

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 524

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/6888 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-39516**

(22) Přihlášeno: **22.12.2021**

(47) Zapsáno: **07.11.2022**

- (73) Majitel:
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
České Budějovice, České Budějovice 2, CZ
- (72) Původce:
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Dobrá Voda u
Českých Budějovic, CZ
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D., Borovany, CZ
- (74) Zástupce:
Mgr. Aleš Lang, Horní Slověnice 15, 373 72 Lišov

- (54) Název užitého vzoru:
**Analytický roztok pro provedení metody
LAMP k detekci mutací SARS-CoV-2**

CZ 36524 U1

Analytický roztok pro provedení metody LAMP k detekci mutací SARS-CoV-2

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká analytického roztoku pro realizaci testů metodou LAMP k odhalení mutací virové nákazy SARS-CoV-2.

Dosavadní stav techniky

10

V současné době se ukazuje, že při pandemické virové nákaze je jedním ze slabých míst společnosti nedostatečná kapacita a flexibilita testování obyvatel pro řízení účinných protiepidemických opatření.

15

Aktuální hrozbou společnosti je SARS-CoV-2, který je novým typem vysoce infekčního koronaviru způsobujícího onemocnění COVID-19. Toto onemocnění se může projevat i závažným onemocněním dýchacích cest a vážným zánětem plic, přičemž je velice rizikové pro osoby trpícími jinými dalšími zdravotními problémy. Jedním z charakteristických rysů SARS-CoV-2 je velmi vysoká přenositelnost, to znamená, že infikovaní jedinci bez jakýchkoli příznaků mohou virus dále přenést na ostatní. Pro další omezení šíření pandemie je proto velmi zásadní připravit testovací sady tak, aby bylo možné tyto časné infekce účinně identifikovat.

20

Vzhledem k celosvětové pandemii je důležité mít propracovaný rychlý a zároveň spolehlivý detekční postup k včasnému zachytu onemocnění, resp. infikovaných osob. Výhoda navrhované molekulárně-biologické metody s názvem „loop mediated isothermal amplification“ – česky izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (dále v textu jen LAMP) spočívá ve vysoké procesivitě LAMP reakce.

25

Použití metody LAMP bylo poprvé zdokumentováno a ověřeno při detekci viru hepatitidy B v roce 2000. Metoda byla vyvinuta k rychlé amplifikaci DNA se zachováním vysoké specifčnosti, účinnosti a za izotermických podmínek. Na rozdíl od známé a primárně používané metody PCR (česky polymerázová řetězová reakce) tedy nevyžaduje cyklování, přičemž ve srovnání s tradičními detekčními metodami je specifita LAMP extrémně vysoká. Bylo zjištěno, že metoda LAMP je 10x až 100x citlivější než metoda PCR. Ve srovnání s metodami PCR a PCR v reálném čase má LAMP výhody v jednoduchosti reakce a ve vyšší účinnosti amplifikace. Obrovská výhoda LAMP je i v úspoře času, protože se DNA amplifikuje $10^9x - 10^{10}x$ za 15 až 60 minut, což může ve srovnání s PCR ušetřit i jednu hodinu. Od svého zavedení byla metoda LAMP optimalizována k detekci patogenů humánních, živočišných i rostlinných (viry, bakterie, protozoa), či nejrůznějších potravinových kontaminantů.

30

35

Vstupní materiál metody LAMP je pak získáván z nejrůznějších tkání (krev, faeces, atd.). K amplifikaci je používána termostabilní DNA polymeráza z bakterie *Geobacillus stearothermophilus* (resp. *Bacillus stearothermophilus*) s dislokázovou aktivitou, která má 5'-3' endonukleázovou aktivitu a sada specifických primerů. Reakční směr pro amplifikaci se v odborných kruzích označuje pojmem mastermix.

40

Primery jsou řetězce nukleové kyseliny (DNA) dlouhé několik bází, které slouží jako počáteční místo replikace templátové DNA. Bez primeru by enzym DNA polymeráza nebyl schopen začít syntézu nového řetězce. V současné době jsou primery komerčně dostupné, a to buď jako předpřipravené, nebo syntetizované na zakázku. Pro rozlišení se primery označují písmeny a čísly.

45

Některý ze známých primerů lze pro metodu LAMP fluorescenčně označit, aby sloužil jako tzv. sonda. Sonda je v podstatě oligonukleotid s fluorescenční značkou (hydrolyzační fluorofor), který funguje jako tzv. reportér. Současně se sondou musí být přítomen zhášec (BHQ – „black hole

50

quencher“), aby došlo k detekovatelné fluorescenci pouze v případě separace molekuly reportéru od molekuly zhášedce. Princip funkce sondy lze zjednodušeně popsat tak, že sonda nasedá na sekvenci mezi primery a při syntéze nového řetězce (tzn. při LAMP analýze) dojde k uvolnění sondy a dojde k emisi fotonu, který se přístrojem zaznamená.

5

Druhým palčivým problémem, který se musí při aktuální pandemii onemocnění virem SARS-CoV-2 řešit, je rozlišování jeho mutací u nakažených jedinců. Každá známá mutace viru má specifické vlastnosti, proto je nezbytné nejenom testovat na pozitivní a negativní výsledky (na přítomnost viru SARS-CoV-2 v analyzovaném roztoku), ale ideálně i na to, jaká mutace viru je v těle nakaženého jedince přítomna.

10

Tento problém se v České republice doposud řeší tak, že pokud dojde k pozitivnímu výsledku pomocí PCR testu, tak je proveden druhý test a to tzv. diskriminační PCR test, který umožňuje stanovit, zda se v konkrétním případě jedná o mutaci, pro kterou je navržen.

15

To je nevýhodné, protože, pokud se jedná při nákaze o mutaci, pro kterou není diskriminační PCR test navržen, tak je provedení testu ztráta zdrojů a času, zejména v případě, že virová nákaza má více než dvě mutace. Což SARS-CoV-2 splňuje, neboť jsou v současné pandemii dominantní čtyři hlavní mutace, a to alfa, beta, gama a delta.

20

Úkolem technického řešení je přinést veřejnosti analytický roztok pro provedení metody LAMP, který by umožnil použít tuto rychlou a levnou metodu k detekci mutací SARS-CoV-2, aby mohly být nahrazeny pomalejší a nákladnější druhy testů, zejména diskriminační PCR testy, nebo sekvenování.

25

Podstata technického řešení

Vytčený úkol je vyřešen pomocí analytického roztoku pro provedení metody LAMP k detekci mutací SARS-CoV-2 vytvořeného podle níže uvedeného technického řešení.

30

Podstata technického řešení spočívá v tom, že analytický roztok pro provedení metody LAMP k detekci mutací SARS-CoV-2 obsahuje mastermix s termostabilní polymerázou s dislokázovou aktivitou, a dále primer F3 se sekvencí

35

CAGGACTTGTCTTACCTTTC pro SARS-CoV-2 - mutace alfa, nebo se sekvencí
AGCCTCTTCTCGTTCCTCAT pro SARS-CoV-2 - mutace beta, nebo se sekvencí
CGGCAGTCAAGCCTCTTC pro SARS-CoV-2 - mutace gama, primer B3 se sekvencí
AGTAGGGACTGGGTCTTC pro SARS-CoV-2 - mutace alfa, nebo se sekvencí
AGTGACAGTTTGGCCTTGTT pro SARS-CoV-2 - mutace beta, nebo se sekvencí
GTGACAGTTTGGCCTTGTTG pro SARS-CoV-2 - mutace gama, primer FIB se sekvencí
GGACAGGGTTATCAAACCTCTTAGTCAATGTTACTTGGTTCCATGC pro SARS-CoV-2
- mutace alfa, nebo se sekvencí

40

GCCAGCCATTCTAGCAGGAGAACACGTAGTCGCAACAGTTCA pro SARS-CoV-2
- mutace beta, nebo se sekvencí

45

GCCAGCCATTCTAGCAGGAGAATTCCTCATCACGTAGTCGCA pro SARS-CoV-2
- mutace gama, primer BIP se sekvencí

AATGATGGTGTATTTGCTTCCAGAATCTAAAGTAGTACCAAAAATCC
pro SARS-CoV-2 - mutace alfa, nebo se sekvencí

50

GCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGTTGGCCTTTACCAGACA

pro SARS-CoV-2 - mutace beta, nebo se sekvencí

GGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTTGTTGGCCTTTACCAGACA

pro SARS-CoV-2 - mutace gama, a dále sondu komplementární k sekvenci analyzované mutace SARS-CoV-2, a dále k sondě kompatibilní zhášedce.

Praktické zkoušky ukázaly, že kombinace těchto čtyř primerů a sondy komplementární k analyzované mutaci SARS-CoV-2 dokáže detekovat konkrétní mutaci virové nákazy SARS-CoV-2. Je velice výhodné, že uvedené primery jsou tržně dostupným artiklem, a proto je příprava analytického roztoku podle technického řešení finančně příznivá a relativně snadná.

5

Mezi výhody technického řešení patří umožnění provádět detekci mutací SARS-CoV-2 metodou LAMP. Je tedy výhodné, že detekce mutací SARS-CoV-2 založená na metodě LAMP umožňuje rychlý skrínig potenciálně infikovaných pacientů, a to i např. přímo na odběrových místech, včetně rozpoznání mutace virového onemocnění u pozitivních pacientů, a jejich dělení na skupiny podle mutací virové nákazy.

10

Objasnění výkresů

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujícím vyobrazení, kde obr. 1 je grafem specificity metody LAMP s analytickým roztokem podle technického řešení na mutaci alfa SARS-CoV-2.

Příklad uskutečnění technického řešení

Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní případy uskutečnění technického řešení jsou představovány pro ilustraci, nikoliv jako omezení technického řešení na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zajistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním technického řešení, která jsou zde popsána.

25

Analytický roztok se připraví smícháním primerů F3, B3, FIB a BIP v mastermixu s termostabilní polymerázou s dislokázovou aktivitou, a dále přimícháním sondy a k ní kompatibilního zhášeče. Uvedené složky analytického roztoku je možné zakoupit, jako katalogové zboží do laboratoří, avšak sonda je v rámci technického řešení nastavena pro reakci se sekvencí konkrétní mutace viru SARS-CoV-2, to znamená s mutací alfa, beta, či gama.

30

Příklad analytického roztoku podle sekvence – SARS-CoV-2 - mutace alfa

35

F3 CAGGACTTGGTCTTACCTTTC

B3 AGTAGGACTGGGTCTTC

40 FIP GGACAGGGTTATCAAACCTCTTAGTCAATGTTACTTGGTTCCATGC

BIP AATGATGGTGTTTATTTTGCTTCCAGAATCTAAAGTAGTACCAAAAATCC

45 sonda FAM-ACGCTGAGGACCCGGATGCGAATGCGGATGCGGATGCCGATA
TCTCTGGGACCAATGGT

zhášeč TCGGCATCCGCATCCGCATTTCGCATCCGGGTCCTCAGCGT-BHQ

Na obr. 1 je znázorněn graf specificity metody LAMP podle výše uvedeného příkladu.

50

Sondu a zhášeč dokáže odborník v rámci rutinní práce analogicky připravit na další sekvence mutací SARS-CoV-2.

Praktické testy ukázaly, že mutace delta obsahuje příliš málo opakujících se úseků nukleové kyseliny, proto lze mutaci delta detekovat nepřímou metodou, a to postupným vylučováním mutace alfa, beta a gama.

- 5 Pokud by byla v následujících měsících, či letech, pomocí sekvenování odhalena další mutace SARS-CoV-2 (např. právě se rozmáhající varianta omikron), která bude mít dostatek opakujících se úseků nukleové kyseliny, bude velice pravděpodobně možné sondu nastavit i na tyto příchozí mutace SARS-CoV-2.
- 10 Analytický roztok s komponenty podle technického řešení se použije v rámci RT-LAMP detekce (izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou s reverzní transkripcí). Reakce RT-LAMP se provádí na přenosné mobilní platformě např. Smart-DART™ (Diagenetix, USA). Reakční směsi LAMP se inkubují po dobu 30 minut při 65 °C v přenosné mobilní platformě Smart-DART™, načež následuje zahřívání na 98 °C po dobu 2 minut pro ukončení reakcí. RT-LAMP detekce umožňuje vyhodnocení pozitivita/negativity reakce a dle rychlosti nástupu amplifikační křivky i kvantifikaci pozitivita. Všechny testy LAMP jsou replikovány alespoň dvakrát a všechny experimenty obsahují negativní kontroly (bez templátu virové nukleové kyseliny).
- 15

20 Průmyslová využitelnost

Analytický roztok pro provedení metody LAMP k detekci mutací SARS-CoV-2 podle technického řešení nalezne uplatnění ve zdravotnictví a výzkumu.

NÁROKY NA OCHRANU

1. Analytický roztok pro provedení metody LAMP k detekci mutací SARS-CoV-2, **vyznačující se tím**, že obsahuje mastermix s termostabilní polymerázou s dislokovanou aktivitou, a dále

5 primer F3 se sekvencí CAGGACTTGTTCTTACCTTTC pro SARS-CoV-2 - mutace alfa,

nebo se sekvencí AGCCTCTTCTCGTTCCTCAT pro SARS-CoV-2 - mutace beta,

nebo se sekvencí CGGCAGTCAAGCCTCTTC pro SARS-CoV-2 - mutace gama,

primer B3 se sekvencí AGTAGGGACTGGGTCTTC pro SARS-CoV-2 - mutace alfa,

nebo se sekvencí AGTGACAGTTTGGCCTTGTT pro SARS-CoV-2 - mutace beta,

10 nebo se sekvencí GTGACAGTTTGGCCTTGTTG pro SARS-CoV-2 - mutace gama,

primer FIB se sekvencí

GGACAGGGTTATCAAACCTCTTAGTCAATGTTACTTGGTTCCATGC
pro SARS-CoV-2 - mutace alfa,

nebo se sekvencí

15 GCCAGCCATTCTAGCAGGAGAACACGTAGTCGCAACAGTTCA
pro SARS-CoV-2 - mutace beta,

nebo se sekvencí

GCCAGCCATTCTAGCAGGAGAATTCCTCATCACGTAGTCGCA
pro SARS-CoV-2 - mutace gama,

20 primer BIP se sekvencí

AATGATGGTGTTTATTTTGCTTCCAGAATCTAAAGTAGTACCAAAAATCC
pro SARS-CoV-2 - mutace alfa,

nebo se sekvencí

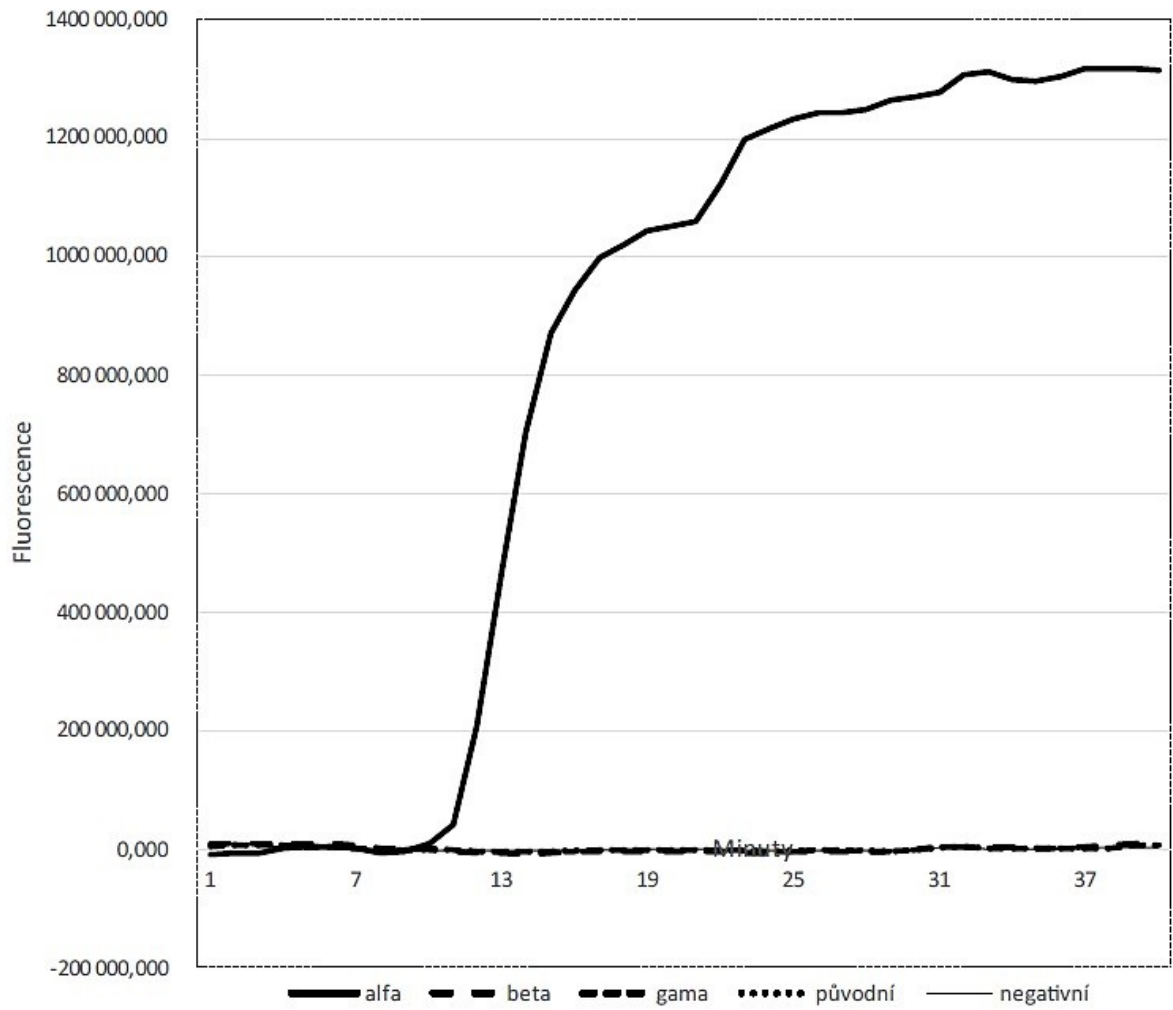
25 GCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGTTGGCCTTTACCAGACA
pro SARS-CoV-2 - mutace beta,

nebo se sekvencí

GGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTTGTGGCCTTTACCAGACA
pro SARS-CoV-2 - mutace gama,

30 a dále alespoň jednu sondu komplementární k analyzované mutaci SARS-CoV-2, a dále zhášec kompatibilní k sondě.

Specificita LAMP pro mutaci Alfa



Obr. 1