

(11) Patento numeris: **3828**

(51) Int. Cl.⁵: **C12Q 1/68**
C07H 21/00

(21) Paraiškos numeris: **IP1456**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 11 10**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 05 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 03 25**

(72) Išradėjas:

Valerija Chmeliauskaitė, LT
Mykolas Mauricas, LT
Vladas-Algirdas Bumelis, LT

(73) Patento savininkas:

Biotechnologijos institutas "FERMENTAS",
V. Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Salmonella bakterijų nustatymo būdas ir zondai

(57) Referatas:

Išradimas apibrėžia naujo Salmonella bakterijų nustatymo būdo sukūrimą, pasižymintį tuo, kad testuojamos bakterijos panaudojamos PCR, taikant zondus 5'- GTAAATCCGGTTCACTTTAACAC-3' ir 5'-GAGTAAATCACTTCACCTACGTG-3', komplementarius S.typhimurium 23S rRNR genui, amplifikacijos produktai analizuojami elektroforetiškai, o apie nustatymo specifiškumą sprendžiama iš amplifikacijos produktų restrikcinės analizės, panaudojant restrikcinę endonukleazę Eco 130 I. Empiriškai nustatyta, kad oligonukleotidiniai zondai yra universalūs ir specifiški tik Salmonella genties bakterijoms. Detekcijos jautrumo riba - 50 bakterijų 10 µl mėginio.

Išradimas apibrėžia naujo Salmonella bakterijų nustatymo būdą bei oligonukleotidinius zondus ir gali būti pritaikytas medicinoje, maisto pramonėje, veterinarijoje.

Seniausias mikrobiologinėse laboratorijose naudojamas Salmonella bakterijų testavimo metodas, įskaitant bakterijų auginimą selektyviose terpėse, o vėliau - gautų kolonijų morfologinių ir biocheminių charakteristikų apibūdinimą, vidutiniškai trunka 4 dienas. Šis metodas naudojamas ir Lietuvos mikrobiologinėse laboratorijose (Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями, Москва, 1984 г.).

Nukleino rūgščių hibridizacijos technologijos panaudojimas - kokybinis šuolis patogeninių mikroorganizmų diagnostikos srityje. Ši metodologija remiasi savybe, jog unikali testuojamo mikroorganizmo polinukleotidinė seka hibridinasi su specifiškai pažymėtu nukleino rūgšties zonu. Šių testų neigiama savybė - nepakankamas jautrumas (WO 89/05359, C12Q 1/68, 1989; EP 0383509, C12Q 1/68, 1990; WO 90/11370, C12Q 1/68, 1990).

Artimiausias siūlomam techniniam sprendimui yra patentas (WO 90/11370, C12Q 1/68, 1990), kuriame Salmonella bakterijų nustatymui panaudoti ³²P-žymėti DNR zondai, komplementarūs Salmonella typhimurium išorinės membranos Omp A genui. Testuojamos bakterijos auginamos iki optinio tankio OD=0,7, 100 µl bakterijų suspensijos filtruojama per nitroceliuliozinį filtrą, DNR imobilizuojama švitinant filtrus 4 minutes UV lempa. Filtrai prehibridinami 45 minutes, o, pridėjus ³²P-žymėto zondo, hibridinami dar 1,5 valandos. Filtrai atplaunami ir 3 dienas atliekama radioautografija.

Metodo trūkumas - nepakankamas jautrumas, ilga trukmė.

Pastaruoju metu molekulinėje biologijoje pradėtas taikyti polimerazės ciklinės reakcijos metodas (Saiki R.K. et al., Science 239, 487-491 (1988)). Tai būdas gauti mikrograminius kiekius norimos DNR nuo labai mažo kiekio DNR matricos, tačiau dar nebuvo tiesiogiai panaudotas Salmonella bakterijų detekcijai.

Išradimo tikslas - sukurti metodą, leidžiantį greitai ir specifiškai nustatyti Salmonella bakterijas. Šis tikslas pasiekiamas, pritaikant Salmonella bakterijų detekcijai polimerazės ciklinę reakciją (PCR), t.y. panaudojus oligonukleotidinius DNR zondus, komplementarius Salmonella typhimurium 23S rRNR genui bei termostabilią DNR polimerazę, kaitaliojant įvairių temperatūrų ciklus nuo denatūracijos iki polimerizacijos temperatūrų, nuo panaudotos DNR matricos enzimatiškai reprodukuojamas - amplifikuojamas nustatyto dydžio Salmonella-specifinis DNR fragmentas, identifikuojamas restrikcijos būdu, o, reakcijoje panaudojus įvairių ne-Salmonella bakterijų DNR, amplifikacijos nėra.

Išradime pateiktų oligonukleotidinių zondu charakteristika:

1. Seka:

5'-GTAAATCCGGTTCACCTTAAACAC-3'

5'-GAGTAAATCACTTCACCTACGTG-3'

Zondai susintetinti Biotechnologijos Instituto "Fermentas" Nukleino rūgščių chemijos sektoriuje cianoetilfosforamiditiniu metodu.

2. Empiriškai buvo nustatyta, jog šie zondai universalūs Salmonella genties bakterijoms, t.y. zondu

panaudojimas polimerazės ciklinėje reakcijoje leidžia mėginyje detektuoti 13 Salmonella rūšių (1 lentelė): S.brandenburg, S.choleraesuis, S.enteritidis, S.haifa, S.infantis, S.isanqi, S.java, S.newport, S.ngor, S.stanley, S.thompson, S.typhimurium, S.tshiongwe.

3. Empiriškai nustatyta, kad zondai specifiškai tik Salmonella genties bakterijoms, t.y., panaudojus zondus mėginiuose, turinčiuose Acinetobacter, Citrobacter, Citrobacter freundii, Escherichia coli, Enterobacter, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Hafnia, Yersinia enterocolitica, Klebsiella, Proteus, Proteus vulgaris, Providencia rettgeri, Pseudomonas, Pseudomonas aeruginosa, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Serratia bakterijas, polimerazės ciklinė reakcija nevyksta (2 lentelė).

Fig.1. Elektroforetinė PCR produktų, gautų su įvairiais S.typhimurium bakterijų kiekiais, analizė. PCR panaudoti bakterijų kiekiai: 1- 5×10^6 , 2- 5×10^5 , 3- 5×10^4 , 4- 5×10^3 , 5- 5×10^2 , 6- 5×10 , 7-5 bakterijos mėginyje, 8-pBR-Alu I fragmentų dydžiai bazių poromis.

Fig.2. Elektroforetinė PCR produktų analizė po inkubavimo su restriktaze Eco130 I. 9-S.typhimurium PCR produktas, 10-S.typhimurium PCR produktas-Eco130 I, 11-S.enteritidis PCR produktas-Eco130 I, 12-S.typhimurium PCR produktas-Eco64 I, 13-pBR-Alu I fragmentų dydžiai bazių poromis.

Fig.3. Elektroforetinė PCR produktų, gautų su įvairiomis bakterijomis, analizė. 14,28-pBR-Alu I fragmentų dydžiai bazių poromis. PCR panaudotos bakterijos: 15, 16, 17-S.enteritidis; 18-S.tshiongwe; 19,20,21-S.infantis; 22,23-S.brandenburg; 24,25,27-S.typhimurium; 26-Y.enterocolitica.

Išradimas iliustruojamas pavyzdžiais.

1 Pavyzdys. Polimerazės ciklinės reakcijos, naudojamos Salmonella genties bakterijų nustatymui jautrumo įvertinimas.

Bakterijų kamienai.

Visi bakterijų kamienai (1,2 lentelės), panaudoti šiame darbe, gauti Vilniaus Higienos centro mikrobiologinėje laboratorijoje.

Polimerazės ciklinė reakcija (PCR).

Reakcija atliekama 100 μ l mišinio, savo sudėtyje turinčio 67 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM $MgCl_2$, 16,6 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM merkaptoetanolio, 1,25 mM dATP, 1,25 mM dTTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dCTP, 0,001 mM praimerius, 20 μ g jaučio serumo albumino, 2 vienetų Taq polimerazės. Testuojamos bakterijos auginamos per naktį 4 ml LB terpės 37°C temperatūroje. 100 μ l ląstelių suspensijos centrifuguojama mikrocentrifugoje 11000 aps./min. 5 minutes, nuosėdos suspenduojamos 100 μ l sterilaus H_2O ir virinama 10 min. 100°C. 10 μ l tokios suspensijos naudojama polimerazės ciklinėje reakcijoje. Empiriškai parinktos polimerazės ciklinės reakcijos sąlygos, t.y. optimalu, kai PCR atliekama 25 ciklus, kurių kiekvienas trunka: 95°C - 1 min., 58°C - 1 min., 70°C - 1 min. Pasibaigus PCR reakcijos mišinį 2 kartus ekstrahuojame chloroformu, o 10 μ l vandeninės fazės analizuojame elektroforetiškai 1,5% agarozės gelyje. PCR rezultate matomas 250 bazių porų dydžio fragmentas (Fig.1).

PCR jautrumo įvertinimui S.typhimurium kultūra buvo auginama per naktį 4 ml LB terpės, ištitruojama fiziologiniame tirpale ir mėginiai po 100 µl išsėjami ant agarizuotos LB terpės gyvybingų ląstelių titrui paskaičiuoti. Su įvairiais bakterijų kiekiais atliekama PCR. Iš Fig.1 pateiktų rezultatų matome, jog testo jautrumo riba - 50 Salmonella bakterijų 10 µl mėginio.

2 Pavyzdys. Oligonukleotidinių zondu, panaudojamų PCR, tyrimas.

Amplifikuoto produkto identifikacija.

Amplifikacijos produktai identifikuojami restrikcijos būdu empiriškai iš daugelio panaudotų restriktazių pasirinkus Eco130 I. Salmonella-PCR produktas - 10 µl buvo inkubuojamas 1 val. 37°C 20 µl reakcijos mišinio, turinčio 50 mM Tris-HCl(pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl ir restrikcinę endonukleazę Eco130 I. Restrikcijos produktai analizuojami elektroforetiškai 2% agarozės gelyje. Fig.2 iliustruoja S.typhimurium- ir S.enteritidis-PCR produktų, restriktuotų Eco130 I, elektroforetinį vaizdą. Absoliučiai identiški vaizdai, pateiktiems Fig.2, gaunami po PCR produktų, PCR reakcijai panaudojus S.brandenburg, S.choleraesuis, S.haifa, S.infantis, S.isangi, S.java, S.newport, S.ngor, S.stanley, S.thompson, S.tshionqwe bakterijas, inkubacijos su Eco130 I.

Salmonella bakterijų nustatymui buvo naudojami zondai

5'-GTAAATCCGGTTCACCTTTAACAC-3' ir

5'-GAGTAAATCACTTCACCTACGTG-3',

komplementarūs Salmonella typhimurium 23S rRNR genui. Pagal 1 ir 2 pavyzdžių metodiką buvo testuota visa eilė Salmonella genties bakterijų bei kitų genčių, įeinančių į Enterobacteriaceae šeimą, bakterijos.

1 lentelė

PCR rezultatai su Salmonella genties bakterijomis

Pvz. Nr.	Pavadinimas	Tirtų kamienų skaičius	Fragmentas ampli- fikuojasi (+) arba ne (-)
3.	<u>S.brandenburg</u>	7	+
4.	<u>S.choleraesuis</u>	1	+
5.	<u>S.enteritidis</u>	42	+
6.	<u>S.haifa</u>	1	+
7.	<u>S.infantis</u>	6	+
8.	<u>S.isangi</u>	2	+
9.	<u>S.java</u>	1	+
10.	<u>S.newport</u>	1	+
11.	<u>S.ngor</u>	1	+
12.	<u>S.stanley</u>	1	+
13.	<u>S.thompson</u>	1	+
14.	<u>S.typhimurium</u>	9	+
15.	<u>S.tshionqwe</u>	1	+

2 lentelė

PCR rezultatai su įvairiomis ne Salmonella bakterijomis

Pvz. Nr.	Pavadinimas	Tirtų kamienų skaičius	Fragmentas amplifikuojasi (+) arba ne (-)
16.	<u>Acinetobacter</u>	1	-
17.	<u>Citrobacter</u>	1	-
18.	<u>Citrobacter freundii</u>	2	-
19.	<u>Escherichia coli</u>	6	-
20.	<u>Enterobacter</u>	4	-
21.	<u>Enterobacter aerogenes</u>	1	-
22.	<u>Enterobacter cloacae</u>	1	-
23.	<u>Hafnia</u>	5	-
24.	<u>Yersinia enterocolitica</u>	1	-
25.	<u>Klebsiella</u>	4	-
26.	<u>Proteus</u>	1	-
27.	<u>Proteus vulgaris</u>	1	-
28.	<u>Providencia rettgeri</u>	1	-
29.	<u>Pseudomonas</u>	2	-
30.	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	3	-
31.	<u>Shigella flexneri</u>	2	-
32.	<u>Shigella sonnei</u>	11	-
33.	<u>Serratia</u>	1	-

Fig.3, 1,2 lentelėse pateikti rezultatai patvirtina, jog, panaudojus oligonukleotidinius praimerius, komplementarius Salmonella typhimurium 23S rRNR genui, vyksta labai specifinė polimerazės ciklinė reakcija, t.y. amplifikacija vyksta tik nuo Salmonella bakterijų DNR, tuo tarpu nuo įvairių kitų bakterijų DNR amplifikacijos nėra. Akivaizdu, kad panaudoti zondai - pakankamai universalūs Salmonella genties bakterijoms, nes jų panaudojimas įgalina nustatyti 13 skirtingų Salmonella rūšių.

Šio išradimo privalumai:

1. Padidintas Salmonella bakterijų nustatymo jautrumas, t.y. tam, kad vyktų polimerazės ciklinė reakcija, užtenka 50 bakterijų mėginyje.
2. Salmonella bakterijų detekcijos laikas sutrumpėja iki vienos dienos.
3. Amplifikuoto produkto identifikavimui naudojama restrikcija. Empiriškai pasirinkta restriktazė Eco130 I (Fig.2).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Oligonukleotidiniai zondai - praimeriai, komplementarūs Salmonella typhimurium 23S rRNR genui, turintys seką:

5'-GAG-TAA-ATC-ACT-TCA-CCT-ACG-TG-3' ir

5'-GTA-AAT-CCG-GTT-CAC-TTT-AAC-AC-3' ,

skirti Salmonella bakterijų nustatymui.

2. Salmonella bakterijų nustatymo būdas, kuriame bakterijos testuojamos zondų pagalba, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad bakterijas panaudoja polimerazės ciklinėje reakcijoje, taikant zondus pagal 1 punktą, amplifikacijos produktus analizuoja elektroforetiškai ir apie nustatymo specifiškumą sprendžia iš amplifikacijos produktų restrikcinės analizės.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad atlieka ne mažiau, nei 25 polimerazės ciklinės reakcijos ciklą, kurių kiekvienas trunka 1 min. - $95^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 1 min. - $58^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 1 min. - $70^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad amplifikacijos produktus identifikuoja, panaudojant restrikcinę endonukleazę Eco130 I.

LT 3828 B

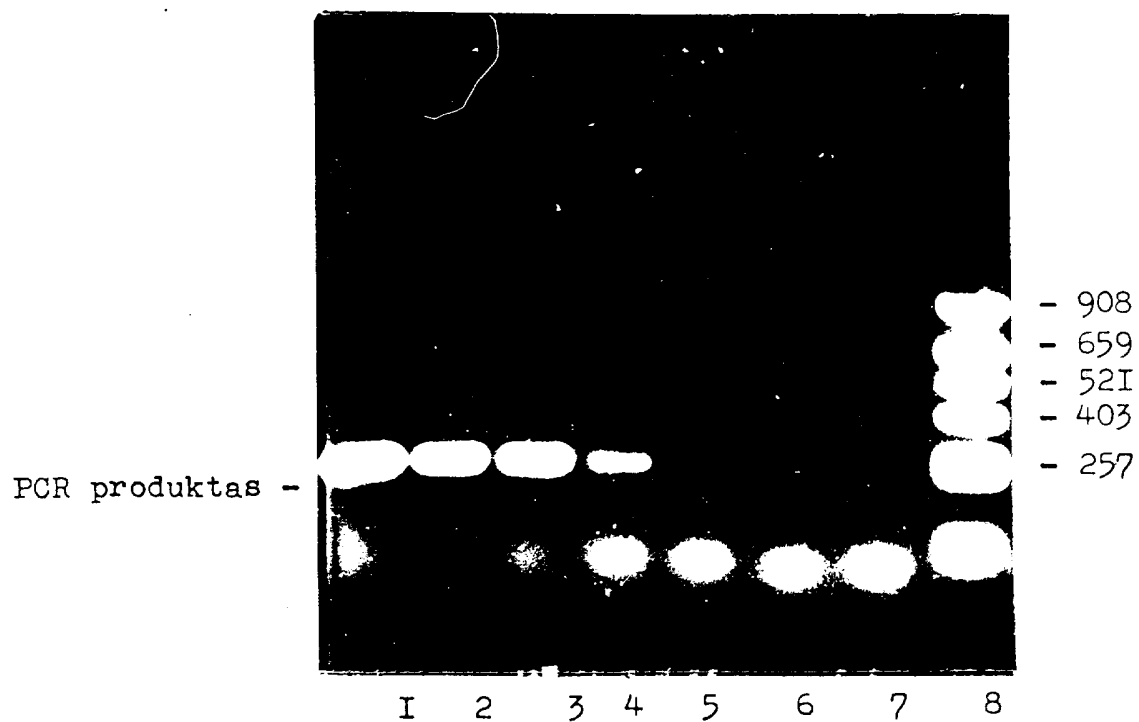


Fig.1

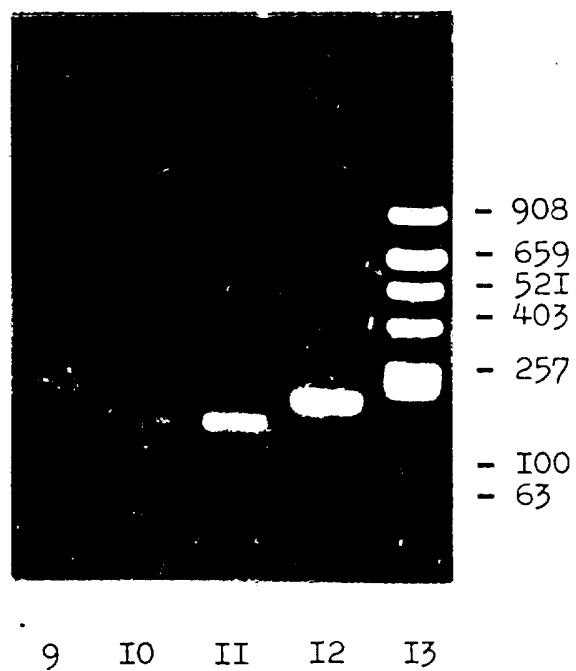


Fig.2

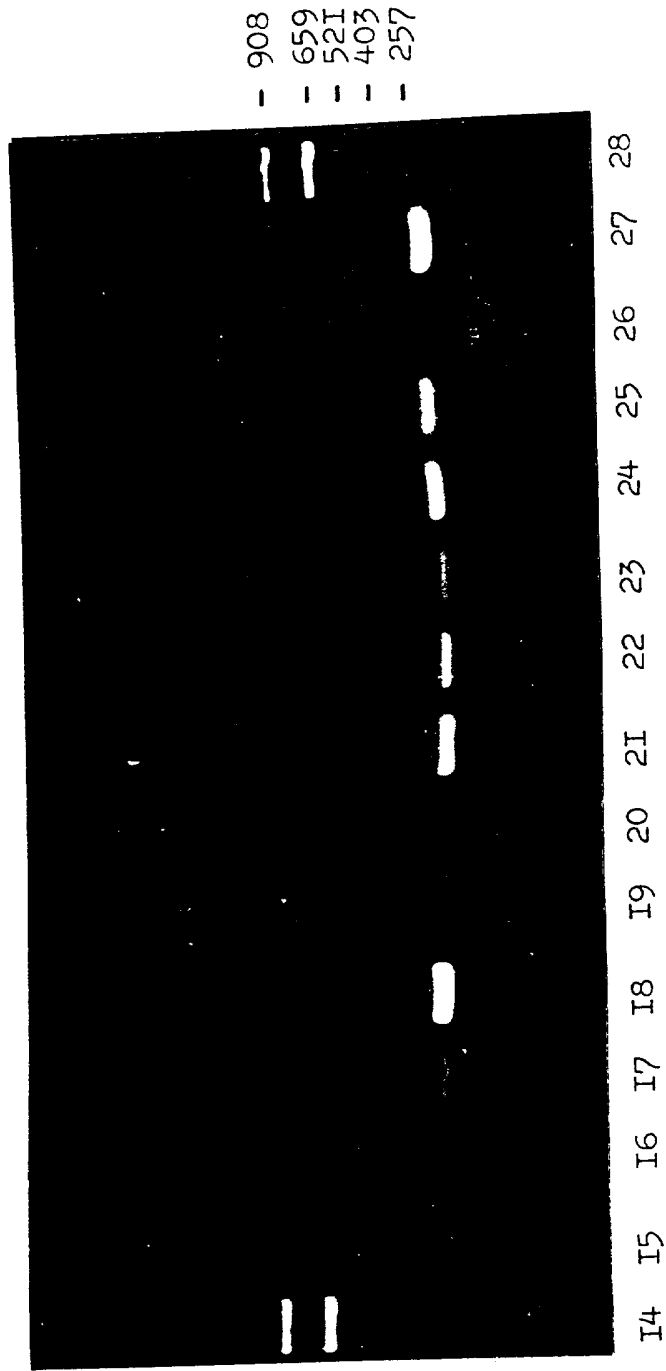


Fig.3