



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013126650/10, 10.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.06.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.06.2013

(45) Опубликовано: 20.08.2014 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CHIOU S.J. ET AL., Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers, *Planta Med*, 2007, v.73, no.13, p. 1421-1426. ALVAREZ I. ET AL., Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Mol Phylogenet Evol*, 2003, v.29, no.3, p. 417-434. HOLLAND P.M. ET AL., Detection of specific polymerase chain reaction product (см. прод.)

Адрес для переписки:

656049, г.Барнаул, пр. Ленина, 61, комн. 106,
ФГБОУ ВПО "Алтайский государственный
университет", отдел охраны интеллектуальной
собственности

(72) Автор(ы):

Куцев Максим Геннадьевич (RU),
Уварова Ольга Васильевна (RU),
Синицина Татьяна Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования "Алтайский
государственный университет" (RU)

(54) НАБОР СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕИТИДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ РОДИОЛЫ ЧЕТЫРЕХНАДРЕЗНОЙ (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.)

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey). Набор включает видоспецифичные участки для создания прямого, обратного праймеров и разрушаемого зонда, а именно прямой праймер - CGGCAACGGATATCTCGGCT-3', обратный праймер - 5'-GGCCTCGCAACCACCACTTGTC-

3', разрушаемый зонд - (флуоресцентная метка)-5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(гаситель). Предложенное изобретение позволяет достоверно, быстро и с высокой чувствительностью идентифицировать видовую принадлежность лекарственного растения - родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.) в ходе проведения скрининга растительного сырья. 1 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, v.88, no.16, p. 7276-7280



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013126650/10, 10.06.2013

(24) Effective date for property rights:
10.06.2013

Priority:

(22) Date of filing: 10.06.2013

(45) Date of publication: 20.08.2014 Bull. № 23

Mail address:

656049, g.Barnaul, pr. Lenina, 61, komn. 106,
FGBOU VPO "Altajskij gosudarstvennyj
universitet", otdel okhrany intellektual'noj
sobstvennosti

(72) Inventor(s):

**Kutsev Maksim Gennad'evich (RU),
Uvarova Ol'ga Vasil'evna (RU),
Sinitsina Tat'jana Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija "Altajskij
gosudarstvennyj universitet" (RU)**

(54) **SET OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES FOR SPECIES IDENTIFICATION OF ROSEROOT (Rhodiola quadrifida (Pall) Fisch et Mey)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a set of synthetic oligonucleotides for species identification of roseroot (Rhodiola quadrifida (Pall.) Fisch. et Mey). The set comprises species-specific areas to create a forward, reverse primers and a destructible probe, namely forward primer - CGGCAACGGATATCTCGGCT-3', the reverse primer - 5'-

GGCCTCGCAACCACCACTTGTC-3', the destructible probe - (fluorescent label)-5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(quencher).

EFFECT: invention enables to identify reliably, fast and with high sensitivity the species of medicinal plant in the course of screening of plant raw material.

1 dwg, 1 ex

R U
2 5 2 6 4 9 9
C 1

R U
2 5 2 6 4 9 9
C 1

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии. Использование набора синтетических олигонуклеотидов позволяет достоверно идентифицировать видовую принадлежность лекарственного растения - родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.). Изобретение может
5 быть использовано для выявления видовой принадлежности данного растения; в ходе проведения скрининга растительного сырья, для контроля на соответствие состава, декларированного производителем.

Среди большого количества методов генодиагностики с целью идентификации присутствия ДНК интересующего вида растений в образце, в качестве основы нашего
10 изобретения был принят формат ПЦР с детекцией в режиме реального времени на основе разрушаемого зонда. ПЦР в реальном времени имеет преимущество перед обычными ПЦР-системами идентификации - отсутствие необходимости последующего анализа, что минимизирует риск контаминации в лаборатории. Характерна также повышенная чувствительность и отсутствие ложноположительного результата при
15 неспецифичном отжиге праймеров. Кроме того, следует отметить обеспеченность практически всех молекулярно-генетических диагностических лабораторий оборудованием, необходимым для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени и широкое использование метода в клинической диагностике и органами госконтроля.

При проведении анализа методов детекции продукта полимеразной цепной реакции выбран метод на основе разрушаемого зонда, так как он относится к специфичным
20 методам детекции, возможно свободное использование без нарушения авторских и смежных прав (первоначально система разрушаемого зонда предложена в 1991 году, при этом все патенты на настоящий момент закончили свое действие).

Техническим результатом заявляемого изобретения является разработка праймеров и разрушаемых зондов на основе данных видоспецифичных нуклеотидных
25 последовательностей ядерной ДНК растений. В качестве видоспецифичных участков нами используется ITS2 фрагмент ядерной ДНК (internal transcribed spacer 2), обладающий большой копийностью в геноме [Alvarez, I. & Wendel, J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. 29, 417-434], и используемый в
30 проектировании системы ДНК-баркодинга. В этом регионе показана высокая вариабельность и потенциальная применимость в качестве маркерного участка [Stoeckle, M. (2003) Use of DNA barcodes to identify flowering plants // Bioscience 53,2-3].

Прототип - рассмотрим идентификацию лекарственных растений с использованием
35 фрагмента ITS2, амплифицированного специфичными праймерами [Chiou SJ, Yen JH, Fang CL, Chen HL, Lin TY Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers/ZPlanta Med. 2007, Oct; 73(13): 1421-6. Epub 2007 Oct 1]. В прототипе используются специфичные наборы праймеров BEL-1/BEL-3 и BEL-2/BEL-3 для амплификации ITS2 участка рДНК 55 лекарственных растений.

Принципиальные отличия прототипа от заявленного изобретения следующие:
40 идентифицируется лекарственное растение с нуклеотидными последовательностями специфичных праймеров отличные от заявленных. Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.), включающий
45 проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, где для идентификации данного растения используют специфичные прямой, обратный праймеры и разрушаемый зонд.

Работа над созданием праймеров строится следующим образом.

1) С помощью открытых и коммерческих баз данных нуклеотидных последовательностей различных видов растений либо в результате самостоятельного определения нуклеотидной последовательности растений выбирается участок генома, встречающийся у всех видов.

5 2) На основании выбранного участка генома с помощью специального программного обеспечения или вручную подбирается последовательность олигонуклеотидов, используемых для проведения ПЦР-реакции (2 праймера и зонд). На данном этапе работа заключается в создании выравнивания многих последовательностей и выборе участка последовательности, где присутствуют отличия для создания прямого, 10 обратного праймеров и зонда. Выравнивание геномных последовательностей означает сравнение последовательностей многих видов друг с другом, поиск гомологичных для растений участков.

3) Изготовление праймеров и зонда производится на автоматических синтезаторах.

4) С помощью практических экспериментов доказываемся пригодность подобранных 15 последовательностей для конкретных целей.

Анализ нуклеотидного полиморфизма последовательности ITS2 на основании данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и секвенированных de novo последовательностей видов, не размещенных в генбанке, позволяет применить данные последовательности в качестве основы для создания праймеров. Для детекции накопления продукта ПЦР 20 в ходе реакции используют технологию с разрушаемым зондом (Holland P M, Abramson R D, Watson R, Gelfand D H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 August 15; 88(16): 7276-7280).

В качестве флуоресцентной метки используют, например, FAM, в качестве гасителя 25 ВHQ1 (возможны другие комбинации флуорофоров и гасителей и это не является предметом охраны авторских прав).

Аналогичные наборы, реакционные смеси, праймеры для амплификации и выявления видовой принадлежности родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.) не известны.

30 Ход работы с применением набора синтетических олигонуклеотидов для амплификации состоит из следующих шагов.

Пример:

1) Растительный материал перед проведением ПЦР с помощью заявляемого набора проводится через процедуру пробоподготовки с использованием набора Diamont DNA 35 kit, в соответствии с инструкцией производителя; в ходе этой процедуры из растительного материала выделяется ДНК, которую в свою очередь используют для ПЦР.

2) Полимеразную цепную реакцию проводят на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, USA). Амплификация проводится по следующей программе: 1 цикл: 95°C - 3 мин; 40 циклов: 95°C - 10 сек, 58°C - 30 сек (на данной стадии производится сканирование уровня флуоресценции). Инкубационная смесь конечным объемом 25 мкл содержит: 14,1 мкл H₂O; 2 мкл ДНК; 2,5 мкл 10X буфер; 2,5 мкл 25 мМ MgCl₂; по 1 мкл 10 мМ каждого праймера; 0,5 мкл зонда; 1,2 мкл 20 мМ dNTPs; 0,2 мкл Taq-полимеразы. Результат амплификации определяют по нарастанию уровня флуоресценции, рис.1.

45 Для выявления родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.), в качестве прямого праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGGCAACGGATATCTCGGCT-3', в качестве обратного праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-GGCCTCGCAACCACCTTGTC-3', в качестве разрушаемого зонда

используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(гаситель). Гаситель располагается и на 5'-конце, а флуоресцентная метка на 3'-конце разрушаемых зондов. Разработан набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.) методом полимеразной цепной реакцией с детекцией в режиме реального времени. Набор обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяющий быстро и достоверно провести идентификацию рассмотренного лекарственного растения.

10

Формула изобретения

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey), включающий проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, отличающийся тем, что для выявления родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.) используют видоспецифичные участки для создания прямого, обратного праймеров и разрушаемого зонда:

15

в качестве прямого праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGGCAACGGATATCTCGGCT-3',

20

в качестве обратного праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-GGCCTCGCAACCACTTGTC-3',

в качестве разрушаемого зонда - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(гаситель).

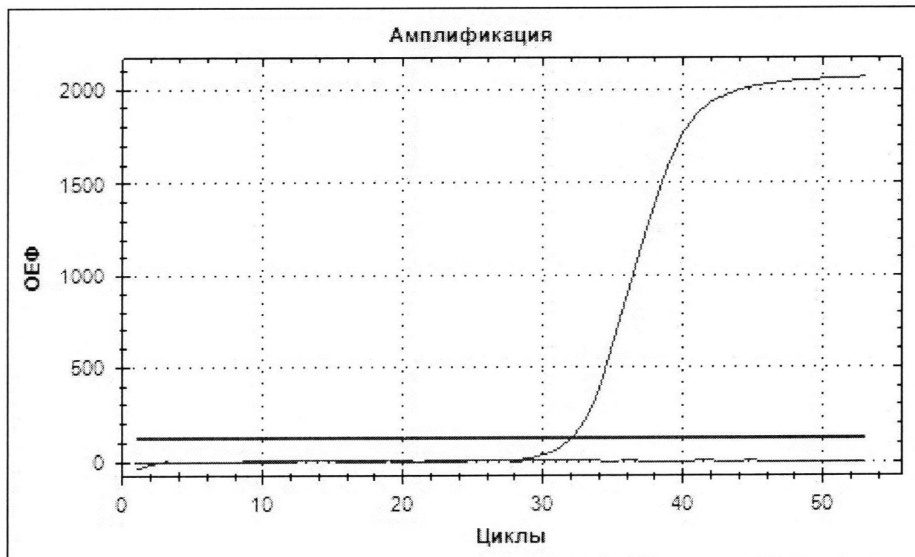
25

30

35

40

45



Пример амплификации со специфическими праймерами родиолы четырехнадрезной (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. et Mey.), отрицательный контроль (вода).

Рис. 1.