



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112623** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61K 39/108 (2006.01)
G01N 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 06186	(72) Винахідник(и): Касянчук Вікторія Вікторівна (UA), Бергілевич Олександра Миколаївна (UA), Дерябін Олег Миколайович (UA), Сміянов Владислав Анатолійович (UA), Сфімова Ольга Миколаївна (UA), Кустуров Володимир Борисович (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.06.2016	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.12.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2016, Бюл.№ 24	

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕЇНОВОЇ КИСЛОТИ (ДНК) ШИГАТОКСИНПРОДУКУЮЧИХ БАКТЕРІЙ E. COLI (STEC)

(57) Реферат:

Спосіб виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) шигатоксинпродукуючих бактерій E. coli (STEC) включає виявлення в досліджуваних зразках специфічних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) за допомогою мультиплексного варіанта полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для проведення ПЛР використовують штучно синтезовані олігонуклеотидні праймери з наступною послідовністю нуклеотидів:

для гена токсину stx2 -

dF1-stx2 5'-CCATGACAACGGACAGC AGT-3'

dR3-stx2 5'-ATCTGACATTCTGGTTGACTCTCTTC-3'

розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 466 пар нуклеотидів;

для гена токсину stx1 -

dstx1-r3 5'-CGCACTGAGAAGAAGAGACTGAAG-3'

dF-stx1 5'-ATGTAATGACTGCTGAAGATGTTGAT-3'

розмір фрагмента ДНК, що синтезується, -512 пар нуклеотидів;

для гена інтиміну eae -

dF2-eae 5'-CGCTCTTGGTATSGCTRGYA-3' (R=A/G, Y=C/T, S=C/G)

dR2-eae 5'-GTCTCGCCAGTATTCGCCAC-3'

розмір фрагмента ДНК, що синтезується - 325 пар нуклеотидів.

UA 112623 U

Корисна модель належить до мікробіології (медичної та ветеринарної), зокрема до лабораторної діагностики, призначений для виявлення специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC-Shiga toxin-producing *E. coli*), може бути використана в діагностичних дослідженнях по виявленню та ідентифікації ентерогеморагічних ізолятів *E. coli*, як лабораторний тест по виявленню забруднення сировини в харчовій промисловості, в науково-дослідних роботах, в біотехнологічному виробництві.

Кишкова паличка (*E. coli*) - бактерія, яка зазвичай знаходиться в кишечнику людей і теплокровних тварин. Більшість штамів кишкової палички нешкідливі. Однак деякі штами, зокрема STEC, продукують шигатоксин, який є одним з найсильніших токсинів, відомих людині. До складу STEC входять високопатогенні серовари *E. coli*: O157:H7 O26, O45, O55, O103, O111, O113, O117, O121, O145, які можуть спричинити тяжкі хвороби харчового походження. На міжнародному рівні існує вимога щодо тестування STEC для забезпечення безпеки харчових продуктів (Орган з безпеки харчових продуктів (EFSA) [1, 3]. У той же час, в Україні швидкі методи ідентифікації STEC на даний час відсутні. Високоспецифічні, швидкі, високочутливі методи виявлення збудників інфекційних захворювань надзвичайно важливі як для охорони здоров'я населення так і з економічної точки зору. Тому існує потреба в розробці нових методів та способів виявлення та диференціації патогенних мікроорганізмів для дослідження харчових продуктів, продовольчої сировини, а також ідентифікації патогенів, в біологічному зразку для виявлення причини захворювання.

Маркерами патогенності STEC є гени шигатоксину 1 (Stx1) і шигатоксину 2 (Stx2), а також ген інтимін (*eae*), який відповідає за адгезію збудника до епітеліальних клітин кишечнику. Отже фактори патогенності STEC детермінуються, відповідно, генами *stx1*, *stx2* та *eae*. Найбільш вірулентні штами STEC мають одночасно усі вказані гени. Штами STEC здатні продукувати або тільки токсини першої (Stx1) чи другої групи (Stx2), або обидві групи токсинів (Stx1) і (Stx2) одночасно, або інші комбінації із перерахованих трьох генів вірулентності [1, 3].

Зустрічаються 7 різних варіантів штамів STEC - за різної комбінації генів вірулентності (таблиця 1).

Таблиця 1

Типи штамів STEC - за наявністю різних комбінацій генів *stx1*, *stx2*, *eae*

Тип	Вірулентність штамів	Stx1	stx2	eae
1	+++++	+	+	+
2	+++++	-	+	-
3	++++	+	-	+
4	++++	-	+	+
5	++++	+	+	-
6	+++	-	-	+
7	+++	+	-	-

Примітка: +++++ - сильновірулентний; ++++ - вірулентний; +++ - середнього ступеня вірулентності

Відомий бактеріологічний спосіб висіву із зразка досліджуваного об'єкта (фекалії, вміст шлунково-кишкового тракту, проби м'яса, м'ясопродуктів) на середовище Ендо або спеціальні середовища для *E. coli*. Висіви інкубують 18-24 години за температури 37-38 °C (при відсутності росту витримують за тієї ж температури ще 48 годин) [2].

Недоліком є те, що він потребує значного часу для проведення аналізу, трудоємний і зменшує рівень біобезпеки в цілому. Прототипом запропонованої корисної моделі є спосіб детекції шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC) шляхом виявлення присутності одного або декількох факторів вірулентності у досліджуваному зразку, у якому передбачається уміст одного або більше мікроорганізмів, що належать до STEC [3] в мультиплексному варіанті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням для цього декількох олігонуклеотидних праймерів, специфічних для одного або декількох факторів вірулентності, що мають наступну послідовність:

для гена токсину *stx2* -
dF1-stx2 5'-CCATGACAACGGACAGCAGT-3'

dR3-stx2 5'-ATCTGACATTCTGGTTGACTCTCTTC-3' розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 466 п.н.;

для гена токсину stx1 -

dstx1-r3 5'-CGCACTGAGAAGAAGAGACTGAAG-3'

5 dF-stx1 5'-ATGTAATGACTGCTGAAGATGTTGAT-3' розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 512 п.н.;

для гена інтиміну eae -

dF2-eae 5'-CGCTCTTGGTATSGCTRGYA-3'

(R=A/G, Y=C/T, S=C/G)

10 dR2-eae 5'-GTCTCGCCAGTATTCGCCAC-3' розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 325 п.н.

Вищезгаданий спосіб є найбільш близьким аналогом.

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 шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC).

20 В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення існуючого способу виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC) шляхом зміни композицій послідовності нуклеїнових кислот в олігонуклеотидних праймерах для підсилення специфічності показника вірулентності у конкретних нуклеїнових кислот та їх фрагментів.

25 Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC), що включає виявлення в досліджуваних зразках специфічних праймерів ДНК за допомогою мультиплексного варіанта полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), згідно з корисною моделлю, для проведення ПЛР використовують штучно синтезовані праймери з наступною послідовністю нуклеотидів:

для гена токсину eae -

dF1-stx2 5'-CCATGACAACGGAC AGC AGT-3'

dR3-stx2 5'-ATCTGACATTCTGGTTGACTCTCTTC-3' розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 466 пар нуклеотидів;

35 для гена токсину stx1 -

dstx1-r3 5'-CGCACTGAGAAGAAGAGACTGAAG-3'

dF-stx1 5'-ATGTAATGACTGCTGAAGATGTTGAT-3' розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 512 пар нуклеотидів;

для гена інтиміну eae -

40 dF2-eae 5'-CGCTCTTGGTATSGCTRGYA-3' (R=A/G, Y=C/T, S=C/G)

dR2-eae 5'-GTCTCGCCAGTATTCGCCAC-3' розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 325 пар нуклеотидів.

Виконання способу, який заявляється, з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє використовувати вищеперелічені варіанти пар праймерів, високоспецифічних до таких факторів вірулентності STEC як stx1, stx2, eae з підсиленими цільовими послідовностями нуклеїнових кислот в олігонуклеотидних праймерах, які можуть бути використані для мультиплексної ГТЛР, що позитивно впливає на її ефективність і відтворюваність.

Суть корисної моделі пояснюється кресленням, де на фіг. 1 зображено використання пари штучно синтезованих олігонуклеотидних праймерів для гена токсину stx2 з наступною послідовністю нуклеотидів:

dF1-stx2 5'-CCATGACAACGGACAGCAGT-3'

dR3-stx2 5'-ATCTGACATTCTGGTTGACTCTCTTC-3'.

На фіг. 1 показано як праймери dF1-stx2 та dR3-stx2 фланкують ділянку гена токсину stx2 і забезпечують синтез фрагмента ДНК розміром 466 п.н. при температурі відпалу 62 °С.

55 На фіг. 2 зображено використання пари штучно синтезованих олігонуклеотидних праймерів для гена токсину stx1 з наступною послідовністю нуклеотидів:

Dstx1-r3 5'-CGCACTGAGAAGAAGAGACTGAAG-3'

dF-stx1 5'-ATGTAATGACTGCTGAAGATGTTGAT-3'.

60 На фіг. 2 показано як праймери dF-stx1 та dstx1-r3 фланкують ділянку гена токсина stx1 і забезпечують синтез фрагмента ДНК розміром 512 п.н. при температурі відпалу 62 °С.

На фіг. 3 зображено використання пари штучно синтезованих олігонуклеотидних праймерів для гена інтиміну eae з наступною послідовністю нуклеотидів:

dF2-eae 5'-CGCTCTTGGTATSGCTRGYA-3' (R=A/G, Y=C/T, S=C/G)

dR2-eae 5'-GTCTCGCCAGTATTCGCCAC-3'.

5 На фіг. 3 показано як праймери dF2-eae та dR2-eae фланкують ділянку гена eae (інтиміну) і забезпечують синтез фрагмента ДНК розміром 325 п.н. при температурі відпалу 62 °С. Праймер dF2-eae є виродженим і враховує поліморфізм гена інтиміну.

10 У заявленому способі виявлення специфічних фрагментів ДНК (stx1, stx2 та eae) шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC) в досліджуваних зразках за допомогою мультиплексного варіанта полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і двох пар штучно синтезованих олігонуклеотидів (праймерів), які дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC) при визначених температурних і часових параметрах та кількості циклів (таблиця 2).

Таблиця 2

Температурний профіль мультиплексного варіанту ПЛР з ДНК бактерій *E. coli* (STEC) з парами олігонуклеотидних праймерів dF1-stx2/dR3-stx2 та dF2-eae/dR2-eae

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95 °С	3 хв	1
2	95 °С	0,5 хв	35
	62 °С	0,5 хв	
	72 °С	0,5 хв	
3	72 °С	4 хв	1
4	10 °С	Зберігання	

15

Праймери з наведеною послідовністю можуть бути використані, як для індивідуального так і для мультиплексного варіантів ПЛР.

20 Спосіб здійснюють наступним чином: пробу (окрему колонію бактеріальної культури) поміщають у пластикову пробірку ємністю 1,5 см³ з 0,3 см лізуючого буферу. Суміш струшують і центрифугують, після чого проводять наступне виділення ДНК набором реагентів для виділення ДНК. Отриману ДНК (0,003 см³) поміщають у пробірку ємністю 0,5 см³ і додають 0,005 см³ (5X) ПЛР-буфера, 0,001 см³ dNTP, по 0,00015 см³ праймерів dF-stx1 і dstx1-r3 (фіг. 2), та по 0,00010 см³ праймерів dF1-stx2 і dR3-stx2 (фіг. 1), dF-eae і dR2-eae (фіг. 3), 0,0005 см³ Taq-полімерази, 0,0115 см³ DEPC-води та 1 краплю мінерального масла. Вміст пробірки струшують і центрифугують, а потім переносять в термоциклер з активною регуляцією температури, наприклад "Терцик" (ДНК-технології, Росія), якому задають вищевказану програму.

25

30 Аналіз результату ПЛР проводять в 1,5 % гелі агарози з барвником - бромистим етидієм. В лунки агарозного гелю вносять 0,010 см³ ампліфікованої суміші. Після проведення електрофорезу фрагменти ДНК виявляють під ультрафіолетовим світлом. Результат ПЛР може бути оцінено візуально по наявності смужок, що відповідають продуктам реакції. Промислове застосування для проведення діагностики шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC), на виробництві в харчовій промисловості, в науково-дослідних роботах, в біотехнологічному виробництві.

35

ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ:

1. Бергілевич О.М. Маркери патогенності *E. coli* O157: H7 та основні гени-мішені для діагностики цього мікроорганізму в яловичині ПЛР тест-системою /О.М. Бергілевич., В.В. Касянчук, О.М. Єфімова зб. наук. праць Харків, держ. зоовет. акад.: //Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини - 2014. - Вип. 28. - 4.2. - С. 188-192.

40

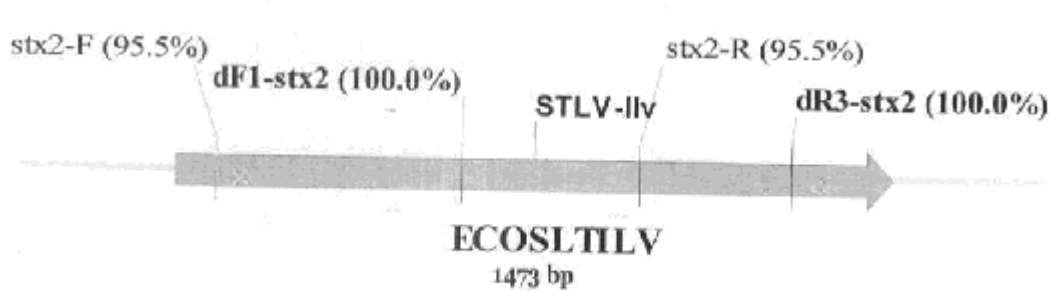
2. ISO/TC 34/SC 9/WG Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups-Qualitative Method.

3. Puttalingamma V., Shylaja R., Batra H.V., Bawa A.S. A novel multiplex PCR system for the detection of virulence associated genes of *E. coli* O157:H7 from food system. /Recent Research in Science and Technology, 2012, 4(5): 36-40.

45

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

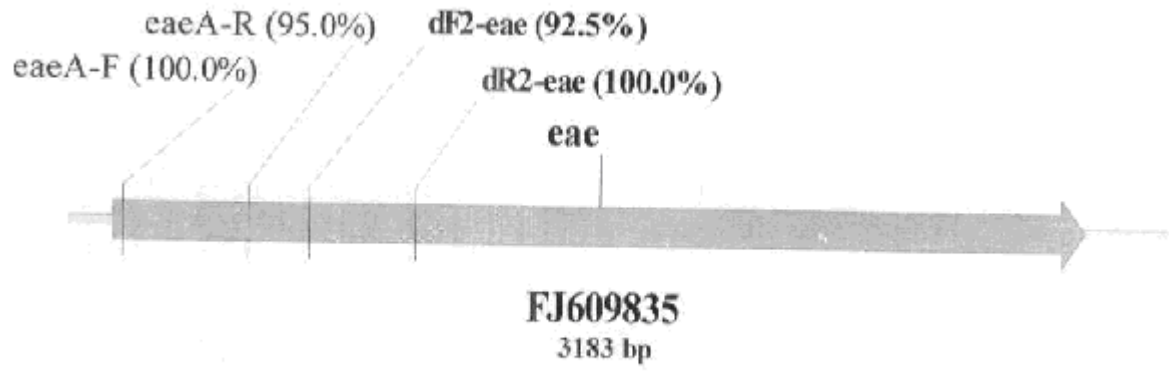
- Спосіб виявлення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) шигатоксинпродукуючих бактерій *E. coli* (STEC), що включає виявлення в досліджуваних зразках специфічних фрагментів нуклеїнової кислоти (ДНК) за допомогою мультиплексного варіанта полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який **відрізняється** тим, що для проведення ПЛР використовують штучно синтезовані олігонуклеотидні праймери з наступною послідовністю нуклеотидів:
- 5 для гена токсину *stx2* -
 10 dF1-*stx2* 5'-CCATGACAACGGACAGC AGT-3'
 dR3-*stx2* 5'-ATCTGACATTCTGGTTGACTCTCTTC-3'
 розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 466 пар нуклеотидів;
 для гена токсину *stx1* -
 15 dstx1-r3 5'-CGCACTGAGAAGAAGAGACTGAAG-3'
 dF-*stx1* 5'-ATGTAATGACTGCTGAAGATGTTGAT-3'
 розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 512 пар нуклеотидів;
 для гена інтиміну *eae* -
 dF2-*eae* 5'-CGCTCTTGGTATSGCTRGYA-3' (R=A/G, Y=C/T, S=C/G)
 dR2-*eae* 5'-GTCTCGCCAGTATTCGCCAC-3'
 20 розмір фрагмента ДНК, що синтезується, - 325 пар нуклеотидів.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фіг. 3

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