



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110546** (13) **C2**  
(51) МПК  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12R 1/01** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 04334</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Ксьонз Ігор Миколайович (UA),</b> <b>Почерняєв Костянтин Федорович (UA),</b> <b>Цівенко Тетяна Михайлівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>22.04.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Ксьонз Ігор Миколайович,</b> вул. Малорудчанська, 1, кв. 1, м. Полтава, 36008 (UA), <b>Почерняєв Костянтин Федорович,</b> вул. Артема, 45, кв. 35, м. Полтава, 36039 (UA), <b>Цівенко Тетяна Михайлівна,</b> вул. Героїв Сталінграда, 13, кв. 96, м. Полтава, 36040 (UA)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>12.01.2016</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Vlahovic K, Dovc A., Lasta P. Zoonotic aspects of animal chlamydioses - a review // Veterinarski arhiv. – 2006. – Vol.76, – P. 259- 274. RU 2241042 C1, 27.11.2004. RU 2205876 C1, 10.06.2003. Sheehy N., Markey B., Gleeson M., Quinn P. J. Differentiation of Chlamydia psittaci and C. pecorum Strains by Species-Specific PCR // Journal of clinical microbiology. - 1996. - Vol. 34.- No.12.- P. 3175-3179. Цівенко Т. М., Ксьонз І. М. Визначення специфічності та валідація розроблених ПЛР-тест-систем для діагностики хламідіозів свійських м'ясоїдних // Біологія тварин. - 2015. Т. 17. - №2. - С. 157-163. Ксьонз І. М., Цівенко Т. М., Почерняєв К. Ф., Корінний С. М., Розроблення ПЛР-ТЕСТ- системи для індикації бактерій роду CHLAMYDIA у біологічних зразках від свійських собак. // Ветеринарна медицина. - 2014. - №2. - С.102-104.
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.07.2015, Бюл.№ 13</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.01.2016, Бюл.№ 1</b>	

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК БАКТЕРІЙ ВИДУ CHLAMYDIA ABORTUS, CHLAMYDIA PECORUM, CHLAMYDIA PSITTACI У ПОЛІМЕРАЗНІЙ ЛАНЦЮГОВІЙ РЕАКЦІЇ ШЛЯХОМ АМПЛІФІКАЦІЇ ФРАГМЕНТА ГЕНА, ЩО КОДУЄ ЕНДОРИБОНУКЛЕАЗУ Р (RNASE P RNA)**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу визначення ДНК бактерій *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, що викликають захворювання у свійських собак, у полімеразній ланцюговій реакції шляхом ампліфікації фрагмента гена, що кодує ендорибонуклеазу Р (RNase P RNA), за допомогою пари праймерів: прямого: CHCPF:5'-GGAGAACTCCAGGGGCCGT-3' та

**UA 110546 C2**

зворотного: CHCPR:5'-GGCAACCATTCATCTAGGGGA-3' з одержанням фрагмента гена ендорибонуклеази розміром 253 пари нуклеотидів.

Винахід належить до молекулярної біології, біотехнології та ветеринарної медицини. Він може бути використаний для діагностики та дослідницьких робіт.

Одним із способів діагностики хвороб, що викликаються мікроорганізмами, є визначення останніх за унікальністю нуклеїнової кислоти, оснований на ампліфікації ДНК у полімеразній ланцюговій реакції (ШЛР). ШЛР - це циклічний процес, кожний цикл якого складається з трьох етапів:

1) денатурація нуклеїнової кислоти, що досліджується;

2) ренатурація нуклеїнової кислоти з олігонуклеотидними праймерами, що обмежують ампліфіковану ділянку;

3) синтез обмеженої праймерами ділянки ДНК до рівня виявлення. Тривалість циклу 1,5-3 хвилини, а число циклів, залежно від кількості вихідного матеріалу - від 30 до 40. Ключовим параметром, що визначає специфічність та чутливість ШЛР є "якість" праймерів: ступінь їх гомології з ДНК матрицею, відсутність взаємної та неспецифічної ренатурації.

Існує ШЛР-тест-система "Полимик" виробництва НВФ "Литех" для ШЛР-ампліфікації ДНК *Chlamydia trachomatis* [1]. Основною відмінністю тест-системи, що пропонується є ШЛР-ампліфікація ДНК *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, які є етіологічними чинниками хламідіозів ссавців, зокрема свійських собак.

В основу винаходу поставлено задачу сконструювати праймери власного дизайну, що будуть обмежувати за складом нуклеотидних послідовностей ділянку гена, який кодує ендорібонуклеазу Р (RNase P RNA) бактерії роду

*Chlamydia* (*Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*) для діагностики хламідійних інфекцій свійських собак.

Поставлена задача вирішується тим, що як і в способі визначення бактерії *Chlamydia trachomatis* за методом ШЛР, у способі, що пропонується також використовується такий підхід. Створення олігонуклеотидних праймерів для визначення хламідійних інфекцій свійських собак у полімеразній ланцюговій реакції передбачало пошук специфічних ділянок гена, що кодує RNase P RNA бактерії роду *Chlamydia* трьох видів: *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci* (які є етіологічними чинниками хламідіозів ссавців, зокрема свійських собак) та зручних для електрофоретичної детекції. Для аналізу з бази даних GenBank [1], були вибрані первинні послідовності геномів бактерій родини *Chlamydia* трьох означених видів: *Chlamydia*: DQ257295 *Chlamydia abortus*, AJ012173 *Chlamydia pecorum*, AJ310737 *Chlamydia psittaci*.

Згідно з винаходом, для ШЛР використовуються олігонуклеотидні праймери, які обмежують консервативну ділянку гена, що кодує ендорібонуклеазу Р (RNase P RNA) бактерії родини *Chlamydiaceae* роду *Chlamydia* видів *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*. Для цього використовується пара розроблених праймерів - одного прямого: CHCPF:5'-GGAGAAACTCCAGGGCCGT-3" та одного зворотного: CHCPR:5'-GGCAACCATTCATCTAGGGGA-3" Продуктом ШЛР є фрагмент гена RNase P RNA, що має розмір - 253 пари нуклеотидів характерний для бактерії *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, що викликають захворювання ссавців, і свійських собак зокрема.

Електрофоретичне розділення продуктів ШЛР у поліакриламідному або агарозному гелі дозволяє чітко визначати наявність ДНК збудників хламідіозу свійських собак за відповідним розміром ампліфікованого фрагмента.

Ідентичність продукту ШЛР підтверджується рестрикційним аналізом з використанням ендонуклеази Alu I, в результаті якого повинні утворюватися два фрагменти ДНК з розміром 104 та 149 пар нуклеотидів.

Пропонований спосіб визначення збудника хламідіозу свійських собак має наступну перевагу: діагностика хламідійної інфекції за консервативною ділянкою ДНК бактерій *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, що є ендемічним збудником хламідіозу у означеного виду ссавців.

Джерела інформації:

1. ТУ-9398-405-17253567-96. Наборы реагентов для обнаружения ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma Hominis*, *Ureaplasma urealyticum* (ПОЛИМИК) в биологических пробах методом полимеразной цепной реакции. Инстр. по примен. - М., НПФ "ЛИТЕХ". - 1996. - 4 с.

2. GenBank (версія 00.2003 року).

3. Virtual Genome Center (<http://alsec/med/umn/edu/VGC.html>).

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 Спосіб визначення ДНК бактерій виду *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci* у полімеразній ланцюговій реакції шляхом ампліфікації фрагмента гена, що кодує ендорибонуклеазу Р (RNase Р RNA), який **відрізняється** тим, що ампліфікацію консервативної за нуклеотидним складом ділянки фрагмента гена RNase Р RNA здійснюють за допомогою пари праймерів: прямого: СНСРF:5'-GGAGAAACTCCAGGGGCCGT-3' та зворотного: СНСРR:5'-GGCAACCATTCTAGGGGA-3' з одержанням фрагмента гена ендорибонуклеази розміром
- 10 253 пари нуклеотидів бактерій *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, що викликають захворювання у свійських собак.

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

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