fragmentų amplifikacijos pavyzdys. Juostose 1-4 parodyti keturių *Escherichia coli* kamienų pavyzdžiai. Visi keturi *Escherichia coli* kamienai rodo esant 480 ir 530 bp fragmentų porą, kurie yra tokie pat, kaip ir RS fragmentai 5 pav., gauti tų pačių kamienų amplifikacijos metu. Likę pavyzdyje komponentai yra atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas. Šiais komponentais galima nustatyti skirtumą tarp keturių *Escherichia coli* kamienų. Du *Citrobacter freundii* kamienai, parodyti juostose 5 ir 6, rodo esant pavyzdžius, kuriuose yra 315, 490 ir 615 bp fragmentai. Šie fragmentai pagal dydį atitinka fragmentus, gautus *C. freundii* kamieno RS amplifikacijos metu, parodytus 6 pav. Papildomi fragmentai, kurie yra atsitiktinių genomo amplifikacijų rezultatas, gali būti panaudojami šių kamienų skirtumo nustatymui.

Reikėtų suprasti, kad išradime pateikti metodai gali būti modifikuoti, pateikus dirbančių toje srityje specialistų pasiūlymus, tačiau neiškreipiant šio išradimo esmės.

I š r a d i m o a p i b r e ž t i s

1. Mikroorganizmų rūšių identifikacijos būdas b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį sudaro:

a) mikroorganizmo genomo DNR išskyrimas, kai genomo DNR sudarančios kintamos sekos išsidėsčiusios tarp labiausiai konservatyvių seku;

b) kintamų seku amplifikacija, susidarant fragmen-
tams, besiskiriantiems dydžiu ir skaičiumi; ir

c) fragmentų atskyrimas pagal dydį ir fragmentų pasiskirstymo analizavimas, tuo būdu nustatant mikroorganizmų rūšis.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtos labai konservatyvios sekos yra labai konservatyvios rDNR sekos, ir minėti fragmentai yra RS fragmentai.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kintamos sekos yra tarpiniai rajonai.

4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad išskyrimo stadiją (a) sudaro lastelės lizavimas ir deproteinizacija.

5. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadiją (b) sudaro, mažiausiai, vienos oligonukleotido pradmenų poros prijungimas prie labai konservatyvių rDNR seku ir nukleino rūgšties polimerazės ir nukleotido trifosfato įvedimas į minėtus pradmenis, tinkamus minėtų seku amplifikacijai.

6. Būdas pagal 5 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad amplifikacija atliekama, mažiausiai, du kartus.

7. Būdas pagal 5 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prisijungimas vyksta, temperatūrai pasiekus 72°C, ir tęsiasi 1-20 minučių.

8. Būdas pagal 5 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prisijungimas vyksta, temperatūrai pasiekus 55°C, ir tęsiasi apie 1-20 minučių.

9. Būdas pagal 8 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prisijungimas tęsiasi 2-10 minučių.

10. Būdas pagal 5 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, oligonukleotido pradmenys yra 15-17 bazių ilgio.

11. Būdas pagal 5 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nukleino rūgšties polimerazė yra DNR polimerazė ir nukleotido trifosfatas yra dezoksiribonukleotido trifosfatas.

12. Būdas pagal 11 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad DNR polimerazė yra termostabili.

13. Būdas pagal 2 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadiją (o) sudaro RS fragmentų atskyrimas elektroforezės būdu, po to, minėtų RS fragmentų atvaizdavimas.

14. Būdas pagal 13 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadiją (c) sudaro elektroforezės būdu atskirtų ir atvaizduotų RS fragmentų tolimesnis palyginimas su baziniais mikroorganizmų duomenimis.

15. Būdas pagal 5 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad baziniuose duomenyse yra fragmentų pasiskirstymas, charakteringas *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella newport*, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, ir *Yersinia enterocolitica*.

16. Būdas pagal 13 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atvaizdavimo stadija (o) atliekama, nudažant RS fragmentus etidijaus bromidu arba nustatant minėtų RS fragmentų padėtį spektrofotometriniu būdu.

17. Būdas pagal 13 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atvaizdavimo stadija (o) atliekama, panaudojant amplifikacijoje fluorescuojanti dezoksinukleotida pagal (b).

18. Būdas pagal 13 punkta, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad panaudojamas, nustatant bakterijų rūšis.

19. Mikroorganizmų rūšių, serotipo ir kamieno identifikacijos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jį sudaro:

a) mikroorganizmo genomo DNR išskyrimas, kai genomo DNR sudarančios kintamos sekos išsidėsčiusios tarp labiausiai konservatyvių sekų ir, papildomai, per viso genomo atsitiktinius rajonus;

b) kintamų sekų amplifikacija, susidarant fragmentams, besiskiriantiems dydžiu ir skaičiumi; ir

c) atsitiktinių rajonų amplifikacija, gaunant AG fragmentus, turinčius ypatingą pasiskirstymą pagal dydį ir skaičių, kartu vykdant (b); ir

d) fragmentų ir AG fragmentų atskyrimas pagal dydį ir fragmentų ir minėtų AG fragmentų analizavimas, nustatant mikroorganizmų rūšis, serotipą ir kamieną.

20. Būdas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtos labai konservatyvios sekos yra labai konservatyvios rDNR sekos, ir minėti fragmentai yra RS fragmentai.

21. Būdas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kintamos sekos yra tarpiniai rajonai.

22. Būdas pagal 19 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad išskyrimo stadiją (a) sudaro lęstelės lizavimas ir deproteinizacija.

23. Būdas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadiją (b) ir stadiją (c) sudaro, mažiausiai, vienos oligonukleotido pradmenų poros prijungimas prie labai konservatyvių rDNR sekų ir prie daugelio minėtų atsitiktinių rajonų, ir nukleino rūgšties polimerazės ir nukleotido trifosfato įvedimas į minėtus pradmenis, tinkamus minėtų sekų ir minėtų atsitiktinių rajonų amplifikacijai.

24. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad amplifikacija atliekama, mažiausiai, du kartus.

25. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prisijungimas vyksta, temperatūrai pasiekus 43-46⁰C, ir tęsiasi 1-10 minučių.

26. Būdas pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prisijungimas vyksta maždaug 5-10 minučių.

27. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, oligonukleotido pradmenys yra 10-12 bazių ilgio.

28. Būdas pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nukleino rūgšties polimerazė yra DNR polimerazė ir nukleotido trifosfatas yra dezoksiribonukleotido trifosfatas.

29. Būdas pagal 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad DNR polimerazė yra termostabili.

30. Būdas pagal 20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadiją (d) sudaro minėtų RS fragmentų ir minėtų AG fragmentų išskyrimas elektroforezės būdu, po to, minėtų RS fragmentų ir minėtų AG fragmentų atvaizdavimas.

31. Būdas pagal 30 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad stadiją (d) sudaro elektroforezės būdu atskirtų ir atvaizduotų RS ir AG fragmentų tolimesnis palyginimas su baziniais mikroorganizmų duomenimis.

32. Būdas pagal 31 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad baziniuose duomenyse yra fragmentų pasiskirstymas, charakteringas rūšims, serotipams ir kamienams šių mikroorganizmų: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*,

Listeria welshimeri, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella newport*, *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, ir *Yersinia enterocolitica*.

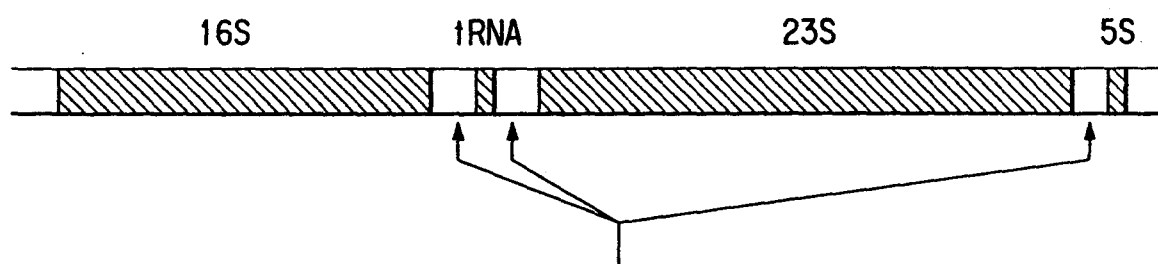
33. Būdas pagal 30 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atvaizdavimo stadija (d) atliekama, nudažant minėtus RS fragmentus ir minėtus AG fragmentus etidijaus bromidu arba nustatant minėtų RS fragmentų padėti spektrofotometriniu būdu.

34. Būdas pagal 30 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atvaizdavimo stadija (d) atliekama, panaudojant amplifikaciją pagal (b) ir (c) fluorescuojanti dezoksinukleotidą.

35. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad panaudojamas, nustatant bakterijų rūšis, serotipą ir kamieną.

218

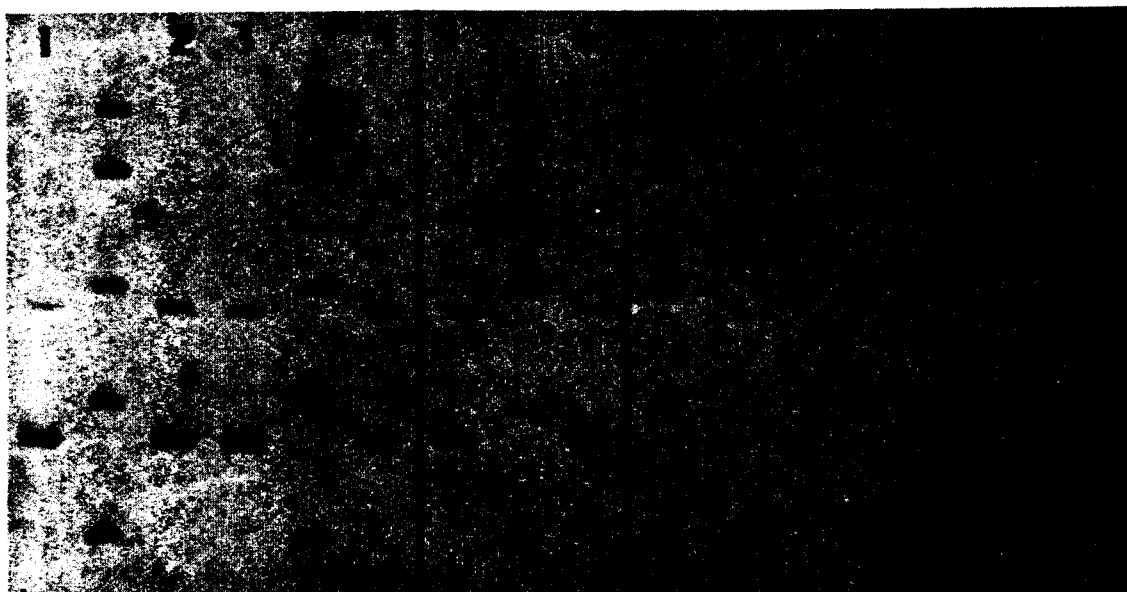
FIG. 1



HYPERVARIABLE SPACER REGIONS

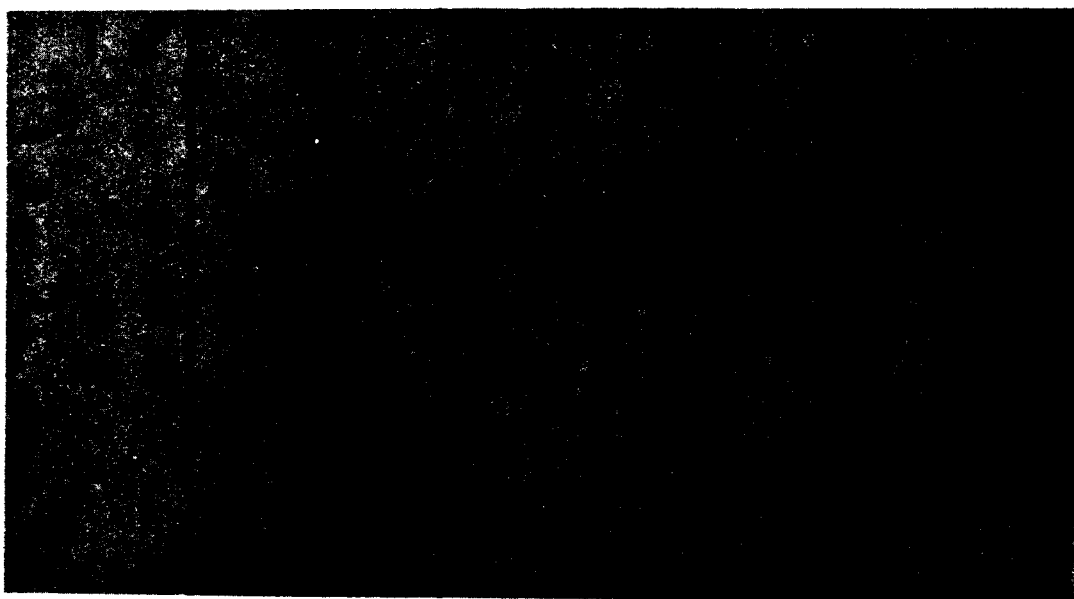
HIPERVARIABILŪS TARPINIAI RAJONAI

FIG. 2



218

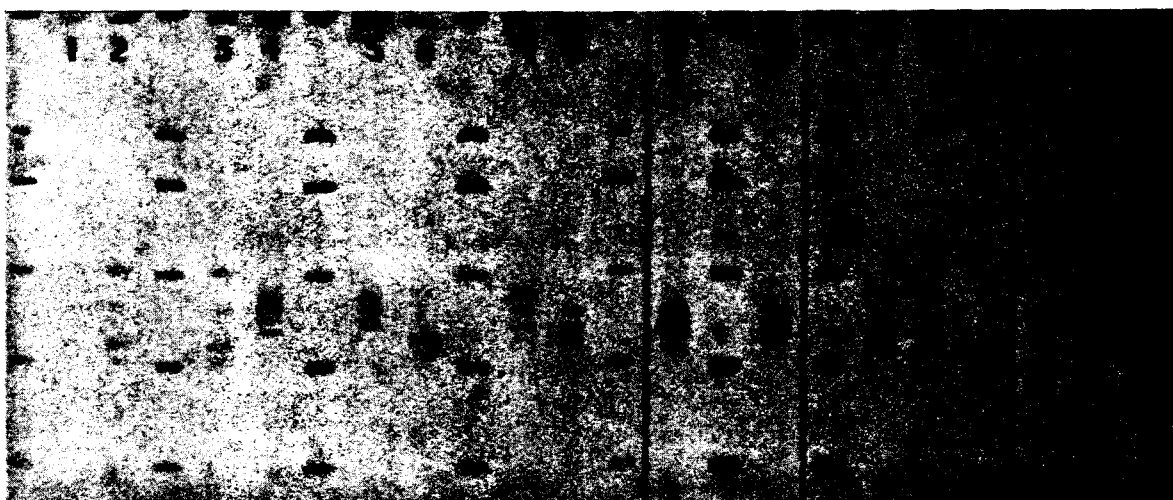
FIG. 3



15

11/15/81

FIG. 4



220

FIG. 5

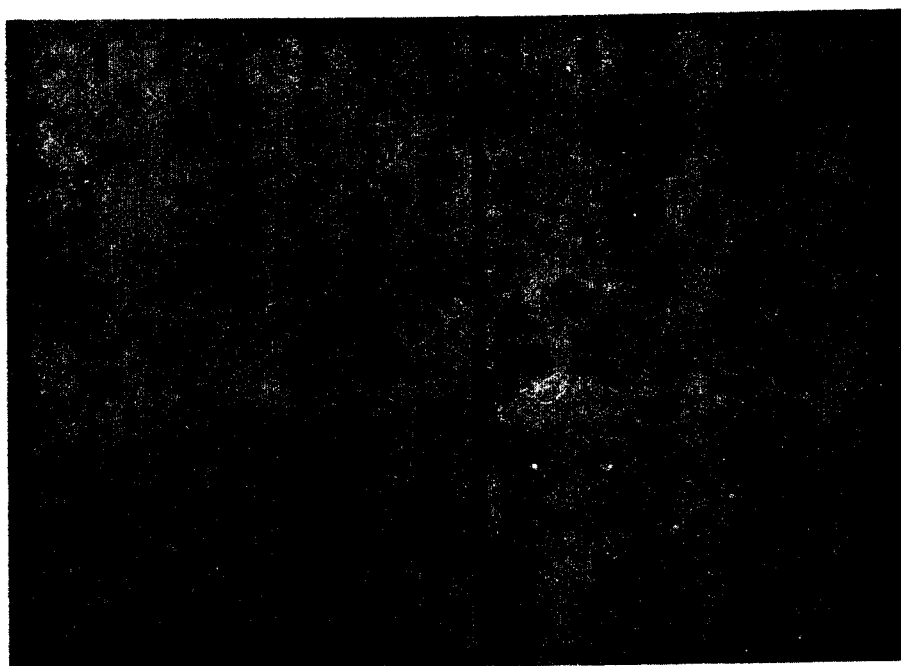


FIG. 6

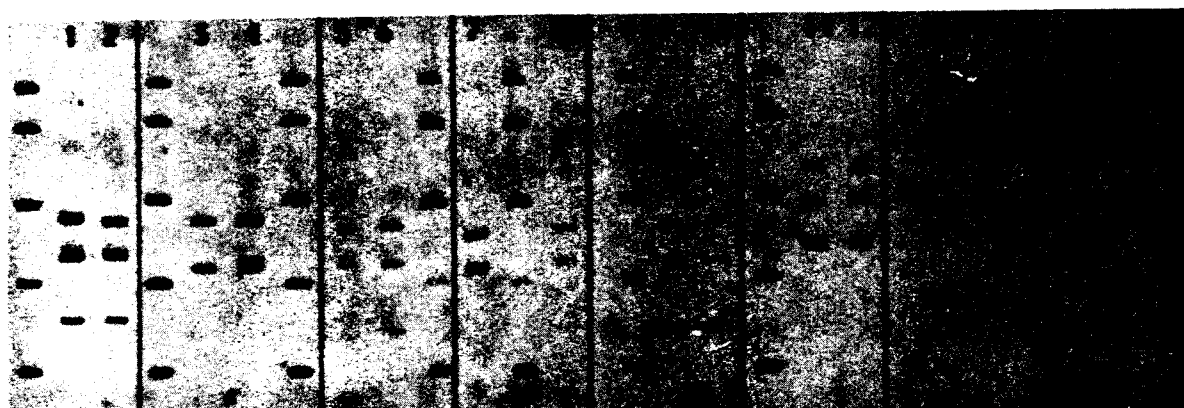


FIG. 7

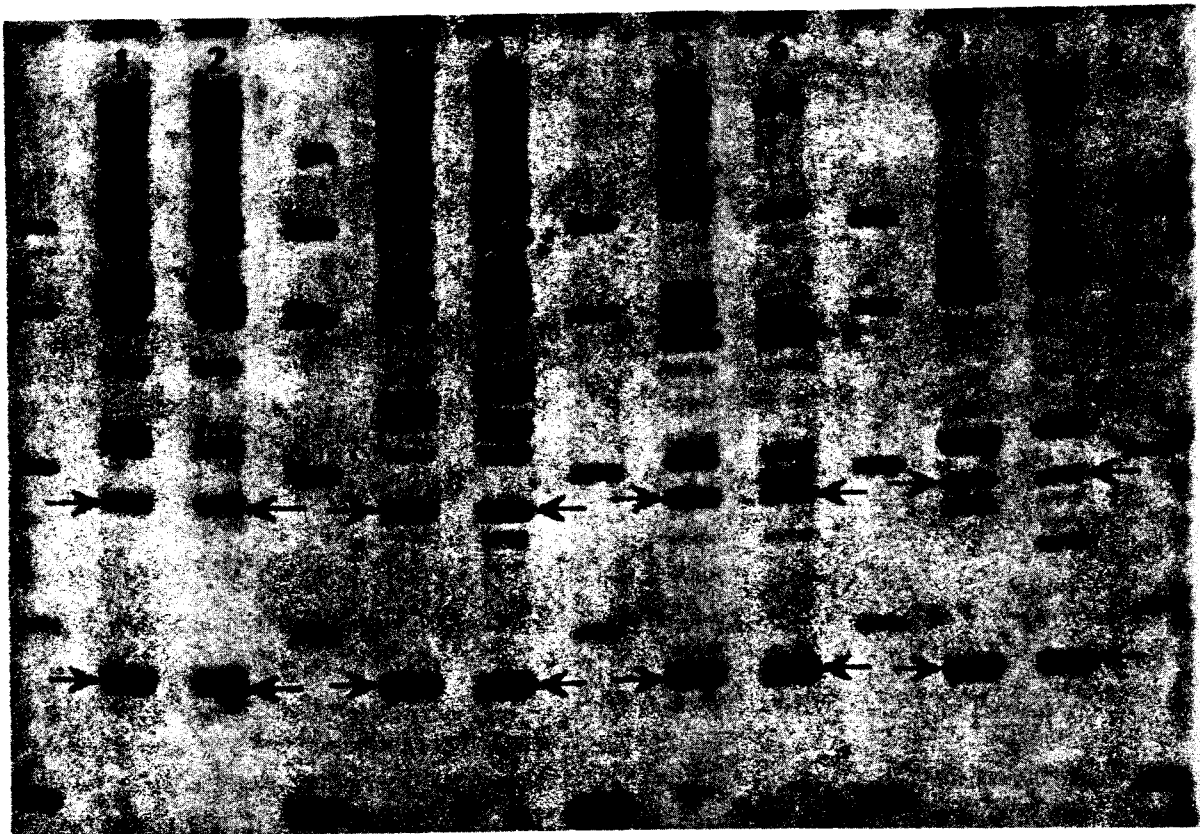


FIG. 8

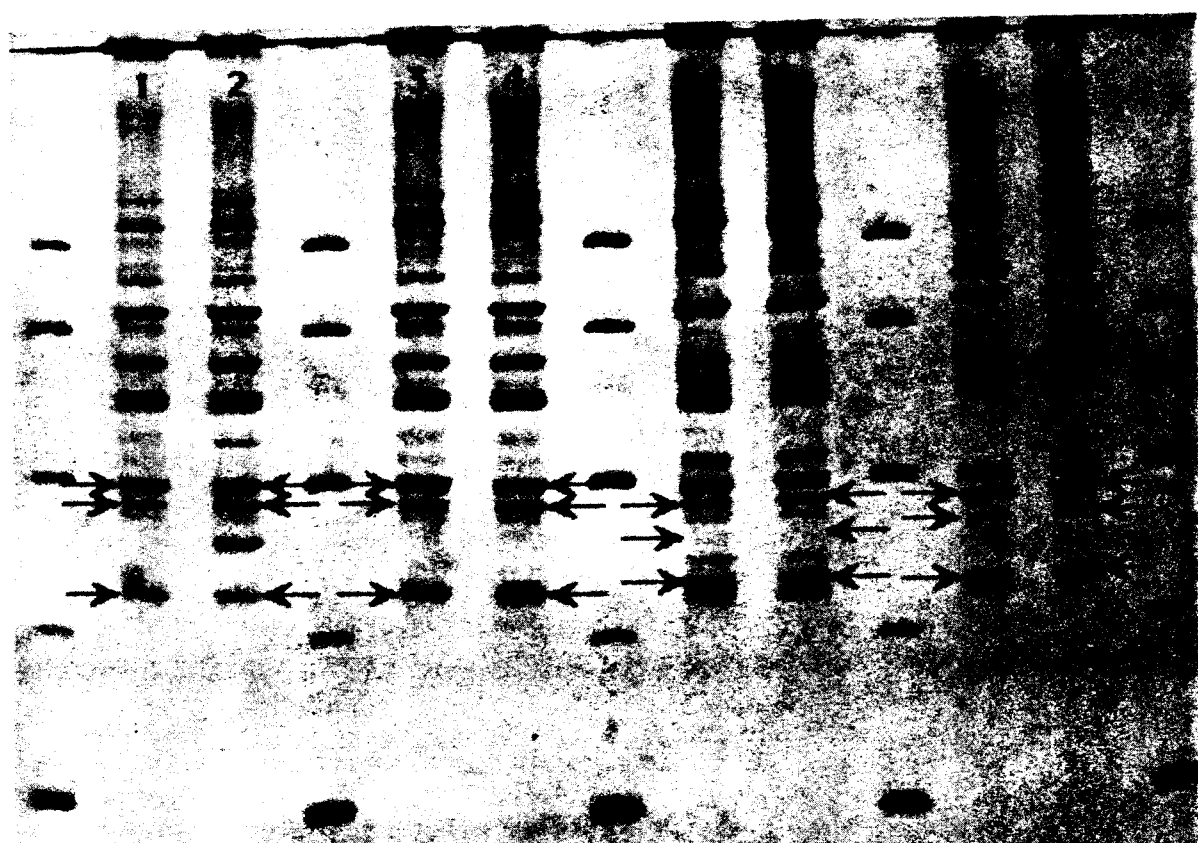


FIG. 9

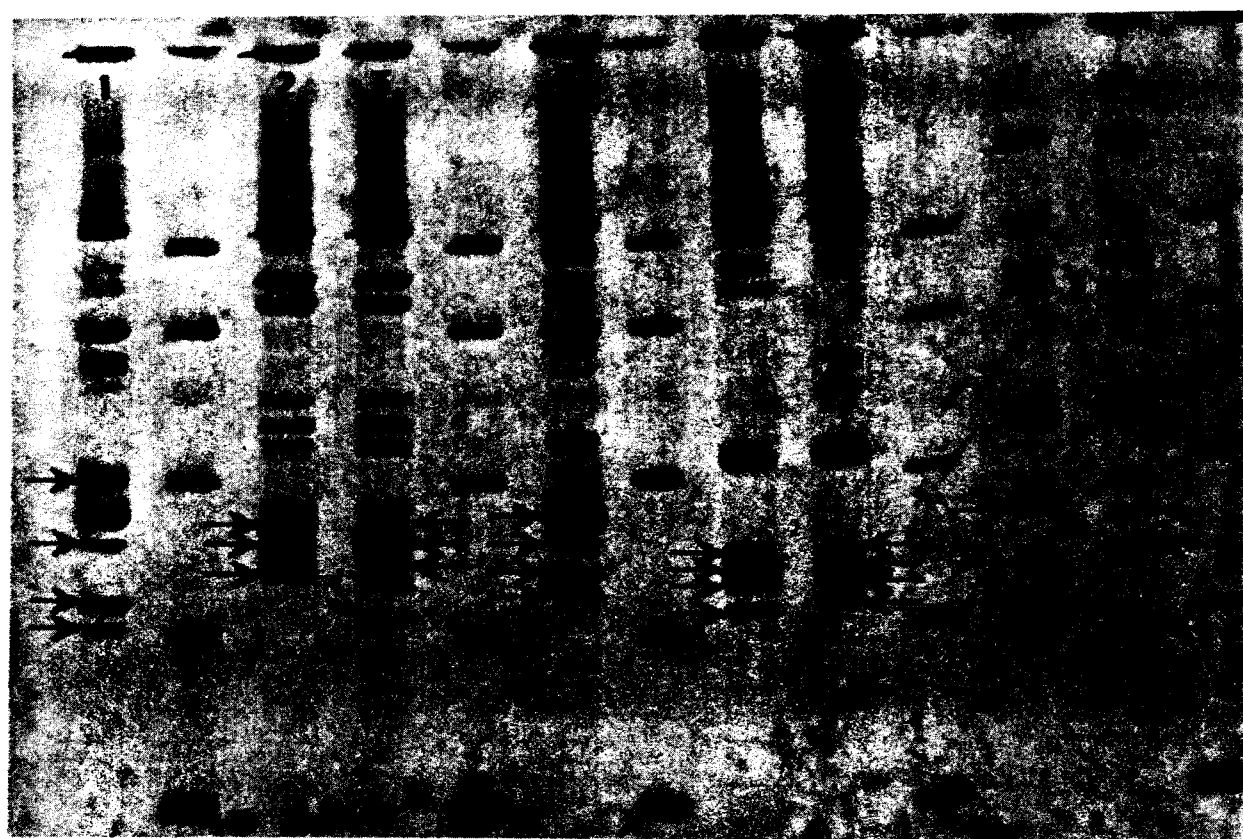


FIG. 10

