



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013119727/15, 26.04.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.04.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.04.2013

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2014 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 27.04.2015 Бюл. № 12

(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. BORCHERT T. et al. 'Who's who' in two different flower types of *Calluna vulgaris* (Ericaceae): morphological and molecular analyses of flower organ identity. ВМС (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),  
Синицына 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 ВЕРЕСКА ОБЫКНОВЕННОГО (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии и предназначено для выявления видовой принадлежности вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.). 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):

*Plant Biol.* 2009 Dec 14; 9: 148 [Найдено 15.08.2014] [он-лайн], Найдено из Интернет: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2803492/pdf/1471-2229-9-148.pdf>. KZ 26274 A4, 15.10.2012. RU 2182176 C2, 10.05.2002

C 2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
R U

R U  
2  
5  
4  
9  
4  
5  
3  
C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013119727/15, 26.04.2013**

(24) Effective date for property rights:  
**26.04.2013**

Priority:

(22) Date of filing: **26.04.2013**

(43) Application published: **10.11.2014** Bull. № 31

(45) Date of publication: **27.04.2015** Bull. № 12

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),  
Sinitsyna 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 IDENTIFICATION OF SPECIES AFFILIATION OF COMMON HEATHER (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.)**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of molecular genetics, genosystematics and pharmacognosy and is intended for the identification of the species affinity of common heather (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.). Claimed is a set of synthetic oligonucleotides for PCR with the fragment ITS2 of

nuclear DNA, including forward and reverse primers and a degradable probe.

EFFECT: set possesses high sensitivity and specificity and makes it possible to carry out the identification of a medicinal plant in a fast and reliable way.

1 dwg, 1 ex

**C 2  
3  
4  
5  
6  
4  
5  
2  
R U**

**R U  
2 5 4 9 4 5 3  
C 2**

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.)

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики и фармакогнозии. Использование набора синтетических олигонуклеотидов позволяет достоверно идентифицировать видовую принадлежность лекарственного растения - вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.). 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].

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 аналоге используются специфичные наборы праймеров BEL-1/BEL-3 и BEL-2/BEL-3 для амплификации ITS2 участка рДНК 55 лекарственных растений. Идентифицируются различные лекарственные растения с нуклеотидными последовательностями специфичных праймеров.

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.), предназначенный для проведения полимеразной цепной реакции фрагмента ITS2 ядерной ДНК, включающий праймеры, характеризующийся тем, что для идентификации вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) в качестве прямого праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом:

5'-CATTAGGCTGAAGGCACGTC-3',

в качестве обратного праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом:

5'-ACAAAGAACAGCATGCACGA-3',

5 в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом:

(флуоресцентная метка)-5'-GTGCTCGGTCTAAAG-3'-(гаситель).

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

10 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.

15 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, 20 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 доказывається пригодность подобранных 25 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 30 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 35 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 вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) не известны.

40 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 45 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 мМ MgCl<sub>2</sub>; 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.

5 Для выявления вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.), в качестве прямого праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: 5'-CATTAGGCTGAAGGCACGTC-3', в качестве обратного праймера используется последовательность ДНК со

10 следующим нуклеотидным составом: 5'-ACAAAGAACAGCATGCACGA-3', в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка)-5'-GTGCTCGGTCTGCTCTAAAAG-3'-(гаситель).

Пример амплификации со специфическими праймерами вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) наблюдают на рис. 1, отрицательный контроль (вода).

15 Разработан новый набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности лекарственного растения - вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.), предназначенный для проведения полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Набор обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяющий быстро и достоверно провести идентификацию

20 рассмотренного лекарственного растения.

#### Формула изобретения

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.), предназначенный для проведения

25 полимеразной цепной реакции фрагмента ITS2 ядерной ДНК, включающий праймеры, характеризующийся тем, что для идентификации вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull.) в качестве прямого праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом:

5'-CATTAGGCTGAAGGCACGTC-3',

30 в качестве обратного праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом:

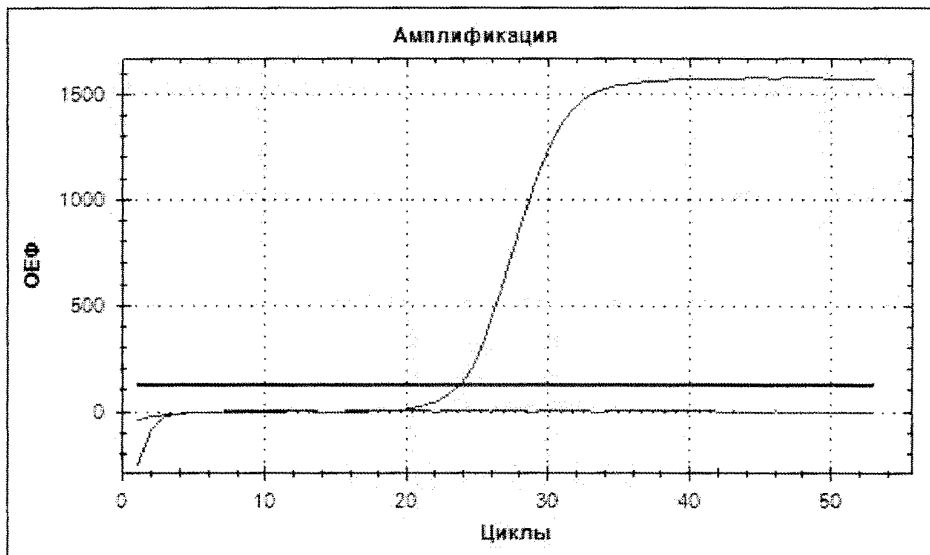
5'-ACAAAGAACAGCATGCACGA-3',

в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом:

35 (флуоресцентная метка)-5'-GTGCTCGGTCTGCTCTAAAAG-3'-(гаситель).

40

45



Пример амплификации со специфическими праймерами  
вереска обыкновенного (*Calluna vulgaris* (L.) Hull. ), отрицательный контроль  
(вода).

Рис. 1