



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55775 (13) U  
(51) МПК  
A61K 39/27 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ПЛАЗМІД рХО1 ТА рХО2 В СКЛАДІ БАКТЕРІЙ *BACILLUS ANTHRACIS* ЗА ДОПОМОГОЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

1

2

(21) u201007017

(22) 07.06.2010

(24) 27.12.2010

(46) 27.12.2010, Бюл.№ 24, 2010 р.

(72) ДЕРЯБІН ОЛЕГ МИКОЛАЙОВИЧ, ДЕРЯБІНА  
ОЛЕНА ГРИГОРІВНА, БЄДНОВ МАКСИМ ОЛЕК-  
САНДРОВИЧ, СКРИПНИК АРТЕМ ВАЛЕРІЙОВИЧ  
(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Спосіб виявлення ДНК плазмід рХО1 та рХО2  
в складі бактерій *Bacillus anthracis*, що включає  
виявлення в досліджуваних зразках специфічних

фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) за допомо-  
гою мультиплексного варіанту полімеразної лан-  
цюгової реакції (ПЛР), який відрізняється тим, що  
для проведення ПЛР використовують штучно син-  
тезовані олігонуклеотидні праймери з наступною  
послідовністю нуклеотидів:

для плазмиди рХО1 (ген протективного антигена) –

ОРА1F 5'-TCCAGACCGTGACAATGATG-3'

ОРА5R4 5'-CACGTTGTAGATTGGAGCCG-3';

для плазмиди рХО2 (ген капсули) –

CPS3F 5'-CACCAACCATCGTCATCG-3'

CPS9R 5'-TTATCCTGTTATGCCATTGAG-3'.

Корисна модель належить до ветеринарної мі-  
кробіології, зокрема, до лабораторної діагностики,  
призначена для виявлення специфічних фрагмен-  
тів нуклеїнових кислот (ДНК) бактерії *Bacillus*  
*anthracis*, може бути використана для проведення  
діагностики сибірки, в науково-дослідних роботах,  
в біотехнологічному виробництві вакцин.

Більшість представників роду *Bacillus* непато-  
генні для людини і тварин, проте даний мікроорга-  
нізм є етіологічним агентом небезпечного інфек-  
ційного захворювання - сибірської виразки. Геном  
*Bacillus anthracis* складається з хромосоми, розмі-  
ром 5,23Mb (мегабаз), та двох великих плазмід –  
рХО1 (182kb (кілобаз)) та рХО2 (96kb). Повністю  
вірулентні штами *Bacillus anthracis* несуть обидві  
плазмиди рХО1 та рХО2. Відсутність будь-якої пла-  
змиди призводить до атенуації *Bacillus anthracis*  
для більшості тваринних моделей, тому, зазвичай,  
молекулярний аналіз в першу чергу спрямований  
на виявлення генів білків токсину *B. anthracis* -  
ragA (кодує синтез протективного антигена), lef  
(кодує летальний фактор) та сау (кодує набряко-  
вий фактор), генів біосинтезу капсули capB, capC,  
capA та capD, а також гену, пов'язаного з деполі-  
меризацією капсули - дер. Три гени токсину знахо-  
дяться на окремих локусах плазмиди рХО1, в той  
час як гени cap і дер організовані в оперон рХО2  
[1, 2, 3].

Єдиний білок капсули *B. anthracis* вважається  
важливим для розвитку інфекції, яка призводить  
до захворювання сибіркою.

Зустрічаються 4 різних типи плазмідного скла-  
ду штамів *Bacillus anthracis* - наявність обох плаз-  
мід, відсутність обох плазмід або відсутність однієї  
з двох (таблиця 1).

Таблиця 1

Варіанти плазмідного складу, *Bacillus anthracis*

Тип	Штам	Капсула	Токсин	Плазмиди	
				рХО1	рХО2
1	Вірулентний	+	+	+	+
2	Вакциний	–	+	+	–
3	Авірулентний	+	–	–	+
4	Непатогенний	–	–	–	–

В генетичному відношенні *B. anthracis* є одним  
з найбільш мономорфних мікроорганізмів, що по-  
в'язано зі здатністю бацили утворювати спори.  
Різниця між його штамми зводиться головним  
чином до наявності або відсутності плазмід. Три-  
валий час основними методами в діагностиці си-  
бірської виразки залишались традиційні мікробіо-  
логічні дослідження (мікроскопія мазків,  
бактеріологічні дослідження з метою виділення  
чистої культури і ідентифікація виділеної культури,

(13) U  
(11) 55775  
(19) UA

біопроба на лабораторних тваринах, серологічні дослідження). Головними недоліками традиційних лабораторних методів діагностики *B. anthracis* є довготривалість, трудомісткість, складність детекції атипичних форм бактерій та необхідність в культивуванні збудника, що в свою чергу негативно впливає на рівень біобезпеки. На сьогодні найбільш надійними тестами ідентифікації *B. anthracis* є визначення чутливості до  $\gamma$ -фагу, виявлення галактозо-N-ацетилглюкозамін полісахариду та полі-D-глютамінової кислоти, а також, виявлення наявності генів токсину та капсули методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Аналог корисної моделі, близький за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється, є бактеріологічний метод висіву із зразка патматеріалу в м'ясо-пептонний бульйон і на м'ясо-пептонний агар, та на агар Хоттінгера (рН 7,4). Одночасно роблять висіви на диференціально-діагностичне середовище з 0,01% фенолфталеїнфосфату натрію, желатиною, на кров'яний бульйон та агар, середовище ГКІ (60% стерильного розчину Хенкса без антибіотиків і 40% стерильної не консервованої сироватки великої рогатої худоби, інактивованої при 56°C протягом 30хв, рН 1,2-1,4). Висіви інкубують 18-24 години за температури 37-38°C (при відсутності росту витримують за тієї ж температури ще 48 годин).

Спільним недоліками зазначених методів є те, що вони потребують значного часу для проведення аналізу, трудомісткі і зменшують рівень біобезпеки в цілому.

Прототипом корисної моделі є спосіб детекції плазмід рХО1 та рХО2 в складі бактерій *Bacillus*

*anthracis* методом ПЛР з використанням для цього олігонуклеотидних праймерів, що мають наступну послідовність [4,5]:

для плазмиди рХО1 (ген протективного антигена) -

РА5 - 5'-TCCTAACACTAACGAAGTCG-3'

РА8 - 5'-GAGGTAGAAGGATATACGGT-3'

для плазмиди рХО2 (ген капсули) -

1234-5'-CTGAGCCATTAAATCGATATG-3'

1301 - 5'-TCCCACTTACGTAATCTGAG-3'

Недоліком зазначених праймерів є те, що вони схильні до утворення димерів та мають низьку температуру віджигу, що впливає на специфічність реакції. Одночасне використання праймерів в мультиплексному варіанті ПЛР не ефективне.

В зв'язку з цим, актуальним питанням є розробка специфічного і швидкого методу детекції бактерії *Bacillus anthracis* та виявлення в її складі плазмід рХО1 та рХО2. Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність і відтворюваність ПЛР.

Задача: створити новий спосіб виявлення плазмід рХО1 та рХО2 в складі бактерій *Bacillus anthracis*.

Завдання досягається тим, що в досліджуваних зразках виявляють специфічні фрагменти нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою мультиплексного варіанту полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) - ферментативної реакції і двох пар штучно синтезованих олігонуклеотидів (праймерів), які дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційного агента при визначених температурних і часових параметрах та кількості циклів (таблиця 2):

Таблиця 2

Температурний режим мультиплексного варіанту ПЛР з ДНК *Bacillus anthracis* з парами олігонуклеотидних праймерів CPS9R/CPS3F та OPA1F/OPA5R4

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95° C	4 хв	1
2	95° C	0,5 хв	35
	60° C	0,5 хв	
	72° C	0,5 хв	
3	72° C	4 хв	1
4	10° C	Зберігання	

Використовують дві пари штучно синтезованих олігонуклеотидних праймерів з наступною послідовністю нуклеотидів:

OPA1F - 5'-TCCAGACCGTGACAATGATG-3'

OPA5R4 - 5'-CACGTTGTAGATTGGAGCCG-3'

CPS3F - 5'-CACCAACCATCGTCATCG-3'

CPS9R - 5'-TTATCCTGTTATGCCATTGAG-3'

Праймери OPA1F та OPA5R4 фланкують ділянку гена протективного антигена (плазмиди рХО1) і забезпечують синтез фрагменту ДНК розміром 607н.з. при температурі віджигу 60°C.

Праймери CPS3F та CPS9R фланкують ділянку гена капсули (плазмиди рХО2) і забезпечують синтез фрагменту ДНК розміром 377н.з. при температурі віджигу 60°C.

Праймери з наведеною послідовністю можуть бути використані для мультиплексного варіанту ПЛР (фігура 1).

Приклад: пробу (окрему колонію бактеріальної культури) поміщують у пластикову пробірку ємністю 1,5см<sup>3</sup> з 0,3см<sup>3</sup> лізуючого буферу. Суміш струшують і центрифугують, після чого проводять наступне виділення ДНК набором реагентів для виділення ДНК. Отриману ДНК (0,003см<sup>3</sup>) поміщують у пробірку ємністю 0,5см<sup>3</sup> і додають 0,005см<sup>3</sup> (5X) ПЛР-буфера, 0,001см<sup>3</sup> dNTP, по 0,00015см<sup>3</sup> праймерів OPA1F і OPA5R4, та по 0,00010см<sup>3</sup> праймерів CPS3FM і CPS9R, 0,0005см<sup>3</sup> Taq-полімерази, 0,0115см<sup>3</sup> DEPC-води та 1 краплю мінерального масла. Вміст пробірки струшують і центрифугують, а потім переносять в термоциклер

з активною регуляцією температури, наприклад "Терцик" (Росія), якому задають вищевказану програму.

Аналіз результату ПЛР проводять в 1,5% гелі агарози з барвником - бромистим етидієм. В лунки агарозного гелю вносять 0,010см<sup>3</sup> ампліфікованої суміші. Після проведення електрофорезу фрагменти ДНК виявляють під ультрафіолетовим світлом.

Результат ПЛР може бути оцінено візуально по наявності смужок, що відповідають продуктам реакції.

Промислове застосування - для проведення діагностики сибірки, в науково-дослідних роботах, в біотехнологічному виробництві вакцин.

Джерела інформації:

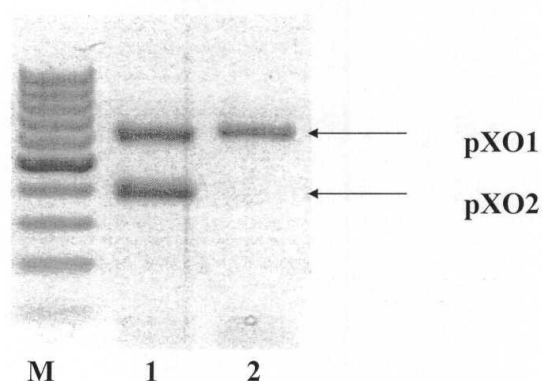
1. Vietri N.J. Identification and characterization of trans-activator involved in the regulation of encapsulation by *Bacillus anthracis* / Vietri N.J., Marrero R., Hoover T.A. - Gene, 1995. - Vol.152, P. 1-9.

2. Makino S. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis* / Makino S., Uchida I., Terakado N. - J.Bacteriol, 1989. - Vol.171, P.722-730.

3. Makino S. Effect of the lower molecular capsule release from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax / Makino S., Watarai M., Cheun HJ. - J.Infect.Dis, 2002. -Vol.186, P.227-233.

4. Hutson R.A. The development and assessment of DNA and oligonucleotide probes for the specific detection of *Bacillus anthracis* / Hutson R.A., Duggleby C.J., Lowe J.R. - J. Appl.Bacteriol., 1993. - Vol.75, P.463-472.

5. Beyer W. A nested PCR and DNA-amplification-fingerprinting method for detection and identification of *Bacillus anthracis* in soil samples from former tanneries / Beyer W., Gloeckner P., Otto J., Bohm R. - Salisbury Med.Bull., 1996. - Vol.87, P.47-49.



**М** – ДНК маркер “100bp DNA Ladder” (Fermentas)

**1** – штам Ценковського-2 (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>) *B. anthracis*

**2** – штам 55 (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>+</sup>) *B. anthracis*