

(11) Patento numeris: **6767** (51) Int. Cl. (2020.01): **C12Q 1/00**

(21) Paraiškos numeris: **2020 506**

(22) Paraiškos padavimo data: **2020-01-09**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2020-07-10**

(45) Patento paskelbimo data: **2020-09-25**

(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: —

(72) Išradėjas:

**Guangfu LIU, CN
Xiaoping YU, CN
Pengjun ZHANG, CN
Xuping SHENTU, CN
Xianshu FU, CN
Qianqian YANG, CN
Mingzhou ZHANG, CN
Peiying HAO, CN**

(73) Patento savininkas:

**China Jiliang University, No. 258, Xueyuan Street, Xiasha Higher Education
Zone, Hangzhou, Zhejiang, CN**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Reda ŽABOLIENĖ, METIDA, Verslo centras „VERTAS“, Gynėjų g. 16, LT-01109
Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**PNR fluorescencinės *in situ* hibridizacijos identifikavimo būdas, rinkinys ir
PNR zondai, skirti *Shigella Castellani* aptikimui**

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su PNR (peptidinės nukleorūgšties, PNR) zondo, skirto *Shigella Castellani* skirtingų tipų mėginiams identifikuoti, modeliavimu. PNR zondo DNR seka yra 5, -GATAATCTACGGCATATGGC-3'. *Shigella Castellani* aptikimui, zondai yra naudojami derinyje su FISH (fluorescencinės *in situ* hibridizacijos, FISH) būdu. Šio išradimo PNR pasižymi dideliu stabilumu ir specifiniu prisijungimu prie DNR ir RNR, greita hibridizacija bei geru įsiskverbimu į ląsteles. Derinant PNR ir FISH būdus, šiuo išradimu sukurtas aptikimo būdas yra greitas, tikslus ir jautrus, todėl pagerėja identifikavimo tikslumas.

IŠRADIMO SRITIS

Šis išradimas yra susijęs su mikroorganizmų, susijusių su maisto sauga, aptikimo būdu, ypač su peptidinės nukleorūgšties (PNR) fluorescencinės *in situ* hibridizacijos identifikavimo būdu, rinkiniu ir PNR zonda, skirtu aptikti *Shigella Castellani*.

PAGRINDINIAI FAKTAI

Su maistu plintantys patogenai yra viena iš pagrindinių priežasčių per maistą plintančių ligų, sukėlusių didelį dėmesį maisto saugos srityje pasaulyje. Remiantis PSO ataskaita, kasmet pasaulyje nustatoma nuo 4 iki 6 milijardų ligos atvejų, susijusių su maistu, ir apie 70 proc. jų sukelia biologiškai užteršti maisto produktai. Kasmet besivystančiose šalyse nuo per maistą plintančių ligų miršta apie 1,8 mln. žmonių, net išsivysčiusiose šalyse kasmet daugiau nei 10 % gyventojų užsikrečia per maistą plintančiomis ligomis. Šiuo metu svarbios patogeninės bakterijos, galinčios sukelti per maistą plintančias ligas, tokios kaip, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157*, *Shigella Castellani* ir kt., yra plačiai aptinkamos pieno produktuose, daržovėse, akvaproduktuose, mėsos produktuose ir kitur, jos yra svarbūs veiksniai, sukeliantys maisto užteršimą. Tuo būdu, norint stebėti maisto saugą, labai svarbu veiksmingai nustatyti per maistą plintančius patogenus.

Tradiciškai *Shigella Castellani* aptinkama auginimo mitybos terpėse būdais. Tačiau šie būdai reikalauja daug laiko ir darbo sąnaudų. Todėl, buvo sukurta daugybė molekulinio lygmens aptikimo būdų, įskaitant polimerazės grandininės reakcijos (PGR), genų lusto technologijos ir imunologinių tyrimų būdus ir kt. Buvo paskelbta daug su *Shigella Castellani* susijusių aptikimo būdų, tačiau šie viešai paskelbti aptikimo būdai yra susiję su laiko sąnaudomis, problemomis, susijusiomis su sudėtingu pradmenų sukonstravimu ir klaidingais teigiamais rezultatais, ir t.t. Derinant PNR zondą kartu su fluorescencinės *in situ* hibridizacijos (FISH) būdu (PNR-FISH), galima sutaupyti daug laiko, palyginti su tradiciniais biocheminiais identifikavimo būdais. PNR-FISH rezultatų nustatymo būdu, pagrįstu fluorescencijos aptikimu ir morfologiniu aptikimu, pagerinamas aptikimo tikslumas ir išvengiama klaidingų teigiamų ir klaidingai neigiamų rezultatų.

SANTRAUKA

Šio išradimo tikslas yra sumodeliuoti PNR zondą, skirtą PNR fluorescencijos *in situ* identifikavimui, kuris yra naudojamas pagrindiniam per maistą plintančiam patogeniui *Shigella Castellani* aptikti. Zondas yra specifiskas *Shigella Castellani*.

Kitas šio išradimo tikslas yra aprūpinti rinkiniu, kuriame būtų naudojamas PNR zondas, kuris greitai ir paprastai galėtų aptikti *Shigella Castellani* maisto saugos testavimo procese.

Dar vienas šio išradimo tikslas yra pateikti *Shigella Castellani* PNR fluorescencijos *in situ* identifikavimo būdą. Būdas kartu su FISH aptikimo technika leidžia greitai aptikti *Shigella Castellani*.

Pirmajam tikslui pasiekti šiame išradime yra naudojami tokie techniniai sprendimai:

PNR zondas, naudojamas kiekybiniam *Shigella Castellani* aptikimui, kur PNR zondo DNR seka yra 5' -GATAATCTACGGCATATGGC -3'. Zondas gali aptikti rRNR, rDNR taikinio seką arba seką, komplementarią *Shigella Castellani* rRNR. PNR zondo N-galas yra sujungtas su bent vieno tipo žymens medžiaga. N-galo žymens medžiaga yra pasirinkta iš šių medžiagų: fluoresceino, biotino ir digoksino.

Norint pasiekti antrąjį tikslą, šiame išradime yra naudojami tokie techniniai sprendimai:

PNR fluorescencinės *in situ* hibridizacijos identifikavimo rinkinys, skirtas *Shigella Castellani* aptikti, apima fiksatorių, hibridizacijos tirpalą ir praplovimo tirpalą. Fiksatoriaus sudėtyje yra paraformaldehido ir natrio hidroksido, tai yra, 4-6 % (wt/vol) paraformaldehido ir 8-10 % (wt/vol) natrio hidroksido. Hibridizacijos tirpalo sudėtyje yra 20-30 % (vol/vol) formamido, 5-10 % (wt/vol) gliukozės sulfato, 10 mM natrio chlorido, 0,1-0,2 % (wt/vol) polisacharozės, 5 mM etilendiamino tetraacto rūgšties.

Praplovimo tirpalo sudėtyje yra 10 mM maleino rūgšties ir 0,3-0,5 % (vol/vol) Tween 20.

Trečiajam tikslui pasiekti šiame išradime yra naudojami tokie techniniai sprendimai:

(1) paimami 1-5 gramai tiriamo mėginio, mėginys įdedamas į mėgintuvėlį, kuriame yra 5-8 ml sterilizuoto LB kultūros tirpalo, ir 1 valandą yra auginama purtant 37 °C

temperatūroje.

(2) bakterijų ląstelės yra surenkamos jas centrifuguojant, vieną kartą švelniai praplaunamos steriliu vandeniu, po to suspenduojamos steriliame vandenyje, bakterijų suspensijos gavimui.

(3) paimama 8-10 µl (2) etapo bakterijų suspensijos patepimui ant sterilaus objekcinio stiklelio, pridama 5-10 µl fiksatoriaus ir gerai sumaišoma.

(4) (3) etapo objekcinis stiklelis įdedamas į 80 °C temperatūros orkaitę 20-30 minučių pakaitinimui.

(5) paimama 15-20 µl hibridizacijos tirpalo, kurio sudėtyje yra 25 ng/ml koncentracijos PNR zondas, ir užlašinama ant objekcinio stiklelio, atliekama hibridizacija 55 °C temperatūroje 20-30 minučių.

(6) po hibridizacijos, 2-3 kartus praplaunama praplovimo tirpalu, kiekvienas praplovimas trunka 5 minutes.

(7) po išdžiovinimo ore, mikroskopu yra stebimas jo fluorescencijos ryškumas ir bakterijų forma.

Šiuo išradimu galima gauti tokius teigiamus efektus: kadangi PNR pasižymi dideliu specifinio susirišimo su DNR ir RNR stabilumu, greita hibridizacija ir geru įsiskverbimu į ląsteles, šiuo išradimu sukurtas aptikimo būdas yra greitas, tikslus ir jautrus. Be to, derinant su FISH būdu, šiuo išradimu yra pagerinamas identifikavimo tikslumas.

IŠSAMUS ĮGYVENDINIMO VARIANTŲ APRAŠYMAS

1 pavyzdys. PNR zondo modeliavimas

NCBI svetainėje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) buvo atrinkta daugybė 16s *Shigella Castellani* rRNR sekų, kurios buvo surūšiuotos naudojant MegAlign programinės įrangos Clusta IV algoritmą. Atlikus rūšiavimą, kintamame regione buvo sumodeliuotas *Shigella-Castellani* specifinis zondas SC-16S-F. Zondo seka buvo tokia: 5'-GATAATCTACGGCATATGGC-3.

Siekiant patikrinti zondo jautrumą ir specifiškumą, zondas buvo patikrintas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Atlikus paiešką BLAST, nustatyta, kad sumodeliuotas zondas pasižymi dideliu specifiškumu. PNR zondas buvo testuojamas

atliekant palyginimą su didžiojo subvieneto (23S/28S) duomenų baze, ir sekos atitikties nebuvo rasta, todėl jokio suklaidinimo dėl to neturėtų įvykti. Atlikus BLAST analizę ir įvertinus programa ProbeCheck, sumodeliuotas zondas SC-16S-F teoriniame lygmenyje pasižymėjo dideliu jautrumu ir specifiškumu. Tolesniame aptikimo etape jis buvo naudojamas kartu su teigiamos kontrolės zondų BacUin. Teigiamos kontrolės zondo BacUin seka buvo tokia: 5'-CTGCCTCCCGTAGGA-3'.

Vėliau parinkta seka buvo susintetinta, o FAM fluoresceinas įjungtas į jos N-galą.

2 pavyzdys. PNR-FISH jautrumo patikrinimas

Jautrumui patikrinti buvo atrinkta vienuolika *Shigella Castellani* tipinių ir išskirtų kamienų. Testavimo būdas buvo toks, kaip aprašyta aukščiau. Kiekviename teste teigiamos ir neigiamos kontrolės testai buvo atlikami vienu metu. Teigiamos kontrolės testo metu zondas BacUin buvo naudojamas kitiems zondams pakeisti, o neigiamos kontrolės teste „tuščiasis zondas“ buvo naudojamas kitiems zondams pakeisti. Rezultatai parodė, kad visi ištirti *Shigella Castellani* kamienai pasižymėjo „teigiama“ hibridizacija su teigiamos kontrolės zondų ir zondų SC-16S-F (kaip parodyta 1 lentelėje). Aukščiau pateikti rezultatai atitiko iš anksto numatomus rezultatus. Zondas SC-16S-F gebėjo aptikti kamieną-taikinį ir pasižymėjo dideliu jautrumu.

1 lentelė. PNR zondo jautrumo patikrinimas

Organizmas	Kamienas	Hibridizacijos rezultatai	
		BacUin	SC-16S-F
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC12022	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC29903	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC25931	+	+
<i>Shigella boydii</i>	ATCC9207	+	+
<i>Shigella boydii</i>	ATCC1247	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC9290	+	+

<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 11835	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC9361	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC29027	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	CMCC 51252	+	+
<i>Shigella Castellani</i>	ATCC 12038	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	CMCC51574	+	+

3 pavyzdys. PNR-FISH specifiškumo patikrinimas

PNR-FISH specifiškumui patikrinti buvo parinkta dešimt reprezentatyvių gramneigiamų ir gramteigiamų bakterijų kamienų. Atrinkti kamienai apėmė: *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*. Testavimo būdas buvo toks, kaip aprašyta aukščiau. Rezultatai parodė, kad tik teigiamos kontrolės zondas BacUin galėjo jungtis su visomis iš bakterijų, o zondas SC-16S-F negalėjo jungtis su šiais ne-taikinio kamienais (2 lentelė), tai rodo, kad SC-16S-F zondas pasižymėjo geru specifiškumu, kurio dėka galima būtų efektyviai išvengti klaidingų teigiamų rezultatų.

2 lentelė. PNR zondo specifiškumo patikrinimas

Organizmas	Kamienas	Hibridizacijos rezultatai	
		BacUin	SC-16S-F
<i>Salmonella enteritidis</i>	CMCC(B)50041	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923	+	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC51329	+	-
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	NCTC 12900	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 11994	+	-

<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	+	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17802	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NCTC12982	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	+	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291	+	-

4 pavyzdys. PNR-FISH būdo ir API būdo, skirtų išskirtiems *Shigella Castellani* kamienams, gautiems iš maisto produktų, identifikuoti, palyginimas

Shigella Castellani aptikimo procedūra buvo atlikta daugeliui maisto mėginių, naudojant šio išradimo PNR-FISH būdą ir API būdą (API LISTERIA strep, *French Biomerieux*, 10300). Po surinkimo, praturtinimo bakterijomis ir mėginių atskyrimo, buvo atliktas identifikavimas šio išradimo PNR-FISH būdu, o API būdas buvo naudojamas kaip etalonas su nuoroda į rinkinio instrukcijas. Rezultatai parodė, kad (3 lentelė) tarp visų aptikimo procese naudojamų mėginių, iš viso buvo nustatyta 16 teigiamų mėginių naudojant šio išradimo zondą SC-16S-F, tuo tarpu 17 teigiamų mėginių buvo identifikuoti API būdu (3 lentelė). Rezultatai parodė, kad PNR-FISH būdas, kuriame naudojama SC-16S-F zondo hibridizacija, pasižymėjo geru *Shigella Castellani* aptikimo greičiu palyginus su tradiciniu klasikiniu būdu, aptikimo proceso rezultatai iš esmės buvo pastovūs, todėl jis gali būti naudojamas pagrindinio su maistu plintančio patogeno – *Shigella Castellani*, aptikimui.

3 lentelė. PNR-FISH būdo ir API būdo aptikimo proceso rezultatų palyginimas faktiniuose mėginiuose

Mėginys	Kiekis	Teigiamų mėginių, aptiktų PNR-FISH būdu, skaičius	Teigiamų mėginių, aptiktų API būdu, skaičius
Žali kiaušiniai	80	4	4
Pieno milteliai	80	2	3
Žalias pienas	80	2	2

Pasterizuotas pienas	80	0	0
Neapdorota kiauliena	80	4	4
Perdirbta mėsa (neapdorota)	80	3	3
Perdirbta mėsa (virta)	80	0	0
Jūros gėrybės	80	2	2

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Peptidininės nukleorūgšties (PNR) zondas, skirtas *Shigella Castellani* aptikimui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad PNR zondo DNR seka yra 5' - GATAATCTACGGCATATGGC-3'.

2. PNR zondas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad zondas gali aptikti *Shigella Castellani* rRNR, rDNR taikinio seką arba seką, komplementarią *Shigella Castellani* rRNR.

3. PNR zondas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo N-galas yra sujungtas su bent vieno tipo žymens medžiaga.

4. PNR zondas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad N-galo žymens medžiaga yra parinkta iš vieno iš šių: fluoresceino, biotino ir digoksino.

5. Rinkinys, skirtas *Shigella Castellani* aptikimui, apimantis zondą pagal bet kurį iš 1-4 punktų.

6. Rinkinys pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad rinkinys papildomai apima bent vieną iš šių tirpalų: fiksatorių, hibridizacijos tirpalą ir praplovimo tirpalą.

7. Rinkinys pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fiksatoriaus sudėtyje yra paraformaldehido ir natrio hidroksido, tai yra, 4-6 % (wt/vol) paraformaldehido ir 8-10 % (wt/vol) natrio hidroksido.

8. Rinkinys pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hibridizacijos tirpalo sudėtyje yra 20-30% (vol/vol) formamido, 5-10 % (wt/vol) gliukozės sulfato, 10 mM natrio chlorido, 0,1-0,2 % (wt/vol) polisacharozės, 5 mM etilendiamino tetraacto rūgšties.

9. Rinkinys pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad praplovimo tirpalo sudėtyje yra 10 mM maleino rūgšties, 0,3-0,5 % (vol/vol) Tween 20.

10. *Shigella Castellani* aptikimo būdas, kuriame yra naudojamas PNR zondas pagal 1-4 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima šiuos etapus:

(1) paimami 1-5 gramai mėginio, mėginys dedamas į mėgintuvėlį, kuriame yra 5-8 ml

sterilizuoto LB kultūros tirpalo, ir auginama purtant 37 °C temperatūroje 1 valandą;

(2) bakterijų ląstelės yra surenkamos jas centrifuguojant, švelniai praplaunamos steriliu vandeniu vieną kartą, po to suspenduojamos steriliame vandenyje, bakterijų suspensijos gavimui;

(3) paimama 8-10 µl (2) etapo bakterijų suspensijos patepimui ant sterilaus objekcinio stiklelio, pridedama 5–10 µl fiksatoriaus ir gerai sumaišoma.

(4) (3) etapo objektinis stiklelis įdedamas į 80° C temperatūros orkaitę pakaitinimui 20-30 minučių.

(5) paimama 15-20 µl hibridizacijos tirpalo, kurio sudėtyje yra 25 ng/ml koncentracijos PNR zondas, ir užlašinama ant objekcinio stiklelio, atliekama hibridizacija 55° C temperatūroje 20-30 minučių.

(6) po hibridizacijos, 2-3 kartus praplaunama praplovimo tirpalu, kiekvienas praplovimas trunka 5 minutes.

(7) po išdžiovinimo ore, mikroskopu yra stebimas fluorescencijos ryškumas ir bakterijų forma.