



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118844

(13) U

(51) МПК

C12Q 1/68 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 02854	(72) Винахідник(и): Бергілевич Олександра Миколаївна (UA), Касянчук Вікторія Вікторівна (UA), Дерябін Олег Миколайович (UA), Терьохіна Олена Вікторівна (UA), Моня Юлія Іванівна (UA), Коростіль Сергій Олексійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.03.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 28.08.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 28.08.2017, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕІНОВОЇ КИСЛОТИ (ДНК) БАКТЕРІЙ CRONOBACTER SPP. (ENTEROBACTER SAKAZAKII)**(57) Реферат:**

Спосіб виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) бактерій Cronobacter spp. (Enterobacter sakazakii) включає виявлення в досліджуваних зразках специфічних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) за допомогою мультиплексного варіанту полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). При цьому, для проведення ПЛР використовують штучно синтезовані олігонуклеотидні праймери, які є специфічними фрагментами до гену 16S rRNA, з наступною послідовністю нуклеотидів:

праймер d16sakF1 (5'-TAACTCCGTGCCAGCAGCC-3'),

праймер d16SsakR (5'-TAAACCACATGCTCCACCGCT-3'),

розмір фрагмента ДНК, що синтезується для обох праймерів, - 451 пар нуклеотидів,

праймер d16SsakF3 (5'-GGCAGGCTTGAGTCTCGTAG-3'),

розмір фрагмента ДНК, що синтезується для даного праймера, - 314 пар нуклеотидів,

праймер 2d16S-F (5'-AGCTAATACCGCATAACGTCTACG-3'),

праймер 2d16S-R (5'-AGGCACTCCCGCATCTCTG-3'),

розмір фрагмента ДНК, що синтезується для обох праймерів, - 863 пар нуклеотидів.

UA 118844 U

Корисна модель належить до мікробіології (медичної та ветеринарної) і молекулярної біології, зокрема до лабораторної діагностики, призначена для виявлення специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) і може бути використана в діагностичних дослідженнях щодо виявлення в досліджуваних об'єктах даного виду мікроорганізмів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Запропонований спосіб полягає у виділенні з досліджуваної проби ДНК бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) з наступною ампліфікацією специфічної ділянки ДНК з використанням оригінальних специфічних олігонуклеотидних праймерів. Детекція продуктів ПЛР аналізу проводиться методом електрофорезу в агарозному гелі.

Бактерії *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) відносять до колиформних мікроорганізмів з родини Enterobacteriaceae, які досить поширені в різних харчових продуктах (сире молоко, молочні продукти (сир, масло, сухе молоко), м'ясо та м'ясні продукти, фрукти, спеції) та об'єктах навколишнього середовища (вода, ґрунт, об'єкти тваринницьких ферм та об'єкти харчових підприємств). Проте, вищезазначені мікроорганізми є умовно-патогенними мікроорганізмами, що можуть спричинити виникнення токсикоінфекцій у людей та раптову смертність від 40 до 80 % у немовлят віком до 6 місяців, що характеризується ознаками менінгіту, сепсису та некротичного ентероколіту [1].

Бактерії *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) належать мікроорганізмів, які добре ростуть на селективних накопичувальних середовищах для патогенних ентеробактерій, проте їх видова ідентифікація пов'язана з певними труднощами, так як вони мають подібні фенотипічні властивості з іншими бактеріями родини Enterobacteriaceae (*Salmonella* spp., *Enterobacter* spp. та *Escherichia* spp.) і особливо близько спорідненими є з бактеріями *Enterobacter cloacae* та *Enterobacter agglomerans* (інша назва *Pantoea agglomerans*).

Відомі класичні лабораторні способи виявлення та ідентифікації бактерії *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*), що базуються на вивченні культуральних та біохімічних властивостей даного мікроорганізму [2].

Недоліками зазначених способів є їх трудомісткість, тривалість і недостатня специфічність відносно диференціації представників даного виду мікроорганізмів. Найбільш достовірними на сьогодні вважаються молекулярно-генетичні методи, що ґрунтуються на виявленні ознак видоспецифічності мікроорганізмів, які заковані в їх генах. До таких методів належать полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Аналіз існуючих в науковій літературі послідовностей генів-мішеней (16SrRNA, *gluA*, *ompA*, *gyrB*; MMS оперон (*dnaG*, *gpaU*, *groD*) специфічних відносно бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*), які б забезпечили необхідну вірогідність в виявленні та ідентифікації збудника дав змогу виявити специфічність ділянок гену 16SrRNA.

Прототипом запропонованої корисної моделі є спосіб постановки полімеразної ланцюгової реакції, що зазначений в методичних вказівках 4.2.2872-11 "Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией".

Відмінними ознаками прототипу від заявленого способу є компоненти для ПЛР, а саме пари олігонуклеотидних праймерів - специфічні фрагменти гену 16SrRNA (праймери d16SsakR1, d16SsakF1 і d16SsakF3).

Недоліком зазначених праймерів є те, що вони містять паліндроми та петлі, а також, схильні до утворення численних гомо- та гетеродимерів, що в цілому впливає на специфічність реакції. Одночасне використання вказаних праймерів в мультиплексному варіанті ПЛР не є ефективним. Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність і відтворюваність ПЛР.

В зв'язку з цим, актуальним питанням є розробка специфічного та швидкого способу виявлення та ідентифікації бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*).

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення існуючого способу виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) методом полімеразної ланцюгової реакції шляхом зміни композицій послідовності нуклеїнових кислот в олігонуклеотидних праймерах для підсилення специфічності показника вірулентності у конкретних нуклеїнових кислот та їх фрагментів.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*), що включає виявлення в досліджуваних зразках специфічних праймерів ДНК за допомогою мультиплексного варіанту полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), згідно із корисною моделлю, для проведення

ПЛР використовують штучно синтезовані праймери з наступною послідовністю нуклеотидів, що зазначено в таблиці 1.

Таблиця 1

Пари олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA та послідовності генів з консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)

№	Праймер	Послідовність (5'→3")	Розмір фрагмента (п.н.)
1	D16sakF1	TAACTCCGTGCCAGCAGCC	451
2	D16SsakR	TAAACCACATGCTCCACCGCT	
3	D16SsakF3	GGCAGGCTTGAGTCTCGTAG	314
4	2d16S-F	AGCTAATACCGCATACGTCTACG	863
5	2d16S-R	AGGCACTCCCGCATCTCTG	

5 Суть корисної моделі пояснюється кресленням, де зображено використання пар штучно синтезованих олігонуклеотидних праймерів.

На кресл. показано як праймери d16SsakR1, d16sakF1 і d16SsakF3 фланкують ділянку гена 16SrRNA і забезпечують синтез фрагментів ДНК.

10 Спосіб виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) здійснюють наступним чином: у штатив необхідно встановити необхідну кількість пробірок (з розрахунку 1 пробірка на кожний досліджуваний зразок та 1 - для негативного контролю виділення (НKB)) та маркують їх. В кожну пробірку вносять по 0,3 см³ лізуючого розчину та по 0,1 см³ досліджуваних зразків, а в пробірку НKB - 0,1 см³ негативного контрольного зразку (НКЗ).

15 Ретельно, але обережно перемішати на вортексі (або піпетувати, намагаючись при цьому не спінувати розчин) та прогріти у термостаті при (65±0,5)°C 5 хвилин. В кожну пробірку окремим наконечником додати по 0,025 см³ ресуспендованого сорбента. Перемішати на вортексі, поставити в штатив на 2 хв. ще раз перемішати і залишити на 5 хв. Відмити проби розчинами для відмивання. Видалити супернатант використовуючи вакуумний насос і окремий наконечник для кожної проби.

20 Для ампліфікації рекомендується підбирати режим орієнтуючись на режими, які вказані в таблиці 2.

Таблиця 2

Режими ампліфікації для ПЛР

Цикл	Температура, С°	Час	Кількість циклів
1	94	3 хв.	1
2	94	30 сек.	35
3	62	30 сек.	
4	72	30 сек.	
5	72	4 хв.	1
6	10	Зберігання	

25 Після закінчення ампліфікації проводять визначення фрагментів нуклеїнової кислоти в агарозному гелі. Довжина ампліфікованого специфічного фрагмента ДНК бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) - 451 п.н.

30 Достовірна ідентифікація *Cronobacter* spp. (*sakazakii*) на даний час можлива лише за умови використання комплексного підходу, що базується на комбінуванні класичних методів дослідження (мікроскопія, культуральні і біохімічні характеристики), так і молекулярно-генетичних (ПЛР) і зокрема із застосуванням заявленого способу виявлення ДНК бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) з специфічними праймерами d16SsakR1, d16sakF1 і d16SsakF3 гену 16SrRNA.

Джерела інформації:

1. Бергілевич А.Н. Характеристика мікробіологічного ризику *Enterobacter sakazakii* в сиром молоці // А.Н. Бергілевич / Scientific Journal "ScienceRise" (ISSN 2313-6286) - Vol. 5/4(5). - 2014. - Р. - 54-61.

2. Методичні рекомендації "Методи виділення та підрахунку кількості бактерій *Enterobacter* (*Cronobacter*) *sakazakii*" / О.М. Бергілевич, В.В. Касянчук, Т.О. Гаркавенко, Н.А. Межинська // Затверджені науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини України (протокол № 1 від 23 грудня 2010 р). - 2010-38с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) бактерій *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*), що включає виявлення в досліджуваних зразках специфічних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) за допомогою мультиплексного варіанту полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який **відрізняється** тим, що для проведення ПЛР використовують штучно синтезовані олігонуклеотидні праймери, які є специфічними фрагментами до гену 16S rRNA, з наступною послідовністю нуклеотидів:

праймер d16sakF1 (5'-TAACTCCGTGCCAGCAGCC-3'),

праймер d16SsakR (5'-TAAACCACATGCTCCACCGCT-3'),

розмір фрагмента ДНК, що синтезується для обох праймерів, - 451 пар нуклеотидів,

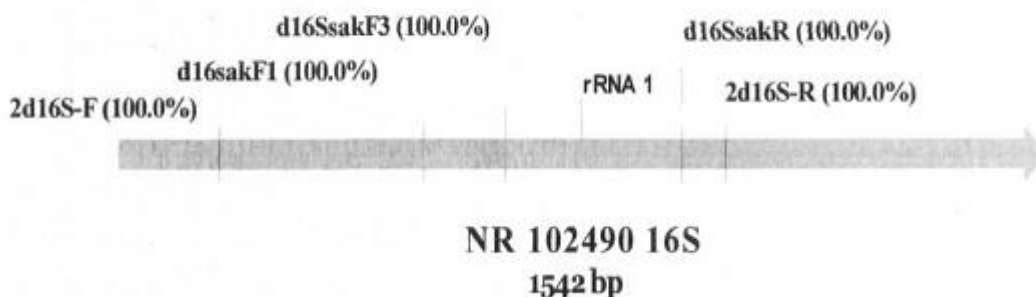
праймер d16SsakF3 (5'-GGCAGGCTTGAGTCTCGTAG-3'),

розмір фрагмента ДНК, що синтезується для даного праймера, - 314 пар нуклеотидів,

праймер 2d16S-F (5'-AGCTAATACCGCATACGTCTACG-3'),

праймер 2d16S-R (5'-AGGCACTCCCGCATCTCTG-3'),

розмір фрагмента ДНК, що синтезується для обох праймерів, - 863 пар нуклеотидів.



Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601