



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013125172/15, 30.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.05.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.05.2013

(45) Опубликовано: 10.12.2014 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 7811766 B2, 12.10.2010. CHIOU S.J. et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. *Planta Med.* 2007 Oct; 73(13): 1421-1426. Epub 2007 Oct 1. RU 2182176 C2, 10.05.2002. НАДТОЧИЙ И.Н. и др. Ареал и зона вредоносности сушеницы топяной (болотной) *Gnaphalium uliginosum* L. (*Filafinella uliginosa* (L.) Opiz.) (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 ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СУШЕНИЦЫ БОЛОТНОЙ (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии и предназначено для выявления видовой принадлежности сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz). Предложен набор синтетических олигонуклеотидов для ПЦР с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, включающий

прямой и обратный праймеры и разрушаемый зонд. Набор обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет быстро и достоверно провести идентификацию лекарственного растения. 1 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

(семейство астровые *Asteraceae* Dumort.). Вестник защиты растений. 2008; 4: 65-66 [Найдено 14.08.2014] [он-лайн], Найдено из Интернет: URL: <http://www.vestnik.iczr.ru/rus/fpdf/pdf/2008-4.pdf>



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 535 063** (13) **C1**

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/68* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013125172/15, 30.05.2013

(24) Effective date for property rights:  
30.05.2013

Priority:

(22) Date of filing: 30.05.2013

(45) Date of publication: 10.12.2014 Bull. № 34

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) **KIT OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES FOR IDENTIFYING SPECIES OF COTTON WEED  
(*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to molecular genetics, genetic classification and pharmacognosy and aims at identifying a species of cotton weed (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz). What is presented is a kit of synthetic oligonucleotides for PCR with ITS2 fragment

of a nuclear DNA comprising upstream and downstream primers and a degradable probe.

EFFECT: kit possesses high sensitivity and specificity, and enables fast and reliable identification of a medicinal herb.

1 dwg, 1 ex

R U 2 5 3 5 0 6 3 C 1

R U 2 5 3 5 0 6 3 C 1

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии. Использование набора синтетических олигонуклеотидов позволяет достоверно идентифицировать видовую принадлежность лекарственного растения - сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz). Изобретение может быть  
5 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  
20 реакции выбран метод на основе разрушаемого зонда, так как он относится к специфичным 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  
25 и разрушаемых зондов на основе данных видоспецифичных нуклеотидных 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 фрагмента ITS2, амплифицированного специфичными праймерами [Chiou SJ, Yen JH,  
35 Fang CL, Chen HL, Lin TY Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers//Planta 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, отличных от заявленных. Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz), включающий проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, для идентификации  
45 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.

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, 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 доказываемость пригодность подобранных 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 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 - BHQ1 (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 сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz) не известны.

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 Diamond DNA 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 H<sub>2</sub>O; 2 мкл ДНК; 2,5 мкл 10X буфер; 2,5 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>; по 1 мкл 10 mM каждого праймера; 0,5 мкл зонда; 1,2 мкл 20 mM dNTPs; 0,2 мкл Taq-полимеразы. Результат амплификации определяют по нарастанию уровня флуоресценции, рис.1.

Для выявления сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz) в качестве прямого праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-СААСGGАТАТСТСGGСТСАС-3', в качестве обратного праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-GTACGACTCAAGACGCACAА-3', в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-CCGTGAACC ATCGAGTTTTT-3'-(гаситель).

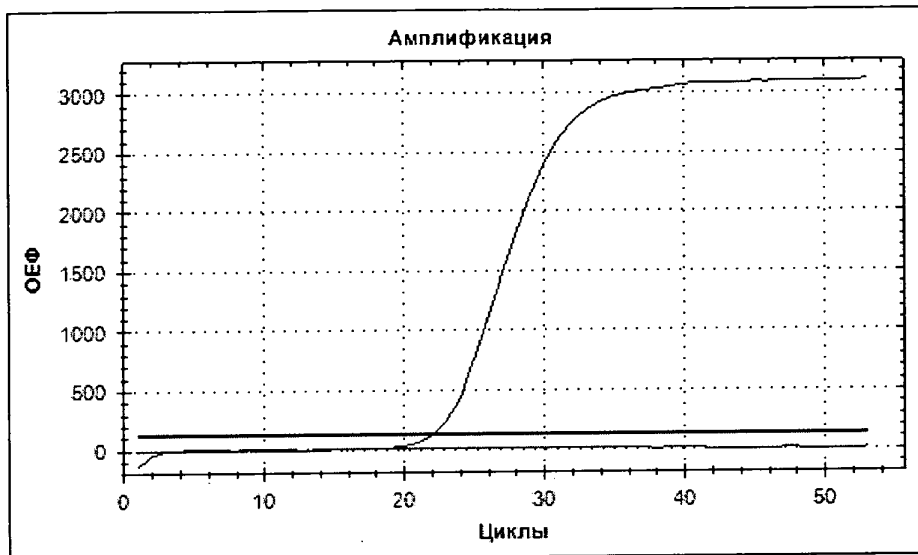
Гаситель располагается на 5'-конце, а флуоресцентная метка на 3'-конце разрушаемых

зондов.

Разработан набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Набор обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет быстро и достоверно провести идентификацию рассмотренного лекарственного растения.

#### Формула изобретения

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Opiz), включающий проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, отличающийся тем, что для идентификации используют видоспецифичные участки для создания прямого, обратного праймеров и разрушаемого зонда, где в качестве прямого праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-СААСGGАТАТСТСGGСТСАС-3'; обратного праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-GTACGACTC AAGACGC АСАА-3'; разрушаемого зонда - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-CCGTGAACC ATCGAGTTTTT-3'-(гаситель).



Пример амплификации со специфическими праймерами сушеницы болотной (*Filaginella uliginosa* (L.) Oriz), отрицательный контроль (вода).

Рис. 1