



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/68 (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2018118282, 17.05.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.05.2018

Дата регистрации:
03.09.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.05.2018

(45) Опубликовано: 03.09.2019 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7, ФКУЗ
Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора

(72) Автор(ы):

Леденева Маргарита Леонтьевна (RU),
Ткаченко Галина Александровна (RU),
Батулин Артём Александрович (RU),
Шпак Иван Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное казенное учреждение
здравоохранения "Волгоградский
научно-исследовательский противочумный
институт" Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO2011146756 A1, 24.11.2011.
AU2013262783 B2, 29.03.2018. САВЧЕНКО С.С.
Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei*
и *Burkholderia pseudomallei*. Автореферат
диссертации. ВАК РФ 03.00.07,
Микробиология. ВОЛГОГРАД - 2008.
RU2545710 C2, 10.04.2015.

(54) НАБОР ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ И ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОГО ЗОНДА
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА BURKHOLDERIA MALLEI И МЕЛИОИДОЗА
BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АМПЛИФИКАЦИИ
(NASBA) В РЕЖИМЕ "РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ"

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и молекулярной биологии. Предложен набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации РНК возбудителей сапа *Burkholderia mallei* и мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* на основе транскрипционной амплификации NASBA в режиме реального

времени. Изобретение может быть использовано для выявления РНК возбудителей сапа *Burkholderia mallei* и мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* в пробах чистых культур, биологическом материале и объектах окружающей среды для нужд здравоохранения, службы Роспотребнадзора и в научных исследованиях. 1 ил., 1 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12Q 1/68 (2013.01)

(21)(22) Application: **2018118282, 17.05.2018**

(24) Effective date for property rights:
17.05.2018

Registration date:
03.09.2019

Priority:

(22) Date of filing: **17.05.2018**

(45) Date of publication: **03.09.2019** Bull. № 25

Mail address:

**400131, g. Volgograd, ul. Golubinskaya, 7, FKUZ
Volgogradskij nauchno-issledovatel'skij
protivochumnyj institut Rospotrebnadzora**

(72) Inventor(s):

**Ledeneva Margarita Leontevna (RU),
Tkachenko Galina Aleksandrovna (RU),
Baturin Artem Aleksandrovich (RU),
Shpak Ivan Mikhaĭlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe kazennoe uchrezhdenie
zdravookhraneniya "Volgogradskij
nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj
institut" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere
zashchity prav potrebitelej i blagopoluchiya
cheloveka (RU)**

(54) **SET OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS AND A FLUORESCENT-LABELED PROBE FOR IDENTIFYING RNAS OF BURKHOLDERIA MALLEI SAP EXCRETION AND BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI MELIOIDOSIS BASED ON TRANSCRIPTION AMPLIFICATION (NASBA) IN REAL TIME MODE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and molecular biology. Disclosed is a set of oligonucleotide primers and a fluorescent-labeled probe for identifying RNA of Burkholderia mallei sap excretion agents and Burkholderia pseudomallei melioidosis based on NASBA transcription amplification in real time.

EFFECT: invention can be used for detection of RNA exciter of Burkholderia mallei sap and Burkholderia pseudomallei melioidosis in samples of pure cultures, biological material and environmental objects for health needs, service of Rospotrebnadzor and in scientific research.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl, 3 ex

Изобретение относится к области биотехнологии, молекулярной биологии и может быть использовано для выявления РНК возбудителей сапа *Burkholderia mallei* и мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* в пробах чистых культур, биологическом материале и объектах окружающей среды специалистами учреждений как практического здравоохранения, службы Роспотребнадзора, так и в научных исследованиях.

В связи с развитием транспортного сообщения между странами, расширением туристических направлений, а также значительными миграционными потоками населения возникает настороженность в отношении завоза на территорию РФ новых или «забытых» для страны патогенов, к числу которых относятся возбудители сапа и мелиоидоза. Рост числа подтвержденных случаев заболевания мелиоидозом отмечается не только в эндемичных по данной инфекции регионах Юго-Восточной Азии и Северной Австралии, но и в ряде стран Европы, Северной и Латинской Америки. Заболеваемость людей сапом отмечается редко, в основном носит профессиональный характер, но в ряде стран, в том числе сопредельных с РФ (Монголия, Турция, Иран и др.) продолжают регистрировать вспышки заболевания у животных. Не исключена возможность использования данных возбудителей, которые относятся к микроорганизмам I-II групп патогенности, в качестве потенциальных агентов биотерроризма. Многообразие клинических проявлений сапа и мелиоидоза существенно затрудняют диагностику и своевременное назначение этиотропной терапии этих опасных заболеваний.

Совокупность данных факторов определяет необходимость исследований, направленных на совершенствование лабораторных методов выявления патогенных буркхольдерий.

В настоящее время среди молекулярно-генетических способов диагностики различных инфекций все более широкое применение находят методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, что обусловлено их способностью выявлять генетический материал микроорганизма в концентрации меньшей нижнего предела детекции полимеразной цепной реакции (ПЦР). К числу таких методов относится основанная на транскрипции амплификация нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification). Высокая чувствительность метода достигается использованием в качестве целевой мишени молекул матричной РНК (мРНК) или рибосомальной РНК (рРНК) микроорганизмов, количество которых может достигать нескольких десятков тысяч на одну бактериальную клетку. В ПЦР используемые в качестве мишени даже многокопийные участки ДНК не превышают двух десятков на бактериальную клетку. Поэтому, с помощью метода NASBA можно детектировать возбудителей и в тех случаях, когда их количество очень мало и недостаточно для выявления методом ПЦР. Это особенно актуально при латентном течении инфекции, на фоне отсутствия клинических признаков заболевания. Другим важным свойством РНК в качестве мишени амплификации является ее меньшая стабильность по сравнению с молекулой ДНК, что определяет возможность использования метода NASBA для контроля эффективности проведенной терапии.

В основе метода транскрипционной амплификации NASBA лежит обнаружение фрагмента РНК в изотермических условиях (при температуре 41°C) с помощью двух специфических праймеров и совместной ферментативной активности трех ферментов: обратной транскриптазы вируса миелобластоза птиц {avian myeloblastosis virus reverse transcriptase - AMV RT), РНКазы *Н Escherichia coli* и РНК-полимеразы фага T7. При этом происходит экспоненциальное накопление одноцепочечной РНК, которая является удобной мишенью для гибридных методов детекции. Использование флуоресцентно-меченых зондов позволяет регистрировать специфический продукт амплификации непосредственно в процессе реакции в режиме «реального времени»,

что существенно сокращает время анализа, снижает риск контаминации и увеличивает специфичность метода.

Технология транскрипционной амплификации NASBA в режиме «реального времени» была применена для выявления возбудителей особо опасных инфекций, таких как *Vibrio cholerae* [Fykse E.M., Skogan G., Davies W., et al. (2007) Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5), 1457-1466] и ряда РНК-содержащих вирусов - высоковирулентного штамма вируса гриппа АН5N1, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), коронавируса SARS, вируса энцефалита Сент-Луис, вируса гепатита С, вируса бешенства, а также вирусов лихорадок Денге, Западного Нила и Чикунгунья [Sidoti F., Bergallo M., Costa C, Cavallo R. (2013) Alternative molecular tests for virological diagnosis. *Mol. Biotechnol.* 53(3), 352-362]. Однако диагностические реагенты на основе реакции транскрипционной амплификации NASBA для выявления *V. mallei* и *V. pseudomallei* не разработаны.

Наиболее близким аналогом являются панбактериальные праймеры и зонд, сконструированные на основе нуклеотидной последовательности гена 23 S рибосомальной РНК и предназначенные для выявления целевого фрагмента нуклеиновой кислоты бактерий методом NASBA в режиме «реального времени» с целью мониторинга микробиологического качества рециркулируемой воды на борту международной космической станции [Bechy-Loizeau A.L., Flandrois J.P., Abaibou H. (2015) Assessment of polycarbonate filter in a molecular analytical system for the microbiological quality monitoring of recycled waters onboard ISS. *Life Sci. Space. Res. (Amst).* 6, 29-35].

Однако отсутствие определения видовой специфичности бактерий с помощью олигонуклеотидов, используемых в вышеприведенном прототипе, исключает возможность их использования для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза.

Целью настоящего изобретения является разработка набора высокоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации *V. mallei* и *V. pseudomallei* методом транскрипционной амплификации NASBA в режиме «реального времени».

Цель достигается созданием набора олигонуклеотидов для идентификации РНК возбудителей сапа и мелиоидоза, содержащего пару высокоспецифичных олигонуклеотидных полимеров к целевой последовательности гена 23 S рРНК, обладающих активностью прямого и обратного праймеров в реакции транскрипционной амплификации NASBA, и флуоресцентно-меченый зонд с комплементарными концевыми последовательностями по типу «молекулярного маяка», обеспечивающего детекцию продуктов реакции в режиме «реального времени», имеющих следующую структуру:

5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACG GCT AAC AAT ACA AAT AAA GAG TA-3' - Burk23SrRNA-T7-P1

5'-CCT TTT GGG TCA TCC TAG A-3' - Burk23SrRNA-P2

5'(FAM)-CCA CAC ATA GGT CTA GTG AGG CGT GTG G-(RTQ-1)3' - Burk23SrRNA-MM

где FAM - карбоксифлуоресцеин, флуоресцентный краситель, длина волны поглощения которого составляет 490 нм, а длина волны флуоресценции - 520 нм. RTQ-1 - гаситель флуоресценции с диапазоном гашения 470-570 нм.

Характеристика олигонуклеотидных праймеров, зонда и РНК-мишени для гибридизации.

Основываясь на данных, представленных в международной базе GenBank Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), подобраны праймеры, обозначенные Burk23SrRNA-T7-P

1/Burk23SrRNA-P2, комплементарные участку гена 23S рРНК и обеспечивающие в реакции NASBA амплификацию специфичного фрагмента рибонуклеиновой кислоты размером 159 п.н.

5 Для детекции продуктов амплификации NASBA в режиме «реального времени» сконструирован зонд формата «молекулярный маяк», обозначенный Burk23SrRNA-MM, на разных концах которого расположены флуорофор и гаситель флуоресценции. Подобная структура зонда обеспечивает максимальный эффект тушения и низкую фоновую флуоресценцию, поскольку молекулы флуорофора и гасителя сближены в пространстве.

10 Апробация разработанного набора олигонуклеотидов была осуществлена на наборе штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. В качестве положительного контроля в экспериментах использовали референтные штаммы *V. mallei* 10230 и *V. pseudomallei* C-141. Выделение РНК проводили из обеззараженных

15 бактериальных суспензий микроорганизмов в концентрациях от 1×10^9 м.к./мл до 1×10^0 м.к./мл. Специфичность амплификации дополнительно подтверждали секвенированием.

Оптимизацию условий реакции NASBA в режиме «реального времени» проводили с использованием коммерчески доступных реагентов, ферментов и приборов, предназначенных для массового использования в лабораторной практике, что позволяет

20 осуществлять быстрое и надежное применение данного изобретения в медицинских и научно-исследовательских лабораториях.

Примеры конкретного выполнения.

Пример 1. Методика конструирования олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого гибридизационного зонда для идентификации РНК

25 возбудителей сапа и мелиоидоза методом NASBA в режиме «реального времени».

На основе изучения *in silico* структуры рибосомального кластера генов (16SpРНК, 23SpРНК, 5S рРНК) в составе секвенированных нуклеотидных последовательностей возбудителей сапа и мелиоидоза, представленных в генетической базе данных GenBank NCBI, для конструирования праймеров и зонда был выбран ген 23S рРНК (GeneID:

30 3112968 (BPSLr08)) (таб. 1).

Для синтеза целевого фрагмента 23 S рРНК методом транскрипционной амплификации NASBA подобрана пара праймеров Burk23SrRNA-T7-P1 и Burk23SrRNA-P2, длина нуклеотидной последовательности которых составила 53 и 19 нуклеотидов, соответственно. GC-содержание гибридизующихся частей праймеров с мишенью

35 составило 32% для праймера Burk23SrRNA-T7-P1 и 47,4% для праймера Burk23SrRNA-P2. При конструировании праймера Burk23SrRNA-T7-P1 для формирования функционального промотора T7 РНК-полимеразы к 5'-концевому участку добавлена последовательность длиной 25 нуклеотидов. Между промоторной зоной праймера Burk23SrRNA-T7-P1 и его участком, гибридизующимся с мишенью, дополнительно

40 добавлены три пуриновых нуклеотида с целью улучшения амплификации. Расчетный размер фрагмента гена 23S рРНК, фланкируемого предлагаемыми праймерами, - 159 п.н.

Для детекции продуктов реакции NASBA в режиме «реального времени» сконструирован зонд Burk23SrRNA-MM в формате «молекулярный маяк», потенциально

45 способный гибридизоваться с амплифицированными 23 S рРНК-мишенями возбудителей сапа и мелиоидоза с образованием стабильных гибридов при температуре 41°C. Флуоресцентное мечение зонда осуществляли комбинацией красителя FAM на 5'-конце и гасителя RTQ-1 на 3'-конце. Сконструированный флуоресцентно-меченый зонд

представлял собой стебель-петля-структурированный олигонуклеотид и имел в регионе стебля 6 взаимнокомплементарных нуклеотидов, при этом размер петли составил 16 нуклеотидов. Вторичную структуру и термодинамические параметры разработанного зонда оценивали в онлайн-режиме с использованием сервера Mfold Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu>).

Предварительно специфичность разработанных праймеров и зонда оценивали *in silico* методом множественного сравнения последовательностей с помощью ресурса BLAST NCBI для установления гомологии между ними и нуклеотидными последовательностями близкородственных видов рода *Burkholderia* и гетерологичных микроорганизмов. На момент проведения компьютерного анализа гомологии выявлено не было.

Пример 2. Амплификация и детекция специфических фрагментов 23S рРНК с помощью разработанного набора праймеров Burk23SrRNA-T7-P1/Burk23SrRNA-P2 и флуоресцентно-меченого зонда Burk23SrRNA-MM для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза методом NASBA в режиме «реального времени».

Для проведения NASBA в режиме «реального времени» с разработанными праймерами Burk23SrRNA-T7-P1/Burk23SrRNA-P2 и олигонуклеотидным зондом Burk23SrRNA-MM необходимо отдельно приготовить раствор ферментов и реакционную смесь, содержащую все остальные компоненты реакции.

Реакционная смесь объемом 12.3 мкл (из расчета на одну пробу) включала следующие компоненты: 40 mM Tris-HCl (pH=8,5), 1 mM каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов («Fermentas», США), 2 mM каждого из рибонуклеозидтрифосфатов («Fermentas», США), 12 mM MgCb («Dialat Ltd», Россия), 87 mM KCl («Sigma-ALDRICH», Германия), 0.5 mM DTT («Fermentas», США), 15% ДМСО («AppHCБет», Германия), 0.125 мкМ прямого и обратного праймеров и 0.0625 мкМ флуоресцентно-меченого зонда. Полученную реакционную смесь выдерживали при температуре 65°C в течение 5 мин.

Раствор ферментов объемом 2.7 мкл (из расчета на одну пробу) включал следующие компоненты: 2.1 мкг BSA («Fermentas», США), 0.08 активных единиц RNase H («Thermo Scientific»), США), 6.4 активных единиц AMV Reverse Transcriptase («Promega», США), 32 активных единицы T7 RNA Polymerase («Thermo Scientific»), США).

В микроцентрифужные пробирки объемом 0,2 мл вносили 12.3 мкл приготовленной реакционной смеси и 5 мкл экстракта РНК анализируемых образцов, после чего термостатировали в следующем режиме: 65°C - 5 мин, 41°C - 5 мин. По окончании инкубации добавляли раствор ферментов и устанавливали пробирки в амплификатор. В качестве отрицательного контрольного образца в реакционную смесь добавляли РНК-буфер.

Реакцию транскрипционной амплификации NASBA в режиме «реального времени» проводили на приборе «Rotor-Gene Q» («QIAGEN GmbH», Германия) в изотермических условиях: 41°C - 5 мин, затем 95 циклов (41°C - 60 с) с детекцией интенсивности флуоресцентного сигнала.

Регистрацию результатов проводили в графической и табличной форме. Детекцию продукта амплификации участка 23SpРНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* для флуорофора FAM осуществляли по каналу Green. Результат считали положительным в случае, если кривая накопления флуоресценции для соответствующего образца имела характерную «сигмовидную» форму и пересекала установленную на определенном уровне пороговую линию, что соответствует наличию значения порогового цикла «Ст» в соответствующей графе в таблице результатов.

Пример 3. Определение чувствительности и специфичности реакции транскрипционной

амплификации NASBA в режиме «реального времени» с помощью разработанного набора олигонуклеотидных праймеров Burk23SrRNA-T7-P1/Burk23SrRNA-P2 и флуоресцентно-меченого зонда Burk23SrRNA-MM для идентификации РНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

5 Чувствительность реакции транскрипционной амплификации NASBA с разработанным набором олигонуклеотидных праймеров Burk23SrRNA-T7-P1/Burk23SrRNA-P2 и флуоресцентно-меченого зонда Burk23SrRNA-MM оценивали при исследовании десятикратных разведений препаратов РНК, полученных из чистых культур возбудителей сапа и мелиоидоза. Штаммы буркхольдерий выращивали на
10 плотных питательных средах в течение 1-2 суток. Готовили бактериальные взвеси клеток в 4 мл 0,15 М раствора натрия хлорида в концентрации 1×10^9 м.к./мл по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)).

15 Предварительную инактивацию образцов и выделение нуклеиновых кислот проводили в условиях, регламентированных СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» и методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV
20 групп патогенности». Процедуру выделения нуклеиновых кислот из исследуемого материала осуществляли с использованием набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя. Постановку реакции NASBA в режиме «реального времени» проводили, как описано в примере 2.

25 Измерение концентрации РНК проводили при помощи коммерческого набора «Qubit™ RNA HS Assay Kit» («Invitrogen», США) и флуориметра «QUBIT 2.0» («Invitrogen», США). Определение количества тотальной РНК осуществляли в пробах чистых культур *B. mallei* и *B. pseudomallei*, выделенных из концентрации 1×10^8 м.к./мл, а затем проводили последовательные десятикратные разведения образцов нуклеиновых кислот.

30 В результате была определена чувствительность реакции транскрипционной амплификации NASBA в режиме «реального времени» с разработанным набором олигонуклеотидов, составившая 0,4 фг/мкл тотальной РНК в образце, что соответствовало 10^1 м.к./мл (рис. 1).

35 Рисунок 1 отображает график нарастания кривых флуоресценции, полученных при амплификации РНК штаммов *B. mallei* 10230 и *B. pseudomallei* C-141 с помощью сконструированных праймеров Burk23SrRNA-T7-P1/Burk23SrRNA-P2 и зонда Burk23SrRNA-MM (1 - *B. mallei* 10230 в концентрации 10^2 м.к./мл, 2 - *B. pseudomallei* C-141 в концентрации 10^2 м.к./мл, 3-*B. mallei* 10230 в концентрации 10^1 м.к./мл, 4 - *B.*
40 *pseudomallei* C-141 в концентрации 10^1 м.к./мл, 5 - отрицательный контроль).

Специфичность разработанного набора олигонуклеотидов оценена на коллекции из 58 штаммов микроорганизмов, из которых 14 штаммов *B. mallei*, 20 штаммов *B. pseudomallei* и 24 штаммов гетерологичных микроорганизмов (12 штаммов *Burkholderia cepacia*, 5 штаммов *Burkholderia thailandensis* и по 1 штамму *Pseudomonas aeruginosa*,
45 *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Echerichia coli*). Оценка специфичности показала отсутствие перекрестных реакций с гетерологичными штаммами и наличие специфической амплификации со всеми штаммами *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Таким образом, разработанный набор олигонуклеотидных праймеров Burk23SrRNA-T7-P1/Burk23SrRNA-P2 и флуоресцентно-меченого зонда Burk23SrRNA-MM может быть использован для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза методом транскрипционной амплификации NASBA в режиме «реального времени» и позволяет в короткий срок с высокой чувствительностью и специфичностью детектировать РНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* в пробах чистых культур, биологическом материале и объектах окружающей среды.

Таблица 1. Характеристика сконструированных олигонуклеотидных праймеров и зонда для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза методом транскрипционной амплификации (NASBA) в режиме «реального времени»

Наименование праймеров и зонда	Последовательность праймеров и зонда	Локализация в гене 23S рРНК <i>B. pseudomallei</i> (GeneID: 3112968 (BPSLr08))	Расчетная длина РНК-ампликона
<i>Burk23SrRNA-T7-P1</i>	5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACG GCT AAC AAT ACA AAT AAA GAG TA-3'	293 – 269 нуклеотид гена 23S рРНК	159 п.н.
<i>Burk23SrRNA-P2</i>	5'-CCT TTT GGG TCA TCC TAG A-3'	135 – 153 нуклеотид гена 23S рРНК	
<i>Burk23SrRNA-MM</i>	5'(FAM)-CCA CAC ATA GGT СТА GTG AGG CGT GTG G-(RTQ-1)3'	160 – 178 нуклеотид гена 23S рРНК	

(57) Формула изобретения

Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации РНК возбудителей сапа *Burkholderia mallei* и мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* на основе транскрипционной амплификации (NASBA) в режиме «реального времени», содержащий пару высокоспецифичных олигонуклеотидных полимеров к целевой последовательности гена 23S рРНК, обладающих активностью прямого и обратного праймеров в реакции транскрипционной амплификации NASBA, и флуоресцентно-меченый зонд с комплементарными концевыми последовательностями по типу «молекулярного маяка», обеспечивающего детекцию продуктов реакции в режиме «реального времени», имеющих следующую структуру:

5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACG GCT AAC AAT ACA AAT AAA GAG TA-3' - Burk23SrRNA-T7-P1

5'-CCT TTT GGG TCA TCC TAG A-3' - Burk23SrRNA-P2

5'(FAM)-CCA CAC ATA GGT СТА GTG AGG CGT GTG G-(RTQ-1)3' - Burk23SrRNA-MM,

где FAM - карбоксифлуоресцеин, флуоресцентный краситель, длина волны

поглощения которого составляет 490 нм, а длина волны флуоресценции - 520 нм. RTQ-1 - гаситель флуоресценции с диапазоном гашения 470-570 нм.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

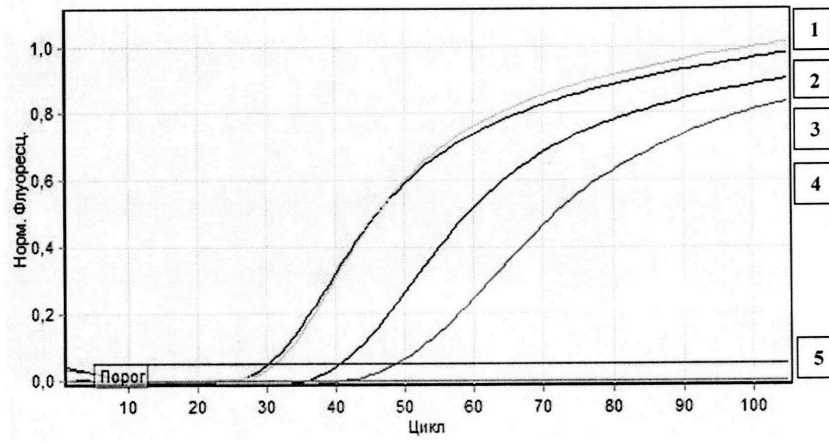


Рис.1