



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **101190**

(13) **U**

(51) МПК

C07K 14/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 03071**

(22) Дата подання заявки: **03.04.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.08.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.08.2015, Бюл.№ 16**

(72) Винахідник(и):

**Уховський Віталій Вікторович (UA),
Куликова Влада Вячеславівна (UA),
Кучерявенко Олександр Олександрович
(UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР РОДУ LEPTOSPIRA, ВИДУ LEPTOSPIRA INTERROGANS У КЛІНІЧНОМУ І ПАТОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ ТА ЗРАЗКАХ ВОДИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспір роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ), здійснюють за допомогою специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) та гібридизаційно-флуоресценції детекції продуктів ампліфікації у режимі реального часу, причому результат ампліфікації ДНК патогенних лептоспір реєструється на каналі флуоресценції FAM/Green за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів Lip L 32, які синтезовані штучно та дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів, при відсутності необхідності проведення електрофорезу для реєстрації результатів реакції.

UA 101190 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, біотехнології, мікробіології, імунології, і виробництва біологічних препаратів.

Аналог корисної моделі - близьким технічним рішенням до об'єкта, що заявляється, - є реакція мікроаглютинації та лізису (РМА).

5 Реакцію ставлять на пластинах із органічного скла з лунками, змішуючи 0,1 см³ досліджуваної сироватки крові тварин з кожного розведення з 0,1см³ антигену.

Контроль реакції - це суміш антигену з фізіологічним розчином по 0,1 см³, в якій лептоспіри повинні залишатись рухомими, без видимих змін морфології та ознак аглютинації і лізису [1].

10 Пластини, які містили суміш сироваток з антигеном, ставлять в термостат і витримують одну годину при температурі 28-30 °С

Реакцію враховують під мікроскопом з конденсором "темного поля" при збільшенні 20 × 10 × 15 і оцінювали в хрестах за чотирибальною системою:

++++ - чотири хрести - аглютиновані 100 % лептоспир;

+++ - три хрести - аглютиновані 75 % лептоспир;

15 ++ - два хрести - аглютиновані 50 % лептоспир;

+ - один хрест - аглютиновані 25 % лептоспир;

- - мінус - аглютинація лептоспир відсутня.

20 Титром вважають найбільше розведення сироватки крові, в якому реакція була оцінена не менше ніж на два хрести при відсутності аглютинації в контролі. Наявність специфічних антитіл у сироватці крові тварин в титрі 1:50 у не вакцинованих, 1:100 - у вакцинованих вважали за позитивну реакцію на лептоспіроз, згідно з чинною настановою лабораторної діагностики лептоспірозу [2].

25 Недоліком реакції мікроаглютинації та лізису є те, що результат враховується візуально шляхом перегляду у темнопольному мікроскопі, що дає можливість виникнення суб'єктивної думки та інтерпретації отриманих результатів, використання значних об'ємів реагентів та культури лептоспир, великої кількості посуду та трудомісткість, а також необхідність працювати з живими культурами лептоспир як антигенів.

Найближчим аналогом корисної моделі є найбільш близька за технічним рішенням - класична полімеразна ланцюгова реакція (класична ПЛР) [3].

30 Ідентифікація та диференціація лептоспир у межах роду *Leptospira* можлива шляхом проведення молекулярно-генетичного аналізу ДНК з визначенням видоспецифічних маркерів патогенних лептоспир (праймерів) (таблиця 1).

Таблиця 1

Праймери для індикації ДНК патогенних лептоспир *Leptospira interrogans* за допомогою класичної ПЛР

Таргетний ген	Назва праймера	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5'→3'	Довжина амплікону
Ген ліпопротеїну зовнішньої мембрани Lip L 32	Lepto F	CGC-TTG-TGG-TGC-TTT-CGG-TGG-T	264
	Lepto R	CTC-ACC-GAT-TTC-GCC-TGT-TGG-G	

35 Екстракцію ДНК проводять за допомогою комерційного набору для екстракції нуклеїнових кислот "ДНК-сорб-В" виробництва "Центрального науково-дослідного інституту епідеміології" (Російська Федерація).

Класичну ПЛР проводять за допомогою комерційного набору "PCR-Core" виробництва фірми IsoGene (Російська Федерація).

40 Аналіз результатів класичної ПЛР проводять у 1,5 % гелі агарози з барвником - бромистий етидій. Після проведення електрофорезу фрагменти ДНК згрупповуються у смужки, які виявляють флуоресцентно при опроміненні ультрафіолетом.

Облік результатів класичної ПЛР проводять за допомогою проведення електрофорезу.

45 У негативному контрольному зразку (К-) смужки повинні бути відсутні. Поява смужки на рівні позитивного контролю свідчить про контамінацію (забруднення) компонентів набору.

У позитивних зразках щодо патогенних лептоспир повинна виявлятися одна смужка жовтогарячого кольору з розміром 264 нуклеотидних залишків.

Отримані результати можна документувати фотографуванням гелів з використанням світлофільтра або використовувати комп'ютерні системи з цифровими відеокамерами.

Недоліком ПЛР є більш тривала постановка реакції, необхідність проведення електрофорезу для обліку результатів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення, який би усував перераховані недоліки прототипу і мав нові якісні показники, а саме: точна візуалізація результатів реакції за допомогою контрольного позитивного та негативного зразків, скорочення витрат реагентів, посуду, спрощення та скорочення часу для постановки реакції за допомогою приладів, відсутність проведення електрофорезу.

Принцип методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) був розроблений американським біохіміком Кері Мюллісом, співробітником фірми "Cetus" [3].

В основу корисної моделі поставлено наступну задачу: - створити новий спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспир роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (ПЛР-РЧ).

Технічний результат корисної моделі полягає в усуненні перерахованих недоліків прототипу і наявності нових якісних показників, а саме: скорочення витрат реагентів, часу обліку результатів, скорочення часу постановки реакції та відсутність суб'єктивності в реєстрації та інтерпретації отриманих результатів, а саме точної реєстрації результатів реакції за допомогою приладів, спостереження за реакцією в реальному часі, безпосередньо вимірюючи накопичення продукту ПЛР в кожному циклі. Принциповою особливістю методу ПЛР в режимі реального часу, на відміну від класичної ПЛР, є можливість кількісного визначення ДНК в досліджуваному матеріалі, відсутність стадії електрофорезу, менш суворі вимоги до організації ПЛР-лабораторії та автоматична реєстрація та інтерпретація отриманих результатів.

Поставлена задача вирішується тим, що у досліджуваних зразках виявляємо специфічні фрагменти нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ) та гібридизаційно-флуоресценції детекції продуктів ампліфікації у режимі реального часу. Результат ампліфікації ДНК патогенних лептоспир реєструється на каналі флуоресценції FAM/Green за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів LipL 32, які синтезовані штучно, та дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів при температурних та часових параметрах та кількості циклів.

Використовують комерційні тест-системи (наприклад ДНК-сорб-В, РИБО-преп, РИБО-сорб виробництва Росія, MoBio Ultra Clean™ BloodSpin™ DNA Isolation Kit).

Матеріалом для лабораторної діагностики лептоспірозу методом ПЛР-РЧ є кров і сеча; трупи дрібних тварин, а саме: серце, шматочки паренхіматозних органів, нирку, транссудат з грудної та черевної порожнини, перикардіальна рідина, сечовий міхур із вмістимим, спинномозкова рідина; абортований плід (цілий або з нього відбирають шлунок із вмістимим та паренхіматозні органи); вода.

Для проведення ПЛР-РЧ використовують наступні компоненти:

Мастер Мікс: (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 0,25 mM кожного дНТФ, 1,5 mM MgCl₂, по 10 nM кожного з праймерів (Lip L 32 F, Lip L 32 R), по 5 nM зонду (LipL 32 P);

Ензим-мікс (0,5 одиниці Taq-ДНК полімерази);

Контрольні зразки:

1. Позитивний контрольний зразок (ПКЗ) - ДНК *L. Icterohaemorrhagiae*.

2. Негативний контрольний зразок (НКЗ) - вода "RNase-free" та "DNase-free".

Зонд для детекції ампліфікації у реальному часі мічений флуоресцентним барвником FAM, на 5'кінці олігонуклеотиду, та гасником флуоресценції BHQ1 - на 3'кінці.

Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність та відтворюваність ПЛР-РЧ (таблиця 2).

Таблиця 2

Характеристика олігонуклеотидних праймерів для детекції ДНК патогенних лептоспир

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність, 5'-3'
LipL 32 F	CGGATAYGTAAAGCCAGGACAAG
LipL 32 R	CGAACTCCCATTTCAGCGATTA
LipL 32 P	FAM-CGGACGGTTTAGTCGAYGGAAACA-BHQ1

Етапи ПЛР-РЧ.

Екстракція ДНК з досліджуваного матеріалу. Проводять комерційним набором для виділення ДНК "ДНК-сорб-В" (ФГУ "ЦНИИЗ" Роспотребнадзора, Россия). Об'єм проби,

необхідний для виділення ДНК -0,1 мл. Розчин для лізису (якщо він зберігався при температурі від +2 до +8 °C прогріти при температурі +65 °C до повного розчинення кристалів). Відібрати необхідну кількість одноразових пробірок об'ємом 1,5 мл внести 300 мкл лізуючого розчину. Промаркувати пробірки, включаючи контроль виділення ДНК (В-). Окремими наконечниками з аерозольним бар'єром внести по 100 мкл проби у пробірку. Для контролю виділення ДНК використовують стерильний фізіологічний розчин в об'ємі 100 мкл. Проби ретельно перемішати на вортексі та прогріти у твердотільному термостаті 5 хв., при температурі +65 °C. Осадити на центрифугу вортексу 5 сек. При не повному розчиненні проби, останню необхідно процентрифугувати на мікроцентрифугу 5 хв., при 8-12 тис об/хв та використовувати для виділення ДНК надосадову рідину. Ретельно ресуспендувати універсальний сорбент на вортексі. У кожен пробірку окремим наконечником додати по 25 мкл ресуспендованого універсального сорбенту. Перемішати на вортексі, поставити у штатив на 5 хв., та ще раз перемішати і залишити у штативі на 5 хв.

Осадити універсальний сорбент у пробірках центрифугуванням при 5 тис. об/хв протягом 30 сек. Видалити надосадову рідину, використовуючи вакуумний аспіратор та окремий наконечник для кожної проби.

Додати у проби по 300 мкл розчину для відмивання 1, перемішати на вортексі до повного ресуспендування універсального сорбенту, процентрифугувати 30 сек. при 10 тис об/хв на мікроцентрифугу. Видалити надосадову рідину, використовуючи вакуумний аспіратор та окремий наконечник для кожної проби.

Додати у проби по 500 мкл розчину для відмивання 2, перемішати на вортексі до повного ресуспендування універсального сорбенту, процентрифугувати 30 сек., при 10 тис об/хв на мікроцентрифугу. Видалити надосадову рідину, використовуючи вакуумний аспіратор та окремий наконечник для кожної проби. Дану процедуру повторити двічі. Надосадову рідину видалити повністю, використовуючи вакуумний аспіратор та окремий наконечник для кожної проби.

Помістити пробірки у термостат при температурі +65 °C на 5-10 хв., для підсушування універсального сорбенту. При підсушуванні кришки пробірок повинні бути відкритими.

У пробірки додати по 50 мкл ТЕ-буфера для елюції ДНК. Перемішати на вортексі. Помістити у термостат при температурі +65 °C на 5 хв., періодично струшуючи на вортексі.

Процентрифугувати пробірки при 12 тис об/хв протягом 1 хв., на мікроцентрифугу. Надосадова рідина містить очищену ДНК. Отримані проби готові до постановки ПЛР.

Очищену ДНК можна зберігати протягом 1 тижня при температурі від +2 до +8 °C та протягом року при температурі не вище мінус 16 °C.

При дотриманні зазначених процедур ефективність виділення ДНК складає 50-70 %.

Підготовка реакційної суміші та проведення ампліфікації. Відібрати необхідну кількість пробірок, об'ємом на 0,2 см³ або кількість лунок у планшеті для ПЛР-РЧ. Розморозити пробірку з "Мастер мікс", ретельно її перемішати на вортексі. Осадити краплини центрифугуванням при 5,0 тис. об/хв., протягом 5 сек., на мікроцентрифугу. Скомпонувати реакційну суміш, змішуючи наступні компоненти з розрахунку на одну реакцію:

19,5 мкл "Мастер мікс";

0,5 мкл "Ензім мікс".

При цьому доцільно готувати реакційну суміш на загальну кількість проб, включаючи контроль. Ретельно перемішати, рознести по 20,0 мкл у чисті пробірки або лунки планшету.

Проведення ампліфікації. Використовуючи наконечники із аерозольним фільтром до кожної пробірки (лунки) із реакційною сумішшю додати по 5,0 мкл виділеної ДНК проби. Під час проведення кожного аналізу необхідно використовувати контрольні зразки: позитивний контрольний зразок (ПКЗ) та негативний контрольний зразок (НКЗ), які додають по 5,0 мкл у пробірки із готовою реакційною сумішшю.

Включити прилад для проведення ПЛР-РЧ (наприклад, "Rotor-Gene 2000/3000" (Corbett Research), "Rotor-Gene Q" (Qiagen), відкрити відповідну до нього програму. Згідно із інструкцією до приладу, задати наступні параметри:

об'єм реакційної суміші - 25 мкл;

тип ротора - 36-well;

режим циклювання (таблиця 3):

Таблиця 3

Умови ампліфікації ДНК патогенних лептоспир за ПЛР-РЧ

№ п/п	Етапи	Температура, °C	Час, сек	Кількість циклів
1	Початкова денатурація ДНК	95	180	1
2	Денатурація ДНК	94	30	40
	Відпалювання праймерів	45	30	
	Елонгація ДНК та вимірювання флуорисценції	72	30	

флуоресценцію вимірюють при 45 °C на каналі FAM.

- Задати функцію оптимізації процесу ампліфікації у наступному порядку: натиснути кнопку "Calibrate"/"Gain Optimisation", далі натиснути кнопку "Calibrate Acquiring"/"Optimise Acquiring". Для барвнику необхідно вказати у графі Min Reading значення 5, а у графі Max Reading - значення 10. У графі "Tube position" вказано номер пробірки, за якої буде автоматично вибраний параметр "gain" - перша пробірка у роторі. Тому у першу позицію ротора необхідно ставити пробірку з реакційною сумішшю. Вибрати функцію "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
- Закрити вікно "Auto Gain Calibration Setup", натиснувши кнопку "Close". Далі натиснути кнопку "Next". Помістити попередньо підготовлені пробірки в ампліфікатор та натиснути кнопку "Start run". Вказати назву експерименту та зберегти його на диску (в цьому файлі будуть автоматично збережені результати даного експерименту). У процесі роботи ампліфікатора або в кінці його роботи необхідно запрограмувати положення пробірок у роторі. Для цього необхідно натиснути кнопку "Edit samples". Всі проби позначають як "невідомі" (Unknown), а контролю позначаються відповідно програмного забезпечення.

Облік та інтерпретація результатів ПЛР-РЧ.

- Результат ампліфікації ДНК патогенних лептоспир реєструється на каналі флуоресценції FAM/Green. ПКЗ використовується для контролю ефективності Taq-ДНК полімерази та контролю хибно-негативних результатів. Натиснути кнопку "Analysis", обрати режим "Quantification", натиснути кнопку "Cycling A FAM", "Show". Скасувати автоматичний вибір порогу детекції (Threshold). В меню основного вікна "Quantification analysis" повинні бути натиснуті дві кнопки "Dynamic tube" та "Slope correct"; в меню основного вікна "More setting" встановити значення NTC threshold-10 %; у меню "Ct calculation" встановити Threshold-0,02. У таблиці результатів (вікно "Quantification result") з'являться значення Ct. При використанні іншого приладу для ампліфікації, користуватись інструкцією до нього.

Облік результатів ПЛР-РЧ аналізу проводиться за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією, що відповідає наявності або відсутності значення порогового циклу Ct.

- Результати аналізу вважаються достовірними, якщо значення Ct по каналу FAM позитивного контрольного зразку (ПКЗ) менше або дорівнює 36 ($Ct \leq 36$) та відсутнє значення Ct негативного контрольного зразку (НКЗ) і контролю виділення ДНК (В-) (таблиця 4).

Таблиця 4

Оцінка результатів аналізу контрольних точок ПЛР-РЧ

Контролі	Етап аналізу	Значення Ct по каналу FAM/Green
В- (контроль виділення ДНК)	виділення ДНК	відсутнє
К- (НКЗ)	ампліфікація	відсутнє
К+ (ПКЗ)	ампліфікація	≤ 36

- Досліджувані зразки вважають позитивними, якщо значення Ct по каналу FAM/Green менше або дорівнює 36 ($Ct \leq 36$), що свідчить про ампліфікацію гена, який кодує специфічну ділянку ДНК патогенних лептоспир. Зразок вважається негативним, якщо значення Ct по каналу FAM/Green відсутнє.

- Результати аналізу не враховуються при:
- відсутності ампліфікації позитивного контрольного зразку (ПКЗ) по каналу FAM;
 - присутності ампліфікації в негативному контрольному зразку (НКЗ) по каналу FAM;
 - якщо значення Ct досліджуваних зразків або контролю по каналу FAM більше 36 ($Ct > 36$);
 - великої розбіжності результатів у повторях.

У цих випадках проводиться повторне випробування!

Джерела інформації:

1. Малахов Ю. А. Лептоспироз животных / Ю. А. Малахов, А. Н. Панин, Г.Л. Соболева. -Я.: ДИА-пресс, 2000. - С. 411-416;
2. Настанова з лабораторної діагностики лептоспирозу. - К., 1996. - 25 с.;
3. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1: 263-273 [PubMed].

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспір роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ), який здійснюють за допомогою специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) та гібридизаційно-флуоресценції детекції продуктів ампліфікації у режимі реального часу, який **відрізняється** тим, що результат ампліфікації ДНК патогенних лептоспір реєструється на каналі флуоресценції FAM/Green за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів Lip L 32, які синтезовані штучно та дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів, при відсутності необхідності проведення електрофорезу для реєстрації результатів реакції.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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