

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 37 552

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/68* (2018.01)  
*C12Q 1/6844* (2018.01)  
*C12Q 1/6876* (2018.01)  
*C12Q 1/686* (2018.01)  
*C12Q 1/6869* (2018.01)  
*C12Q 1/6888* (2018.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-41303**  
(22) Přihlášeno: **18.09.2023**  
(47) Zapsáno: **12.12.2023**

(73) Majitel:  
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ

(72) Původce:  
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ  
Ing. Lucie Frejlichová, Osová Bítýška, CZ  
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Lednice, CZ

(54) Název užitého vzoru:  
**Sada pro masivně paralelní detekci bakterie  
rodu *Curtobacterium* na platformě  
dvoukanálového sekvenátoru**

CZ 37552 U1

## Sada pro masivně paralelní detekci bakterie rodu *Curtobacterium* na platformě dvoukanálového sekvenátoru

### 5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká sady pro masivně paralelní detekci bakterií rodu *Curtobacterium*, využívající postup molekulární identifikace masivně paralelním sekvenováním.

10

### Dosavadní stav techniky

Bakterie rodu *Curtobacterium* působí často jako kontaminanty explantátových *in vitro* kultur, které jsou zaměřeny na množení plodin. Tyto bakterie se často vyskytují v rostlinných pletivech jako endofyty, které většinou nevykazují známky patogenity či virulence. Pro detekci existují pouze metody založené na PCR. Existuje také detekční způsob izolace těchto bakterií a na základě morfolgie a Sangerova sekvenování markerových genů je určen patogen porovnáním sekvencí s databázemi. Tento způsob patří mezi klasické způsoby a je časově velmi náročný. Pro zlepšení možností prevence je potřebná detekce, která přesně a rychle detekuje bakteriální patogeny ve vzorku. Navrhovaná metoda detekce bakterií rodu *Curtobacterium* s využitím masivně paralelní sekvenace představuje vysoce precizní způsob detekce. Metoda poskytuje dostatečnou efektivitu, citlivost a zároveň rychlost detekce.

### 25 Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro masivně paralelní detekci bakterií rodu *Curtobacterium* na platformě dvoukanálového sekvenátoru, využívající postup molekulární identifikace masivně paralelním sekvenováním, vyznačující se tím, že obsahuje set oligonukleotidových primerů pro metagenomickou detekci hub:

30

forward primer GTAGTAGGGGGTGTGCTCGAT (Sequence Number ID 1)

reverse primer CACGATGGCGGAGGACTAC (Sequence Number ID 2)

35

Uvedenou kombinaci primerů lze s výhodou používat v mastermixu s Q5 High-Fidelity DNA Polymerase kitem a nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s templátovou DNA extrahovanou z rostlinného pletiva, např. stonku nebo z kontaminované explantátové kultury. Získaný amplikon je doporučeno sekvenovat pomocí metody masivně paralelního sekvenování, kdy lze s výhodou používat Index kit Nextera XT a přístroj MiniSeq, dvoukanálový sekvenátor využívající sekvenaci syntézou.

40

Navrhovaná metoda detekce bakterie rodu *Curtobacterium*, využívající postup molekulární identifikace masivně paralelním sekvenováním představuje precizní způsob detekce. Metoda je levnější než detekce využívající čtyřkanálové sekvenátory, a poskytuje dostatečnou efektivitu, citlivost a zároveň rychlost detekce.

45

Navržený přístup je výsledkem testování různých kombinací primerů, které vykazovaly různou efektivitu amplifikace sekvencí cílové bakterie. Zvolená finální kombinace primerů poskytovala vysoce spolehlivou detekci bakterií rodu *Curtobacterium*. Navržená metoda je rychlá a oproti jiným metodám umožňuje velmi přesnou detekci bakterií rodu *Curtobacterium*, které způsobují kontaminace explantátových kultur. Jako negativní kontrola byly použity DNA bakterií rodu *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Methylobacterium* a *Roseomonas*, které se také často vyskytují jako kontaminanty explantátových kultur.

50

Objasnění výkresů

Obr. č. 1: Amplifikovaný fragment genu *metal-dependent transcriptional regulator* v rámci referenční sekvence kontaminantu/bakterie rodu *Curtobacterium*. Velikost fragmentu je 169 pb (párů bází). Cílová oblast hybridizace primerů je vysoce specifická pro rod *Curtobacterium*.

Obr. č. 2: Distribuce délky přečtených fragmentů DNA po sloučení párových čtení. Na ose x jsou uvedeny délky jednotlivých čtení, na ose y procento získaných sekvencí.

Příklady uskutečnění technického řešení

Extrakce DNA z kontaminovaných explantátových kultur, bakteriální kultury nebo z části rostliny. Z výše zmíněného materiálu se odebere 50 až 100 mg hmoty, a z tohoto množství se pak přímo extrahuje DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) podle instrukcí výrobce.

Masivně paralelní detekce bakterií rodu *Curtobacterium*

Pro samotnou detekci byly použity primery podle tohoto technického řešení:

Název	Označení	Sekvence (5'-3')
forward primer 1	Eichcurt_1_fwd	GTAGTAGGGGGTGTGCTCGAT (SN ID 1)
reverse primer 2	eichcurt_2_rev	CACGATGGCGGAGGACTAC (SN ID 2)

Reakce byla prováděna s použitím mastermixu o následujícím složení:

Reagencie	Množství
5× Pufr	5,0 µl
Nukleáz prostá voda	10,0 µl
Polymeráza 2,5 jednotek/µl	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> roztok 25mM	1,0 µl
dNTPs 10mM	0,2 µl
Primer 1 10µM (SN ID 1)	1,0 µl
Primer 2 10µM (SN ID 2)	1,0 µl
Templát (DNA) 50-250 ng	2,0 µl

25 *Teplotní profil PCR*

Reakce probíhala v termocykleru, např. TProfessional Standard Gradient (Biometra). Teplotní profil pro reakci: úvodní denaturace při 95 °C po dobu 3 minuty, následuje 35 cyklů 95 °C 40 s, 50 °C 40 s a 72 °C 40 s, a finální elongace při 72 °C 7 minut.

30 *Kontrola detekce*

Pro ověření detekce je možné PCR produkty vzniklé amplifikací v termocykleru separovat na agarózovém gelu (1,2 %) s přidavkem fluorescenčního barviva, po dobu cca 1 hodiny při napětí 100 V. Na transiluminátoru pak lze vizualizovat vzniklé PCR produkty o velikosti 169 pb.

*Purifikace PCR produktu*

PCR produkt je nutno purifikovat, např. kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel).

*Příprava knihoven pro masivně paralelní sekvenování DNA (High-throughput sequencing)*

Purifikovaný PCR produkt je vhodný k sekvenaci masivně paralelním způsobem. Příprava genomové knihovny je založena na technologii Nextera XT, která umožňuje sekvenaci ampliconů a celých genomů mikroorganismů. Finální knihovna je třeba zkontrolovat pomocí např. High Sensitive DNA kit (Agilent Technologies) a stanovit koncentrace. Knihovna je následně připravena ve finální koncentraci 1,8 pM roztoku.

*Sekvenování*

Připravené knihovny byly osekvenovány pomocí kitu MiniSeq Mid Output Kit (300-cycles) na přístroji MiniSeq (Illumina). K sekvenování takto připravených knihoven lze použít i jiné přístroje využívající technologii sekvenace syntézou, jejich využití je však finančně nákladnější.

*Výsledky*

K výchozímu zpracování dat získaných sekvenací vzorku A7\_M1 (číslo genomu v NCBI: JAUZED000000000, BioProject č. PRJNA100042) byl použit vzorek z kontaminované explantátové kultury podnože GF677 v laboratoři Mendeleum – ústav genetiky, ZF MENDELU. Pro bioinformatické zpracování PCR ampliconů získaných navrženými primery byl využit software CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Pro klastrování byl využit online nástroj SCATA (<https://scata.mykopat.slu.se/>) a pro finální identifikaci rodu patogenu byl využit BLASTN (NCBI, National Center for Biotechnology Information).

*Ověření metody*

Byla provedena také klasická izolace bakterie rodu *Curtobacterium* na Petriho misky, které byly morfologicky a markerově identifikovány pomocí Sangerova sekvenování genu ITS (internal transcribed spacer) s následným porovnáním sekvencí s databází NCBI.

*Výsledky*

Byl testován roztok DNA, který byl odebrán z kontaminovaných explantátových kultur. Celkem bylo získáno 3 529 064 identifikačních čtení, po sloučení párových čtení bylo získáno 2 701 430 čtení, dále byly odstraněny duplikované sekvence a výsledný počet činil 1 350 715 identifikačních čtení. 1 319 167 identifikačních čtení bylo přiřazeno k rodu *Curtobacterium*, resp. k sekvenci genu, který kóduje protein „*metal-dependent transcriptional regulator*“. Průměrné pokrytí sekvenovaného regionu, tzv. coverage, bylo 277 098 nukleotidů na konkrétní pozici. Šíření těchto závažných kontaminantů explantátových kultur plodin lze zabránit pouze používáním prostého množitelského materiálu a včasným odstraňováním infikovaných kultur z provozu.

Průmyslová využitelnost

Popsanou reakční směs pro precizní detekci bakterií rodu *Curtobacterium* na dvoukanálovém sekvenátoru je možné dodávat diagnostickým laboratořím jako kit. Zavedením tohoto inovovaného postupu diagnostiky lze precizně detekovat tyto bakterie v provozech využívajících explantátové kultury, ale i v DNA získané z jiných prostředí. Tímto způsobem je také možné identifikovat infikované rostliny na poli (v sadech) a rovněž detekovat infekci ještě před započatím množitelského procesu u již infikovaných matečných rostlin a předejít tak významným ztrátám v produkci, protože kontaminantů se v provozech explantátových kultur jen velmi těžko zbavuje.

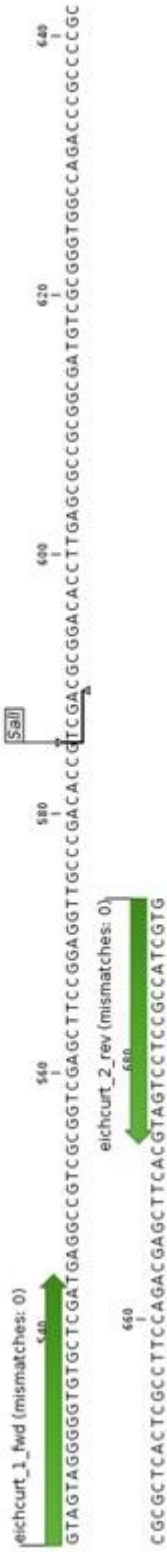
**NÁROKY NA OCHRANU**

1. Sada pro masivně paralelní detekci bakterie rodu *Curtobacterium* na platformě dvoukanálového sekvenátoru, **vyznačující se tím**, že obsahuje kombinaci nukleotidových sekvencí primerů:

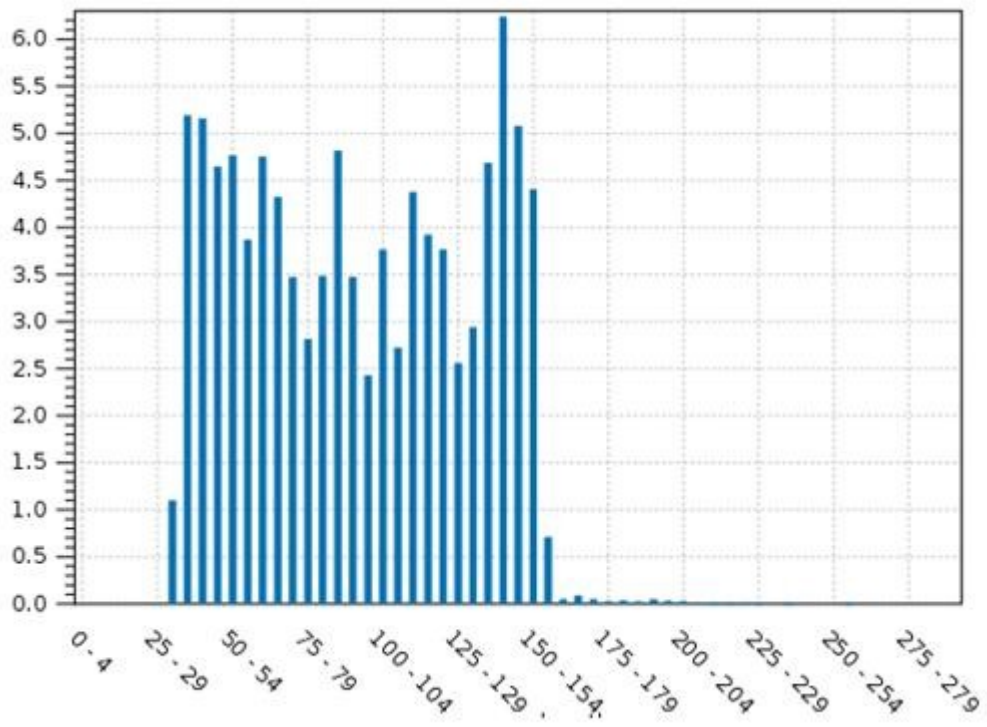
5 forward primer GTAGTAGGGGGTGTGCTCGAT (Sequence Number ID 1)

reverse primer CACGATGGCGGAGGACTAC (Sequence Number ID 2).

2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2