



(19) **UA** (11) **31 897** (13) **U**  
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12)

(21), (22) Заявка: u200714142, 17.12.2007

(24) Дата начала действия патента: 25.04.2008

(46) Дата публикации: 25.04.2008<sub>С12N</sub> 7/00  
20070101CFI20080121ВНУА

(72) Изобретатель:

Болотин Виталий Игоревич, UA

(73) Патентовладелец:

НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
"ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И  
КЛИНИЧЕСКОЙ ВЕТЕРИНАРНОЙ  
МЕДИЦИНЫ", UA

(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *M. HYORNEUMONIAE* ПРИ ПОМОЩИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

(57)

Способ выявления ДНК *M. hyorheumoniae* посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) включает амплификацию теоретически рассчитанного высокоспецифического гена *M. hyorheumoniae*, в качестве ПЦР – мишени. Используют пары праймеров oMhyoFor (TAAGTTTCATTCGCGCTAGCCC) и oMhyoRev (TGCTCCTACTCCATATTGCC) при температуре

отжига 56 С и синтеза фрагмента длиной 455 пар нуклеотидов.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2008, N 8, 25.04.2008. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

U  
A  
3  
1  
8  
9  
7  
U

U  
A  
3  
1  
8  
9  
7  
U



(19) **UA** (11) **31 897** (13) **U**

(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF  
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL  
PROPERTY

(12)

(21), (22) Application: u200714142, 17.12.2007

(24) Effective date for property rights: 25.04.2008

(46) Publication date: 25.04.2008<sub>C12N</sub> 7/00  
20070101CFI20080121BHUA

(72) Inventor:  
Bolotin Vitalii Ihorovych, UA

(73) Proprietor:  
"INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL AND  
CLINICAL VETERINARY MEDICINE" NATIONAL  
SCIENTIFIC CENTER, UA

(54) METHOD FOR REVEALING OF M.HYOPNEUMONIAE DNA BY POLYMERASE CHAIN REACTION

(57)

A method for revealing of M. hyopneumoniae DNA by the Polymerase Chain Reaction (PCR) comprises the amplification of theoretically calculated high-specific M. hyopneumoniae gene as the PCR-target. oMhyoFor (TAAGTTCATTCGCGCTAGCCC) and oMhyoRev (TGCTCCTACTCCATATTGCC) primer pairs are used at annealing temperature of 56 C and

synthesis of the fragment consisting of 455 pairs of nucleotides.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2008, N 8, 25.04.2008. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U  
A  
3  
1  
8  
9  
7  
U

U  
A  
3  
1  
8  
9  
7  
U



(19) **UA** (11) **31 897** (13) **U**  
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12)

(21), (22) Дані стосовно заявки:  
u200714142, 17.12.2007

(24) Дата набуття чинності: 25.04.2008

(46) Публікація відомостей про видачу патенту  
(деклараційного патенту): 25.04.2008<sub>C12N 7/00</sub>  
20070101CFI20080121ВНУА

(72) Винахідник(и):  
Болотін Віталій Ігорович, UA

(73) Власник(и):  
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР  
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ  
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", UA

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДНК *M. HYORNEUMONIAE* ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

(57)

Спосіб виявлення ДНК *M. hyorheumoniae* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) включає ампліфікацію теоретично розрахованого високоспецифічного гена *M. hyorheumoniae*, як

ПЛР – мішені. Використовують пари праймерів oMhyoFor (TAAGTTTCATTCGCGCTAGCCC) та oMhyoRev (TGCTCCTACTCCATATTGCCC) за температури відпалу 56 С і синтезу фрагмента довжиною 455 пар нуклеотидів.

U  
A  
3  
1  
8  
9  
7  
U

U  
A  
3  
1  
8  
9  
7  
U

## Опис винаходу

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології, зокрема до розробки молекулярно-генетичних способів діагностики мікоплазмозу свиней, а саме, до виявлення *M. hyorheumoniae* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Ензоотична пневмонія свиней, що спричиняється збудником *M. hyorheumoniae*, реєструється на всіх континентах світу та завдає щорічно великих економічних збитків. Діагностика захворювання ускладнюється в першу чергу його субклінічним перебігом, завдяки чому відсутня можливість виявлення носіїв мікоплазм та своєчасного впровадження профілактичних заходів.

Існуючі дані щодо молекулярно-генетичної організації збудників мікоплазмозів сільськогосподарських тварин, особливо, які базуються на вивченні послідовностей основних генів мікоплазм, ізольованих у різних країнах світу, надають змогу проводити роботу з удосконалення розроблених ПЛР-тест-систем та впровадження їх в практику лабораторної діагностики.

Діагноз на ензоотичну пневмонію свиней встановлюється на основі виділення збудника, індикації його антигенів, а також специфічних антитіл в діагностичних титрах.

У відповідності до діючих рекомендацій МЕБ полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) застосовують з метою індикації генетичного матеріалу збудників мікоплазмозів свиней а також для визначення виду та штаму мікоплазм (з залученням методик визначення поліморфізму патернів рестрикції продуктів ПЛР). Існуючі методики ПЛР- діагностики ензоотичної пневмонії свиней ґрунтуються на виявленні мікоплазмених антигенів за високо консервативними генами ([www.oie.int](http://www.oie.int)).

Відомий спосіб виявлення 476п.н. (пар нуклеотидів) ділянки гену 16s rRNA за допомогою ПЛР- аналізу [Detection of *Mycoplasma hyorheumoniae*. Mattsson JG, Bergstrom K, Wallgren P, Johansson KE:1995, - J. Clin. Microbiol, 33:893-897]. Цей спосіб ґрунтується на застосуванні системи праймерів при температурі відпалу 47°C. Це рішення може бути прототипом. Недоліком прототипу є низька специфічність способу детекції внаслідок низької температури відпалу праймерів та вища собівартість за рахунок більшого реакційного об'єму (50мл) за спосіб, що пропонується.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення ДНК *M. hyorheumoniae* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, що включає ампліфікацію теоретично розрахованого високоспецифічного гена *M. hyorheumoniae*, як ПЛР - мішені шляхом використання пари праймерів оMhyoFor (TAAGTTCATTCGCGCTAGCCC) та оMhyoRev (TGCTCCTACTCCATATTGCC) за температури віджигу 56°C і синтезу фрагменту довжиною 455п.н., щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконується наступним чином.

Пробопідготовка. Як матеріал для дослідження використовують кров, стабілізовану цитратом натрію або розчином глюкози та назальні змиви від інфікованих свиней.

Екстракція загальної ДНК проводиться за допомогою набору для екстракції загальної ДНК- Сорб-А або ДНК-Сорб-Б (Амплісенс, Москва, Росія), або аналогічного. Процедура складається із лізису клітин та їх детриту, сорбції ДНК на сорбенті, дво-триразового відмивання сорбованої ДНК та екстракції ДНК із сорбенту за допомогою ТЕ-буферу.

Ампліфікація. Готують загальну (для усієї кількості проб) суміш реагентів для ампліфікації з розрахунку (на 1 пробу):

- 13,0мл деіонізованої води;
- 2,0мл 50мМ Mg<sup>++</sup>;
- 5,0мл реакційного буферу;
- 2,5мл суміші dNTP;
- по 1мл праймерів;
- 0,5мл Taq-полімерази.

Після додавання Taq-полімерази, що проводиться в останню чергу, одержану суміш ретельно перемішують на вортексі. Після чого, суміш у дозі 20мл вносять в усі пробірки підготовлені для ампліфікації. Потім додають в усі пробірки по 1 краплі (близько 25мл) мінерального масла. Для проведення ампліфікації у відповідну пробірку з реакційною сумішшю під шар масла вносять 5мл розчину сумарної ДНК проби. Для негативного контрольного зразку в пробірку вносять - 5мл деіонізованої води, а в пробірку для позитивного контрольного зразку - 5мл розчинної ДНК *M. hyorheumoniae*. Пробірки закривають й центрифугують протягом 3-5 секунд при 2000об/хв на мікроцентрифузі. Переносять пробірки в нагрітий до температури 95°C програмний термостат (ампліфікатор) і проводять ампліфікацію за наступною програмою (табл.)

Після закінчення реакції проводять аналіз продуктів ПЛР, шляхом поділу фрагментів ДНК в агарозному гелі. Потім проводять електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР.

Приготування робочого розчину буфера (ТБЕ) для електрофорезу.

У мірну колбу ємністю 1000,0см<sup>3</sup> вносять вміст пакета з буфером для електрофорезу, доводять до міткі дистильованою водою та ретельно перемішують до повного розчинення осаду.

Приготування агарозного гелю. У конічну колбу ємністю 250см<sup>3</sup> вносять вміст одного пакета з агарозою, додають 100,0см<sup>3</sup> робочого розчину буфера ТБЕ і ставлять колбу на водяну баню. Вміст колби доводять до кипіння, повністю розтоплюють, помішуючи скляною палочкою та охолоджують до температури 50-60 °С.

Отриманий розчин агарози повинен бути прозорим і не вміщувати окремих нерозчинених часток. Після чого у колбу з розчином агарози вносять 50,0мл розчину бромиду етидія.

Підготовка електрофоретичної камери до заливання агарозного гелю. Встановлюють гребінку на платформу, розміщуючи її на відстані 3см одна від одної та заливають у неї охолоджену до температури 50°C агарозу . Після застигання агарози (приблизно через 25-30хв.) обережно витягають гребінку; платформу з агарозним гелем переносять до електрофоретичної камери.

В електрофоретичну камеру заливають необхідну кількість розчину буфера ТБЕ так, щоб він покривав агарозний гель шаром завтовшки 4-5мм.. Для нанесення проби відбирають у кількості 10мкл продукту ампліфікації та вносять у відповідну лунку агарозного гелю, під шар буфера ТБЕ так, щоб вміст одного кармана агарозного гелю не перетікав у інший.

Електрофорез проводять у градієнті напруги 8В/см. Потім виймають платформу з агарозним гелем з електрофоретичної камери, дають рідині стекти з гелю та промивають агарозний гель дистильованою водою у кількості 200см<sup>3</sup> 2-3 рази. Агарозний гель вміщують на скло УФ- трансільюмінатору. Фрагменти аналізованої ДНК виявляються у вигляді смужок жовтогарячого кольору при проходженні УФ- випромінювання з довжиною хвилі 310нм.

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

У позитивних контрольних зразках (К+) одна смужка жовтогарячого кольору розміром 455 нуклеотидний залишок (п. н.).

Відсутність смужки жовтогарячого кольору на рівні позитивного контролю (К+) (455п.н.) свідчить про відсутність збуднику ензоотичної пневмонії свиней. Наявність смужки, що відповідає за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (455п.н.), свідчить про наявність в зразку ДНК *M.hyorneumonіae*. Результат аналізу не можна вважати достовірним, якщо на доріжці будь-якого негативного контролю виявляється специфічна смужка. Необхідно поставити не менше трьох негативних контролів на етапі виділення ДНК і стільки ж на етапі постановки ПЛР для виявлення джерела контамінації.

Ефективність способу розкривається в прикладах.

Приклад 1. Для оцінки чутливості та відтворюваності способу щодо індикації ДНК збудника досліджували клінічний матеріал в кількості 12 проб від хворих свиней, що були інфіковані штамом *M. hyorнеumonіae* 232. Для контролю специфічності способу використовували зразки хромосомної ДНК *M. hyorнеumonіae*. Їх було досліджено з використанням способу-прототипу та розробленого способу. Встановлено, що за допомогою способу-прототипу ДНК збудника виявляється лише в 9 випадках з 12. Розроблений спосіб дозволяв детектувати ДНК в усіх досліджуваних пробах від хворих свиней. Дослідження були проведені триразово, при повтореннях результати відтворені.

Приклад 2. Для контролю внутрішньовидової специфічності способу було використано такі штами *M. hyorнеumonіae*, як 232А, 7448 та J. Для контролю специфічності способу використовували хромосомальні ДНК *M. hyorhinis* BTS-7, *M.flocculare* та *M.hyoѕinovіae*.

Після ампліфікації встановлено наявність специфічних смуг різної інтенсивності у всіх трьох зразків ДНК різних штамів *M.hyorнеumonіae*. З пробами хромосомальної ДНК *M.hyorhinis* BTS-7, *M.flocculare* та *M.hyoѕinovіae* після ампліфікації не утворювалось смуг ампліконів.

Розроблено спосіб виявлення ДНК збуднику ензоотичної пневмонії свиней за допомогою ПЛР, який може успішно використовуватись у ветеринарній практиці та при лабораторних дослідженнях.

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	94°C	4хв	1
	94°C	1хв	
2	56°C	1хв	45
	72°C	1хв	
3	72°C	7хв	1

### Формула винаходу

Спосіб виявлення ДНК *M. hyorнеumonіae* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що включає ампліфікацію теоретично розрахованого високоспецифічного гена *M. hyorнеumonіae*, як ПЛР - мішені, який відрізняється тим, що використовують пари праймерів оMhyoFor (TAAGTTCATTTCGCGCTAGCCC) та оMhyoRev (TGCTCCTACTCCATATTGCC) за температури відпалу 56 С і синтезу фрагмента довжиною 455 пар нуклеотидів.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2008, N 8, 25.04.2008. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.