



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013125173/15, 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 2007264638 A1, 15.11.2007. АРТЮКОВА Е.В. и др. Филогенетические связи дальневосточных аралиевых по результатам сравнения последовательностей ITS региона ядерной рДНК. Генетика. 2005; 41(5): 1-10 [Найдено 13.08.2014] [он-лайн], Найдено из Интернет: URL: <http://www.biosoil.ru/files/00000035.pdf>. CHIOU S.J. et al. Authentication of medicinal herbs (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 СВОБОДНОЯГОДНИКА КОЛЮЧЕГО, ЭЛЕУТЕРОКОККА (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии и предназначено для выявления видовой принадлежности свободнойягодника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.). 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):

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

RU 2 535 064 C1

RU 2 535 064 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 535 064**⁽¹³⁾ **C1**

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013125173/15, 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) **SET OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES FOR SPECIES IDENTIFICATION OF SPINY
ELEUTEROCOCUS, ELEUTHEROCOCCUS (Eleutherococcus senticosus (Rupr. et Maxim.) Maxim.)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of molecular genetics, genetic systematics and pharmacognosy, and is intended for species identification of spiny eleuterococus, eleutherococcus (Eleutherococcus senticosus (Rupr. Et Maxim.) Maxim.). The set of synthetic oligonucleotides for PCR

with fragment ITS2 of nuclear DNA is proposed, comprising forward and reverse primers and a destructible probe.

EFFECT: set has a high sensitivity and specificity and enables to identify quickly and reliably the medicinal plant.

1 dwg, 1 ex

R U 2 5 3 5 0 6 4 C 1

R U 2 5 3 5 0 6 4 C 1

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии. Использование набора синтетических олигонуклеотидов позволяет достоверно идентифицировать видовую принадлежность лекарственного растения - свободнойгодника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.). Изобретение может 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 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 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.

На основе анализа возможных методов детекции продукта полимеразной цепной реакции нами выбран метод на основе разрушаемого зонда на основе того, что он относится к специфичным методам детекции, возможности свободного его использования 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 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 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, 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: идентифицируется лекарственное растение с нуклеотидными последовательностями специфичных праймеров, отличных от заявленных. Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - свободнойгодника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.), включающий проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, где для идентификации данного растения используют специфичные прямой, обратный праймеры и разрушаемый зонд, в качестве прямого праймера

используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGGCAACGGATATCTCGGCT-3'; в качестве обратного праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGCACGACAGGAGAAGAGGGCTT-3'; в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-CATCGAGTCTTTGAACGCAA-3' (гаситель).

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 доказываемся 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 свободной почки колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.) 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 Diamont 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 с, 58°C - 30 с (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 mM dNTPs; 0,2 мкл Taq-полимеразы. Результат амплификации определяют по нарастанию уровня флуоресценции, рис.1.

Для выявления свободнойгодника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.), в качестве прямого праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGGCAACGGATATCTCGGCT-3'; в качестве обратного праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGCACGACAGGAGAAGAGGGCTT-3'; в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-C ATCGAGTCTTTGAACGCAA-3'-(гаситель).

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

Разработан новый набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - свободнойгодника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.) - методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Набор обладает высокими чувствительностью и специфичностью, позволяющими быстро и достоверно провести идентификацию рассмотренного лекарственного растения.

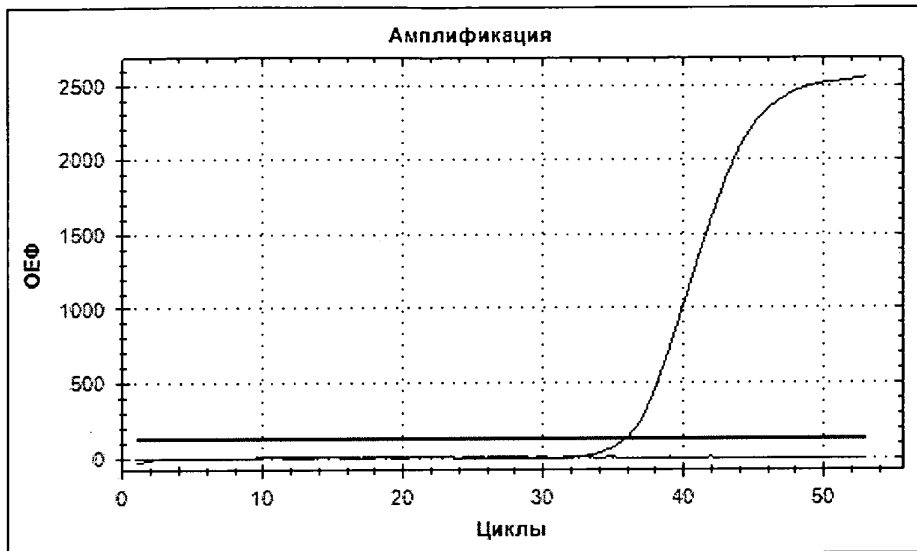
Формула изобретения

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности свободнойгодника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.), включающий проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, отличающийся тем, что для идентификации свободнойгодника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.) используют видоспецифичные участки для создания прямого, обратного праймеров и разрушаемого зонда, где в качестве прямого праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGGCAACGGATATCTCGGCT-3'; обратного праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CGCACGACAGGAGAAGAGGGCTT-3'; разрушаемого зонда - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-CATCGAGTCTTTGAACGCAA-3'-(гаситель).

35

40

45



Пример амплификации со специфическими праймерами свободной годника колючего, элеутерококка (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.), отрицательный контроль (вода).

Рис. 1