



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 116390

(13) U

(51) МПК

G01N 33/535 (2006.01)

A61K 39/187 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 06964**

(22) Дата подання заявки: **29.06.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.05.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.05.2017, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Ситюк Микола Петрович (UA),
Спиридонов Владислав Геннадієвич
(UA),
Галка Ігор Васильович (UA),
Ничик Сергій Анатолійович (UA)**

(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для діагностики африканської чуми свиней призначений для виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних, паранхіматозних органів, тканин) ДНК вірусу АЧС шляхом приготування суспензії з патологічного субстрату, виділенням нуклеїнової кислоти та її ампліфікації. Детекцію ДНК вірусу АЧС здійснюють за специфічною ділянкою гена, що кодує вірусний протеїн вірусу (VP72) специфічними праймерами (прямий - gcagggcaagggtatactga, зворотний - ctctgatgagggctcttgct, флуоресцюючий зонд - FAM-tcatcggaaagcattcatga-BHQ1), що дозволяє виявити не менше 10 копій вірусної ДНК.

UA 116390 U

Галузь техніки до якої належить винахід: ветеринарна вірусологія, зокрема для виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних, паранхіматозних органів, тканин) ДНК вірусу африканської чуми свиней (АЧС) шляхом приготування суспензії з біологічного субстрату, виділенням нуклеїнової кислоти та її ампліфікації.

У світовій практиці за діагностики африканської чуми свиней в лабораторних умовах використовуються наступні методи: реакція гемадсорбції (РГАд), метод флуоресціюючих антитіл (МФА), твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), імуопероскидазний тест (NPLA) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Одним із сучасних та високочутливих тестів за діагностики АЧС є полімеразна ланцюгова реакція у різних модифікаціях, вітчизняних тест-систем якої в Україні не розроблено.

Аналог винаходу.

"Способ и тест-система для обнаружения ДНК вируса африканской чумы свиней с помощью специфических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции / Калабеков И.М., Жигалева О.Н., Власова Н.Н., Цыбанов С.Ж., Колбасов Д.В. 2009. Изобретение к Патенту 2009 г. [1]."

Постановка реакції.

Поставлена задача вирішується способом для виявлення ДНК вірусу АЧС в зразках органів і крові хронічно інфікованих, хворих та загинув тварин та в інфікованій культурі клітин, за якого для постановки ПЛР проводять денатурацію досліджуваної ДНК за температури 94 °С, гібридизацію ДНК зі специфічними праймерами, комплементарними в висококонсервативній області геному вірусу АЧС району гена Р30, що має наступний нуклеотидний склад:

P30F-5' - aga atg ggg atc cat tct gca tgt get gtt tga-3'

P30R-5' - cta aaa atc cgg atg tag gtg aga tta aag ctt a-3',

з температурою відпалу 55 °С протягом 10-30 сек. з числом циклів ампліфікації від 30-35, потім проводять оцінку результатів реакції без попередньої рестрикції одержаного продукту і тест-системи, до складу якої входить три набори з пластиковими флаконами та пробірками:

1) набір для виділення нуклеїнових кислот, що містить нуклеосорбент з буфером для відмивання на основі гуанідинтіюанату;

2) набір для постановки ПЛР, який включає специфічні олігонуклеотидні праймери, комплементарні висококонсервативній області геному вірусу АЧС району гена Р30, який має наступний нуклеотидний склад:

P30F-5' - aga atg ggg atc cat tct gca tgt gct gtt tga-3'

P30R-5' - cta aaa atc cgg atg tag gtg aga tta aag ctt a-3'

термостабільний фермент Таг-полімерази, ПЦР-суміш для постановки реакції, позитивний контроль;

3) набір для проведення електрофорезу, що містить агарозу і буфер для електрофорезу з бромистим етидієм.

Перший набір дозволяє швидко та якісно виділяти ДНК вірусу АЧС без попередньої підготовки суспензії із органів і виділення формених елементів з крові.

При постановці ПЛР у другому наборі походить багаторазове повторювання циклів денатурації досліджуваної ДНК за температури 94 °С, гібридизації ДНК зі специфічними праймерами за температури 55 °С і синтезу з них комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою стабільної ДНК-полімерази за температури 72 °С і одночасної посадки праймерів, при цьому виключається використання метилгідроксиду ртуті. У результаті ампліфікації концентрація синтезованого фрагменту в досліджуваній пробі збільшується в мільйони разів, що дозволяє візуально враховувати результати аналізу за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (третій набір).

Технічним результатом винаходу є підвищення ступеня специфічності і чутливості, а також скорочення часу проведення діагностичної роботи в зразках органів і крові від хворих тварин.

За наявності в досліджуваному зразку геному вірусу АЧС синтезується фрагментом 374 п.о. Встановлено, що в процесі виділення виникає "стандартний" вихід ДНК, що не потребує попереднього багаторазового розведення нуклеїнової кислоти для постановки ПЛР.

Даний аналог взято як найближчий прототип.

В основу винаходу поставлена задача розробити полімеразну ланцюгову реакцію у режимі реального часу для діагностики африканської чуми свиней з метою виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних, паранхіматозних органів, тканин) ДНК вірусу.

Поставлена задача вирішується тим, що матеріалом дослідження була ДНК вірусу африканської чуми свиней, генотип І (VP72), надана Експериментальним інститутом Зоопрофілактики (Перуджа, Італія).

ДНК та РНК із клінічного матеріалу виділяли загальноприйнятим методом [4].

- Нуклеотидну послідовність праймерів та флуоресцентних зондів було підбрано із використанням програми Primer Express (Applied Biosystems). TaqMan® зонд для детекції фрагменту ДНК вірусу АЧС мічений флуоресцентним барвником FAM (6-карбоксифлуоресцин), а для детекції внутрішнього контролю специфічного для свині - JOE (ефір 6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцин-N-гідроксисукциніміду).

Таблица 1

Праймери для детекції ДНК вірусу АЧС

Мішень	Нуклеотидна послідовність		
	Прямий	Зворотний	Флуоресціюючий зонд
вірус АЧС	gcaggggcaaggggtatactga	ctctgatgaggggctcttgct	FAM- tcatcggaaagcattcat ga-BHQ1

- Ампліфікацію здійснювали в режимі реального часу на приладі ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems) із наступним температурним профілем: активація ДНК полімерази - 5 хв. при 94 °C, та 45 циклів ампліфікації, які включали денатурацію (20 сек. при 95 °C), відпалювання праймерів (30 сек. при 55 °C) та елонгацію (30 сек. при 72 °C).

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3.

- Для детекції ДНК вірусу АЧС було вибрано ділянку гена нуклеопротейну збудника. Щоб попереджати отримання псевдонегативних результатів та контролювати якість і кількість виділеної ДНК було підбрано праймери для детекції специфічного для свиней гену.

- При оптимізації ПЛР-аналізу визначали оптимальну температуру відпалювання праймерів, концентрацію праймерів та флуоресцентних зондів. Шляхом емпіричного підбору встановлено, що оптимальною температурою відпалювання праймерів, при якій забезпечується максимальна специфічність та ефективність ПЛР, є 55 °C. На рис. показано приклад позитивного та негативного зразка щодо АЧС.

- Для встановлення специфічності ПЛР аналізу було проведено дослідження на різному біологічному матеріалі (табл.). Як видно із представлених в таблиці результатів дослідження за допомогою розробленого аналізу відбувається детекція специфічного фрагменту ДНК вірусу АЧС. Перехресних чи неспецифічних реакцій на інших біологічних об'єктах не відмічається. Додатково специфічність аналізу було підтверджено шляхом сиквенування продуктів ампліфікації та порівняння отриманих нуклеотидних послідовностей із базою даних NCBI (National Center for Biotechnology Information).

На фіг. 1 зображені криві ампліфікації за барвниками FAM та JOE.

- На фіг. 2 зображені криві ампліфікації, отримані при постановці розведень плазмодної ДНК (А – 1000 копій, В – 100 копій, С – 10 копій).

Таблица 2

Результати дослідження по вивченню специфічності аналізу.

№	Біологічний матеріал	Результат дослідження методом ПЛР у реальному часі набором	
		Значення граничного циклу Ct (FAM)	Значення граничного циклу Ct (JOE)
1	ДНК вірусу АЧС	21,04	21,05
2	ДНК вірусу АЧС	21,45	21,48
3	Стабілізована кров свиней, що не містить вірус АЧС	-	22,03
4	Стабілізована кров свиней, що не містить вірус АЧС	-	21,25
5	Стабілізована кров свиней, що не містить вірус АЧС	-	21,96
6	Стабілізована кров свині, хворої на репродуктивно-респіраторний синдром свиней (PPCS)	-	20,06

7	Стабілізована кров свині, хворої на хламідіоз	-	21,85
8	Стабілізована кров свині, хворої на хламідіоз	-	21,78
9	Стабілізована кров свині, хворої на КЧС	-	25,45

Чутливість аналізу визначали на розведеннях плазмідної ДНК, яка містить фрагмент ДНК вірусу АЧС. Встановлено, що за допомогою запропонованого тесту можна виявити не менше 10 копій вірусної ДНК.

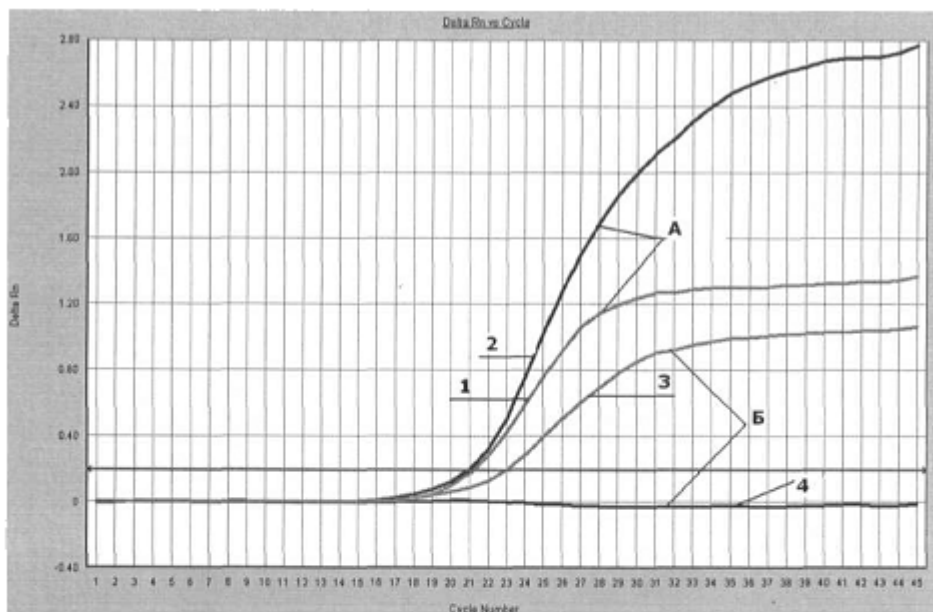
- 5 Отже, запропонований діагностичний набір на основі ПЛР для ідентифікації вірусу АЧС є специфічним та достатньо чутливим, що дозволяє рекомендувати його у практику ветеринарних лабораторій для швидкої діагностики цього особливо небезпечного захворювання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу для діагностики африканської чуми свиней, що призначений для виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних, паранхіматозних органів, тканин) ДНК вірусу АЧС шляхом приготування суспензії з патологічного субстрату, виділенням нуклеїнової кислоти та її ампліфікації, який **відрізняється** тим, що детекцію ДНК вірусу АЧС здійснюють за специфічною ділянкою гена, що кодує вірусний протеїн вірусу (VP72) специфічними праймерами (прямий - gcagggaagggtataactga, зворотний - ctctgatgagggtcttctgct, флуоресцюючий зонд - FAM-tcatcggaagcattcatga-BHQ1), що дозволяє виявити не менше 10 копій вірусної ДНК.

15



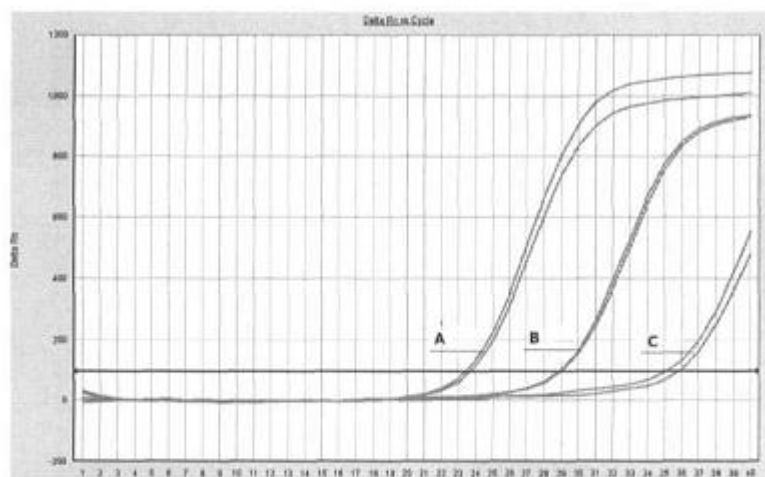
Фіг. 1

Криві ампліфікації за барвниками FAM та JOE

Примітка:

А. - позитивний зразок. 1. крива ампліфікації ділянки гена специфічного для свині (JOE), 2. крива ампліфікації ділянки ДНК вірусу АЧС (FAM);

Б. - негативний зразок. 3. крива ампліфікації ділянки гена специфічного для свині (JOE), 4. крива ампліфікації ділянки ДНК вірусу АЧС (FAM).



Фіг. 2

Криві ампліфікації отримані при постановці розведень плазмідної ДНК (А - 1000 копій, В - 100 копій, С - 10 копій)

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