

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ
ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК ҚҰҚЫҒЫ КОМИТЕТІ

ӨНЕРТАБЫСҚА ПАТЕНТ

ЗАҢ



АСТАНА

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



(19)

ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ
ЗИЯТКЕРЛІК МЕНШІК ҚҰҚЫҒЫ КОМИТЕТІ

(11)

ӨНЕРТАБЫСҚА

№ 18657

(12)

ПАТЕНТ

(54) АТАУЫ: Қойлар мен ешкілердің контагиозды эктимасын полимераздық тізбектік реакция (ПТР) әдісімен диагностикалау тәсілі

(73) ПАТЕНТ ИЕЛЕНУШІСІ: Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

(72) АВТОР (АВТОРЛАР): Мамадалиев Сейдиганбар Мамадалиевич; Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич; Белоусов Вячеслав Юрьевич; Строчков Виталий Михайлович; Зайцев Валентин Лукьянович

(21) Өтінім № 2005/1176.1

(22) Өтінім берілген күн 07.10.2005

Патенттің күші Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында, оны күшінде ұстау үшін ақы уақытылы төленген жағдайда сақталады.

Қазақстан Республикасы Әділет министрінің
Зияткерлік меншік құқығы комитетінің
терайымы



Л. С. Стамбекова

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН



(19) КОМИТЕТ ПО ПРАВАМ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

(12) **ПАТЕНТ**
(11) № **18657**
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) НАЗВАНИЕ: Способ диагностики контагиозной эктимы овец и коз методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

(73) ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ: Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(72) АВТОР (АВТОРЫ): Мамадалиев Сейдигапбар Мамадалиевич; Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич; Белоусов Вячеслав Юрьевич; Строчков Виталий Михайлович; Зайцев Валентин Лукьянович

(21) Заявка № 2005/1176.1

(22) Дата подачи заявки 07.10.2005

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе

Председатель Комитета
по правам интеллектуальной собственности
Министерства юстиции Республики Казахстан



Л. С. Стамбекова



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 18657

(51) G01N 33/53 (2009.01), G01N 33/569
(2009.01), C12N 15/10 (2009.01)

КОМИТЕТ ПО ПРАВАМ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2005/1176.1

(22) 07.10.2005

(45) 15.04.2011, бюл. № 4

(64) KZ (A) № 18657, 16.07.2007, бюл. № 7

(72) Мамадалиев Сейдигалбар Мамадалиевич;
Сандыбаев Нурлан Тамамбаевич; Белоусов Вячеслав
Юрьевич; Строчков Виталий Михайлович; Зайцев
Валентин Лукьянович

(73) Республиканское государственное предприятие
на праве хозяйственного ведения "Научно-
исследовательский институт проблем биологической
безопасности" Комитета науки Министерства
образования и науки Республики Казахстан

(56) Torfacon EG, Gunadóttir S. «Polymerase chain
reaction for laboratory diagnosis of orf virus
infections», J Clin Virol. 2002 Feb;24(1-2):79-84

RU 2003138290 A (Государственное научное
учреждение Институт экспериментальной
ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
Сибирского отделения Россельхозакадемии)
10.06.2005

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ
КОНТАГИОЗНОЙ ЭКТИМЫ ОВЕЦ И КОЗ

МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)

(57) Изобретение относится к ветеринарной
вирусологии, а именно, к молекулярной диагностике
и представляет собой способ диагностики вируса
контагиозной эктимы овец и коз методом
полимеразной цепной реакции с использованием
специфических праймеров.

Способ осуществляется путем постановки
полимеразной цепной реакции, при которой с
использованием синтезированных специфических
праймеров выявляют ДНК вируса контагиозной
эктимы овец и коз.

Способ диагностики вируса контагиозной
эктимы овец и коз методом «гнездовой»
полимеразной цепной реакции, которая
дополнительно повышает специфичность, позволяет
точно и очень быстро выявлять ДНК контагиозной
эктимы овец и коз из патологического материала от
больных животных. При этом возможно
одновременное исследование большого количества
проб.

(19) KZ (13) B (11) 18657

Изобретение относится к ветеринарной вирусологии, а именно, к молекулярной диагностике и касается способа диагностики вируса контагиозной эктимы овец и коз методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров.

Известен способ диагностики парапоксвирусов модифицированным методом (полугнездовой) полимеразной цепной реакции, в котором синтезируют праймеры на район гена B2L-вируса контагиозной эктимы овец и коз, штамма NZ2. ПЦР продукт, образующийся в результате амплификации гена B2L, составляет 594 п.н. (пар нуклеотидов).

Недостатком данного способа является большой размер амплифицируемого фрагмента, что значительно увеличивает время проведения исследований (Yasuo Inoshima, Akira Marooka, Hiroshi Sentsui. // J. Virol. Meth.2000.-V.-84.-P.201-208).

Задачей изобретения является разработка способа диагностики вируса контагиозной эктимы овец и коз модифицированным методом полимеразной цепной реакции.

Способ диагностики вируса контагиозной эктимы овец и коз методом «гнездовой» полимеразной цепной реакции дополнительно повышает специфичность, позволяет точно и очень быстро выявлять ДНК контагиозной эктимы овец и коз из патологического материала от больных животных. При этом возможно одновременное исследование большого количества проб.

Способ диагностики контагиозной эктимы овец и коз включает выделение ДНК вируса, проведение ПЦР и электрофорез в агарозном геле, осуществляют постановку «гнездовой» ПЦР с использованием двух пар специфических праймеров на ген B3L вируса контагиозной эктимы овец и коз, который не имеет гомологов среди других посквирусов; внутренних специфических праймеров, фланкирующие фрагменты ДНК размерами 294 п.н. и 119 п.н.; используют праймеры, имеющие нуклеотидные последовательности:

Внешние праймеры:

S-1 - agt tct teg agt tcg ctt agg agt

S-2 - ggc ggt cgt ata aca cta act ctc

Внутренние («гнездовые») праймеры:

S-3 - cat tag gtc tcc gct tac ttg aac

S-4 - aac tct cgc acc tta aac tac ctc

Выделение ДНК из органо-тканевых материалов.

Выделение вирусной ДНК из патологического материала проводят следующим образом: пораженный участок кожи больного животного разрезают на мелкие кусочки стерильным скальпелем и растирают до однородного состояния в фарфоровой ступке. Суспензию замораживают до минус 70°C и вновь растирают в ступке, процедуру повторяют трижды. Последующие этапы выделения используют также при выделении ДНК вирусов из инфицированных культур клеток. Вирусодержащую суспензию центрифугируют при 12000 об/мин в течение 5 мин, осадок отбрасывают, надосадочную жидкость используют для выделения вирусной ДНК. К вирусодержащей суспензии

добавляют ДСН до конечной концентрации 0,5 % и протеиназу К до 1 мкг/мл. Смесь инкубируют 2 ч при 37°C. К смеси добавляют равный объем фенола, осторожно перемешивают и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. Водную фазу отделяют и обрабатывают равным количеством смеси фенол-флороформ-изоамиловый спирт в соотношении (25:24:1), перемешивают и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. К водной фазе добавляют равный объем хлороформа, перемешивают и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин.

Для осаждения ДНК вируса в водную фазу добавляют 1/10 объема 3М ацетата натрия и 2,5 объема 100 % этанола. Затем раствор центрифугируют 30 мин при 10000 об/мин. Осадок ДНК промывают 75 % этанолом, растворяют в ТЕ буфере.

Олигонуклеотидные праймеры.

Специфические праймеры конструируют на геном вируса контагиозной эктимы овец и коз при помощи компьютерной программы. Внутренние и внешние праймеры к ДНК-последовательности вируса контагиозной эктимы овец и коз, синтезируют на синтезаторе олигонуклеотидов.

Проведение ПЦР.

Реакцию полимеразной цепной реакции проводят на термоциклере. Оптимальными условиями постановки метода ПЦР являются следующие параметры:

Пре - денатурация 95°C - 9 мин

95°C - 30сек

55°C - 10сек

72°C - 15сек

и для проведения второго раунда ПЦР ("гнездовая" ПЦР):

Пре - денатурация 95°C - 1 мин

95°C - 20 сек

55°C - 10сек

72°C - 15сек

Пост-репликация 72°C - 7 мин

Амплификацию в первом раунде проводят в течение 35 циклов, а во - втором в течение 20 циклов.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации ДНК.

Электрофорез продуктов амплификации ДНК вируса ИЛТ птиц проводят в аппарате для горизонтального электрофореза при напряжении 8В/см. Для электрофореза используют 2 % (в/о) раствор агарозы в трис - боратном буфере (ТВЕ-буфере). Визуализацию ДНК проводят в УФ-свете. Документирование полученных результатов проводят при помощи фотографирования гелей в УФ-свете.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Данный способ позволяет проводить диагностику контагиозной эктимы овец и коз. С этой целью у больных животных на анализ отбирают корочки, выделяют ДНК и проводят первый раунд ПЦР с внешними праймерами S-1 (прямой) и S-2 (обратный). Размер основного

фрагмента ДНК амплификации при этом составляет 294 п.о. Второй раунд ПЦР проводят с внутренними праймерами S-3 (прямой) и S-4 (обратный), при этом продукт амплификации составляет 119 п.о. Электрофорез продуктов амплификации ДНК вируса контагиозной эктимы проводят в 2 % агарозном геле. Документирование полученных результатов проводят при помощи фотографирования гелей в УФ-свете, с использованием оранжевого светофильтра на цифровую фотокамеру.

Способ диагностики вируса контагиозной эктимы овец и коз на основе полимеразной цепной реакции был успешно апробирован и прошел комиссионную проверку на базе Научно-исследовательского сельскохозяйственного института МОН РК.

Предложенный способ позволяет быстро и точно выявить ДНК контагиозной эктимы овец и коз.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики контагиозной эктимы овец и коз, включающий выделение ДНК вируса, постановку полимеразной цепной реакции и электрофорез в агарозном геле, *отличающийся* тем, что осуществляют постановку «гнездовой» ПЦР с использованием двух пар специфических праймеров на ген В3L вируса контагиозной эктимы овец и коз.

2. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что используют две пары внешних и внутренних, специфических праймеров, фланкирующие фрагменты ДНК размерами 294 п.н. и 119 п.н.

3. Способ по п.1, *отличающийся* тем, что используют праймеры, имеющие нуклеотидные последовательности:

Внешние праймеры: S-1-agt tct tcg agt tcg ctt agg agt

S-2 -ggc ggt cgt ata aca cta act ctc

Внутренние («гнездовые») праймеры:

S-3 -cat tag gtc tcc gct tac ttg aac

S-4 -aac tct cgc acc tta aac tac ctc