



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **146047** (13) **U**
(51) МПК (2021.01)
C12N 15/00
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 03182	(72) Винахідник(и): Мельничук Сергій Дмитрович (UA), Ничик Сергій Анатолійович (UA), Панасенко Григорій Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.05.2020	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 21.01.2021	(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 20.01.2021, Бюл.№ 3	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РНК КОРОНАВІРУСУ SARS COV-2 МЕТОДОМ ІЗОТЕРМІЧНОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ LAMP В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

(57) Реферат:

Спосіб визначення РНК коронавірусу SARS CoV-2 методом ізотермічної ампліфікації LAMP в реальному часі включає ідентифікацію фрагментів А та В нуклеокапсидного гена N SARS CoV-2. Для проведення реакції використовують полімеразу Bst I, яка має ревертазну та полімеразну активність та дозволяє проводити етапи зворотної транскрипції та ампліфікації одночасно в одній пробірці без зміни температури (в ізотермічних умовах) з різноманітними варіантами детекції, як в режимі реального часу (за рахунок флуоресценції інтеркалятора SYBR Green), так і по "кінцевій точці" (візуальна інтерпретація результатів).

UA 146047 U

UA 146047 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини і може бути використана для діагностики коронавірусу SARS CoV-2.

Пандемія, спричинена розповсюдженням коронавірусу SARS CoV-2 серед людей усіх континентів, викликала необхідність розробки чутливих і специфічних ампліфікаційних альтернативних методів для виявлення нуклеїнових кислот ДНК та РНК (РНК для SARS CoV-2) поряд з технологією полімеразної ланцюгової реакції. Однією з таких високочутливих і специфічних технологій є метод ізотермічної ампліфікації LAMP (Loop-Mediated Amplification) [1, 2].

Процес специфічного "розмноження" (ампліфікації) фрагмента нуклеїнової кислоти (РНК) коронавірусу відбувається завдяки каталітичній активності полімерази з бактерій *Bacillus stearothermophilus* (*Geobacillus*), яка поєднує дві активності: ревертазну (зворотно-транскриптазну) та полімеразну з "витісненням ланцюга" (SDA, Strand Displacement Amplification). Отже, одноетапно відбувається процес "перепишування" з РНК-вої копії коронавірусу в ДНК-кову, а після цього одразу починається синтез-"розмноження" специфічних фрагментів ДНК коронавірусу завдяки унікальному дизайну синтетичних специфічних олігонуклеотидів. Такий спосіб детекції РНК коронавірусу передбачає лише один етап: виділення РНК і додавання її в ампліфікаційну суміш. Процес ізотермічний в діапазоні 50-60 °С. Детектування відбувається за рахунок флуоресценції інтеркалятора SYBR Green, який зв'язується з дволанцюговими фрагментами ДНК, які утворюються за рахунок ампліфікації. Як позитивний контроль служить клонований в плазміді pUC19 фрагмент гена N коронавірусу SARS CoV-2.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити чутливий та специфічний спосіб, який дозволяє проводити тестування як на приладах з можливістю флуоресцентної детекції в режимі ПЛР в реальному часі, так і без дороговартісного обладнання, оскільки процес ампліфікації відбувається без зміни температури, в ізотермічних умовах з різноманітними варіантами детекції, як в режимі реального часу (Фіг. 1), так і по "кінцевій точці" (Фіг. 2).

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення РНК коронавірусу SARS CoV-2 методом ізотермічної ампліфікації LAMP в реальному часі включає ідентифікацію фрагментів А та В нуклеокапсидного гена N SARS CoV-2. Для проведення реакції використовують полімеразу Bst I, яка має ревертазну та полімеразну активність та дозволяє проводити етапи зворотної транскрипції та ампліфікація одночасно в одній пробірці без зміни температури (в ізотермічних умовах) з різноманітними варіантами детекції, як в режимі реального часу (за рахунок флуоресценції інтеркалятора SYBR Green), так і по "кінцевій точці" (візуальна інтерпретацією результатів).

Таблиця 1

Перелік олігонуклеотидів для детекції РНК коронавірусу SARS CoV-2 методом ізотермічної ампліфікації LAMP

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність, 5'-3'	Призначення
NG A-F3	TGGCTACTACCGAAGAGCT	Ампліфікація фрагмента А нуклеокапсидного гена N SARS CoV-2
NG A-B3	TGCAGCATTGTTAGCAGGAT	
NG A-FIP	TCTGGCCCCAGTTCCTAGGTAAGTCCAGACGAATTCGTGGTGG	
NG A-BIP	AGACGGCATCATATGGGTTGCACGGGTGCCAATGTGATCT	
NG A-LF	GGACTGAGATCTTTTCATTTTACCGT	
NG A-LB	ACTGAGGGAGCCTTGAATACA	Ампліфікація фрагмента В нуклеокапсидного гена N SARS CoV-2
NG B-F3	ACCGAAGAGCTACCAGACG	
NG B-B3	TGCAGCATTGTTAGCAGGAT	
NG B-FIP	TCTGGCCCCAGTTCCTAGGTAAGTTCGTGGTGGTGACG GTAA	
NG B-BIP	AGACGGCATCATATGGGTTGCACGGGTGCCAATGTG ATCT	
NG B-LF	CCATCTTGGACTGAGATCTTTTCATT	Ампліфікація фрагмента В нуклеокапсидного гена N SARS CoV-2
NG B-LF	ACTGAGGGAGCCTTGAATACA	

Технологічний процес запропонованого способу складається з екстракції нуклеїнових кислот з біологічного матеріалу, ампліфікації та обліку результатів. Зворотна транскрипція, що забезпечує "перепис" вірусної РНК SARS CoV-2 в молекулу комплементарної ДНК (кДНК), об'єднана з процесом ампліфікації за рахунок двох активностей полімерази Bst I (*Bacillus stearothermophilus*).

Екстракція ДНК. Для дослідження використовують клінічний матеріал (слина, мокрота, суспензія фекальних мас, кров, плазма, сироватка).

Виділення РНК проводять за допомогою комплектів реагентів згідно інструкції виробника.

Ампліфікація. Для постановки LAMP ампліфікації готують реакційну суміш, об'ємом 20 мкл з розрахунку на одну реакцію, яка включає наступні компоненти:

- 10,0 мкл LAMP-суміші (буфер, дезоксинуклеотидтрифосфати);
- 3,0 мкл суміші олігонуклеотидів (згідно з таблицею по двох регіонах; гену N (А та В) в окремих пробірках, маркують як А та В;
- 1,0 мкл розчину SYBR Green (інтеркалятор);
- 1,0 мкл полімерази Bst I.

До приготовленої реакційної суміші додають 5 мкл виділеної РНК з досліджуваного матеріалу.

Додатково ставлять позитивний (К+) та негативний (К-) контролю реакції ампліфікації LAMP, вносячи у реакційну суміш по 5 мкл позитивного контролю та негативного контролю (НК) відповідно.

Умови реакції ампліфікації представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Умови ампліфікації LAMP РНК вірусу SARS CoV-2

№ з/п	Етапи	Температура, °C	Час
1	Зворотна транскрипція + LAMP ампліфікація	65,0	60 хв

Програмування ампліфікатора в режимі реального часу проводиться за наступною програмою:

1. 65 °C 10 сек. детектування по каналу Fam/SYBR
2. 65 °C 10 сек. детектування по каналу Fam/SYBR
3. 65 °C 10 сек. детектування по каналу Fam/SYBR

Ці три етапи повторюються 120 разів (циклів) як це показано на Фіг. 1.

Облік та інтерпретація результатів. По накопиченню флуоресценції інтеркалятора SYBR Green в режимі реального часу на ампліфікаторах з флуоресцентною детекцією роблять висновок про позитивний результат. Відсутність кривої флуоресценції свідчить про негативний результат.

Якщо результати LAMP ампліфікації враховують по кінцевій точці, як це показано на Фіг. 2, тоді візуально реєструють колір флуоресценції і роблять висновок про наявність чи відсутність позитивного чи негативного зразка.

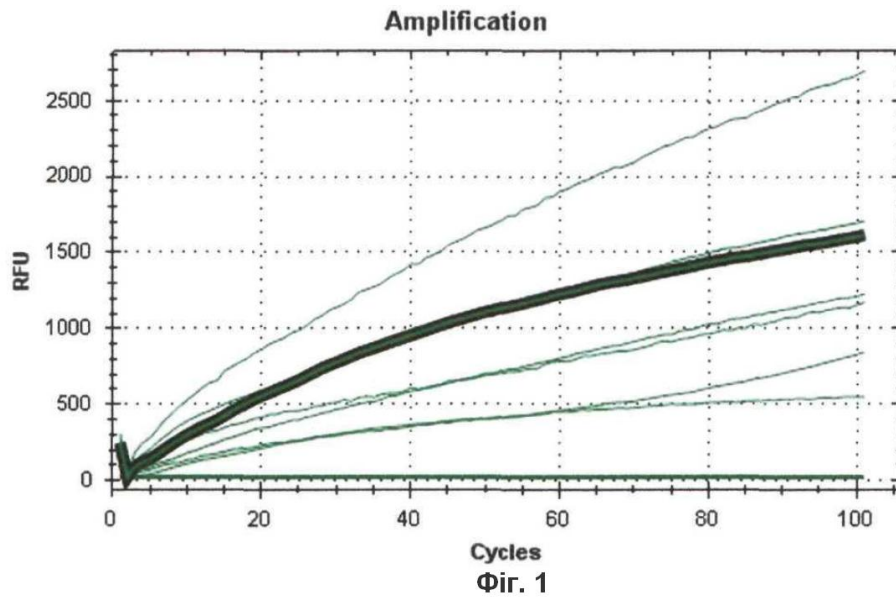
Джерела інформації:

1. Zhang Y., Odiwuor N., Xiong J., Sun L., Nyaruaba R. O., Wei H., Tanner N. A. (2020). Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028373>.

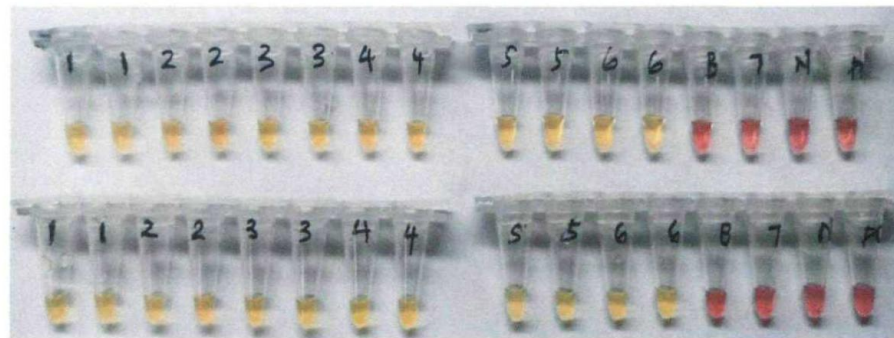
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 28, E63.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення РНК коронавірусу SARS CoV-2 методом ізотермічної ампліфікації LAMP в реальному часі, що включає ідентифікацію фрагментів А та В нуклеокапсидного гена N SARS CoV-2, який **відрізняється** тим, що для проведення реакції використовують полімеразу Bst I, яка має ревертазну та полімеразну активність та дозволяє проводити етапи зворотної транскрипції та ампліфікації одночасно в одній пробірці без зміни температури (в ізотермічних умовах) з різноманітними варіантами детекції, як в режимі реального часу (за рахунок флуоресценції інтеркалятора SYBR Green), так і по "кінцевій точці" (візуальна інтерпретація результатів).



LAMP в режимі реального часу з детекцією по SYBR Green



Фіг. 2

LAMP детекція результатів ампліфікації по «кінцевій точці»: флуоресценція жовтим кольором – позитивні зразки, малиновий колір – негативні зразки.