



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013106976/10, 18.02.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.02.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.02.2013

(45) Опубликовано: 10.09.2014 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2113481 C1, 20.06.1998. EA 14986 B1, 29.04.2011. GenBank: N HE863772, 06.07.2012. GenBank: N HE863772, 05.10.2010. GenBank: N HM854157, 05.10.2010. GenBank: N GU384199, 19.05.2010. GenBank: N HM854164, 05.10.2010. GenBank: N HM854167, 05.10.2010. UNTERGASSER A., et. al., Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3, Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, Web Server issue W71-W74. CN 101348833 A, 21.01.2009

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 ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ И СЕКВЕНИРОВАНИЯ ITS1-5.8S-ITS2 СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к набору синтетических олигонуклеотидов для амплификации и последующего секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 сосудистых растений, включающего проведение полимеразой цепной реакции с помощью универсальных праймеров со следующим

нуклеотидным составом: primer ITS-for CGTAACAAGGTTTCCGTAG, primer ITS-rew GGAATCCTTGTAAGTTTCTTT. Изобретение позволяет эффективно анализировать структуру внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомной ДНК сосудистых растений. 1ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 528 063** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013106976/10, 18.02.2013

(24) Effective date for property rights:
18.02.2013

Priority:

(22) Date of filing: 18.02.2013

(45) Date of publication: 10.09.2014 Bull. № 25

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 AMPLIFICATION AND SEQUENCING ITS1-5,8S-ITS2 OF VASCULAR PLANTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a set of synthetic oligonucleotides for amplification and subsequent sequencing ITS1-5.8S-ITS2 of vascular plants, comprising carrying out a polymerase chain reaction using universal primers with the following nucleotide composition: primer ITS-for

CGTAACAAGGTTTCCGTAG, primer ITS-rew
GGAATCCTTGTAAGTTTCTTT.

EFFECT: invention enables to analyse effectively the structure of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA of vascular plants.

1 dwg

RU 2 528 063 C1

RU 2 528 063 C1

Изобретение относится к области молекулярной генетики и геносистематики, может быть использовано для синтеза и последующего анализа структуры внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомной ДНК сосудистых растений.

Для молекулярно-генетических исследований в области систематики растений на уровне видов наиболее часто используемыми являются внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS) области ядерной рибосомальной ДНК (18S-5.8S-26S), обладающие большой копийностью в геноме [Alvarez, I. & Wendel, J. F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 417-434]. В этом регионе показана высокая вариабельность и потенциальная применимость в качестве маркерного участка (за исключением папоротников) [Stoeckle, M. (2003) Use of DNA barcodes to identify flowering plants // *Bioscience* 53, 2-3]. На уровне видов дискриминация и простота технического исполнения подтверждаются в большинстве филогенетических исследований, при использовании ITS к тому же существует большое количество данных о последовательностях для данного региона. Анализ полиморфизма межгенных спейсеров позволяет изучать филогенетические отношения между близкородственными видами, а также изучать филогению между популяциями внутри вида и между отдельными индивидуумами.

Преимущество региона ITS в том, что она может быть амплифицирована по частям (имеется два более мелких фрагмента - ITS1 и ITS2 - прилегающих к 5.8S локусу, который расположен в центре всего участка и консервативен). Консервативный регион 5.8S на самом деле содержит филогенетической информации для дискриминации на уровне классов [Cullings, K. W. & Vogler, D. R. (1998) A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution // *Mol. Ecol.* 7, 919-923]. Некоторые участки 5.8S из немногих видов растений и грибов имеют индели [Hershkovitz, M.A. & Lewis, L.A. (1996) Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region // *Mol. Biol. Evol.* 13, 1276-1295]. Для филогенетической реконструкции ITS, как любой быстро развивающийся некодирующий локус, может потребовать разработки комплекса оценки гомологии последовательности. Таким образом, 5.8S локус может служить в качестве опорной точки для поиска алгоритмов, которые используются для филогенетических целей.

Для проведения полимеразной цепной реакции используют праймеры - короткие ДНК-затравки, между которыми происходит синтез определенной последовательности. Для амплификации последовательностей межгенных спейсеров используют, как правило, праймеры, качественный состав которых определяется по нуклеотидной последовательности структурных субъединиц рибосомальных повторов, т.е. 18S и 28S рДНК. Ограниченность использования праймеров обусловлена их видоспецифичностью [Blattner F.R. (1999) Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. In.: *Biotechniques* 27:1180-1186; White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322. Academic Press, San Diego; Фризен Н. Молекулярные методы, используемые в систематике растений. - Барнаул: АзБука, 2007.-64 с.].

Рассмотрим прототип - способ исследования структурно-функциональной организации ДНК рибосомального кластера эукариот, предусматривающий проведение полимеразной цепной реакции с помощью универсальных праймеров, где в качестве праймеров используют последовательности ДНК со следующим ITS1-5.8S-ITS2 нуклеотидным составом:

5' -СТАСТАГАТGGTTCGАТТАGTC-3'

5'-GTCCCTGCCGTTTGTACACA-3'

для анализа внутреннего межгенного спейсера; ITS1-5.8S-ITS2 [Патент RU №2113481 от 20.06.98. Способ исследования структурно-функциональной организации ДНК рибосомального кластера эукариот].

Недостатком данного метода является то, что берется широкий круг таксонов эукариот. Данное обстоятельство чревато тем, что довольно высок процент загрязнения: в результате полимеразной цепной реакции может произойти преимущественная амплификация ITS1-5.8S-ITS2 нецелевого вида.

Работа над созданием праймеров строится следующим образом.

1) С помощью открытых и коммерческих баз данных нуклеотидных последовательностей различных видов сосудистых растений либо в результате самостоятельного определения нуклеотидной последовательности сосудистых растений выбирается участок генома, уникальный для данной группы видов.

2) На основании выбранного участка генома с помощью специального программного обеспечения или вручную подбирается последовательность олигонуклеотидов, используемых для проведения ПЦР-реакции (часто 2 праймера). На данном этапе работа заключается в создании выравнивания многих последовательностей и выборе участка последовательности, где отсутствуют отличия. Выравнивание геномных последовательностей означает сравнение последовательностей многих видов друг с другом, поиск универсальных для сосудистых растений участков.

3) Изготовление праймеров производится на автоматических синтезаторах.

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

Анализ нуклеотидного полиморфизма последовательности ITS1-5.8S-ITS2 на основании данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (нуклеотидная база данных представляет собой набор последовательностей из нескольких источников, в том числе GenBank, RefSeq, ТПА и PDB). Данные базы обеспечивают основу для медико-биологических исследований и открытий - позволяют применить данные последовательности в качестве основы для создания праймеров.

Для определения универсальных праймеров выявлены сверхконсервативные субпоследовательности 18S и 28S рДНК различных видов сосудистых растений, которые используются в качестве основы для подбора праймеров для работы методом ПЦР.

Предлагаемое изобретение используется для синтеза и последующего анализа структуры внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомной ДНК сосудистых растений. Задачей данного изобретения является поиск универсальных праймеров, применимых для анализа структуры ITS1-5.8S-ITS2 сосудистых растений.

Поставленная задача решается посредством определения последовательности праймеров, а именно для амплификации ITS1-5.8S-ITS2 рибосомной ДНК сосудистых растений предложена пара праймеров следующего нуклеотидного состава:

primer ITS-for CGTAACAAGGTTTCCGTAG

primer ITS-rew GGAATCCTTGTAAGTTTCTTT

Аналогичные наборы, реакционные смеси, праймеры для амплификации и последующего секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 рибосомной ДНК сосудистых растений неизвестны.

Заявляемый набор синтетических олигонуклеотидов для амплификации и последующего секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 проверяют на различных видах сосудистых

растений.

Ход работы с применением набора синтетических олигонуклеотидов для амплификации и последующего секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 рибосомной ДНК сосудистых растений состоит из следующих шагов.

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

10 2) Полимеразную цепную реакцию проводят на амплификаторе MyCycler (Bio-Rad, USA). Амплификация проводится по следующей программе: 6 циклов: 30 циклов: 94°C - 45 сек, 56°C - 60 сек, 72°C - 70 сек; завершающая стадия: 72°C - 10 мин, охлаждение при 4°C.

15 Инкубационная смесь конечным объемом 25 мкл содержит: 14,6 мкл H₂O; 2 мкл ДНК; 2,5 мкл 10X буфер; 2,5 мкл 25 mM MgCl₂; по 1 мкл 10 mM каждого праймера; 1,2 мкл 20 mM dNTPs; 0,2 мкл Taq-полимеразы.

20 3) Разделение продукта амплификации производится в 1,8% агарозном геле и 0,5 M TAE-буфере при 2,5 В/см в горизонтальной электрофорезной камере Pharmacia LKB-GNA 200. После электрофореза гель окрашивается раствором этидиум бромид в концентрации 2,5 мг/л в течение 20 мин и фотографируется в проходящем УФ-излучении. На фиг.1 наблюдают результат амплификации ITS1-5.8S-ITS2 рибосомной ДНК различных видов сосудистых растений.

Наличие продуктов амплификации во всех дорожках подчеркивает универсальность предлагаемых праймеров.

25 Секвенирование проводят на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3500 xl с использованием протоколов и наборов реагентов, универсальных рекомендуемых производителем и предлагаемых праймеров. Примеры некоторых последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 рибосомной ДНК, размещенные в генбанке NCBI.

30 1) Последовательность ITS 1-5.8S-ITS2 *Bunias orientalis* секвенированная с помощью предлагаемых праймеров размещена в генбанке NCBI под номером HE863772.1.

2) Последовательность ITS1-5.8S-ITS2 *Rhododendron fauriei* секвенированная с помощью предлагаемых праймеров размещена в генбанке NCBI под номером NM854166.1.

35 3) Последовательность ITS1-5.8S-ITS2 *Calluna vulgaris* секвенированная с помощью предлагаемых праймеров размещена в генбанке NCBI под номером NM854157.1.

4) Последовательность ITS1-5.8S-ITS2 *Rhodiola rosea* секвенированная с помощью предложенных праймеров размещена в генбанке NCBI под номером GU384199.1.

40 5) Последовательность ITS1-5.8S-ITS2 *Rhododendron adamsii* секвенированная с помощью предложенных праймеров размещена в генбанке NCBI под номером NM854164.1.

6) Последовательность ITS1-5.8S-ITS2 *Rhododendron japonicum* секвенированная с помощью предложенных праймеров размещена в генбанке NCBI под номером NM854167.1.

45 Формула изобретения

Набор синтетических олигонуклеотидов для амплификации и последующего секвенирования ITS1-5.8S-ITS2 сосудистых растений, включающий проведение полимеразной цепной реакции с помощью универсальных праймеров, отличающийся

тем, что в качестве праймеров используются последовательности ДНК со следующим нуклеотидным составом:

primer ITS-for CGTAACAAGGTTTCCGTAG

primer ITS-rew GGAATCCTTGTAAGTTTCTTT

5

10

15

20

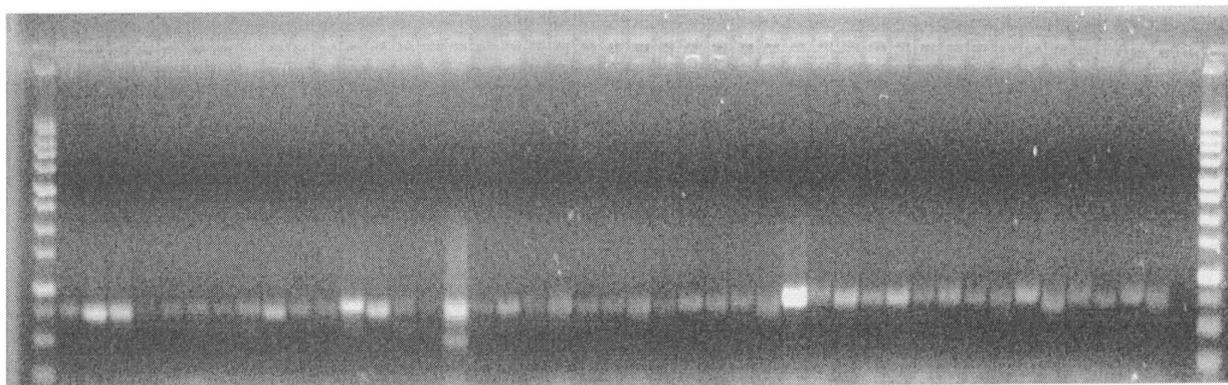
25

30

35

40

45



Результат амплификации ITS1-5.8S-ITS2 рибосомной ДНК различных видов сосудистых растений.

Фиг. 1