

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/6809 (2020.02); G01N 33/56933 (2020.02); G01N 2333/30 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019128896, 06.08.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.08.2019Дата регистрации:
21.09.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.08.2019

(45) Опубликовано: 21.09.2020 Бюл. № 27

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, НИИ
эпидемиологии и микробиологии имени
Пастера, Вагановой А.Н.

(72) Автор(ы):

Ваганова Анастасия Николаевна (RU),
Борисенко Сергей Владимирович (RU),
Вербов Вячеслав Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им.
Пастера Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека" (ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии имени
Пастера) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2663453 C1, 06.08.2018. RU
2646123 C1, 01.03.2018. US 5691149 A1,
25.11.1997. КОЗЛОВА А.Д. и др.
"Дифференциация *Mycoplasma bovis*,
Mycoplasma bovigenitalium, *Mycoplasma*
californicum и выявление *Ureaplasma diversum*
методом ПЦР в реальном времени".
Сельскохозяйственная биология, май 2019, том
54, no.2, с.378-385, DOI: (см. прод.)(54) Система олигонуклеотидных праймеров и зонда для выявления ДНК *Mycoplasma bovigenitalium*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области микробиологии, биотехнологии и ветеринарии. Предложена система олигонуклеотидных праймеров и зонда для идентификации ДНК *Mycoplasma bovigenitalium* в биологическом материале от крупного рогатого скота, сырье для биологической промышленности и питательных средах для работы с культурами клеток методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Пара олигонуклеотидных праймеров имеет структуру:

M.bgen2 F 5'-TTGTTGCGCACCTTGGATCT-3'

M.bgen2 R 5'-GGTCGATTCCACCAGCTCTA-3'

Флуоресцентно меченный зонд для идентификации ампликонов, синтезирующихся на матрице ДНК *Mycoplasma bovigenitalium* в ходе реакции ПЦР в реальном времени, имеет структуру:

M.bgen2 Pr 5'-FAM CСATCАTATGAGCTGAATCCTACTGT BHQ1-3'

Изобретение позволяет дифференцировать *Mycoplasma bovigenitalium* от близкородственных микоплазм вида *Mycoplasma bovis* и может быть

использовано для выявления носительства *Mycoplasma bovis* у крупного рогатого скота, контроля качества сырья для

биотехнологической промышленности и культуральных питательных сред для исследовательской работы. 3 пр., 2 ил.

(56) (продолжение):

10.15389/agrobiology.2019.2.378rus. LYSNYANSKY I. et al. "Identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel." *Veterinary Record*, 2009, v.165(11), p.319-322. doi:10.1136/vr.165.11.319.

R U 2 7 3 2 6 2 6 9 2 6 2 6 C 1

R U 2 7 3 2 6 2 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6809 (2018.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12R 1/35 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/6809 (2020.02); G01N 33/56933 (2020.02); G01N 2333/30 (2020.02)(21)(22) Application: **2019128896, 06.08.2019**(24) Effective date for property rights:
06.08.2019Registration date:
21.09.2020

Priority:

(22) Date of filing: **06.08.2019**(45) Date of publication: **21.09.2020** Bull. № 27

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, ul. Mira, 14, NII
epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera,
Vaganovoj A.N.**

(72) Inventor(s):

**Vaganova Anastasiya Nikolaevna (RU),
Borisenko Sergej Vladimirovich (RU),
Verbov Vyacheslav Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij
institut epidemiologii i mikrobiologii im. Pastera
Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity
prav potrebitel'j i blagopoluchiya cheloveka"
(FBUN NII epidemiologii i mikrobiologii imeni
Pastera) (RU)**(54) **SYSTEM OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS AND PROBE FOR DETECTING DNA MYCOPLASMA BOVIGENITALIUM**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; veterinary science.

SUBSTANCE: invention relates to microbiology, biotechnology and veterinary science. Disclosed is a system of oligonucleotide primers and a probe for identifying *Mycoplasma bovis* DNA in biological material from cattle, raw material for biological industry and nutrient mediums for operation with cell cultures by polymerase chain reaction in real time. Pair of oligonucleotide primers has structure: M.bgen2 F 5'-TTGTTGCGCACCTTGGATCT-3' M.bgen2 R 5'-GGTCGATTCCACCAGCTCTA-3'. Fluorescent labeled probe for identification of

amplicons synthesized on the *Mycoplasma bovis* DNA matrix during the PCR reaction in real time has the following structure: M.bgen2 Pr 5'-FAM CCATCATATGAGCTGAATCCTACTGT BHQ1-3'.

EFFECT: invention enables to differentiate *Mycoplasma bovis* from closely related *Mycoplasma bovis* mycoplasmas and can be used to detect carrier *Mycoplasma bovis* in cattle, quality control of raw material for biotechnological industry and culture nutrient media for research work.

1 cl, 3 ex, 2 dwg

Изобретение относится к области микробиологии, биотехнологии и ветеринарии, и может быть использовано для диагностики заболеваний животных вирусной, бактериальной и др. этиологии, а также выявления носительства *Mycoplasma bovis* у крупного рогатого скота, контроля качества сырья для биотехнологической промышленности и культуральных питательных сред для исследовательской работы.

В состав предлагаемой системы, позволяющей выявлять ДНК *Mycoplasma bovis* входит пара олигонуклеотидных праймеров, комплементарных видоспецифичному участку в составе гена ацетат-киназы *ackA* *Mycoplasma bovis*, и обладающих активностью прямого и обратного праймера и имеющих структуру

M.bgen2 F 5'-TTGTTGCGCACCTTGGATCT-3'

M.bgen2 R 5'-GGTCGATTCACACCAGCTCTA-3'

M.bgen2 Pr 5'-FAM CCATCATATGAGCTGAATCCTACTGT BHQ1-3'

и флуоресцентно меченный гидролизный зонд для оценки накопления ампликонов на матрице ДНК *Mycoplasma bovis* в ходе реакции ПЦР в реальном времени, комплементарный видоспецифичному участку в составе гена ацета-киназы *ackA* *Mycoplasma bovis*, расположенному в составе последовательности, фланкируемой вышеуказанными праймерами и имеющий структуру

M.bgen2 Pr 5'-FAM CCATCATATGAGCTGAATCCTACTGT BHQ1-3'

Использование праймеров позволяет выявлять ДНК *M. bovis* в биологическом материале от крупного рогатого скота и дифференцировать микоплазмы данного вида от филогенетически близкородственных микоплазм *M. bovis*.

Изобретение может быть использовано в ветеринарии для выявления генетического материала одного из возбудителей микоплазмозов крупного рогатого скота - *M. bovis*, в целях диагностики ассоциированных с ним инфекционных заболеваний и выявления случаев бессимптомного носительства, также разработанная тест-система может применяться для научных исследований.

Изобретение может применяться в биотехнологии для контроля контаминации сырья животного происхождения и его производных на предмет контаминации микоплазмами вида *M. bovis*.

M. bovis является этиологическим агентом при маститах, пневмониях, артритах и кератоконъюнктивитах у крупного рогатого скота. Также микоплазмы данного вида часто колонизируют репродуктивный тракт животных, и могут быть связаны с различными заболеваниями репродуктивных органов, абортами и яловостью. Инфекции репродуктивной системы коров часто протекают бессимптомно или сопровождаются развитием вульвовагинита. Патоген также выделяется у коров из влагалища и цервикального канала при неэффективном осеменении (Hillman R., 2008).

При колонизации *M. bovis* репродуктивной системы коров возможно дальнейшее распространение патогена с выделениями из влагалища животного, при этом микоплазмы часто попадают на поверхность вымени, что приводит к развитию мастита.

M. bovis чаще, чем микоплазмы других видов, выявляется при инфекционных заболеваниях репродуктивной системы быков. Как правило поражаются дистальные отделы репродуктивного тракта. В то же время персистенция *M. bovis* в репродуктивной системе быков может протекать бессимптомно, при этом носительство выявляется у 9-63% быков в разных странах. При распространении инфекции возможно

развитие эпидидимита и тестикулита, что сказывается на качестве спермы, выражающемся, прежде всего, в изменении морфологии сперматозоидов и снижении их подвижности (Kirkbride С.А., 1987).

5 Заражение *M. bovis genitalium* может происходить половым, контактным и воздушно-капельным путем. Специфических мер по профилактике заболеваний, ассоциированных с данным патогеном в настоящее время не разработано, что определяет важность своевременного выявления случаев инфекции и носительства среди поголовья крупного рогатого скота.

10 Также *M. bovis genitalium* может присутствовать в сыворотке клинически здорового крупного рогатого скота и выступать в качестве контаминанта сырья биологического происхождения для биологической промышленности.

15 *M. bovis genitalium* является ауксотрофным микроорганизмом, поэтому для ее культивирования необходимы питательные среды, обогащенные различными веществами. Для осуществления энергетического метаболизма данных микоплазм в среде должны присутствовать спирты и жирные кислоты. Потребность в жирных кислотах или спиртах также характерна для микоплазм вида *M. bovis*. Данные бактерии, как и *M. bovis genitalium* являются возбудителями заболеваний крупного рогатого скота. *M. bovis* и *M. bovis genitalium* обладают высоким уровнем сходства, при этом заболевания, вызываемые *M. bovis* часто характеризуются более тяжелым течением. Также тяжелое 20 течение заболевания может быть связано со смешанными инфекциями, вызываемыми двумя указанными видами микоплазм. Таким образом, целесообразно проводить дифференциальную диагностику инфекций, вызванных микоплазмами этих видов, а также случаев микст-инфекции.

25 Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) обеспечивает выявление ДНК *M. bovis genitalium* с большей точностью, чем культуральные методы выявления данного патогена (Justice-Allen А., 2011). В основе указанного метода лежит процесс специфического матричного синтеза цепей ДНК, ведущий к многократному копированию фрагментов целевой ДНК при ее наличии в материале. Процесс матричного синтеза осуществляется находящимся в составе реакционной смеси 30 ферментом ДНК-полимеразой.

Отличительной чертой модификации ПЦР, известной как ПЦР в реальном времени, является возможность оценки течения реакции в ходе ее прохождения. В данном случае оценка проводится путем измерения накопления флуоресценции испускаемой флуоресцеином (FAM), связанным с зондом в составе системы. Необходимым условием 35 для испускания флуоресценции флуоресцеином является разрушение зонда, происходящее при его связывании с комплементарной последовательностью в присутствии фермента ДНК-полимеразы, приводящее к пространственному разобщению флуоресцеина со связанными с теми же зондами молекулами ВНQ-1. При этом активность расщепления зондов и освобождения флуорохромов находится в прямой зависимости от содержания 40 целевых ампликонов в реакционной смеси.

Обеспечение специфичности реакции амплификации ДНК определяется подбором праймеров к целевым последовательностям ДНК, распознающим уникальные, присущие только им нуклеотидные структуры. Копирование ДНК возможно только при связывании праймера с одноцепочечной ДНК, при этом процесс начинается 45 исключительно на 5' конце праймера. Праймеры являются обязательными компонентами реакционной смеси. По своей химической структуре они являются олигонуклеотидами, комплементарными высококонсервативным и высокоспецифичным последовательностям в составе целевой ДНК. В тест-системах для диагностики

инфекционных заболеваний целевой ДНК является ДНК соответствующего патогена.

Олигонуклеотидные зонды в составе реакционной смеси обеспечивают возможность детекции накопления продукта ПЦР в режиме реального времени. Возможность детекции продукта ПЦР достигается за счет освобождения флуорохромов при разрушении зондов в присутствии специфических ампликонов. Повышение специфичности определяется тем, что зонды не вступают во взаимодействие с другими последовательностями ДНК в исследуемом материале.

Таким образом, выбор фрагмента для подбора системы праймеров и зонда является определяющим для специфичности ПЦР тест-системы для диагностики инфекционных заболеваний. Данный фрагмент должен быть последовательностью в составе генома патогена, на выявление которого направлена тест-система, обладающей консервативной структурой высокоспецифичной именно для данного патогена и непредатавленной в геноме других организмов.

Наиболее близким аналогом представленной системы праймеров и зонда для выявления ДНК *M. bovis genitalium* являются специфические системы олигонуклеотидных праймеров и зондов, направленные на выявление в исследуемом материале последовательностей межгенного спейсера 16S-23S рРНК (Boonyayatra S., 2012; Parker A.M., 2017). Сконструированные системы праймеров и зондов авторы использовали в ПЦР в реальном времени для идентификации *M. bovis genitalium*. Их применение позволяло проводить идентификацию *M. bovis genitalium* в клиническом материале от крупного рогатого скота, а также дифференцировать *M. bovis genitalium* от других микоплазм, вызывающих заболевания у крупного рогатого скота. Отличием предлагаемой системы праймеров и зондов от описанных является выбор видоспецифической мишени, а именно участка в составе гена ацетат-киназы *askA*.

Целью настоящего изобретения является разработка системы, включающей олигонуклеотидные праймеры и зонд для идентификации *M. bovis genitalium* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Цель достигается конструированием системы специфичных праймеров и зонда для идентификации ДНК одного из возбудителей микоплазмозов крупного рогатого скота *M. bovis genitalium*, имеющих следующую структуру:

M.bgen2 F 5'-TTGTTGCGCACCTTGGATCT-3'

M.bgen2 R 5'-GGTCGATTCCACCAGCTCTA-3'

M.bgen2 Pr 5'-FAM CCAATCATATGAGCTGAATCCTACTGT BHQ1-3'

Характеристика олигонуклеотидных праймеров и участка амплифицируемой ДНК.

На основе анализа геномной последовательности *M. bovis genitalium*, представленной в международной базе данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), были подобраны праймеры, обозначенные M.bgen2 F и M.bgen2 R, комплементарные фрагменту гена, продуктом которого является ацетат-киназа, *askA* *M. bovis genitalium* и обладающие активностью прямого и обратного праймера. Также был подобран олигонуклеотидный зонд M.bgen2 P, комплементарный участку последовательности генома *M. bovis genitalium*, находящейся между участками, распознаваемыми праймерами M.bgen2 F и M.bgen2 R.

В ходе экспериментов по разработке и апробации тест-системы в качестве положительного контроля использовали образцы клинического материала от крупного рогатого скота. Материал был отобран при обследовании животных на животноводческих предприятиях, где были выявлены случаи бронхопневмонии телят и маститов с симптоматикой, характерной для инфекций, ассоциированных с *M. bovis*,

M. bovis genitalium и другими микоплазмами. Из исследуемого материала была выделена ДНК, в экспериментах использовались полученные препараты очищенной ДНК.

Примеры конкретного выполнения.

Пример 1. Методика конструирования системы олигонуклеотидных праймеров и зонда для идентификации ДНК возбудителя микоплазмоза крупного рогатого скота *M. bovis genitalium* с помощью ПЦР в реальном времени

На основании изучения полногеномной последовательности возбудителя микоплазмозов крупного рогатого скота *M. bovis genitalium*, представленных в международной базе данных Genbank, для конструирования праймеров, была выбрана последовательность гена ацетат-киназы *ackA*, пригодная для идентификации *M. bovis genitalium*. Размер данного гена составляет 1359 п.н. (GenBank NCBI AP017902.1). В составе выбранной генетической структуры был определен участок ДНК, имеющий нуклеотидные отличия от геномных последовательностей других микоплазм, вызывающих заболевания крупного рогатого скота и иных микроорганизмов. Расчетная длина фрагмента ДНК, амплификация которого возможна с использованием подобранных праймеров, составила 126 п.н.. В составе данного фрагмента была подобрана специфическая для *M. bovis genitalium* последовательность для создания олигонуклеотидного зонда. В качестве компонентов олигонуклеотидного зонда, обеспечивающих детекцию амплификации ДНК были выбраны молекулы флуоресцеина (FAM) и ВНQ-1. В данном случае фотоны, испускаемый флуоресцеином при возбуждении, и имеющие длину волны около 518 нм, полностью поглощаются гасителем ВНQ-1.

Оценка гомологии распознаваемого с помощью предложенных праймеров участка со сходными последовательностями в геномах других организмов была проведена *in silico* путем сравнения указанного участка с генетическими структурами, депонированными в международной базе данных GenBank. Сравнение осуществлялось с помощью алгоритма BLASTN на web-сервере Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). На момент проведения анализа *in silico* гомологии подобранной последовательности с последовательностями ДНК других организмов выявлено не было.

Пример 2. Амплификация специфических фрагментов ДНК *M. bovis genitalium* с детекцией накопления специфического фрагмента ДНК методом ПЦР в реальном времени.

Для проведения ПЦР в реальном времени с использованием разработанной системы праймеров и зондов были приготовлены реакционные смеси, включавшие по 10 пмоль каждого из компонентов системы для идентификации возбудителя микоплазмозов крупного рогатого скота *M. bovis genitalium*, а также другие компоненты, необходимые для проведения реакции данного типа.

Общий объем реакционной смеси 25 мкл на 1 пробу. Для его приготовления в пробирке смешивали следующие компоненты:

Готовая смесь для ПЦР марки qPCRmix-HS (ООО "Евроген", Москва) - 5 мкл
 Праймер *M.bgen2 F* (10 пМ/мкл) - 1 мкл
 Праймер *M.bgen2 R* (10 пМ/мкл) - 1 мкл
 Зонд *M.bgen2 Pr* (10 пМ/ мкл) - 1 мкл
 вода деионизированная - 15 мкл
 исследуемая проба ДНК - 2 мкл.

Для проведения ПЦР в реальном времени с помощью программного обеспечения амплификатора «CFX96» (Bio-Rad, США) был задан температурный режим, включавший

этап предварительной денатурации ДНК при 94°C - 5 мин, затем в течение 50 циклов - денатурация ДНК при 94°C - 15 сек; отжиг праймеров при 60°C - 30 сек; элонгация цепи при 70°C - 30 сек. Оценка уровня флуоресценции в пробе проводилась в конце каждого цикла. При наличии в пробе ДНК *M. bovis genitalium* отмечался рост флуоресценции в ходе прохождения реакции, что отражено на графике, построенном на основании данных о накоплении флуоресценции, собранных и обработанных программой CFX-Manager (Bio-Rad, США), (фиг. 1). 15 кривых на графике, выходящих на плато при значениях RFU (относительные единицы флуоресценции) по оси у, составляющих 350-770 отражают процесс накопления флуоресцентного сигнала при постановке ПЦР с образцами, содержащими ДНК *Mycoplasma bovis genitalium*. Линии, проходящие в области не выше 40 по шкале у отражают отсутствие накопления флуоресцентного сигнала при постановке ПЦР с образцами, не содержащими ДНК *Mycoplasma bovis genitalium*.

Пример 3. Оценка аналитической специфичности реакции амплификации с помощью разработанных олигонуклеотидных праймеров для выявления ДНК возбудителя микоплазма крупного рогатого скота *M. bovis genitalium*.

Для определения аналитической специфичности проводилась постановка ПЦР в реальном времени с ДНК, выделенной из клинических образцов, полученных от крупного рогатого скота, в которых было установлено присутствие близкородственных патогенов крупного рогатого скота *M. bovis* и *Ureaplasma diversum*, а также с образцами ДНК, выделенной из культур патогенных для человека микоплазм *M. hominis*, *U. parvum* и *U. urealyticum*.

Постановку реакции ПЦР осуществляли, в соответствии с методикой, описанной в примере 2. При постановке ПЦР с материалом, содержащим ДНК вышеуказанных патогенных микоплазм, накопления продукта не отмечалось (фиг. 2). Кривая, выходящая на плато при значениях RFU (относительные единицы флуоресценции) по оси у, составляющих >250 отражает процесс накопления флуоресцентного сигнала при постановке ПЦР с образцом, содержащими ДНК *Mycoplasma bovis genitalium*. Пять кривых, отражающих отсутствие накопления флуоресцентного сигнала при постановке ПЦР с образцами, не содержащими ДНК *Mycoplasma bovis*, содержащими ДНК *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* не пересекают порогового значения 30 RFU, отмеченного прямой чертой.

Предложенная система праймеров и зонда пригодна для использования для идентификации *M. bovis genitalium*, они позволяют дифференцировать его от филогенетически близкого вида *M. bovis* и определить присутствие ДНК *M. bovis genitalium* в течение 3-4 часов в биологическом материале от животных, и отличается от существующих аналогов использованием в качестве генетической мишени участка в составе гена ацетат-киназы *ackA*.

(57) Формула изобретения

Система олигонуклеотидных праймеров и зонда для идентификации ДНК *Mycoplasma bovis genitalium* в биологическом материале от крупного рогатого скота, сырье для биологической промышленности и питательных средах для работы с культурами клеток методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, отличающаяся тем, что в ее состав входят праймеры и зонд, комплементарные фрагменту гена ацетат-киназы *ackA* *Mycoplasma bovis genitalium*, имеющие следующую структуру:

M.bgen2 F 5'-TTGTTGCGCACCTTGGATCT-3'

M.bgen2 R 5'-GGTCGATTCCACCAGCTCTA-3'

5 M.bgen2 Pr 5'-FAM CCATCATATGAGCTGAATCCTACTGT BHQ1-3',

10

15

20

25

30

35

40

45

```

<SequenceData sequenceIDNumber="1">
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Forward primer M.bgen2 F</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq>

```

```

</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>
ttgttgccacaccttgatct
</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic_construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>

```

```

<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Reverse primer M.bgen2 R</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>
  ggctcgattccaccagctcta
</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_molType>DNA</INSDSeq_molType>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

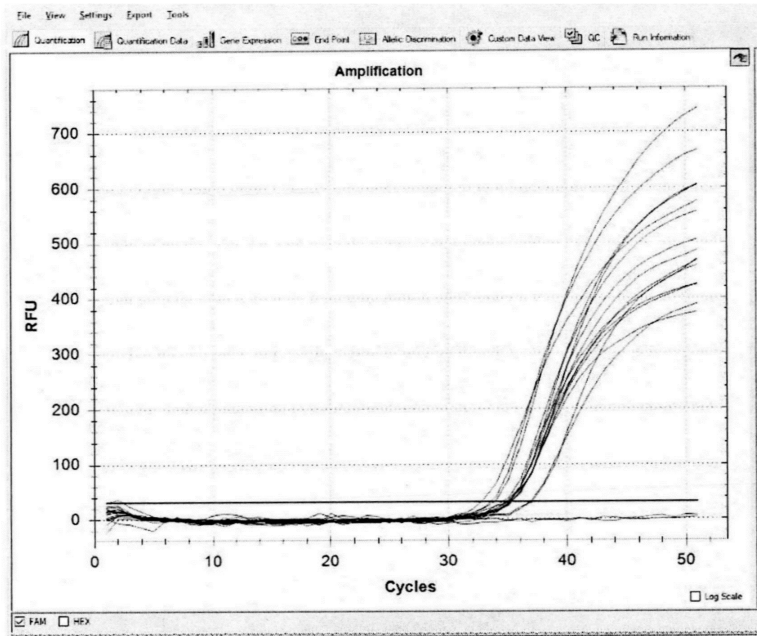
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Probe M.bgen2 Pr</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>fluorescein-linked cysteine</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>

```

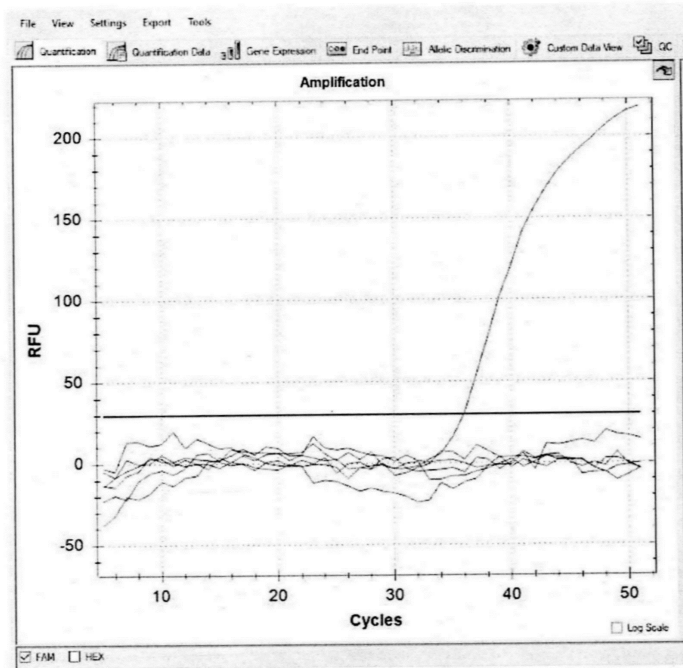
```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>modified_base</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>26</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mod_base</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>OTHER</INSDQualifier_value>
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Black hole 1 (BHQ1)-linked thymine</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>
ccatcatatgagctgaatcctactgt
</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>

```



Фиг. 1



Фиг. 2