



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/6806 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2018145639, 20.12.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.12.2018

Дата регистрации:
03.06.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.12.2018

(45) Опубликовано: 03.06.2020 Бюл. № 16

Адрес для переписки:

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
"Алтайский государственный университет",
ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Куцев Максим Геннадьевич (RU),
Скапцов Михаил Викторович (RU),
Уварова Ольга Васильевна (RU),
Иванова Мария Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: Харзинова В.Р. РАЗРАБОТКА
МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПАНЕЛИ
МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ
И СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
ПОПУЛЯЦИЙ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ
RANGIFER TARANDUS,
Сельскохозяйственная биология, том 50, номер
6, 2015, стр. 756-765. N. GALTIER ET AL.
Mitochondrial DNA as a marker of molecular
diversity: a reappraisal, Molecular ecology, (см.
прод.)

(54) Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления ДНК представителей семейства Оленевые

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к области молекулярной генетики, геносистематики. Использование набора синтетических олигонуклеотидов позволяет достоверно идентифицировать представителей семейства Оленевые. Изобретение может быть использовано для выявления фальсификата дериватов (кровь, рог, мясо и др.) оленей и подмены их другими продуктами животноводства (курица, КРС, свинья, лошадь, мелкий рогатый скот); в ходе проведения скрининга сырьевого

состава мясной продукции, для выявления состава сырья и БАД, а также для контроля на соответствие состава, декларированного производителем. Разработаны праймеры и разрушаемые зонды на основе данных видоспецифичных нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК животных. В качестве видоспецифичных участков нами используется фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COX 1). 1 пр.

(56) (продолжение):

vol.18, issue 22, 2009, pp. 4541-4550. A.K. Lockley, R.G. Bardsley, DNA-based methods for food authentication, Trends in Food Science & Technology, vol. 11, issue 2, February 2000, pp. 67-77.

R U 2 7 2 2 7 5 8 C 1

R U 2 7 2 2 7 5 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 722 758**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12Q 1/6806 (2020.02)

(21)(22) Application: **2018145639, 20.12.2018**

(24) Effective date for property rights:
20.12.2018

Registration date:
03.06.2020

Priority:

(22) Date of filing: **20.12.2018**

(45) Date of publication: **03.06.2020** Bull. № 16

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Kutsev Maksim Gennadevich (RU),
Skaptsov Mikhail Viktorovich (RU),
Uvarova Olga Vasilevna (RU),
Ivanova Mariya Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**

(54) SET OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES FOR DETECTING DNAs OF REPRESENTATIVES OF DEER FAMILY

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology, particularly to molecular genetics and genosystematics. Invention can be used to detect counterfeit derivatives (blood, horn, meat, and so forth) of deer and substitute them with other livestock products (chicken, cattle, pig, horse, small horned livestock); during meat components raw materials screening, for raw materials and biologically active substance detection, as well as for control over conformity of composition declared by the

manufacturer. Primers and destructible probes are developed on the basis of data of species-specific nucleotide sequences of mitochondrial DNA of animals. Species-specific areas are represented by a mitochondrial cytochrome oxidase 1 (COX 1) fragment.

EFFECT: use of a set of synthetic oligonucleotides enables reliably identifying representatives of the deer family.

1 cl, 1 ex

RU 2 722 758 C1

RU 2 722 758 C1

Изобретение относится к области молекулярной генетики, геносистематики. Использование набора синтетических олигонуклеотидов позволяет достоверно идентифицировать представителей семейства Оленевые. Изобретение может быть использовано для выявления фальсификата дериватов (кровь, рог, мясо и др.) оленей и подмены их другими продуктами животноводства (курица, КРС, свинья, лошадь, мелкий рогатый скот); в ходе проведения скрининга сырьевого состава мясной продукции, для выявления состава сырья и БАД, а также для контроля на соответствие состава декларированного производителем.

Среди большого количества методов генодиагностики с целью идентификации присутствия ДНК интересующего вида 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 фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COX 1) представителей семейства Оленевых. В качестве видоспецифичных участков нами используется фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (cytochrome oxidase subunit I (COX1) gene), обладающий большой копийностью в геноме (от ~100 до >1000 копий в одной клетке). Аналитические методы, основанные на анализе генов митохондриальной ДНК очень чувствительны, надежны и полезны для образцов низкого качества, таких как старые пятна крови, волосы животных, перья птицы и частицы костей из-за большого количества копий мтДНК в то время как методы, использующие ядерную ДНК, часто не применимы к сильно деградированным образцам. Другим преимуществом этих методов является то, что для определения видовой принадлежности исследуемого образца, даже если нет эталонного образца, может использоваться поиск с помощью алгоритма BLAST [Nakamura H., Muro T., Imamura S., Yuasa I. (2008) Forensic species identification based on size variation of mitochondrial DNA hypervariable regions. // International Journal of Legal Medicine, 123(2). 177-184].

Прототип - рассмотрим идентификацию некоторых видов оленей с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и капиллярного электрофореза на основе флуоресценции с использованием 4 видоспецифических праймеров, комплементарных участку D-петли митохондриальной ДНК, и цитохрома b в качестве внутреннего ПЦР-контроля. В прототипе используются специфичные наборы праймеров RED для благородного оленя (*Cervus elaphus*), NIP для пятнистого оленя (*Cervus nippon*), WAP для вапиту (*Cervus elaphus subspecies*), REIN для северного оленя (*Rangifer tarandus*)

для амплификации фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COX 1) участка мДНК [Eung Soo, K., Young Hwa, K., Byoung Seob, K., Seung Eun, O., Eui Jung, D., & Mi Young, L. (2012). Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and fluorescencebased capillary electrophoresis for identification of deer species from antlers. // African Journal of Biotechnology, 11(13)].

Принципиальные отличия прототипа от заявленного изобретения следующие: идентифицируются представители семейства Оленевые с нуклеотидными последовательностями специфичных праймеров, отличные от заявленных.

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления видовой принадлежности представителей семейства Оленевые, включающий проведение полимеразной цепной реакции фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COX 1) мДНК, где для идентификации представителей семейства Оленевые 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 животных, либо в результате самостоятельного определения нуклеотидной последовательности животных 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 животных участков.

3) Изготовление праймеров и зонда производится на автоматических синтезаторах.

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

Анализ нуклеотидного полиморфизма последовательности фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COX 1) 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 USA. 1991 August 15; 88(16): 7276-7280).

В качестве флуоресцентной метки используют, например, FAM, в качестве гасителя ВHQ1 (возможны другие комбинации флуорофоров и гасителей и это не является предметом охраны авторских прав). Возможно расположение гасителя на 5'-конце флуорофора на 3'-конце зонда. Возможно расположение гасителя на 3'-конце флуорофора на 5'-конце зонда.

Аналогичные наборы, реакционные смеси, праймеры для амплификации и выявления видовой принадлежности представителей семейства Оленевые не известны.

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

Пример:

1) Образец животной ткани 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 животного материала выделяется ДНК, которую в свою очередь используют для ПЦР.

5 2) Полимеразную цепную реакцию проводят на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, USA). Амплификация проводится по следующей программе: 1 цикл: 95°C - 3 мин.; 35 циклов: 95°C - 10 сек, 57°C - 15 сек (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 mM MgCl₂; по 1 мкл 10 mM каждого
10 праймера; 0,5 мкл зонда; 1,2 мкл 20 mM dNTPs; 0,2 мкл Taq-полимеразы. Результат амплификации определяют по нарастанию уровня флуоресценции.

Для выявления ДНК представителей семейства Оленевые (благородный олень (*Cervus elaphus*), пятнистый олень (*Cervus nippon*), северный олень (*Rangifer tarandus*), сибирский марал (*Cervus elaphus sibiricus*)) в качестве прямого праймера используется
15 последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: Cer-F 5'-AATGTTATCGTAACCGCACA-3', в качестве обратного праймера используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: Cer-R 5'-TTCGAGGGAATGCTATGTCT-3', в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: CerFAM FAM-5'-
20 TCCCСТААТААТТGGTGCCC-3'-BHQ.

Для выявления представителей семейства Оленевые производили выделение ДНК из крови благородного оленя (*Cervus elaphus*), пятнистого оленя (*Cervus nippon*), северного оленя (*Rangifer tarandus*), сибирского марала (*Cervus elaphus sibiricus*). В качестве отрицательного контроля использовали ДНК, выделенную из крови коровы (*Bos taurus*)
25 и свиньи (*Sus scrofa*), также в качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду. Амплификацию проводили для каждого образца ДНК в отдельной пробирке в соответствии с указанным выше программой ПЦР и составом реакционной смеси на амплификаторе CFX96. Результаты измерения уровня флуоресценции, отражающего протекание реакции ПЦР в реальном времени
30 визуализировали с помощью стандартного программного обеспечения CFX Manager Bio-Rad (Фиг. 1).

Наличие в образце ДНК представителей Оленевые определяли по превышению уровня флуоресценции реакционной смеси порогового уровня (Threshold). Пороговый уровень устанавливали в автоматическом режиме (15% от максимального уровня
35 флуоресценции). В результате проведенного анализа выявили накопление продукта амплификации для образцов ДНК, выделенной из благородного оленя (*Cervus elaphus*), пятнистого оленя (*Cervus nippon*), северного оленя (*Rangifer tarandus*), сибирского марала (*Cervus elaphus sibiricus*). Не наблюдали накопление продукта амплификации в пробирках с образцами ДНК, выделенной из крови коровы (*Bos taurus*), свиньи (*Sus scrofa*), а
40 также с отрицательным контролем - деионизированной водой.

Разработан новый набор синтетических олигонуклеотидов для выявления ДНК представителей семейства Оленевые методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Набор обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяющий быстро и достоверно провести идентификацию
45 рассмотренных представителей семейства Оленевые.

(57) Формула изобретения

Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления ДНК представителей

семейства Оленевые, используемый для проведения полимеразной цепной реакции фрагмента митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COX 1) мДНК, отличающийся тем, что для идентификации представителей семейства Оленевые используют видоспецифичные участки для создания прямого, обратного праймеров и разрушаемого зонда: для выявления ДНК представителей семейства Оленевые (благородный олень (Cervus elaphus), пятнистый олень (Cervus nippon), северный олень (Rangifer tarandus), сибирский марал (Cervus elaphus sibiricus))

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

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

в качестве разрушаемого зонда используется последовательность ДНК со следующим нуклеотидным составом: (флуоресцентная метка) -5'-TCCCСТААТААТТGGTGCCC-3'- (гаситель), при этом гаситель может располагаться и на 5'-конце, а флуоресцентная метка на 3'-конце разрушаемых зондов.

15

20

25

30

35

40

45