

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 657

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2018.01)
C12Q 1/6844 (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: **2023-41431**
(22) Přihlášeno: **01.11.2023**
(47) Zapsáno: **30.01.2024**

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

(72) Původce:
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ
Ing. Jakub Pečenka, Ph.D., Lednice, CZ
Ing. Jana Čechová, Ph.D., Slavkov, CZ
Ing. Dorota Anna Tekielska, Krakov, PL
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Lednice, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Sada pro molekulární identifikaci
bakteriálních kontaminantů rodu Leifsonia
metodou real-time PCR**

CZ 37657 U1

Sada pro molekulární identifikaci bakteriálních kontaminantů rodu *Leifsonia* metodou real-time PCR

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká sady pro detekci významných kontaminantů tkáňových kultur rodu *Leifsonia* metodou real-time PCR.

10

Dosavadní stav techniky

Bakterie rodu *Leifsonia* 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. Při jejich přemnožení v explantátové kultuře však mohou v důsledku kompetice o živiny a působením na vnitřní environment negativně ovlivňovat růst a kvalitu explantátů. Pro kvalitní a citlivou detekci existují pouze metody založené na PCR. Existuje také detekční způsob založený na izolaci těchto bakterií a na základě morfologie, následně je pomocí Sangerova sekvenování markerových genů určen patogen či endofyt porovnáním sekvencí s databázemi. Tímto způsobem lze identifikovat patogeny a bakteriální kontaminanty porovnáním jejich 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 kontaminanty ve vzorku. Navrhovaná metoda detekce bakterií rodu *Leifsonia* s využitím metody real-time PCR představuje vysoce precizní způsob detekce. Metoda poskytuje dostatečnou efektivitu, citlivost a zároveň rychlost detekce.

Podstata technického řešení

30 Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro real-time PCR metodu zaměřenou na detekci kontaminujících bakterií rodu *Leifsonia* vyznačující se tím, že obsahuje set oligonukleotidových primerů a TaqMan sondy pro specifickou detekci kontaminujících bakterií rodu *Leifsonia*:

35 forward primer: AAGGAGCATCTGGCACCC
reverse primer: GATGTCCTTCTCGTTCTC
TaqMan sonda: GGTCGAGAGCATCCGCGAC (FAM -BHQ1)

40 pro amplifikaci části unikátní sekvence genu „*sugar phosphate isomerase/epimerase family protein*“ bakterie *Leifsonia* sp. o velikosti 144 bp. Uvedené primery lze s výhodou využívat v mastermixu 2× HoTaq Real-Time PCR kit (MCLAB) spolu s nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s DNA izolovanou z infikované explantátové kultury, většinou jde o mix bakteriálního biofilmu s částí infikované rostliny z explantátové kultury. Navrhovaná metoda detekce bakteriálního kontaminantu rodu *Leifsonia* prostřednictvím real-time PCR představuje
45 rychlý, nenáročný způsob detekce vyznačující se vysokou specifitou a senzitivitou.

Objasnění výkresů

50 Obr. 1: Uvedená sekvence zobrazuje amplifikovaný fragment genu *sugar phosphate isomerase/epimerase family protein* v rámci genomické sekvence kontaminantu/bakterie rodu *Leifsonia*. Velikost fragmentu je 144 pb (párů bází). Cílová oblast hybridizace primerů a TaqMan sondy je vysoce specifická pro bakteriální kontaminant rodu *Leifsonia*. Na obrázku jsou vyznačeny pozice hybridizace pro forward primer (eichleif_1_fwd, Sequence ID 1), TaqMan sondu (eichleif_taq, Sequence ID 3) a reverse primer (eichleif_2_rev, Sequence ID 2).

Příklady uskutečnění technického řešení

První krok představuje 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.

Uvedené primery a sondy lze s výhodou využívat v Mastermixu s HoTaq Real-Time PCR Kitem a nukleáz prostou vodou. Reakční směs se smíchá s templátovou DNA extrahovanou ze směšného vzorku explantátové kultury. Metoda je citlivější a rychlejší než metody založené na klasické PCR.

Detekce bakteriálních kontaminantů rodu *Leifsonia* metodou real-time PCR

Extrakce DNA z explantátové kultury – biofilm, část rostliny

Z části napadené explantátové kultury se odebere biofilm a pletiva o hmotnosti 50 až 100 mg, a z tohoto množství se pak přímo extrahuje DNA pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) podle instrukcí výrobce.

Detekce patogenů metodou real-time PCR v duplexním provedení

Pro samotnou detekci byly použity primery a sonda podle předkládaného technického řešení:

Název	Označení	Sekvence (5'-3')
forward primer	eichleif_1_fwd	AAGGAGCATCTGGCACCC (Sequence ID 1)
reverse primer	eichleif_2_rev	GATGTCCTTCTCGTTCTC (Sequence ID 2)
TaqMan sonda	eichleif_taq	GGTCGAGAGCATCCGCGAC (FAM-BHQ1) (Sequence ID 3)

Reakce byla prováděna s použitím mastermixu o následujícím složení:

Reagencie	Množství
2× HoTaq Real-Time PCR Kit	10,0 µl
Nukleáz prostá voda	6,0 µl
forward primer (eichleif_1_fwd) (ID 1) 10µM	0,8 µl
reverse primer (eichleif_2_rev) (ID 2) 10µM	0,8 µl
TaqMan sonda (eichleif_taq) (ID 3) 10µM	0,2 µl
Templát (DNA) 0,5 až 5,0 µg	2,0 µl

Teplotní profil pro Real-time instrument

Reakce probíhala v přístroji qTower³ (Analytik Jena). Teplotní profil pro reakci: úvodní denaturace při 95 °C po dobu 3 minuty, následuje 40 cyklů 95 °C 40 s, 50 °C 40 s a 72 °C 40 s.

Kontrola detekce

V představeném technickém řešení dochází ke kontrole detekce DNA bakteriálního kontaminantu generováním fluorescenčního signálu, který přímo monitoruje přístroj pro real-time PCR. Pro ověření detekce je možné PCR produkty vzniklé amplifikací v real-time PCR termocyklu separovat na agarózovém gelu (1,2 %) s přídavkem fluorescenčního barviva, po dobu cca 1 hodiny při napětí 100 V. Na transiluminátoru pak lze vizualizovat vzniklé PCR produkty a potvrdit přítomnost na základě jejich velikosti. Produkt o velikosti 144 bp je typický pro amplifikovaný úsek genu „sugar phosphate isomerase/epimerase family protein“ bakterie *Leifsonia* sp. o velikosti 144 bp.

Výsledky

- Byly testovány vstupní vzorky DNA 8 různých typů, každý z nich byl použit ve třech ředěních (neředěný, ředěný 10× a ředěný 100×). Vstupní vzorky DNA jsou popsány v tabulce 1 níže. Bakteriální kultury rodů *Leifsonia*, *Roseomonas*, *Curtobacterium*, *Methylobacterium* a *Luteibacter* byly získány z kontaminovaných explantátových kultur kultivovaných na DKW/Juglans mediu. Tyto meristémové kultury byly podnože Gisela 5 umístěné v laboratoři Mendeleum – ústav genetiky, ZF MENDELU. Dále byly v experimentu použity vzorky DNA jako negativní kontrola, DNA extrahovaná ze dřeva révy vinné, ze dřeva slivoně a kontrola bez templátové DNA.

Tab. 1: Výsledky detekce s použitými koncentracemi DNA a Ct hodnotami.

Vzorek DNA	Koncentrace ng.μl ⁻¹	Ct (threshold cycle)
Leifsonia_M4	273,09	25,77
Leifsonia_M4	27,3	29,78
Leifsonia_M4	2,73	34,65
Roseomonas_M10	56,03	-
Roseomonas_M10	5,6	-
Roseomonas_M10	0,56	-
Curtobacterium_M15	228,37	-
Curtobacterium_M15	22,83	-
Curtobacterium_M15	2,28	-
Methylobacterium_M18	48,48	-
Methylobacterium_M18	4,84	-
Methylobacterium_M18	0,48	-
Luteibacter_M28	134,9	-
Luteibacter_M28	13,49	-
Luteibacter_M28	1,34	-
Réva vinná explantát	96,96	-
Réva vinná explantát	9,69	-
Réva vinná explantát	0,96	-
Dřevo slivoně_1	131,45	-
Dřevo slivoně_1	13,14	-
Dřevo slivoně_1	1,31	-
Dřevo slivoně_2	99,91	-
Dřevo slivoně_2	9,99	-
Dřevo slivoně_2	0,99	-
kontrola bez DNA	0	-
kontrola bez DNA	0	-
kontrola bez DNA	0	-

- Reakce byla optimalizována pro koncentrace bakteriální DNA v rozmezí 2,73 až 273,09 ng.μl⁻¹ s odpovídajícími hodnotami Ct v rozmezí 25,77 až 34,65. Navržený detekční systém byl plně validován pro uvedený bakteriální kontaminant rodu *Leifsonia* v explantátových kulturách *in vitro*. V současnosti neexistuje jednoznačně vymezený protokol k detekci bakterie rodu *Leifsonia*, která infikuje explantátové kultury. Dostupné jsou pouze obecné protokoly k amplifikaci bakteriální 16S RNA, které musí být následně sekvenovány pro ověření přítomnosti konkrétní bakterie.

Průmyslová využitelnost

- 5 Popsanou reakční směs pro precizní a rychlou detekci bakteriálního kontaminantu rodu *Leifsonia* je možné dodávat diagnostickým laboratořím jako kit. Zavedením tohoto inovovaného postupu diagnostiky významně kontaminující bakterie lze precizně detekovat bakterii rodu *Leifsonia* v explantátových kulturách či přímo v rostlinných pletivech. Tímto způsobem je možné identifikovat infikované rostliny v sadech a rovněž detekovat infekci ještě před převedením do *in vitro* kultur a předejít tak významným ztrátám v produkci.

10

NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada pro detekci bakteriálního kontaminantu explantátových kultur rodu *Leifsonia* metodou real-time PCR, **vyznačující se tím**, že obsahuje:

5 set pro detekci rodu *Leifsonia*:

forward primer o sekvenci AAGGAGCATCTGGCACCC (Seq ID 1)

reverse primer o sekvenci GATGTCCTTCTCGTTCTC (Seq ID 2)

TaqMan sondu o sekvenci GGTCGAGAGCATCCGCGAC (Seq ID 3).

10 2. Sada podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je sonda označena kombinací fluoroforu FAM a zhášedce BHQ1.

1 výkres



Obr. 1