



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115774** (13) **U**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 11624	(72) Винахідник(и): Кітам Володимир Олегович (UA), Літовченко Олександр Вікторович (UA), Коробка Вадим Леонідович (UA), Шевченко Любов Миколаївна (UA), Шевченко Тетяна Вікторівна (UA), Янковський Дмитро Станіславович (UA), Димент Галина Семенівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.11.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2017, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ФІРМА "О.Д. ПРОЛІСОК", вул. Софіївська, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл., 08671 (UA)

(54) СПОСІБ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВИДОВОГО СКЛАДУ БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ СПЕЦИФІЧНИХ ПРАЙМЕРІВ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

(57) Реферат:

Спосіб якісного та кількісного визначення видового складу багатокомпонентного бактеріального препарату містить представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter*, за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. Визначають склад бактеріального препарату на рівні видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* та *Acetobacter aceti*, при цьому використовують праймери: *L.aciF* 5'-TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC-3' та *L.aciR* 5'-CCTTCCCTCACGGTACTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гену 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) довжиною 207 пар нуклеотидів; *L.casF* 5'-GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' та *L.casR* 5'-TGATCTCTCAGGTGATCAAAA-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гену рибосомальної РНК (rRNA) *Lactobacillus casei* довжиною 1200 пар нуклеотидів.

UA 115774 U

Корисна модель належить до мікробіології та біотехнології й може бути використана для якісного та кількісного визначення вмісту бактерій видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* та *Acetobacter aceti* у складі багатокомпонентних бактеріальних препаратів, зокрема мультикомпонентних пробіотиків, методом полімеразної ланцюгової реакції.

Розширення асортименту мультикомпонентних пробіотиків потребує постійного якісного та кількісного контролю їх складу. Стандартні мікробіологічні підходи, такі як виділення окремих культур та ідентифікація їх таксономічного положення на основі вивчення морфологічних та біохімічних властивостей, не завжди дають можливість кількісно оцінити вміст різних компонентів у складі мультисимбіозу. Необхідно відмітити, що такі методи є відносно часо- та працезатратними. Використання сучасних методів, заснованих на детекції та ідентифікації послідовностей ДНК із використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), дозволяє значно прискорити таксономічну ідентифікацію складових мікробних консорціумів. Крім цього одна з модифікацій цього методу кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (ПЛР-РЧ) дозволяє проводити не тільки якісний, але й кількісний аналіз складових мультисимбіозів.

Полімеразна ланцюгова реакція базується на багатократному виборчому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів *in vitro* (в штучних умовах) (Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. - 1988. - Т. 239. - Р. 487-491). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє задані умови, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в зразку, що досліджується, навіть в надзвичайно малих концентраціях. Така вибірковість та специфічність ПЛР досягається завдяки ретельно підібраним праймерам (зазвичай короткі, хімічно синтезовані молекули ДНК довжиною 20-30 нуклеотидних залишків), які обмежують з двох боків послідовність, що розмножується/копіюється/ампліфікується.

На сьогодні метод ПЛР широко використовується для ідентифікації та детекції видоспецифічних генів.

Відомо способи ідентифікації представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter* методами ПЛР, що базуються в основному на ампліфікації специфічних ділянок кластеру генів, які кодують 5S, 16S, 23S субодиниці бактеріальної рибосоми, спейсери між ними та ген *lacZ* (Hyuk-Sang Kwon, Eun-Hee Yang, Seung-Hun Lee, Seung-Woo Yeon, Byung-Hwa Kang, Tae-Yong Kim. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 2005. - Т. 250, 1. - Р. 55-62); (Markiewicz L., Biedrzycka E. Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages // *Pol. J. Food Nutr. Sci.* - 2005. - 14/55, № 4. - Р. 359-365); (Tokunaga R, Tanaka H., Hashiguchi K., Nagano M., Arakawa T., Tokunaga M. Rapid detection of acetic acid bacteria in the traditional pot-fermented rice vinegar Kurozu // *Food Sci. Technol. Res.* - 2009. - 15, № 6. - Р. 587-590.). (Lick S., Keller M., Bockelmann W., Heller K. J. Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene // *System. Appl. Microbiol.* - 1996. - 19. №. - Р. 74-77.); (Blajotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F., Andolfi R. 16S-23S rDNA inter-genic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolosus* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis // *System. Appl. Microbiol.* - 2002. - 25. N. - Р. 520-527.); (Tilsala-Timisjarvi A., Alatossava T. Characterization of the 16S-23S and 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of dairy propionibacteria and their identification with species-specific primers by PCR // *Int. J. Food Microbiol.* - 2001. - 68, N. - Р. 45-52.).

Відомі способи базуються в основному на ампліфікації специфічних ділянок кластеру генів, які кодують 5S, 16S, 23S субодиниці бактеріальної рибосоми, спейсери між ними. Висока консервативність рибосомального кластеру генів дозволила розробити праймери для ідентифікації не тільки окремих видів та підвидів, але й загалом родів пробіотичних бактерій. В той же час така консервативність може спричинювати появи хибно-позитивних результатів для деяких штамів, а різна копіюваність цих генів не тільки у різних видів, але й у різних штамів не дозволяють використовувати їх для достовірного аналізу кількості бактеріальних клітин у дослідних зразках.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб визначення наявності ДНК пробіотичних бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* і *Acetobacter*, який базується на полімеразній ланцюговій реакції, використовуючи праймери до ділянки одного з генів рибосомального оперону, що кодує синтез 16S субчастинки рибосомальної РНК (Янковский Д.С., Заец В.Н., Зварич В.А., Китаєв В.О., Дымєнт Г.С. Использование метода полимеразной цепной реакции для идентификации бактериального состава мультикомпонентных пробиотиков // Современная педиатрия. - 2012. - № 6. (46). - С. 65-68. - прототип). До недоліків вказаного способу слід віднести високу консервативність гена 16S рРНК, що може призводити до неспецифічного зв'язування цих праймерів із геном 16S рРНК інших представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter*. Крім того необхідно відмітити різну копіюваність даного гена не лише у представників різних видів, але й штамів цього роду. Це часто ускладнює, а подекуди й унеможливорює проведення видової ідентифікації та точного кількісного аналізу вмісту бактерій.

Задачею корисної моделі є створення способу якісного та кількісного визначення видового складу багатокомпонентних бактеріальних препаратів, що містять представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter* за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення якісного та кількісного складу багатокомпонентного бактеріального препарату, що містить представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter* за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу, згідно з корисною моделлю, визначають склад бактеріального препарату на рівні видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* та *Acetobacter aceti*, при цьому для виду *Lactobacillus acidophilus* використовують праймери L.aciF 5'-TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC-3' та L.aciR 5'-CCTTTCCCTCACGGTACTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) довжиною 207 пар нуклеотидів; для виду *Lactobacillus casei* БКПМ В-5724 використовують праймери L.casF 5'-GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' та L.casR 5'-TGATCTCTCAGGTGATCAAAA-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена рибосомальної РНК (rRNA) *Lactobacillus casei* довжиною 1200 пар нуклеотидів; для виду *Lactobacillus gasseri* ІМБ В-7135 використовують праймери L.gasF 5'-GAGTGCGAGAGCACTAAAG-3' та L.gasR 5'-CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянки генів транспортної та 23S рибосомальної РНК (tRNA та 23S rRNA) довжиною 198 та 423 пари нуклеотидів відповідно; виду *Lactobacillus helveticus* ІМБ В-7115 використовують праймери L.helF 5'-GAAGTGATGGAGAGTAGAGATA-3' та L.helR 5'-CTCTTCTCGGTGCGCTTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянки генів транспортної та 23S рибосомальної РНК (tRNA та 23S rRNA) довжиною 179 та 429 пар нуклеотидів відповідно; для виду *Lactobacillus salivarius* використовують праймери L.salF 5'-ATTCACCTCGTAAGAAGT-3' та L.salR 5'-CGACGACCATGAACACCTGT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) довжиною 993 пари нуклеотидів; для виду *Lactobacillus rhamnosum*, який базується на полімеразній ланцюговій реакції, використовували праймери L.rhaF 5'-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3' та L.rhaR 5'-GCGATGCGAATTTCTATTATT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянки генів 23S та 16S рибосомальної РНК (23S та 16S rRNA) довжиною 186 та 399 пар нуклеотидів відповідно; для виду *Lactobacillus plantarum* використовують праймери L.plaF 5'-GCCGCTAAGGTGGGACAGAT-3' та L.plaR 5'-TTACCTAACGGTAAATGCGA-3', які дозволяють ампліфікувати 2 ділянки гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) довжиною 283 та 512 пар нуклеотидів; для виду *Lactobacillus fermentum* використовують праймери L.ferF 5'-AAGAATCAGGTAGTCGAAGTG-3' та L.ferR 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCTC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) довжиною 147 пар нуклеотидів; для виду *Lactobacillus brevis* використовують праймери L.breF 5'-TTTGACGATCACGAAGTGACCG-3' та L.breR 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCTC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) довжиною 495 пар нуклеотидів; для виду *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* використовують праймери L.bulgF 5'-GCTCAACTCCTCATCAACCGGGCC-3' та L.bulgR 5'-CGCCGCCCGGGTGAAGGTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена АТФ-залежної хелікази довжиною 687 пар нуклеотидів; для виду *Bifidobacterium bifidum* ІМБ В-7113

використовують праймери B.bifF 5'-ACAAGAGCTGGCTTGAAGGAGTCGTA-3' та B.bifT 5'-ATGTAGGATTCTCTGAGCCAGATCG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена білка ініціації реплікації хромосоми DnaA 304 пари нуклеотидів *Bifidobacterium bifidum*; для виду *Bifidobacterium longum* використовують праймери B.lonF 5'-TTTCTATTGAACAGACACAGGTTTGCCC-3' та B.lonR 5'-AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку CRISPR-повтору довжиною 268 пар нуклеотидів; для виду *Bifidobacterium adolescentis* використовують праймери B.adoF 5'-GTGGCTGATAACACGACAACAGATCC-3' та B.adoR 5'-TTTTGAAGGCGGGAAGATGTCCT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена білка ініціації реплікації хромосоми 268 пар нуклеотидів; для виду *Bifidobacterium breve* використовують праймери B.breF 5'-CCGGATGCTCCATCACAC-3' та B.breR 5'-ACAAAGTGCCTTGCTCCCT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) довжиною 288 пар нуклеотидів; для виду *Bifidobacterium longum subsp. infantis* використовують праймери B.infR 5'-GCAAGGCACTTTGTGTTGAG-3' та B.infR 5'-AAGAACGAGGAATCAAAGGAAACC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) *Bifidobacterium longum subsp. infantis* довжиною 1399 пар нуклеотидів; для виду *Propionibacterium acidopropionici* ВКПМ В-5800 використовують праймери Pr.acF 5'-CTGGAAGCTGGCCGTCG-3' та Pr.acR 5'-CTTGCAACACAACACATTAC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) довжиною 304 пари нуклеотидів; для виду *Lactococcus lactis* ВКПМ В-5725 використовують праймери LacF 5'-GTACTTGTACCGACTGGA-3' та LacR 5'-GGGATCATCTTTGAGTGAT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) довжиною 163 пари нуклеотидів; для виду *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ВКПМ В-5388 використовують праймери Str.termF 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3' та Str.termR 5'-CGAACAGCATTTGATGTTA-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена бета-галактозидази довжиною 968 пар нуклеотидів; для виду *Acetobacter acetii* ВКПМ В 5495 використовують праймери AcetF 5'-TGGTACGGCATTCGGG-3' та AcetR 5'-ACGCTCAATGGACCACTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена алкоголь-дегідрогенази довжиною 285 пар нуклеотидів.

Порівняльний аналіз вибраних олігонуклеотидних праймерів здійснювали за допомогою програми Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) для виключення фрагментів гомологічних до ДНК споріднених та неспоріднених видів. Геномний аналіз проводився за повними послідовностями геномів бактерій, доступних в GenBank, на основі гомології до нуклеотидної послідовності генів молочнокислих бактерій за допомогою програми Blast.

Спосіб здійснюють таким чином: із відібраного зразка виділяють ДНК (лужний лізис із подальшим спиртовим осадженням чи будь-який відповідний набір для виділення ДНК з бактеріальних клітин), готують стандартну суміш для ПЛР-«реального часу» із додаванням *ZubGreenI* чи *SybrGreen* (відповідно до інструкцій виробника реактивів), проводять реакцію, використовуючи будь-який ампліфікатор, який підтримує ПЛР-РЧ та дозволяє знімати показники флуоресценції для *SybrGreen* чи *FAM*. Кількісний аналіз отриманих даних проводять за допомогою стандартної кривої (будується для кожного конкретного штаму окремо) чи відносно паралельної реакції із додаванням зразка ДНК, отриманої із відомої кількості клітин (розраховується за формулою:

$$\text{Кількість клітин у зразку} = \text{кількість клітин у контролі} * 2^{-(Ct(\text{зразку}) - Ct(\text{контролю}))},$$

де Ct - це цикл ПЛР в реальному часі, на якому проходить статистично достовірне збільшення флуоресценції по відношенню до базового рівня флуоресценції.

Запропонований спосіб може бути застосовано при дослідних та виробничих роботах з ідентифікації та оцінки кількості пробіотичних бактерій видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* та *Acetobacter acetii* у бактеріальних препаратах, заквасках та ферментованих харчових продуктах за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

Корисна модель пояснюється прикладом.

Приклад. Визначення якісного та кількісного вмісту пробіотичних бактерій за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції реального часу у складі мультипробіотика серії «Симбітер», що містить бактерії видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*,

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum subsp. infantis, Propionibacterium acidopropionici, Lactococcus lactis, Streptococcus salivarius ssp. thermophilus та Acetobacter aceti. Точну кількість клітин пробіотичних бактерій паралельно оцінювали мікробіологічними методами. ДНК виділяли з чистої культури та її розведень в 2 та 10 раз відповідно. Для цього 1 мл мультипробіотика та його відповідних розведень осаджували центрифугуванням протягом 10 хв при 13 тис. об. за допомогою мікроцентрифуги "MiniSpin" (Eppendorf, Німеччина). Далі проводили лізис осаджених клітин за допомогою лізуючого буферу "BQ1" (Macher-Nagel, Германія), відповідно до інструкцій виробника. Готову ДНК з освітленого лізату виділяли методом спиртового висолювання. Якість та чистоту отриманої ДНК оцінювали за допомогою спектрофотометра "Cary50 Scan" (Varian, Австралія). Для проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу використовували термостабільну Taq ДНК полімеразу, відповідний 2,5х ПЛР-буфер (вже містив 25 mM MgCl₂ та їх ZUBRGreen), розчини чотирьох дезоксирибонуклеотидтрифосфатів в об'ємі:

2,5х буфер	10 мкл
dNTP 2,5 mM	2,5 мкл
Taq	2,5 мкл
Праймер Forward	2 мкл
Праймер Reverse	2 мкл
ДНК проба	6 мкл

ПЛР-РЧ проводили за допомогою приладу "ДТ-322" (ДНК-Технологія, Росія) з відповідним програмним забезпеченням.

Параметри:

- початкова стадія денатурації ДНК при 94 °C впродовж 5 хвилин;
- 50 циклів, які складаються з:
 - етапу при 94 °C впродовж 30 секунд,
 - етапу при 58 °C впродовж 30 секунд,
 - етапу при 72 °C впродовж 1 хвилини 30 секунд;
 - кінцева стадія елонгації при 72 °C впродовж 5 хвилин.
- «Крива плавлення», яка складається з 80 циклів зменшення температури на 0,5 °C з 94 °C до 54 °C по 30 с.

Полімеразну ланцюгову реакцію «реального часу» (Фіг.1) проводили з різними праймерами, специфічними до таких видів пробіотичних бактерій:

1. Lactobacillus acidophilus
2. Lactobacillus casei
3. Lactobacillus gasseri
4. Lactobacillus helveticus
5. Lactobacillus salivarius
6. Lactobacillus rhamnosum
7. Lactobacillus plantarum
8. Lactobacillus fermentum
9. Lactobacillus brevis
10. Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus
11. Bifidobacterium bifidum
12. Bifidobacterium longum
13. Bifidobacterium adolescentis
14. Bifidobacterium breve
15. Bifidobacterium longum subsp. infantis
16. Propionibacterium acidopropionici
17. Lactococcus lactis
18. Streptococcus salivarius ssp. thermophilus
19. Acetobacter aceti

З кожної реакції відбирали по 10 мкл кінцевого продукту ПЛР і аналізували шляхом електрофорезу в агарозному гелі (Фіг. 2). Для розділення фрагментів ДНК, отриманих під час проведення ПЛР, використовується 2 % агарозний гель, який містить бромистий етидій для фарбування ампліконів і подальшої візуалізації результатів під дією ультрафіолетових променів.

Графіки залежності «Точки перетину» Cp від кількості клітин в 1 мл зразка наведено на Фіг. 3 та 4. Формули перерахунку кількості клітин кожного виду, що досліджується, наведено в таблиці.

Фіг. 1. Графік залежності рівня флуоресценції від номеру циклу в ПЛР «реального-часу» із використанням праймерів специфічних до: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* та *Acetobacter aceti*.

Фіг. 2. Гель-електрофорез продуктів ампліфікації. Показано (по порядку): *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* та *Acetobacter aceti*.

Фіг. 3. Графік залежності C_p від кількості клітин у зразку для *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* та *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Фіг. 4. Графік залежності C_p від кількості клітин в зразку для *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* та *Acetobacter aceti*.

Таблиця

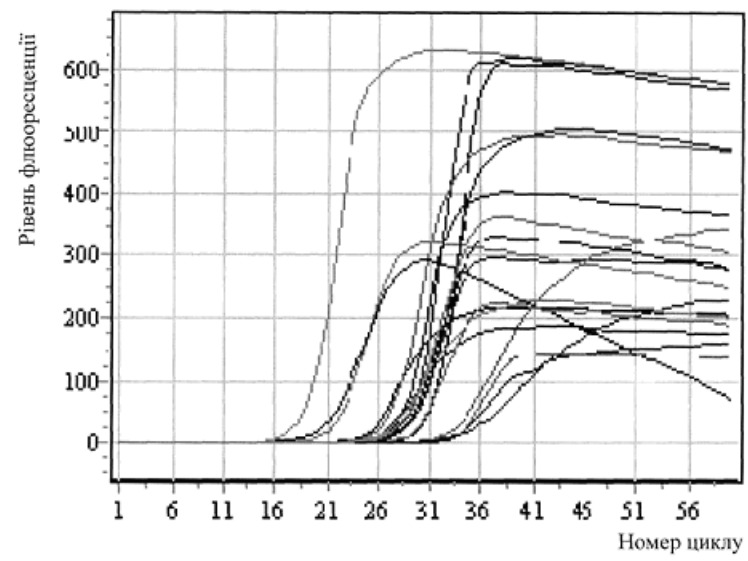
Формули розрахунків кількості клітин в 1 мл зразка для кожного досліджуваного виду/штаму

№ з/п	Вид	Формула розрахунку кількості клітин (N) в 1 мл зразка, відповідно до «Точки перетину» C_p (x)
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$N = -3 \cdot 10^7 \cdot x + 7 \cdot 10^8$
2	<i>Lactobacillus casei</i>	$N = -3 \cdot 10^7 \cdot x + 9 \cdot 10^8$
3	<i>Lactobacillus gasseri</i>	$N = -2 \cdot 10^7 \cdot x + 6 \cdot 10^8$
4	<i>Lactobacillus helveticus</i>	$N = -3 \cdot 10^7 \cdot x + 6 \cdot 10^8$
5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	$N = -3 \cdot 10^7 \cdot x + 6 \cdot 10^8$
6	<i>Lactobacillus rhamnosum</i>	$N = -3 \cdot 10^7 \cdot x + 7 \cdot 10^8$
7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	$N = -2 \cdot 10^7 \cdot x + 6 \cdot 10^8$
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	$N = -3 \cdot 10^7 \cdot x + 8 \cdot 10^8$
9	<i>Lactobacillus brevis</i>	$N = -3 \cdot 10^7 \cdot x + 9 \cdot 10^8$
10	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	$N = -2 \cdot 10^7 \cdot x + 4 \cdot 10^8$
11	<i>Acetobacter aceti</i>	$N = -3 \cdot 10^6 \cdot x + 7 \cdot 10^7$
12	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	$N = -6 \cdot 10^7 \cdot x + 10^9$
13	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$N = -5 \cdot 10^7 \cdot x + 10^9$
14	<i>Bifidobacterium breve</i>	$N = -6 \cdot 10^7 \cdot x + 2 \cdot 10^9$
15	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	$N = -6 \cdot 10^7 \cdot x + 2 \cdot 10^9$
16	<i>Bifidobacterium longum</i>	$N = -6 \cdot 10^7 \cdot x + 10^9$
17	<i>Lactococcus lactis</i>	$N = -10^7 \cdot x + 3 \cdot 10^8$
18	<i>Propionibacterium acidopropionici</i>	$N = -3 \cdot 10^6 \cdot x + 9 \cdot 10^7$
19	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	$N = -2 \cdot 10^7 \cdot x + 6 \cdot 10^8$

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб якісного та кількісного визначення видового складу багатокомпонентного бактеріального препарату, що містить представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* та *Acetobacter*, за допомогою специфічних праймерів методом

полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу, який **відрізняється** тим, що визначають склад бактеріального препарату на рівні видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Propionibacterium acidopropionici*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* та *Acetobacter aceti*, при цьому використовують праймери: *L.aciF* 5'-TGCAAAGTGGTAGCGTAAGC-3' та *L.aciR* 5'-CSTTTCCCTCACGGTACTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) довжиною 207 пар нуклеотидів; *L.casF* 5'-GTGCTGCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' та *L.casR* 5'-TGATCTCTCAGGTGATCAAAA-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена рибосомальної РНК (rRNA) *Lactobacillus casei* довжиною 1200 пар нуклеотидів; *L.gasF* 5'-GAGTGCGAGAGCACTAAAG-3' та *L.gasR* 5'-СТАТТТСААГТТГАГТТТТСТ-3', які дозволяють ампліфікувати ділянки генів транспортної та 23S рибосомальної РНК (tRNA та 23S rRNA) *Lactobacillus gasseri* довжиною 198 та 423 пари нуклеотидів відповідно; *L.helF* 5'-GAAGTGATGGAGAGTAGAGATA-3' та *L.helR* 5'-СТСТТСТCGGTGCGCTTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянки генів транспортної та 23S рибосомальної РНК (tRNA та 23SrRNA) *Lactobacillus helveticus* довжиною 179 та 429 пар нуклеотидів відповідно; *L.salF* 5'-ATTCACTCGTAAGAAGT-3' та *L.salR* 5'-CGACGACCATGAACCACCTGT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) *Lactobacillus salivarius* довжиною 993 пари нуклеотидів; *L.rhaF* 5'-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3' та *L.rhaR* 5'-GCGATGCGAATTTCTATTATT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянки генів 23S та 16S рибосомальної РНК (23S та 16S rRNA) *Lactobacillus rhamnosum* довжиною 186 та 399 пар нуклеотидів відповідно; *L.plaF* 5'-GCCGCTAAGGTGGGACAGAT-3' та *L.plaR* 5'-TTACCTAACGGTAAATGCCA-3', які дозволяють ампліфікувати 2 ділянки гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) *Lactobacillus plantarum* довжиною 283 та 512 пар нуклеотидів відповідно; *L.ferF* 5'-AAGAATCAGGTAGTCGAAGTG-3' та *L.ferR* 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCTC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) *Lactobacillus fermentum* довжиною 147 пар нуклеотидів; *L.breF* 5'-TTTGACGATCACGAAGTGACCG-3' та *L.breR* 5'-GCCTTGAGAGATGGTCCTC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) *Lactobacillus brevis* довжиною 495 пар нуклеотидів; *L.bulF* 5'-GCTCAACTCCTCATCAACCGGGCC-3' та *L.bulR* 5'-CGCCGCCCGGGTGAAGGTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена АТФ-залежної хелікази *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* довжиною 687 пар нуклеотидів; *B.bifF* 5'-ACAAGAGCTGGCTTGAAGGAGTCGTA-3' та *B.bifR* 5'-ATGTAGGATTCCTGAGCCAGATCG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена білка ініціації реплікації хромосоми *DnaA* довжиною 304 пари нуклеотидів; *B.lonF* 5'-TTTCTATTGAACAGACAGGTTTGCCC-3' та *B.lonR* 5'-AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку CRISPR-повтору *Bifidobacterium longum* IMB B-7150 довжиною 268 пар нуклеотидів; *B.adoF* 5'-GTGGCTGATAACACGACAACAGATCC-3' та *B.adoR* 5'-TTTTGAAGGCGGGGAAGATGTCCT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена білка ініціації реплікації хромосоми *Bifidobacterium adolescentis* IMB B-7148 довжиною 268 пар нуклеотидів; *BibreF* 5'-CCGGATGCTCCATCACAC-3' та *BibreR* 5'-ACAAAGTGCCTTGCTCCCT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) *Bifidobacterium breve* IMB B-7132 довжиною 288 пар нуклеотидів; *BiinfR* 5'-GCAAGGCACTTTGTGTTGAG-3' та *BiinfR* 5'-AAGAACGAGGAATCAAAGGAAACC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) *Bifidobacterium longum subsp. infantis* довжиною 1399 пар нуклеотидів; *Pr.acF* 5'-CTGGAAGCTGGCCGTCG-3' та *Pr.acR* 5'-CTTGCAACACAACACATTAC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 23S рибосомальної РНК (23S rRNA) *Propionibacterium acidopropionici* ВКПМ B-5800 довжиною 304 пари нуклеотидів; *LacF* 5'-GТАСТТGTACCGACTGGA-3' та *LacR* 5'-GGGATCATCTTTGAGTGAT-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена 16S рибосомальної РНК (16S rRNA) *Lactococcus lactis* ВКПМ B-5725 довжиною 163 пари нуклеотидів; *Str.termF* 5'-CACTATGCTCAGAATACA-3' та *Str.termR* 5'-CGAACAGCATTGATGTТА-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена бета-галактозидази *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ВКПМ B-5388 довжиною 968 пар нуклеотидів; *AcetF* 5'-TGGTACGGCATTCCGGG-3' та *AcetR* 5'-ACGCTCAATGGACCACTG-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку гена алкоголь-дегідрогенази *Acetobacter aceti* ВКПМ B 5495 довжиною 285 пар нуклеотидів, що дозволяє точно визначити кількість клітин зазначених бактерій у зразках, що досліджуються.



Фиг. 1

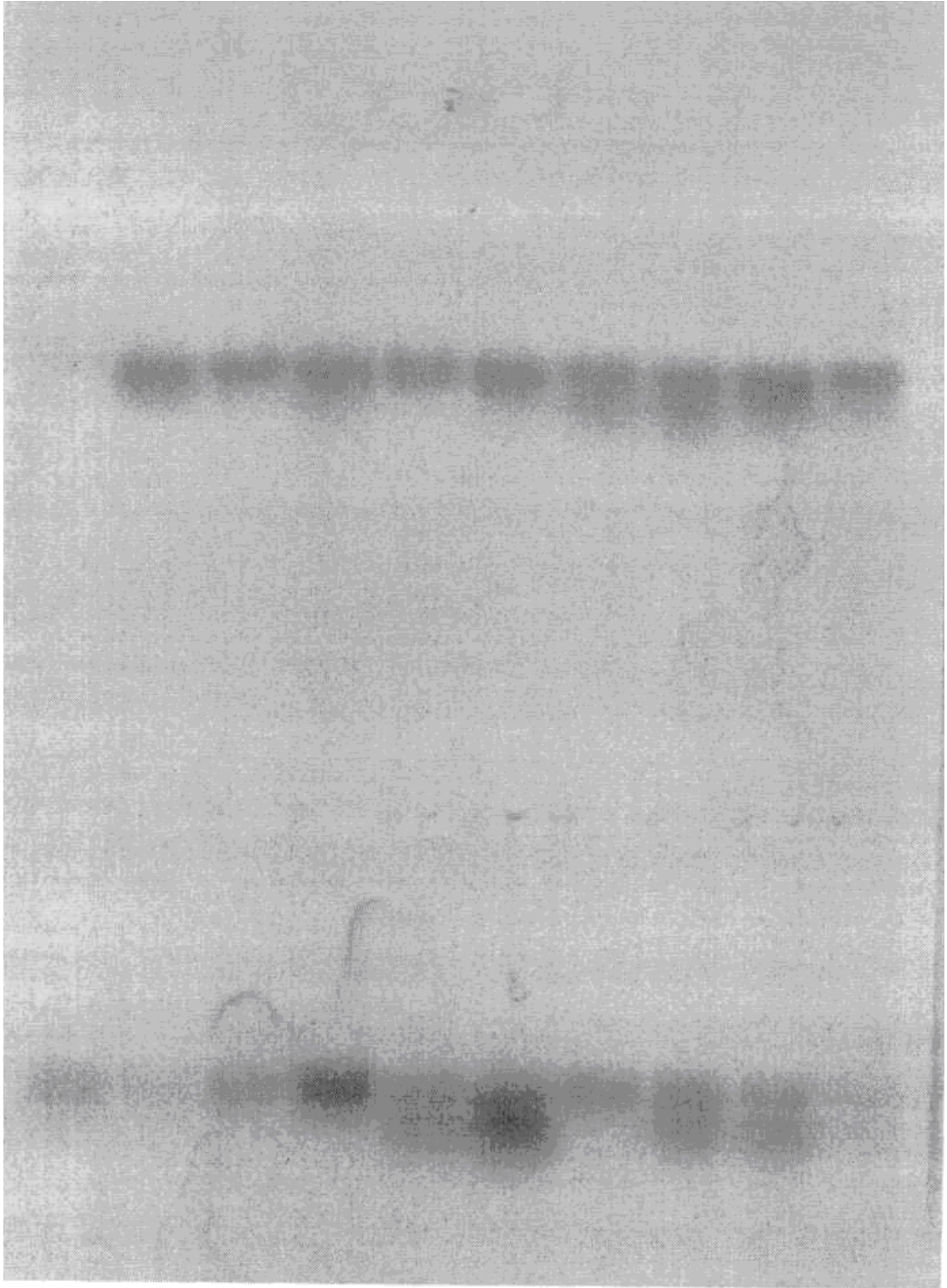
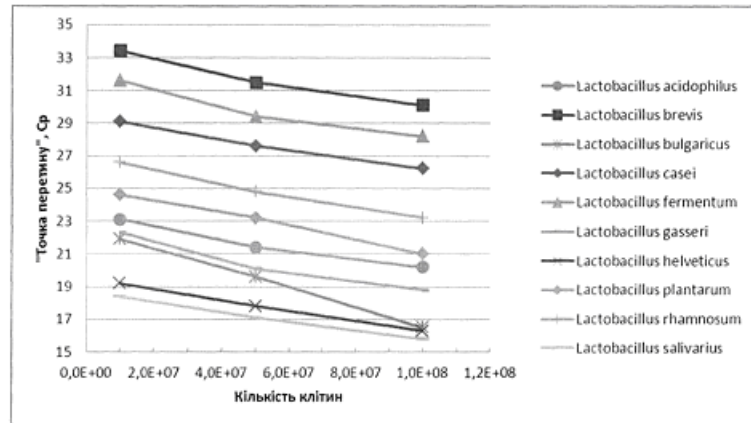
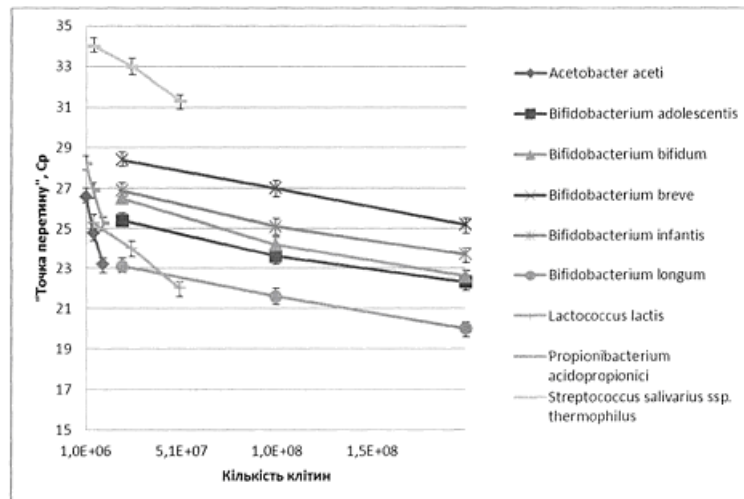


Fig. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601