



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014142228/10, 20.10.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
20.10.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.10.2014

(45) Опубликовано: 27.01.2016 Бюл. № 3

(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, Vol.73, N.13, pp. 1421-1426. ALVAREZ I. et al., Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Mol Phylogenet Evol.*, 2003, Vol.29, N.3, pp.417-434. US2009081657 A1, 26.03.2009. RU 2182176 C2, 10.05.2002.

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Куцев Максим Геннадьевич (RU),  
Уварова Ольга Васильевна (RU),  
Шмаков Александр Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) НАБОР СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВОЛОДУШКИ МНОГОЖИЛЬЧАТОЙ (*Vupleurum multinerve* DC.)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к набору синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности володушки многожилчатой (*Vupleurum multinerve* DC.), включающий проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК. При этом 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'-

TATCCCGGCTCTCGCATCGA-3'; обратного праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-GACGAGGCACGGGAGGTCAG-3', разрушаемого зонда последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка) -5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(гаситель). Изобретение позволяет эффективно идентифицировать видовую принадлежность володушки многожилчатой (*Vupleurum multinerve* DC.) в ходе проведения скрининга растительного сырья. 1 ил., 1 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014142228/10, 20.10.2014

(24) Effective date for property rights:  
20.10.2014

Priority:

(22) Date of filing: 20.10.2014

(45) Date of publication: 27.01.2016 Bull. № 3

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

Kutsev Maksim Gennad'evich (RU),  
Uvarova Ol'ga Vasil'evna (RU),  
Shmakov Aleksandr Ivanovich (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 BUPLEURUM MULTINERVE (Bupleurum multinerve DC)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a set of synthetic oligonucleotides for species identification of Bupleurum multinerve (Bupleurum multinerve DC.), comprising polymerase chain reaction with a fragment ITS2 of nuclear DNA. And for identification species-specific portions are used to create the forward, reverse primers and destroyed probe, where the forward primer is the DNA sequence with the following nucleotide structure: 5'-TATCCCGGCTCTCGCATCGA-3'; the reverse

primer is the DNA sequence with the following nucleotide structure: 5'-GACGAGGCACGGGAGGTCAG-3', the destroyed probe DNA sequence with the following nucleotide composition (fluorescent label)-5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(quencher).

EFFECT: invention enables the species identification of Bupleurum multinerve during screening of plant raw materials.

1 dwg, 1 ex

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии. Использование набора синтетических олигонуклеотидов позволяет достоверно идентифицировать видовую принадлежность лекарственного растения володушки многожилчатой (*Vupleurum multinerve* DC.). 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: идентифицируются лекарственные растения с нуклеотидными последовательностями специфичных праймеров, отличные от заявленных. Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - володушки многожилчатой (*Vupleurum multinerve* DC.), предназначенный для проведения полимеразной цепной реакции фрагмента ITS2 ядерной ДНК, включающий для идентификации данного растения видоспецифичные праймеры прямой, обратный праймеры и разрушаемый зонд:

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

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

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

35 Аналогичные наборы, реакционные смеси, праймеры для амплификации и выявления видовой принадлежности володушки многожилчатой (*Vulpurum multinerve* DC.) неизвестны.

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

40 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.

45 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.

5 Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - володушки многожилчатой (*Vulpurum multinerve DC.*), предназначенный для проведения полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Набор включает видоспецифичные участки для создания прямого, обратного праймеров и разрушаемого зонда, а именно прямой праймер 5'-TATCCCGGCTCTCGCATCGA-3', обратный праймер 5'-GACGAGGCACGGGAGGTCAG-10 3', в качестве разрушаемого зонда (флуоресцентная метка)-5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(гаситель). Набор обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяющий быстро и достоверно провести идентификацию рассмотренного лекарственного растения.

15 **Формула изобретения**

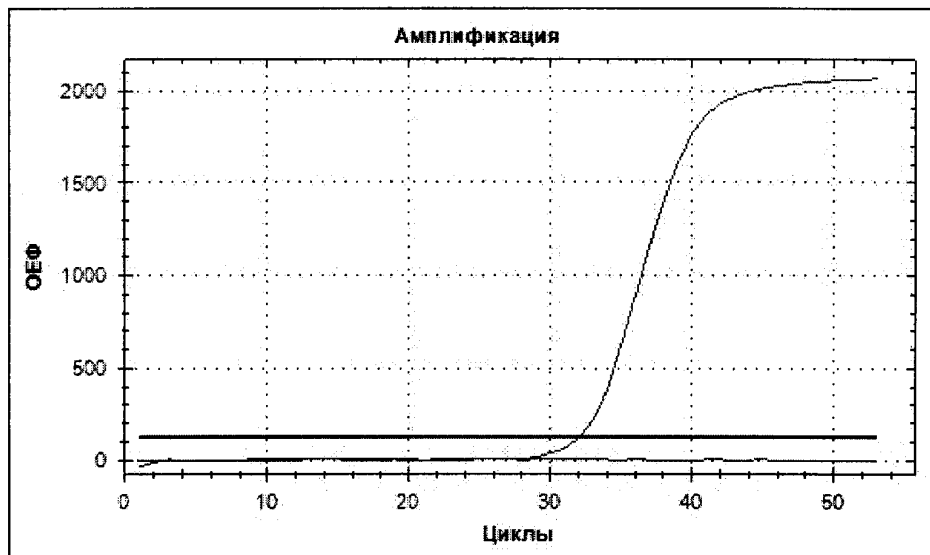
Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности володушки многожилчатой (*Vulpurum multinerve DC.*), включающий проведение полимеразной цепной реакции с фрагментом ITS2 ядерной ДНК, отличающийся тем, что для идентификации используют видоспецифичные участки для создания прямого, 20 обратного праймеров и разрушаемого зонда, где в качестве прямого праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-TATCCCGGCTCTCGCATCGA-3'; обратного праймера - последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-GACGAGGCACGGGAGGTCAG-3', разрушаемого зонда последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 25 (флуоресцентная метка)-5'-CCGTGAACCATCGAGTTTTT-3'-(гаситель).

30

35

40

45



Пример амплификации со специфическими праймерами  
володушки многожилчатой (*Vulpaurum multinerve* DC.), отрицательный  
контроль (вода).

Рис. 1