



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112731** (13) **U**
(51) МПК
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 07160	(72) Винахідник(и): Кітам Володимир Олегович (UA), Літовченко Олександр Вікторович (UA), Коробка Вадим Леонідович (UA), Шевченко Любов Миколаївна (UA), Шевченко Тетяна Вікторівна (UA), Янковський Дмитро Станіславович (UA), Димент Галина Семенівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.07.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.12.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2016, Бюл.№ 24	(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ФІРМА "О.Д.ПРОЛІСОК", вул. Софіївська, 17-а, с. В. Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл., 08671 (UA)

(54) СПОСІБ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІФІДОБАКТЕРІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ СПЕЦИФІЧНИХ ПРАЙМЕРІВ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ**(57) Реферат:**

Спосіб якісного та кількісного визначення вмісту біфідобактерій *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції реального часу, згідно з яким використовують праймери В. lonF 5'-TTTCTATTGAACAGACACAGGTTTGCCC-3' та В. lonR 5'-AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку CRISPR довжиною 268 пар нуклеотидів (1807...2074) В. *longum* subsp. *longum*, яка характеризується високою видо-/штамспецифічністю та є однокопіювальною, що дозволяє точно визначити кількість клітин бактерій даного виду у зразках, що досліджуються.

UA 112731 U

Корисна модель належить до мікробіології й може бути використана для якісного та кількісного визначення вмісту бактерій виду *Bifidobacterium longum subsp. longum* у складі пробіотиків, бактеріальних препаратів та ферментованих харчових продуктів, що містять багатовидові консорціуми мікроорганізмів, методом полімеразної ланцюгової реакції.

Розробка та виробництво продуктів на основі багатокомпонентних бактеріальних консорціумів потребують постійного якісного та кількісного контролю їх складу. Стандартні мікробіологічні підходи, такі як виділення окремих культур та ідентифікація їх таксономічного положення на основі вивчення морфологічних та біохімічних властивостей, не завжди дають можливість кількісно визначити вміст різних компонентів у складі мультисимбіозу. Необхідно відмітити, що такі методи є відносно часо- та працезатратними. Використання сучасних методів, заснованих на детекції та ідентифікації послідовностей ДНК із використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), дозволяє значно прискорити видову ідентифікацію складових мікробних консорціумів. Крім того одна з модифікацій цього методу - кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (ПЛР-РЧ) дозволяє проводити не тільки якісний, але й кількісний аналіз складових мультисимбіозів.

Полімеразна ланцюгова реакція базується на багатократному виборчому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів *in vitro* (в штучних умовах) (Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 p., T. 239, ss. 487-491). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє задані умови, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку навіть в надзвичайно малих концентраціях. Така вибірковість та специфічність ПЛР досягається завдяки ретельно підібраним праймерам (зазвичай короткі, хімічно синтезовані молекули ДІЖ довжиною 20-30 нуклеотидних залишків), які обмежують з двох боків послідовність, що розмножується/копіюється/ампліфікується.

На сьогодні метод ПЛР широко використовується для ідентифікації та детекції видоспецифічних генів.

Відомо спосіб ідентифікації представників роду *Bifidobacterium* методами ПЛР, що базується в основному на ампліфікації специфічних ділянок кластеру генів які кодують 5S, 16S, 23S субодиниці бактеріальної рибосоми та спейсери між ними (Hyuk-Sang Kwon, Eun-Hee Yang, Seung-Hun Lee, Seung-Woo Yeon, Byung-Hwa Kang, Tae-Yong Kim. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 2005 p., T. 250, 1, ss. 55-62). Висока консервативність даного кластеру дозволила розробити праймера для ідентифікації не тільки окремих видів та підвидів, але й загалом роду *Bifidobacterium*. В той же час така консервативність може спричинювати появи хибно-позитивних результатів для деяких штамів, а різна копіюваність цих генів не тільки у різних видів, але й у різних штамів не дозволяють використовувати їх для достовірного аналізу кількості бактеріальних клітин в дослідних зразках.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб визначення наявності ДНК бактерій виду *Bifidobacterium longum subsp. longum*, який базується на полімеразній ланцюговій реакції із використанням праймера до ділянки одного з генів рибосомального оперону, що кодує синтез 16S субчастинки рибосомальної РНК (Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., and Oyaizu, H. 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA gene-targeted species-specific primers. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4506-4512. - прототип). Так, вказані праймера (BiLON-1: 5'-TTCCAGTTGATCGCATGGTC-3' та BiLON-2: 5'-GGGAAGCCGTATCTCTACGA-3') дозволяють ампліфікувати ділянку гену 16S рРНК довжиною 831 пар нуклеотидів. До недоліків вказаного способу слід віднести високу консервативність гену 16S рРНК, що може призводити до не специфічного зв'язування цих праймерів із геном 16S рРНК інших представників роду *Bifidobacterium*. Крім того необхідно відмітити різну копіюваність даного гену не лише у представників різних видів, але й штамів цього роду. Це часто ускладнює, а подекуди й унеможливорює проведення точного кількісного аналізу вмісту *Bifidobacterium longum subsp. longum*.

Задачею корисної моделі є створення способу якісного та кількісного визначення вмісту *B. longum subsp. longum* за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення наявності ДНК бактерій виду *Bifidobacterium longum subsp. longum*, який базується на полімеразній ланцюговій реакції, використовували праймери B. lonF 5'-TTTCTATTGAACAGACACAGGTTTGGCC-3' та B. lonR 5'-

AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку CRISPR довжиною 268 пар нуклеотидів (1807...2074) *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Продукт ампліфікації:

1 ttctattga acagacacag gtttccccg catgcgcggg gatgatccgc actggagttc
 61 gtggacatgg acgcgccgca cgtttcccc gcatgcgcgg ggatgatccg aacgagccga
 5 121 acagggagcc gatcttacc aagtttggcc cgcgcgcgcg gggatgatcc ggatattcgtg
 181 caggacacga agtggttcgc gtagttggcc ccgcgcgcgc ggggatgatc cgcattcggc
 241 aacggcggca aaatcggcaa atcagttt

Дана ділянка геному характеризується високою видо-/штамспецифічністю та не має копій, що дозволяє точно аналізувати кількість клітин *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* у зразках.

10 Праймери було підібрано за допомогою програми PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) згідно з правилами молекулярного дизайну, базуючись на даних повного секвенування геному *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (Hao, Y., Huang, D., Guo, H., Xiao, M., An, H., Zhao, L., Zuo, F., Zhang, B., Hu, S., Song, S., Chen, S. and Ren, F. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68, a new strain from a healthy Chinese centenarian. J. Bacteriol. 2011 p., T. 193, 3, ss. 787-788.) взятих з бази даних GenBank (NC_014656). Було вибрано ділянку CRISPR (1807...2074), яка характеризується високою видо-/штамспецифічністю та не має повторів/копій, що дозволяє точно аналізувати кількість клітин *B. longum* subsp. *longum* у зразку. Порівняльний аналіз вибраних олігонуклеотидних праймерів здійснювали за допомогою програми Blast

20 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) для виключення фрагментів гомологічних до ДНК споріднених та неспоріднених видів. Геномний аналіз проводився за повними послідовностями геномів бактерій, доступних в GenBank, на основі гомології до нуклеотидної послідовності генів молочнокислих бактерій за допомогою програми Blast.

Спосіб здійснюють таким чином: із відібраного зразка виділяють ДНК (лужний лізис із подальшим спиртовим осадженням чи будь-який відповідний набір для виділення ДНК з бактеріальних клітин), роблять стандартну суміш для ПЛР-«реального часу» із додаванням ZuberGreen1 чи SybrGreen (відповідно до інструкцій виробника реактивів), проводять реакцію використовуючи будь-який ампліфікатор, який підтримує ПЛР-РЧ та дозволяє знімати показники флуоресценції для SybrGreen чи FAM. Кількісний аналіз отриманих даних проводять за допомогою стандартної кривої (будується для кожного конкретного штаму окремо) чи відносно паралельної реакції із додаванням зразка ДНК, отриманої із відомої кількості клітин (розраховується за формулою:

$$\text{Кількість клітин у зразку} = \text{кількість клітин в контролі} * 2^{-(Ct(\text{зразку}) - Ct(\text{контролю}))}$$

35 Запропонований спосіб може бути застосовано при дослідних та виробничих роботах з ідентифікації та оцінки кількості біфідобактерій *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* у бактеріальних препаратах, заквасках та ферментованих харчових продуктах за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

Корисна модель пояснюється прикладом.

40 Приклад. Визначення якісного та кількісного вмісту *B. longum* subsp. *longum* за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції реального часу в окремій культурі та мультисимбіозі.

Для виділення ДНК на молоці було вирощено три добові культури: чиста культура *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, пробіотичний мультисимбіоз "Симбітер" та мультисимбіоз, який не містить *B. longum* subsp. *longum*. ДНК виділяли з 1 мл добової культури шляхом лізису бактеріальних клітин із подальшим спиртовим висолюванням ДНК. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу використовували термостабільну Taq ДНК полімеразу, відповідний 2,5х ПЛР-буфер (вже містив 25 mM MgCl₂ та 1x ZUBRGreen), розчини чотирьох дезоксирибонуклеотидтрифосфатів в об'ємі:

2,5х буфер	10 мкл
dNTP 2,5 mM	2,5 мкл
Taq	2,5 мкл
Праймер Forward	2 мкл
Праймер Reverse	2 мкл
ДНК проба	6 мкл

50 ПЛР-РЧ проводили за допомогою приладу "ДНК-Технологія ДТ-322" з відповідним програмним забезпеченням. Параметри:

- початкова стадія денатурації ДНК при 94 °C впродовж 5 хвилин;
- 50 циклів, які складаються з:
- етапу при 94 °C впродовж 30 секунд;
- етапу при 61 °C впродовж 30 секунд;

- етапу при 72 °C впродовж 30 секунд;
 - кінцева стадія елонгації при 72 °C впродовж 5 хвилин.
 - "Крива плавлення", яка складається з 80 циклів зменшення температури на 0,5 °C з 94 °C до 54 °C по 30 с

5 Полімеразну ланцюгову реакцію "реального часу" проводили з різними пробами ДНК: реакція № 1 ампліфікація ДІЖ чистої культури *B. longum* subsp. *longum*, реакція № 2 ампліфікація ДНК мультисимбіозу та реакція № 3 ампліфікація ДНК мультисимбіозу, який не містив *B. longum* subsp. *longum*.

10 З кожної реакції відбирали по 10 мкл кінцевого продукту ПЛР і аналізували шляхом електрофорезу в агарозному гелі. Для розділення фрагментів ДНК отриманих під час проведення ПЛР використовується 2 % агарозний гель, який містить бромистий етидій для фарбування ампліконів і подальшої візуалізації результатів під дією ультрафіолетових променів.

15 Кількісно вміст *B. longum* subsp. *longum* в чистій культурі оцінювали відносно мультисимбіозу (концентрація клітин *B. longum* subsp. *longum* відома) згідно з формулою:

$X = N_{\text{контроль}} * 2^{-(Ct(X) - Ct(\text{контроль}))}$, - де N - кількість клітин в контролі, Ct - це цикл ПЛР в реальному

20 часі, на якому проходить статистично достовірне збільшення флуоресценції по відношенню до базового рівня флуоресценції. Оскільки концентрація клітин *B. longum* subsp. *longum* в 1г мультисимбіоза складала $2 \cdot 10^9$, то $X = 2 \cdot 10^8 * 2^{-(21 - 24)} = 1,6 \cdot 10^9$. Таким чином в чистій культурі *B. longum* subsp. *longum* кількість клітин в 1 грамі складає $1,6 \cdot 10^9$.

25 Результати полімеразної ланцюгової реакції наведені на Фіг. 1 Визначення ДНК *B. longum* subsp. *longum* методом ПЛР-РЧ, де показано чисту культуру *B. longum* subsp. *longum* (1), повноцінний мультисимбіоз (2) та мультисимбіоз, який не містить *B. longum* subsp. *longum* (3) та Фіг. 2 Гель-електрофорез продуктів ампліфікації, де показано чисту культуру *B. longum* subsp. *longum* (1), повноцінний мультисимбіоз (2), мультисимбіоз, який не містить *B. longum* subsp. *longum* (3) та маркер (М).

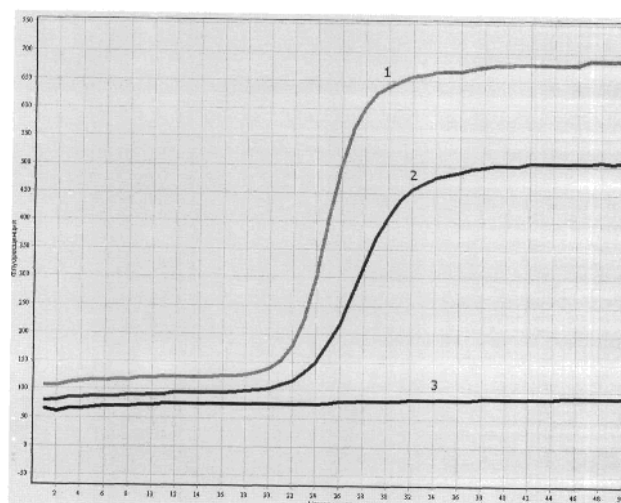
Таким чином, запропонований спосіб дозволяє ефективно використовувати метод ПЛР- "реального часу" для якісного та кількісного визначення вмісту *B. longum* subsp. *longum* за допомогою специфічних праймерів.

30

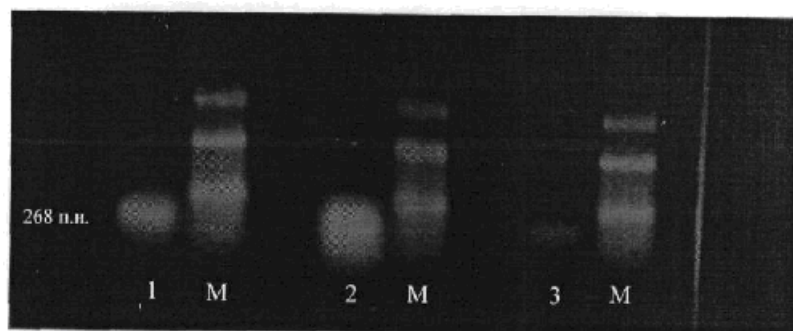
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб якісного та кількісного визначення вмісту біфідобактерій *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* за допомогою специфічних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції реального часу, який **відрізняється** тим, що використовують праймери *B. lonF* 5'-TTTCTATTGAACAGACACAGGTTTGCCC-3' та *B. lonR* 5'-AAACTGATTTGCCGATTTTGCC-3', які дозволяють ампліфікувати ділянку CRISPR довжиною 268 пар нуклеотидів (1807...2074) *B. longum* subsp. *longum*, яка характеризується високою видо-/штамспецифічністю та є однокопійовальною, що дозволяє точно визначити кількість клітин бактерій даного виду у зразках, що досліджуються.

40



Фіг. 1



Фіг.2

Комп'ютерна верстка В. 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