



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **61929** (13) **U**  
(51) МПК  
C12N 15/11 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ОДНОЛАНЦЮГОВИХ ФРАГМЕНТІВ ДНК**

1

2

(21) u20101013542

(22) 15.11.2010

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) ОБЕРЕМОК ВОЛОДИМИР ВОЛОДИМИРОВИЧ, РАЗУМЕЙКО ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, ІВАШОВ АНАТОЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, СІМЧУК АНДРІЙ ПАВЛОВИЧ

(73) ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.І. ВЕРНАДСЬКОГО

(57) Спосіб отримання одноланцюгових фрагментів ДНК, в якому проводять полімеразну ланцюго-

ву реакцію (ПЛР) у два етапи, який **відрізняється** тим, що спочатку проводять ПЛР із двома специфічними праймерами, підібраними на основі секвенованих послідовностей геномів, і одержують дволанцюговий фрагмент ДНК, після чого проводять ПЛР з одним спеціальним праймером, що зв'язує один з ланцюгів ДНК-праймером у кільце чи створює довгі одно-дволанцюгові послідовності ДНК, які обробляють ДНК-лігазою, а вивільнені таким чином одноланцюгові ДНК-фрагменти очищують методом електрофорезу в агарозному гелі та виділяють ТЕ-буфером.

Технічне рішення відноситься до області молекулярної генетики.

Відомий спосіб отримання одноланцюгових фрагментів ДНК у векторах, сконструйованих на основі фага M13 E. coli для одержання одноланцюгових ділянок ДНК. Особливість фага M13 E. coli складається в можливості його існування у двох формах: дволанцюговій реплікативній і одноланцюговій фаговій [Messing J. M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing // Methods Mol. Biol. - 1993. - V. 23. - P. 9-22].

Недоліком зазначеного способу є складність отримання ділянки ДНК, яка цікавить.

Відомий також спосіб асиметричного ПЛР, обраний за найближчий аналог, у якому полімеразну ланцюгову реакцію здійснюють у один етап - коли проводять ПЛР із двома специфічними праймерами, один з яких додається у більшій концентрації, ніж інший. Завдяки цьому синтезується одноланцюговий ДНК фрагмент, який містить у собі праймер, якого було більше [Друца В.Л., Кабердин В.Р., Королёва О.Н., Шилов И.А. Эффективный метод направленного введения мутаций в плазмиды и клонирования однотяжевых фрагментов ДНК // Биоорг. химия.-1991.-Т. 17, № 11. - с. 1487-1493].

В основу корисної моделі поставлено завдання вдосконалення способу отримання одноланцюгових фрагментів ДНК, у якому за рахунок технологічних прийомів - здійснення двоетапної

полімеразної ланцюгової реакції, що вивільняє одноланцюгові ДНК-фрагменти, забезпечують одержання досить великої кількості копій одноланцюгових молекул ДНК.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі отримання одноланцюгових фрагментів ДНК полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводять у два етапи - спочатку проводять ПЛР із двома специфічними праймерами, підібраними на основі секвенованих послідовностей геномів і одержують дволанцюговий фрагмент ДНК, після чого проводять ПЛР з одним спеціальним праймером, який зв'язує один з ланцюгів ДНК праймером у кільце чи створює довгі одно-дволанцюгові послідовності ДНК, які обробляють ДНК-лігазою, а вивільнені таким чином одноланцюгові ДНК-фрагменти очищують методом електрофорезу в агарозному гелі та виділяють ТЕ-буфером.

Заявлений спосіб створює можливість:

1) отримувати одноланцюгову ДНК швидко й дешево;

2) створювати кільцеві ДНК;

3) створювати довгі послідовності фрагментів ДНК, які повторюються.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю відмінних ознак та технічним результатом полягає у наступному. Спосіб реалізовано в системі in vitro (у пробірці), що дозволяє уникнути маніпуляцій з бактеріями, для утримання та зараження котрих

(19) **UA** (11) **61929** (13) **U**

потрібен час, тому завдяки винаходу збільшується швидкість отримання одноланцюгових молекул ДНК.

Після отримання дволанцюгової матриці ДНК дослідник має вибір для рішення декількох завдань: отримання одноланцюгових фрагментів, створення довгих послідовностей фрагментів ДНК, які повторюються, синтез кільцевих ДНК.

Спосіб реалізується таким чином.

I крок. Створення дволанцюгового фрагмента ДНК за допомогою ПЛР-аналізу із специфічними праймерами, підібраними на основі секвенований послідовностей геномів.

II крок. Зв'язування одного з фрагментів ДНК праймером у кільце або у одно-дволанцюгові послідовності (Фіг. 1). Для зв'язування фрагменту ДНК у кільце чи формування одно-дволанцюгової послідовності ДНК конструюється такий праймер, частина якого буде відпалюватися на 3'-кінці, а інша на 5'-кінці одноланцюгової послідовності ДНК та проводять ПЛР. Після цього продукти ПЛР обробляють ДНК-лігазою.

Наприкінці реалізації способу одноланцюгові ДНК-фрагменти будуть вільно плавати в розчині реакційної суміші. Одноланцюгові фрагменти ДНК легко відділити від дволанцюгових методом електрофорезу й одержати з агарозного гелю елюючим розчином.

Приклад конкретного виконання.

Для проведення ПЛР використовується наступна реакційна суміш (реактиви фірми "Амплі-Сенс", Москва).

I крок. Реакційна суміш обсягом 30 мкл містить: 5x PCR-буфер - 5 мкл;  $MgSO_4$ , 50 mM - 1,5 мкл;  $H_2O$  (деіонізована) - 3 мкл; dNTP-mix, 2 mM - 2,5 мкл;  $T_{aq}$ -полімераза, 5 од/мкл - 0,5 мкл; мінеральне масло - 10,5 мкл; 2 праймери, 3,3 OD/мол -

по 1 мкл; ТЕ-буфер з досліджуваною ДНК - 5 мкл. ПЛР проводять у режимі: денатурація 94°C - 1 хв., відпал 40-65°C - 1 хв., синтез 72°C - 1 хв. - 5 циклів; денатурація 94°C - 0,5 хв., відпал 40-65°C - 0,5 хв., синтез 72°C - 0,5 хв. - 40 циклів. Термінальну стадію синтезу проводять при 72°C - 3 хв.

Очищені методом електрофорезу в агарозному гелі й виділені ТЕ-буфером дволанцюгові фрагменти ДНК використовують для вивільнення одноланцюгових фрагментів ДНК під час другого кроку.

II крок. Реакційна суміш обсягом 26 мкл містить: 5x PCR-буфер - 5 мкл;  $MgSO_4$ , 50 mM - 1,5 мкл;  $H_2O$  (деіонізована) - 3 мкл; dNTP-mix, 2 mM - 0,25 мкл;  $T_{aq}$ -полімераза, 5 од/мкл - 0,5 мкл; мінеральне масло - 10,5 мкл; 1 праймер, 3,3 OD/мол - 0,1 мкл; ТЕ-буфер з досліджуваною ДНК - 5 мкл. ПЛР проводять у режимі: денатурація 94°C - 1 хв., відпал 40-65°C - 1 хв., синтез 72°C - 1 хв. - 1 цикл. Термінальну стадію синтезу проводять при 72°C - 1 хв. Продукти ПЛР обробляють T4 ДНК-лігазою протягом 65 хв. при температурі 22°C.

Очищені методом електрофорезу в агарозному гелі одноланцюгові фрагменти ДНК виділяють ТЕ-буфером.

Технічне рішення представлене графічно.

Фіг. - Схема отримання одноланцюгових фрагментів ДНК: 0 - фрагмент досліджуваного геному організму; а - дволанцюговий ДНК-фрагмент; b - одноланцюговий ДНК-фрагмент; c - одно-дволанцюгова послідовність ДНК; d - дволанцюгова кільцева ДНК; e - обробка ДНК-лігазою; I, II - кроки методу; P P P P P, D D D D D, Z Z Z Z Z - праймери; А, Б - варіації методу.

Спосіб може знайти промислове застосування при синтезі ДНК-інсектицидів, виробництві ліків на основі ДНК (ДНК-ліки).

