



УКРАЇНА

(19) UA (11) 33963 (13) U

(51) МПК (2006)

A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ Виявлення збудника вірусного артеріїту коней з родини Arteriviridae у патологічному матеріалі, сироватках крові, культуральній рідині, змивах із носової порожнини та еякуляті (жеребців) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

1

2

(21) u200801077

(22) 29.01.2008

(46) 25.07.2008, Бюл.№ 14, 2008 р.

(72) СИНІЦІН ВІТАЛІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, UA,  
КУЛИКОВА ВЛАДА ВЯЧЕСЛАВІВНА, UA(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, UA

(57) Спосіб виявлення збудника вірусного артеріїту коней з родини Arteriviridae у патологічному матеріалі, сироватках крові, культуральній рідині, змивах із носової порожнини, еякуляті (жеребців), що включає виявлення в досліджуваних зразках специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) за

допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який відрізняється тим, що для проведення ПЛР використовують штучно синтезовані олігонуклеотидні праймери з наступною послідовністю нуклеотидів (праймери):

нуклеотиди мають послідовність:

нуклеотиди першого етапу реакції:

CE (5'TGGTAGGTGCTTCATTGGCT 3')

DE (5'GCGGCAC AAGAACA CTCTG 3')

нуклеотиди другого етапу реакції:

CI (5'CCTGAGACACTGAGTCGCGT 3')

DI (5'CCTGATGCCAC ATGG AATGA 3').

Спосіб виявлення збудника вірусного артеріїту коней з родини Arteriviridae у сироватках крові, культуральній рідині, змивах носової порожнини та патологічному матеріалі, еякуляті (жеребців) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Корисна модель відноситься до ветеринарної медицини, зокрема ветеринарної вірусології.

Аналог корисної моделі - близьким за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється є реакція зв'язування комплементу (РЗК). Принцип реакції полягає а тому, що антитіла приймають участь у зв'язуванні комплементу з вірусними поліпептидами. Недоліком вказаного методу є те, що він тривалий (2 доби), недостатньо чутливий та специфічний. Крім того, в РЗК не можна досліджувати антикомплементарні сироватки крові, які часто зустрічаються.

Найближчим аналогом корисної моделі є найбільш близька за технічним рішенням до винаходу реакція мікронеїтралізації (РМН), що включає змішування двократних розведень сироваток з постійною дозою вірусу, інкубацію суміші протягом 1-2 годин при 37°C, зараження нею чутливих тест-об'єктів (культури клітин у 96-ти лунковому планшеті), спостереження за тест-об'єктами. Результати РН в культурі клітин враховують по цитопатичній дії (ЦПД) на культурі клітин.

Недоліком реакції мікронеїтралізації є те, що результат враховується через 4-5 діб (тривалість реакції), використання значних об'ємів реагентів, великої кількості посуду, трудомісткість.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб виявлення, який би усував перераховані недоліки прототипу і володів новими якісними показниками, а саме: скорочення витрат реагентів, посуду, часу обліку результатів дослідження постановки реакції.

Принцип методу полімеразної ланцюгової реакції був розроблений американським біохіміком Кері Мюллісом, співробітником фірми "Cetus" [Mullis K.B., Fakis F.A., Scaarf S. Et al. // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. - New York, 1986. - P.263-273].

Збудник вірусного артеріїту коней, за даними закордонних досліджень, досить поширений в природі і протягом останніх років кількість випадків, що реєструються досить велика.

Лабораторна діагностика в Україні не проводиться через відсутність розроблених методів діагностики. В зв'язку з цим звертає на себе увагу розробка ефективного і швидкого методу детекції збудника.

Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність і відтворюваність ПЛР.

(13) U

(11) 33963

(19) UA

Задача: створити новий спосіб виявлення збуднику вірусного артеріїту коней з родини Arteriviridae у сироватках крові, культуральній рідині, змивах носової порожнини та патологічному матеріалі, еякуляті (жеребців).

Завдання досягається тим, що в досліджуваних зразках виявляємо специфічні фрагменти нук-

леїнових кислот (кДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції-ПДР - ферментативної реакції і двох пар штучно синтезованих олігонуклеотидів (праймерів), які дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів при температурних і часових параметрах та кількості циклів:

Таблиця

№ пп	Етап	Температура, °С	Експозиція, хвилин	Кількість повторень
1	Пепередня денатурація	95	1	1
2	Денатурація	95	0,4	40
3	Віджиг праймерів	52	0,4	
4	Елонгація	72	1	
5	Фінальна елонгація	72	7	1

Праймери мають послідовність:

Праймери першого етапу реакції:

CE (5'TGGTAGGTGCTTCATTGGCT 3')

DE (5'GCGGCACAAGAACACTTCTG 3')

Праймери другого етапу реакції:

CI (5'CCTGAGACACTGAGTCGCGT 3')

DI (5CCTGATGCCACATGGAATGA 3)

Приклад

Пробу (сироватка крові, носові змиви, біомаса, гомогенат патологічного матеріалу, культура клітин, еякулят) (1гр.) помішують у пластикову пробірку ємкістю 1,5мл і додають 500мкл дистильованої води. Суміш зтрушують і центрифугують, після чого проводимо виділення РНК комерційним набором реагентів «РИБО-золь-А» для виділення РНК. Далі необхідно провести реакцію зворотної транскрипції, а саме: приготувати реакційну суміш, яка містить ліофілізовану RT-mix (Містить випадкові гексануклеотиди), 125мкл РНК-елюента (DEPC-H<sub>2</sub>O), 6мкл ревертази, 10мкл РНК- проби. В отриману в реакції оберненної транскрипції кДНК для наступної постановки ПЛР розвести в 2 рази ДНК-буфером (до 20мкл кДНК додати 20мкл ДНК-буфера). Для проведення реакції зворотної транскрипції використовуємо комерційний комплект "РЕВЕРТА-L-100".

Готуємо реакційну суміш для проведення ПЛР:

Для цього в пробірку ємкістю 0,5мкл помішують 1мкл dNTP-mix, по 0,25мкл пари праймерів першого етапу реакції та 3,5мкл H<sub>2</sub>O, далі віск - 15мкл, 5мкл ПЛР-буферу, 2,5мкл Mg<sup>2+</sup>, 9мкл H<sub>2</sub>O, 0,5мкл Taq-полімерази, 21мкл мінерального масла і 2мкл кДНК вносимо під мінеральне масло.

Переносимо в термоциклер з активною регуляцією температури, наприклад "Терцик" (Росія), якому задаємо вище вказану програму.

Аналогічну реакційну суміш готуємо з парою праймерів другого етапу реакції та проводимо ампліфікацію за вище згаданою схемою.

Аналіз результату ПЛР проводиться в 1,5% гелі агарози з барвником - бромистим етидієм. В лунки атарозного геля вносять 10-12мкл ампліфікованої суміші. Після проведення електрофорезу фрагменти кДНК згруповуються в смужки, які виявляють флуоресцентно при опроміненні ультрафіолетом.

Результат ПЛР може бути оцінений візуально за наявності смужок, що відповідають продуктам реакції.

Промислове застосування - для виявлення вірусу вірусного артеріїту коней з родини Arteriviridae у сироватках крові, культуральній рідині, змивах носової порожнини та патологічному матеріалі, еякуляті (жеребців).