



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114260** (13) **C2**  
(51) МПК**C12N 15/11** (2006.01)**C12Q 1/68** (2006.01)**C12Q 1/04** (2006.01)**C12R 1/225** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

- (21) Номер заявки: **а 2016 06262**
- (22) Дата подання заявки: **09.06.2016**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.05.2017**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.01.2017, Бюл.№ 1**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.05.2017, Бюл.№ 9**
- (72) Винахідник(и):  
**Жукова Ярослава Фрідріхівна (UA),**  
**Вакуленко Микола Михайлович (UA),**  
**Науменко Оксана Василівна (UA),**  
**Мудрак Тетяна Петрівна (UA),**  
**Петров Пилип Ігорович (UA)**
- (73) Власник(и):  
**ІНСТИТУТ ПРОДОВОЛЬЧИХ РЕСУРСІВ**  
**НААН,**  
вул. М. Раскової, 4-а, м. Київ, 02660 (UA)

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
US 2014242672 A1, 28.08.2014  
KR 20040077544 A, 04.09.2004  
RU 2508408 C2, 27.02.2014  
Pelletier Ch. et al. Cell Surface Characteristics of Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, and Lactobacillus rhamnosus Strains / Christophe Pelletier, Christine bouley, Chantal Cayuela, Sylvie Bouttier, Pierre Bourlioux, Marie-Noelle Bellon-Fontaine // APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. - 10 May 1997. - Vol. 63. - № 5. - P. 1725 - 1731  
Bjorneholm S. et al. Enumeration and Identification of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei F19 / Stina Bjorneholm, Annelie Eklow, Maria Saarela, Jaana Matto // Microbial Ecology in Health and Disease. - 2002. - Vol. 3. - P. 7 - 13  
Mori K. et al. Comparative Sequence Analyses of the Genes Coding for 16s rRNA of Lactobacillus casei-Related Taxa / Katsumi Mori, Koji Yamazaki, Tomoharu Ishiyama, Masahito Katsumata, Kayo Kobayash, Yuji Wiwai, Norio Inoue, Haruo Shinan // INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. - Jan. 1997. - Vol. 47. - № 1. - P. 54 - 57  
Ward L.J.H. and Timmins M.J. Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction / L.J.H. Ward and M.J. Timmins // Letters in Applied Microbiology. - 1999. - Vol. 29. - P. 90 - 92  
Coudeyras S. et. al. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain Lactobacillus rhamnosus 35 within the Lactobacillus casei Group // Applied and Environmental Microbiology. - May 2008. - Vol. 74. - № 9. - P. 2679 - 2689  
RU 2375459 C2, 10.12.2009

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КУЛЬТУР LACTOBACILLUS CASEI, LACTOBACILLUS PARACASEI ТА LACTOBACILLUS PARACASEI SUBSP. PARACASEI ЗА ДОПОМОГОЮ ПАРИ СПЕЦИФІЧНИХ ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПРАЙМЕРІВ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ****(57) Реферат:**

Винахід належить до способу визначення культур Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei та Lactobacillus paracasei subsp. paracasei за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції, що використовують при дослідних та виробничих роботах з ідентифікації ДНК культур Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei та Lactobacillus paracasei subsp. paracasei у заквашувальних препаратах та ферментованих харчових продуктах.

UA 114260 C2



Винахід належить до біотехнології, харчової промисловості і може бути використаним для ідентифікації видів *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus paracasei* в заквашувальних препаратах та ферментованих продуктах харчування.

Молочнокислі бактерії, які належать до роду *Lactobacillus* широко використовуються як лікарські пробіотичні препарати для профілактики і лікування діареї і запальних станів, а також як біологічно активні добавки і продукти функціонального харчування для людини і кормові добавки для тварин [1].

Лактобацили - *Lactobacillus*, зокрема види *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* характеризуються високим функціональним потенціалом та широко застосовуються у складі сучасних заквашувальних препаратів для виробництва різноманітних кисломолочних продуктів, таких як: кисломолочні напої, кефір, йогурт, ряжанка, сир тощо. Залучення до раціону харчування таких кисломолочних продуктів дозволяє без використання лікувальних препаратів поліпшити загальний стан здоров'я людини шляхом впливу біологічно активних культур *Lactobacillus* на мікроекологію кишкового тракту, перетравлювання та засвоєння їжі. Основні переваги від споживання функціональних молочних продуктів з *Lactobacillus* полягають у пригніченні кишкових патогенних мікроорганізмів, поліпшенні засвоєння лактози, зниженні рівня холестерину в сироватці крові та стимуляції імунної системи.

Рід *Lactobacillus* об'єднує мікроорганізми - грампозитивні, кислотостійкі, аеротолерантні, факультативно анаеробні та які не утворюють спори. Лактобацили є хемоорганотрофами і ростуть на багатих середовищах, каталазонегативні і утворюють молочну кислоту як кінцевий продукт метаболізму вуглеводів.

На даний час ідентифіковано понад 140 видів лактобацил [2]. Зважаючи на загальний роду для зручності систематизації виділяють кілька філогенетичних груп, кожна з яких об'єднує від кількох до двох десятків видів. Найбільш численні групи *Lactobacillus*: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. sakei* [3].

Основним і найпоширенішим критерієм видової належності лактобацил є їх культуральні, морфологічні та біохімічні властивості. Однак ідентифікація цих мікроорганізмів з використанням лише таких тестів викликає певні труднощі. Зокрема, ідентифікація близькоспоріднених видів *L.rhamnosus*, *L.plantarum*, *L.casei*, *L.paracasei* на основі лише фенотипових характеристик ускладнена через подібність їх властивостей [4]. Сучасні генетичні методи є перспективною альтернативою класичної біохімічної ідентифікації. Активний розвиток методів на основі полімеразної ланцюгової реакції - ПЛР, відкриває нові можливості для швидкої ідентифікації молочнокислих бактерій [5, 6]. ПЛР дозволяє ефективно проводити ідентифікацію та детекцію видоспецифічних генів культур за допомогою підібраних специфічних олігонуклеотидних праймерів [7].

Праймери - синтетичні олігонуклеотиди - короткі фрагменти нуклеїнової кислоти, комплементарні певним послідовностям ДНК або РНК, які ініціюють синтез комплементарного ланцюга за участі ДНК-полімерази. Праймерів має бути два - прямий та зворотний, які обмежують ділянку ДНК, що піддається ампліфікації, тобто чисельному копіюванню. Праймери ініціюють синтез нового ланцюга ДНК, починаючи з 3'-кінця [8].

Використання термостабільних ДНК-полімераз зробило спосіб ПЛР зручним та загальнозживаним. Тепер полімеразна ланцюгова реакція широко використовується для ідентифікації та детекції видоспецифічних генів [9].

Для гена або ділянки ДНК, яка цікавить дослідників, підбирається пара праймерів, за допомогою якої можна провести ампліфікацію ділянки характерної довжини і отримати відповідні амплікони, які ідентифікують розділенням в агарозному гелі методом електрофорезу [10].

Для початкової ідентифікації роду, філогенетичної групи і виду *Lactobacillus* використовують мікробіологічні та біохімічні методи, однак вони дають лише попередні відомості про систематичне положення даного мікроорганізму і часто не дозволяють віднести його до певного виду. Для більш точної ідентифікації мікроорганізмів використовують різноманітні молекулярно-генетичні методи [11].

Ці методи можна поділити на кілька груп:

1. Методи, які не пов'язані з ПЛР: поділ сумарного білка клітин в SDS-PAGE електрофорезі; аналіз рестрикційних фрагментів хромосомної ДНК - RLFP; ДНК-ДНК гібридизація, в тому числі з використанням чипів -comparative genomic hybridization, CGH [12].

2. Методи, засновані на реакції ПЛР: використовуються як випадкові праймери - RAPD, так і праймери для повторюваних послідовностей ДНК - REP-PCR, ERIC-PCR і праймери для певних генів. Як такі гени частіше за інших використовуються гени 16S і 23S рибосомальних РНК і спейсерні ділянки між ними. Використовуються також деякі білок-кодуєчі гени: hsp60 - ген білка

теплового шоку; *dnaK* - ген білка теплового шоку 70 kDa; *groA* - ген  $\alpha$ -субодиниці РНК-полімерази; *tuf* - ген фактору елонгації Tu;  $\beta$ -субодиниці F1F0-АТФ синтази [13, 14, 15].

3. Методи ПЛР, засновані на визначенні нуклеотидної послідовності ДНК: визначення нуклеотидної послідовностей окремих генів, або їх фрагментів рибосомальної РНК і білок-кодуючих генів; визначення одиночних нуклеотидних замін в таких генах - SNP; одночасне визначення нуклеотидної послідовності фрагментів кількох білок-кодуючих генів - MLST [16, 17].

Для ідентифікації виду частіше використовується ПЛР з родоспецифічними і видоспецифічними праймерами, створеними за генами і міжгенними вставками рибосомальних і білок-кодуючих генів, з подальшим аналізом продуктів реакції методом електрофорезу і визначенням їх нуклеотидної послідовності. Для ідентифікації штамової приналежності лактобацил частіше використовуються рестрикційний аналіз ДНК, ПЛР з неспецифічними праймерами - RAPD, REP-PCR, ERIC-PCR, визначення нуклеотидних послідовностей ряду генів - MLST, гібридизація з чипами CGH.

Однак жоден з перерахованих методів не є універсальним, кожен має свої переваги, недоліки, межі застосування і використовується для аналізу конкретних видів або груп видів [18]. Тому існує нагальна потреба залучення нових генів для молекулярно-генетичної ідентифікації лактобацил.

Відомий спосіб детекції *Lactobacillus casei* і та *Lactobacillus paracasei*, що включає синтез олігонуклеотидних праймерів до 16S рРНК, проведення порівняння даного гена з послідовностями, специфічними для *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus paracasei* згідно з базою даних GenBank [19]. Цей спосіб дозволяє ідентифікувати бактеріальні ізоляти на рівні виду. До недоліків даного способу можна віднести необхідність проведення гідролізу і секвенування ампліконів, порівняння кожного з базою даних GenBank, що обумовлює довготривалість і високу вартість процесу тестування [20].

Найбільш близьким способом до винаходу, що заявляється є специфічні праймери на основі вибраного фрагмента ДНК, генетичного маркера - міжгенної ділянки, яка передує оперону F1F0 АТФ синтази - gene *atpD*, product ATP synthase subunit beta, специфічного для *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus paracasei*, із залученням аналізу повних геномів референтних штамів *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus paracasei*, представлених у базі даних GenBank ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank\\_Search.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank_Search.html)). Вибрані фрагменти ДНК було перевірено за допомогою програми BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) [21]. Однак ці праймери не достатньо специфічні та мають високий ступінь самокомплементарності.

Спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції є об'єктом даного винаходу.

Спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції у заквашувальних препаратах та ферментованих харчових продуктах, відповідно до винаходу, для визначення ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* використовують пару олігонуклеотидних праймерів до генетичного маркера - гена *urp*:

прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та

зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Створення нових заквасок та бактеріальних препаратів для виробництва ферментованих харчових продуктів вимагає швидкої ідентифікації молочнокислих бактерій. Одним з найвживаніших мікроорганізмів, які застосовуються у заквашувальних культурах є *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Ідентифікація, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* на рівні фенотипу з використанням стандартних мікробіологічних методів, за біохімічними ознаками з використанням комерційних тест-систем API 50 CH, складна внаслідок гетерогенності бактерій в межах виду, що не завжди дозволяє встановити точне таксономічне положення та отримати цілісну оцінку властивостей *Lactobacillus*.

Для точної детекції та ідентифікації ряду культур роду *Lactobacillus* використовуємо спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР.

Спосіб визначення ДНК за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР використовують для детекції та ідентифікації бактерій *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* на видовому рівні, що

дозволяє ефективно відбирати безпечні і технологічні культури *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* при виробництві заквашувальних препаратів, ферментованих харчових продуктів та здійснювати контролювання їх наявності.

Вибір праймерів ґрунтується на таких критеріях: високий рівень подібності фрагментів ДНК з ДНК штамів культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, вміст основ GC не менше 50 %, не утворення димерів, комплементарність послідовностям ДНК на граничних ділянках фрагмента.

У даному винаході спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ш за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urp* методом полімеразної ланцюгової реакції здійснено підбір пари високоспецифічних олігонуклеотидних праймерів з низьким ступенем самокомплементарності за принципом молекулярної ампліфікації ген-специфічної полімеразної ланцюгової реакції [22].

Спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції у заквашувальних препаратах, ферментованих харчових продуктах та для здійснення контролювання їх наявності, в якому для визначення ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* використовують пару олігонуклеотидних праймерів до гена *urp* урацил фосфорібозилтрансферази, послідовність якого представлена у базі даних GenBank: gene *urp-Uracil phosphoribosyltransferase*, 1318402-1319031=630 bp:

прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культури *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Запропонований спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції застосовують у наукових дослідженнях та виробничих роботах з ідентифікації ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* у заквашувальних препаратах, ферментованих харчових продуктах, здійснюють контролювання їх наявності методом полімеразної ланцюгової реакції.

Для визначення ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* використовують пару специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urp*:

прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Підбір пари праймерів проводять згідно правил молекулярного дизайну. Для підбору праймерів використовують програми Primer, Oligo, тощо, які дозволяють здійснювати багатofакторний аналіз вибраних послідовностей ДНК. Порівняльний аналіз підібраної пари специфічних олігонуклеотидних праймерів здійснюють за допомогою програми Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) для виключення фрагментів гомологічних до ДНК споріднених та неспоріднених видів.

Геномний аналіз проводять за повними послідовностями геномів культур, доступних в GenBank, на основі гомології до нуклеотидних послідовностей генів молочнокислих бактерій за допомогою програми Blast.

Об'єктом дослідження є культури *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* які належать до Cellular organisms > Bacteria > Firmicutes > Bacilli > Lactobacillales > Lactobacillaceae > Lactobacillus > Lactobacillus casei group > Lactobacillus casei / Lactobacillus paracasei [23].

Для визначення ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* вибрано добре вивчений ген *urp* із *Lactobacillus casei* W56, complete genome, який відповідає за синтез білка урацил фосфорібозилтрансферази [22].

За даними GenBank per. № HE970764.1 - фрагмент від 1318402 p до 1319031 p довжиною 630 bp,

Lactobacillus casei W56 complete genome  
GenBank: HE970764.1

```

LOCUS HE970764      3075780 bp      DNA      circular BCT 27-FEB-2015
FEATURES
    source           1..3075780
                     /organism="Lactobacillus casei W56"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="W56"
                     /db_xref="taxon:1215914"

    gene            1318402..1319031
                     /gene="upp"
                     /locus_tag="BN194_13550"

    CDS             1318402..1319031
                     /gene="upp"
                     /locus_tag="BN194_13550"
                     /EC_number="2.4.2.9"
                     /inference="ab initio
                     prediction:GeneMark.hmm,Prodigal_v2.60,
                     glimmer3/rbs_finder,Critica_1.05"
                     /note="Product derived from
                     UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1;Gene name derived from
                     UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1;EC number derived from
                     UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="Uracil phosphoribosyltransferase"
                     /protein_id="CCK22302.1"
                     /db_xref="GI:406358032"
                     /db_xref="EnsemblGenomes-Gn:BN194_13550"
                     /db_xref="EnsemblGenomes-Tr:CCK22302"
                     /db_xref="GOA:K0N4J8"
                     /db_xref="InterPro:IPR005765"
                     /db_xref="InterPro:IPR029057"
                     /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:K0N4J8"
    /translation="MGKFTVLNHP LIQHKLTLIRDKHAGTKEFREIANEIAELMVYEI
    TRDLPLESIEIETPMGKTIQKQLAGKKLAVVPILRAGLGMVDGVLRLIPAAKVGHIGM
    YRDEKTLKPHEYFVKMPPDIEQRDLII VDPMLATGGSANMAIEALKKRGATSMRLVVL
    VAAPEGVKAVQAANPDVDIYAAALDDHLNENGYIVPGLGDAGDR LFGTK"

```

Див. Фіг. 1 "Послідовність гена upp *Lactobacillus casei* W56, complete genome".

Спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції - виконання підбору пари специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена upp:

прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культури *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, тобто:

- прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp діє з 127 p, а
  - зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp діє з 276 p.
- Розмір послідовності: 630 bp.

```

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start   len    tm      gc%    any th    3' th    hairpin seg
LEFT PRIMER 127    20    58.98   55.00    0.00    0.00    0.00 GAAATCACACGGGATCTGCC
RIGHT PRIMER 276    20    59.03   45.00   10.83    0.00    0.00 AATCAGGCGCAAACACCAT
SEQUENCE SIZE: 630
INCLUDED REGION SIZE: 630

```

PRODUCT SIZE: 150, PAIR ANY TH COMPL: 0.00, PAIR 3' TH COMPL: 0.00

```

1 ATGGGCAAATTTACAGTTTTGAATCACCCGTTGATTTCAGCATTAAGCTGACCCTGATTCGGC
61 GACAAGCATGCTGGAACCAAGGAGTTCGCGGAAATCGCCAATGAAATCGCGGAATTAATG
121 GTGTATGAAATCACACGGGATCTGCCACTTGAAAGTATCGAAATTGAGACCCGATGGGT
left primer >>>>>>>>>>>>>>>
181 AAAACTATCCCCAACAGCTTGCTGGCAAGAAGCTTGC GGTTGTTCCAATTTTGC CGCGC
241 GGTTTAGGGATGGTTGATGGTGT TTTGCGCCTGATTCAGCCGCAAAAGTCGGTCACATT
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<< right primer
301 GGCATGTATCGCGATGAGAAGAC CCTTAAACCGCATGAATACTTTGTTAAAATGCCGCG
361 GATATTGAACAACGGGATTTGATCAT TGTTGATCCAATGCTGGCAACTGGCGGATCAGCT
421 AACATGGCCATTGAGGCACTCAAGA AGCGTGGTGCCACATCAATGCGGCTAGTTGTCTTG
481 GTAGCAGCGCCGGAGGGTGTTAAAG CCGTCCAGGCGGCCAATCCAGATGTCGATATCTAT
541 GCGGCAGCGTTAGATGATCATTTGA ACGAAAAATGGCTATATTGTGCCGGGTCTTGAGAT
601 GCAGGCGACAGACTTTTGGGACAAA AATGA

```

Розмір фрагмента: 150 bp

GAAATCACACGGGATCTGCCACTTGAAAGTATCGAAATTGAGACACCGATGGGTAAAACTATCCAA  
AAACAGCTTGCTGGCAAGAAGCTTGCGGTTGTTCCAATTTTGC GCGCGGGTTTAGGGATGTTTGAT  
GGTGTTTTGCGCCTGATT

Див. Фіг. 2 "Підбір праймерів до гена *urp* *Lactobacillus casei* W56, complete genome".

Виконання перевірки пари специфічних олігонуклеотидних праймерів у Спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urr* методом полімеразної ланцюгової реакції:

прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, за допомогою програми BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), див. Фіг. 3 "Перевірка пари праймерів до гена *urp* культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*".

Спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції виконується таким чином:

- вибір генетичного маркера - гена *urp*;
- підбір пари специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urp*;
- перевірка пари специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urp* за допомогою програми BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>);

- перевірка дієвості пари специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urp* методом полімеразної ланцюгової реакції.

Підібрану пару специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urr*: прямий праймер *Lc.pc F* 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та зворотний праймер *Lc.pc R* 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* - використовують за проведення полімеразної ланцюгової реакції.

## Приклад

Перевірка дієвості пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР по визначенню ДНК у заквашувальних препаратах, ферментованих харчових продуктах та здійснення контролювання наявності культур.

- У способі визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції для проведення полімеразної ланцюгової реакції використовували реакційну суміш з термостабільної Taq-полімерази, відповідного десятикратного ПЛР-буферу з  $MgCl_2$ , розчину чотирьох дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, праймерів та проб в об'ємі, мкл:

H <sub>2</sub> O	8,5
Taq-полімераза	0,5
10X буфер з $MgCl_2$ 25 мМ	2
dNTP 0,5 мМ	2
праймер 1F (10 пкМ/мкл)	2,5
праймер 2R (10 пкМ/мкл)	2,5
проба	2,
	25,

10 де:

праймер 1 F Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp - (10 пкМ/мкл) - 2,5 мкл,

праймер 2 R-Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - (10 пкМ/мкл) - 2,5 мкл,

проби об'ємом 2 мкл:

1 - деіонізована вода

- 15 2 - проба ДНК йогурту, який містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*;

3 - проба ДНК бактеріального препарату Danisco TA Lyo 125DCU, який не містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*;

- 20 4 - проба ДНК бактеріального препарату Лактіале, який містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*;

5 - проба ДНК бактеріального препарату Лактуале, який містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Отримали аліквоти № 1-5 об'ємом по 25 мкл для проведення полімеразної ланцюгової реакції.

- 25 Полімеразну ланцюгову реакцію 5-ти аліквот проводили у термоциклері "GeneAmp PCR System 9600" з відповідним програмним забезпеченням. Параметри:

- початкова стадія денатурації ДНК за 95 °C впродовж 2 хвилин;

- 40 циклів ампліфікації, які складаються з:

- 30 - етапу денатурації за 95 °C впродовж 30 секунд,

- етапу відпалювання олігонуклеотидних праймерів за 60 °C впродовж 30 секунд,

- етапу добудови нитки ДНК за 72 °C впродовж 60 секунд;

- кінцева стадія елонгації фрагментів за 72 °C впродовж 5 хвилин.

У кожній з аліквот прикладу використовували пару специфічних олігонуклеотидних праймерів до гена *urp*:

- 35 прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та

зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*,

разом з різними пробами ДНК:

- 40 1 Повна відсутність ДНК у пробі - деіонізована вода, контроль реакційної суміші з праймерами

2 ДНК йогурту, який містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*;

- 45 3 ДНК бактеріального препарату Danisco TA Lyo 125DCU, який не містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* - негативний контроль;

4 ДНК бактеріального препарату Лактіале, який містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*;

5 ДНК бактеріального препарату Лактуале, який містить *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

- 50 Результати полімеразної ланцюгової реакції аліквот № 1-5 наведено в таблиці 1 "Перевірка роботи пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР по визначенню ДНК бактеріальних препаратів".

Амплікони характерної довжини 150 bp специфічного фрагмента ДНК гена *urp* культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* розрізняють після електрофоретичного розділення в агарозному гелі.

Для розділення фрагментів ДНК, отриманих під час ПЛР, проводили електрофорез у 2 % агарозному гелі в трис-ацетат-EDTA буфері, який містив барвник бромистий етидій для фарбування ампліконів і подальшої візуалізації результатів під дією ультрафіолетових променів.

З кожної аліквоти № 1-5 відібрали по 10 мкл і кожну 10 мкл аліквоту окремо змішали з 3 мкл буферу для нанесення. У лунки 2 % агарозного гелю внесли:

- маркер молекулярної ваги з кроком 100 bp для контролю розміру отриманого фрагмента (ДНК маркер GeneRuler™ 100+ П.М. "Ферментас");
- аліквоти № 1-5.

Провели електрофорез у камері для горизонтального електрофорезу за напруги 70 В протягом 60 хв. Результати електрофорезу оцінювали, переглядаючи та фотографуючи гель в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 254 нм на трансільюмінаторі. Як контроль розміру отриманого фрагмента використовують ДНК маркер GeneRuler™ 100+ П.М. ("Ферментас"), див. фотографія "Дієвість пари специфічних олігонуклеотидних праймерів по визначенню ДНК бактеріальних препаратів".

Як видно на фотографії - у аліквотах 2, 4 та 5 присутній амплікон 150 bp, що свідчить про наявність 150 bp специфічного фрагмента ДНК гена *urp* культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. У аліквоті 1 з деіонізованою водою та аліквоті 3 з ДНК бактеріального препарату Danisco TA Lyo 125DCU, негативний контроль - амплікон 150 bp відсутній.

Результатом застосування способу визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР є ампліфікація фрагментів 150 bp специфічного фрагмента ДНК генетичного маркера - гена *urp*, що дозволяє визначити присутність ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* у заквашувальних препаратах, ферментованих харчових продуктах та за здійснення контролювання їх наявності.

Запропонований спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* за допомогою специфічних праймерів методом ПЛР має переваги у значній економії реактивів, витрат часу і в точності детекції та ідентифікації культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*.

Запропонований спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР використовують для якісного визначення ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, видової ідентифікації культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* у наукових дослідженнях та технологічних роботах у промисловості.

Рекомендовано використовувати спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР для визначення ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* при проведенні моніторингу зразків заквашувальних препаратів та ферментованих харчових продуктів, перевірки відповідності наявності *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* згідно з нормативними та супровідними документами на виробництві та у торговельній мережі.

Джерела інформації:

[1] Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker C.J. / Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action. // Microbiol. Molec. Biol. Rev., 2008, 72, 4, p. 738-764.

[2] <http://www.bacterio.cict.fr/Lactobacillus.html>.

[3] Felis G., Dellaglio F. / Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. // Curr. Issues Intestinal Microbiol, 2007, 8, p. 44-61.

[4] Ботина, С.Г. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования // Генетика. 2006. - Том 42. - № 12. - с. 1621-1635.

[5] Chagnaud P. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria application to six common *Lactobacillus* species/ P. Chagnaud // Journal of Microbiological Methods. - 2001. - Vol. 44, p. 139-148.

- [6] Ботина С.Г., Климина К.М., Коробан Н.В., Амерханова А.М., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Реклассификация отечественных пробиотических культур бактерий рода *Lactobacillus*. Генетика, 2010, 46, 11, с. 1485-1492.
- [7] Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. // Science, 1988, v. 239, p. 487-491.
- [8] Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements/ Walker JA, Hughes DA, Hedges DJ, Anders BA, Laborde ME, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA. // Genomics, 2004, v. 83 (3) p. 518-527.
- [9] PCR Protocols/ Innis et al. // Academic Press. Inc., 1990, p. 219-227.
- [10] Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. // Москва: Мир, 1984. - с. 157-167.
- [11] Singh S., Goswami P., Singh R., Heller KJ Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. // LWT-Food science and technologie 2009, 42, p.448-457.
- [12] Markiewicz LH, Biedrzycka E., Wasilewska E., Bielecka M. Rapid molecular identification and characteristics of *Lactobacillus* strains. // Folia Microbiol. 2010, 55, 5 p. 481-488.
- [13] Saito S., Kobayashi M., Kimoto-Nira H., Aoki R., Mizumachi K., Miyata S., Yamamoto K., Kitagawa Y., Suzuki C. Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR. // FEMS Microbiology Letters, 2011, 316, p. 70-76.
- [14] Huang C.-H., Lee F.-L. The *dnaK* gene as a molecular marker for the classification and discrimination of the *Lactobacillus casei* group. // Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 99, p. 319-327.
- [15] Sievers M, Uermosi C, Fehlmann M, Krieger S. Cloning, sequence analysis and expression of the F1F0-ATPase beta-subunit from wine lactic acid bacteria. // Syst Appl Microbiol., 2003 26, 3, p. 350-6.
- [16] Huang C.-H., Chang M.-T., Huang M.-C., Lee F.-L. Rapid identification of *Lactobacillus plantarum* group using the SNaPshort minisequencing. // Systematic and applied microbiology, 2011, 34, p. 586-589.
- [17] Raftis E., Salvetti E., Torriani S., Felis GE, O'Toole PW Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. Appl. Environ. // Microbiol., 2011, 77, 3, p. 954-965.
- [18] Новикова Н.А., Точилина А.Г., Соловьева И.В. Способ индикации бактерий рода *Lactobacillus* / DisCollection.ru. - 10.12.2009-RU 2375459.
- [19] Морейра JLS, Мота Р., Орта Ф. та ін. Ідентифікація до виду з *Lactobacillus*, виділених в пробіотичних пошукових досліджень людського, тваринного або харчової походження за 16S-23S рРНК профілювання обмеження // Мікробіологія ВМС, 2005. - Том 5-15. - с. 1-9.
- [20] Джобулаева А.К., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Байкара Б.Т., Джакибаева Г.Т., Кебекбаева К.М. / Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S RRNA гена // Биологические науки № 8 за 2014 год. (часть 1), с. 63-67.
- [21] Полуэктова Е.У., Даниленко В.Н. Способ видовой идентификации лактобацилл *L.casei/paracasei*, *L.fermentum*, *L.plantarum* и *L.rhamnosus* // Патент на изобретение № 2508406 / <http://www.findpatent.ru/patent/250/2508406.html>.
- [22] Song BF, Ju LZ, Li YJ, Tang LJ. Chromosomal Insertions in the *Lactobacillus casei* upp Gene That Are Useful for Vaccine Expression // Appl Environ Microbiol. 2014 June; 80(11): p. 3321-3326.
- [23] Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy / edited by Wilhelm H. Holzapfel, Brian J.B. Wood.: John Wiley & Sons. // 2014, ISBN 1118655273, 9781118655276. - p. 632.

Таблица 1

Перевірка роботи пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом ПЛР по визначенні ДНК бактеріальних препаратів

№ аліквоти	Проба ДНК	Праймери	Ампліфікат
1	Деіонізована вода	Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp	-
		Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp	

Продовження таблиці 1

№ аліквоти	Проба ДНК	Праймери	Ампліфікат
2	проба ДНК йогурту, який містить <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> та <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp	150 bp
		Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp	
3	проба ДНК бактеріального препарату Danisco TA Lyo 125DCU, який не містить <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> та <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp	-
		Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp	
4	проба ДНК бактеріального препарату Лактіале, який містить <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> та <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp	150 bp
		Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp	
5	проба ДНК бактеріального препарату Лактіале, який містить <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> та <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp	150 bp
		Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp	
- - не виявлено, не ідентифіковано.			

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

Спосіб визначення культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції у заквашувальних препаратах та ферментованих харчових продуктах, який **відрізняється** тим, що для визначення ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* використовують пару олігонуклеотидних праймерів до генетичного маркера - гена *urp*:  
 прямий праймер Lc.pc F 5'-GAAATCACACGGGATCTGCC-3' 20 bp та  
 зворотний праймер Lc.pc R 5'-AATCAGGCGCAAAACACCAT-3' 20 bp - для ампліфікації 150 bp фрагмента ДНК культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

10

15

**Lactobacillus casei W56 complete genome**

GenBank: HE970764.1

GenBank

LOCUS HE970764 3075780 bp DNA circular BCT 27-FEB-2015

DEFINITION Lactobacillus casei W56 complete genome.

ACCESSION HE970764

VERSION HE970764.1 GI:406356677

DBLINK BioProject: [PRJEB219](#)  
BioSample: [SAMEA2271945](#)

KEYWORDS complete genome.

SOURCE Lactobacillus casei W56

ORGANISM Lactobacillus casei W56  
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;  
Lactobacillus.

REFERENCE 1

AUTHORS Hochwind,K., Weinmaier,T., Schmid,M., van Hemert,S., Hartmann,A.,  
Rattei,T. and Rothballer,M.

TITLE Draft genome sequence of Lactobacillus casei W56

JOURNAL J. Bacteriol. 194 (23), 6638 (2012)

PUBMED [23144392](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 3075780)

AUTHORS Rattei,T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (26-JUL-2012) University of Vienna, Department of,  
Computational Systems Biology, Althanstr. 14, 1090 Vienna, AUSTRIA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..3075780  
/organism="Lactobacillus casei W56"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="W56"  
/db\_xref="taxon:[1215914](#)"

gene 1318402..1319031  
/gene="upp"

CDS 1318402..1319031  
/gene="upp"  
/locus\_tag="BN194\_13550"  
/EC\_number="2.4.2.9"  
/inference="ab initio  
prediction:GeneMark.hmm,Prodigal v2.60,  
glimmer3/rbs\_finder,Critica\_1.05"  
/note="Product derived from  
UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1;Gene name derived from  
UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1;EC number derived from  
UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1"  
/codon\_start=1

**Фіг. 1 «Послідовність гену upp Lactobacillus casei W56, complete genome».**

```

/transl_table=11
/product="Uracil phosphoribosyltransferase"
/protein_id="CCK22302.1"
/db_xref="GI:406358032"
/db_xref="EnsemblGenomes-Gn:BN194_13550"
/db_xref="EnsemblGenomes-Tr:CCK22302"
/db_xref="GOA:K0N4J8"
/db_xref="InterPro:IPR005765"
/db_xref="InterPro:IPR029057"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:K0N4J8"
/translation="MGKFTVLNHPILQHKLTILRDKHAGTKEFREIANEIAELMVYEI
TRDLPLESIEIETPMGKTIQKQLAGKKLAVVPILRAGLGMVDGVLRLIPAAKVGHIGM
YRDEKTLKPHEYFVKMPDIEQRDLIIIVDPMLATGGSANMAIEALKKRKATSMRLVVL
VAAPEGVKAVQAANPDVDIYAAALDDHLNENGYIVPGLGDAGDRLFGTK"

```

**FASTA*****Lactobacillus casei* W56, complete genome**

GenBank: HE970764.1  
 LOCUS HE970764 3075780 bp DNA circular BCT 27-FEB-2015  
 DEFINITION *Lactobacillus casei* W56 complete genome. (LOCUS CCK22302.1)

```

gene      1318402..1319031
          /gene="upp"
          /locus_tag="BN194_13550"
CDS       1318402..1319031      630 bp

```

```

ATGGGCAAAATTACAGTTTGAATCACCCGTTGATTGAGCATAAGCTGACCCCTGATTGGGACAAAGCATGCTGGAACCAAGG
AGTTCGCGGAAATCGCCAATGAAATCGCGGAATTAATGGTGTATGAAATCACACGGGATCTGCCACTTGAAAGTATCGAAAT
TGAGACACCGATGGGTAAACTATCCAAAACAGCTTGCTGGCAAGAAGCTTGCAGTGTGTTCCAAATTTGCGCGCGGGTTTA
GGGATGGTGTATGGTGTGTTGCGCCTGATCCAGCCGCAAAAGTCGGTCACATTGGCATGTATCGCGATGAGAAGACCCCTTA
AACCGCATGAATACTTTGTTAAATGCGCGCGGATATTGAACAACGGGATTGATCATTGTTGATCCCAATGCTGGCAACTGG
CGGATCAGTAAACATGGCCATTGAGGCACTCAAGAAGCGTGGTGCACATCAATGCGGCTAGTTGTCTTGGTAGCAGCGCCG
GAGGGTGTAAAGCCGTCAGGCGGCCAATCCAGATGTCGATATCTATGCGGCAGCGTTAGATGATCATTGAACGAAATG
GCTATATTGTGCCGGTCTTGAGATGCAGGCGACAGACTTTTGGGACAAATGA

```

**Білок урацил фосфорібозилтрансфераза з *Lactobacillus casei* W56****Uracil phosphoribosyltransferase [*Lactobacillus casei* W56]**

GenBank: CCK22302.1  
**Identical Proteins**  
 LOCUS CCK22302 209 aa linear BCT 27-FEB-2015  
 DEFINITION Uracil phosphoribosyltransferase [*Lactobacillus casei* W56].  
 ACCESSION CCK22302  
 VERSION CCK22302.1 GI:406358032  
 DBLINK BioProject: PRJEB219  
 BioSample: SAMEA2271945  
 DBSOURCE embi accession HE970764.1  
 KEYWORDS .  
 SOURCE *Lactobacillus casei* W56  
 ORGANISM *Lactobacillus casei* W56  
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;  
 Lactobacillus.  
 REFERENCE 1  
 AUTHORS Hochwind, K., Weinmaier, T., Schmid, M., van Hemert, S., Hartmann, A.,  
 Rattei, T. and Rothballer, M.

**Фіг. 1 Продовження 1**

TITLE Draft genome sequence of *Lactobacillus casei* W56  
 JOURNAL J. Bacteriol. 194 (23), 6638 (2012)  
 PUBMED [23144392](#)  
 REFERENCE 2 (residues 1 to 209)  
 AUTHORS Rattei, T.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (26-JUL-2012) University of Vienna, Department of,  
 Computational Systems Biology, Althanstr. 14, 1090 Vienna, AUSTRIA

FEATURES
   
     source
   
         Location/Qualifiers
   
             1..209
   
             /organism="Lactobacillus casei W56"
   
             /strain="W56"
   
             /db\_xref="taxon:1215914"
   
     Protein
  
         1..209
   
         /product="Uracil phosphoribosyltransferase"
   
         /EC\_number="2.4.2.9"
   
     Region
  
         65..182
   
         /region\_name="PRTases\_typeI"
   
         /note="Phosphoribosyl transferase (PRT)-type I domain;  
         cd06223"
   
         /db\_xref="CDD:206754"
   
     Site
  
         order(78,80,131..133,135..139,163)
   
         /site\_type="active"
   
         /db\_xref="CDD:206754"
   
     CDS
  
         1..209
   
         /gene="upp"
   
         /locus\_tag="BN194\_13550"
   
         /coded\_by="HE970764.1:1318402..1319031"
   
         /inference="ab initio  
         prediction:GeneMark.hmm,Prodigal\_v2.60,  
         glimmer3/rbs\_finder,Critica\_1.05"
   
         /note="Product derived from  
         UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1;Gene name derived from  
         UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1;EC number derived from  
         UniProtKB/Swiss-Prot:B3WDL1"
   
         /transl\_table=11
   
         /db\_xref="EnsemblGenomes-Gn:BN194\_13550"
   
         /db\_xref="EnsemblGenomes-Tr:CCK22302"
   
         /db\_xref="GOA:K0N4J8"
   
         /db\_xref="InterPro:IPR005765"
   
         /db\_xref="InterPro:IPR029057"
   
         /db\_xref="UniProtKB/TrEMBL:K0N4J8"

ORIGIN
   
     1 mgkftvlnhp liqhkltlir dkhagtkufr eianeiaelm vyeitrdlpl esieietpmg
   
     61 ktiqkqlagk klavvpilra glgmvdgvir lipaakvghi gmyrdektlk phefyvkmp
   
     121 dieqrdliiv dpmlatggsa nmaiealkkr gatsmrlvvl vaapegvkav qaanpdvdiy
   
     181 aaalddhlne ngyivpglgd agdrifgtk

Fig. 1 Продовження 2

### Primer3 Output

No mispriming library specified

Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any th	3' th	hairpin seg
LEFT PRIMER	127	20	58.98	55.00	0.00	0.00	0.00 GAAATCACACGGGATCTGCC
RIGHT PRIMER	276	20	59.03	45.00	10.83	0.00	0.00 AATCAGGCGCAAACACCAT

SEQUENCE SIZE: 630

INCLUDED REGION SIZE: 630

PRODUCT SIZE: 150, PAIR ANY TH COMPL: 0.00, PAIR 3' TH COMPL: 0.00

[illegible]

181 AAAACTATCCAAAAACAGCTTGCTGGCAAGAAGCTTGCGGTTGTTCCAATTTTGC GCGCG  
241 GGTTTAGGGATGGTTGATGGTGT TTTGCGCCTGATTCCAGCCGCAAAAGTCGGTCACATT

301 GGCATGTATCGCGATGAGAAGACCCCTTAAACCGCATGAATACTTTGTTAAATGCCGCCG  
361 GATATTGAACAACGGGATTTGATCATTGTTGATCCAATGCTGGCAACTGGCGGATCAGCT  
421 AACATGGCCATTGAGGCACTCAAGAAGCGTGGTGCCACATCAATGCGGCTAGTTGTCTTG  
481 GTAGCAGCGCCGGAGGGTGTAAAGCCGCTCCAGGCGGCCAATCCAGATGTCGATATCTAT  
541 GCGGCAGCGTTAGATGATCATTTGAACGAAATGGCTATATTGTCCGGGTCTTGGAGAT  
601 GCAGGGCAGAGACTTTTTGGGACAAAATGA

KEYS (in order of precedence):

>>>>> left primer                      <<<<< right primer

#### ADDITIONAL OLIGOS

		start	len	tm	gc	any th	3' th	hairpin	seg
1	LEFT PRIMER	343	20	59.04	45.00	5.05	0.00	0.00	TTTGTTAAATGCCGCCGGA
	RIGHT PRIMER	483	20	59.03	50.00	0.00	0.00	0.00	TACCAAGACAAGTACGCCGA
	PRODUCT SIZE: 141,	PAIR ANY_TH COMPL:	0.00,	PAIR 3'_TH COMPL:	0.00				
2	LEFT PRIMER	464	20	59.03	50.00	0.00	0.00	0.00	TGCGGCTAGTTGTCTTGGA
	RIGHT PRIMER	597	20	59.08	50.00	0.00	0.00	0.00	TCCAAGACCCGGCACATAT
	PRODUCT SIZE: 134,	PAIR ANY_TH COMPL:	15.83,	PAIR 3'_TH COMPL:	7.90				
3	LEFT PRIMER	42	20	59.17	55.00	10.77	10.77	0.00	TAAGCTGACCCGTGATTGGG
	RIGHT PRIMER	146	20	58.98	55.00	0.00	0.00	0.00	GGCAGATCCCGTGTGATTTC
	PRODUCT SIZE: 105,	PAIR ANY_TH COMPL:	0.00,	PAIR 3'_TH COMPL:	0.00				
4	LEFT PRIMER	62	20	59.04	50.00	22.37	6.97	0.00	ACAAGCATGCTGGAACCAAG
	RIGHT PRIMER	227	20	59.33	50.00	0.00	0.00	0.00	GGAAACAACCGCAAGCTCTT
	PRODUCT SIZE: 166,	PAIR ANY_TH COMPL:	1.89,	PAIR 3'_TH COMPL:	3.42				

## Statistics

	con sid	too many	in tar get	in excl reg	not ok reg	bad GCs	no GC clamp	tm too low	tm too high	high any th	high 3 <sup>rd</sup> compl	high hair- pin	poly X	high end stab	
Left	3112	0	0	0	0	117	0	992	804	0	0	28	19	0	1152
Right	3053	0	0	0	0	121	0	979	781	0	0	10	37	0	1125

Pair Stats:

considered 358, unacceptable product size 349, primer in pair overlaps a primer in a better

pair 136, ok 9

libprimer3 release 2.3.6

```
(primer3 results.cgi release 4.0.0)
```

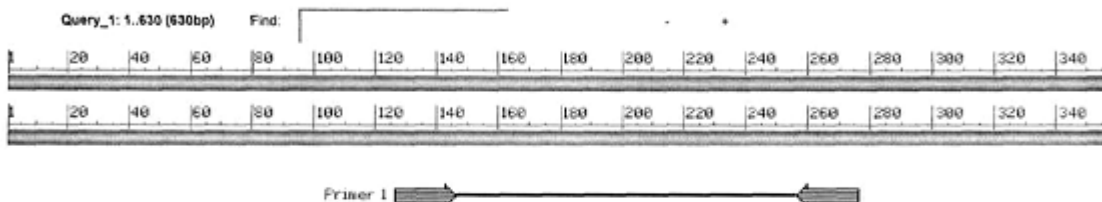
Fig. 2 «Підбір праймерів до гену *urp* *Lactobacillus casei* W56, complete genome».

**Input PCR template****Range**

1 - 630

**Specificity of primers**

Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Genome database (reference assembly only) for selected species

**Other reports**Search SummaryGraphical view of primer pairs

Primer pairs for job RU-aU8PQznjpQl5HUyd6dSk8a0cEL3BaBQ

**Detailed primer reports****Primer pair 1**

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAAATCACACGGGATCTGCC	Plus	20	127	146	58.98	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	AATCAGGCGCAAAACACCAT	Minus	20	276	257	59.03	45.00	4.00	2.00
Product length	150								

**Products on potentially unintended templates**

>NZ\_CP012148.1 *Lactobacillus paracasei* strain L9, complete genome

product length = 150

Features associated with this product:

uracil phosphoribosyltransferase

Forward primer	1	GAAATCACACGGGATCTGCC	20
Template	1276180	.....	1276199
Reverse primer	1	AATCAGGCGCAAAACACCAT	20
Template	1276329	.....	1276310

**Fig. 3 «Перевірка пари праймерів до гену *urr* культур *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* та *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*».**

>NC\_014334.2 *Lactobacillus casei* str. Zhang, complete genome

```

product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1118150 ..... 1118169
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1118299 ..... 1118280

```

>NZ\_AP012541.1 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130 DNA, complete genome

```

product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1153247 ..... 1153266
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1153396 ..... 1153377

```

>NZ\_CP006690.1 *Lactobacillus casei* 12A, complete genome

```

product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1134645 ..... 1134664
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1134794 ..... 1134775

```

>NZ\_CM001848.2 *Lactobacillus casei* LcY chromosome, whole genome shotgun sequence

```

product length = 150
Features associated with this product:
  uracil phosphoribosyltransferase

Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1282374 ..... 1282393
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1282523 ..... 1282504

```

>NC\_022112.1 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2, complete genome

```

product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1164959 ..... 1164978
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1165108 ..... 1165089

```

>NC\_021721.1 *Lactobacillus casei* LOCK919, complete genome

```

product length = 150
Features associated with this product:
  uracil phosphoribosyltransferase

Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1306818 ..... 1306837
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1306967 ..... 1306948

```

Фіг. 3 Продовження 1

>NZ\_CM001861.1 *Lactobacillus casei* LcA chromosome, whole genome shotgun sequence

product length = 150

Features associated with this product:

uracil phosphoribosyltransferase

Forward primer	1	GAAATCACACGGGATCTGCC	20
Template	1308914	.....	1308933
Reverse primer	1	AATCAGGCGCAAAACACCAT	20
Template	1309063	.....	1309044

>NC\_018641.1 *Lactobacillus casei* W56 complete genome

product length = 150

Features associated with this product:

uracil phosphoribosyltransferase

Forward primer	1	GAAATCACACGGGATCTGCC	20
Template	1318528	.....	1318547
Reverse primer	1	AATCAGGCGCAAAACACCAT	20
Template	1318677	.....	1318658

>NC\_017474.1 *Lactobacillus casei* BD-II, complete genome

product length = 150

Features associated with this product:

uracil phosphoribosyltransferase

Forward primer	1	GAAATCACACGGGATCTGCC	20
Template	1312192	.....	1312211
Reverse primer	1	AATCAGGCGCAAAACACCAT	20
Template	1312341	.....	1312322

>NC\_017473.1 *Lactobacillus casei* LC2W, complete genome

product length = 150

Features associated with this product:

uracil phosphoribosyltransferase

Forward primer	1	GAAATCACACGGGATCTGCC	20
Template	1281302	.....	1281321
Reverse primer	1	AATCAGGCGCAAAACACCAT	20
Template	1281451	.....	1281432

>NZ\_CP013921.1 *Lactobacillus paracasei* strain KL1, complete genome

product length = 150

Forward primer	1	GAAATCACACGGGATCTGCC	20
Template	1237931	.....	1237912
Reverse primer	1	AATCAGGCGCAAAACACCAT	20
Template	1237782	.....	1237801

Фіг. 3 Продовження 2

>NZ\_GG670152.1 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 25302 genomic scaffold SCAFFOLD1, whole genome shotgun sequence

```
product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        725468 ..... 725449
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        725319 ..... 725338
```

>NC\_010999.1 *Lactobacillus casei* BL23 complete genome, strain BL23

```
product length = 150
Features associated with this product:
  uracil phosphoribosyltransferase
```

```
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1320211 ..... 1320230
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1320360 ..... 1320341
```

>NZ\_CP012187.1 *Lactobacillus paracasei* strain CAUH35, complete genome

```
product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1092402 ..... 1092421
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1092551 .....C..... 1092532
```

>NZ\_CP007122.1 *Lactobacillus paracasei* N1115, complete genome

```
product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1622009 ..... 1621990
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1621860 .....C..... 1621879
```

>NC\_008526.1 *Lactobacillus casei* ATCC 334 chromosome, complete genome

```
product length = 150
Forward primer 1      GAAATCACACGGGATCTGCC 20
Template        1144552 ..... 1144571
Reverse primer 1      AATCAGGCGCAAAACACCAT 20
Template        1144701 .....C..... 1144682
```

Фіг. 3 Продовження 3



**Фотографія 1**  
**"Дієвість пари специфічних олігонуклеотидних праймерів по визначенню ДНК бактеріальних препаратів"**

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

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