



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/68 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023109455, 13.04.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.04.2023

Дата регистрации:
24.10.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.04.2023

(45) Опубликовано: 24.10.2023 Бюл. № 30

Адрес для переписки:

111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А, ФБУН
ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Патентоведу правового управления

(72) Автор(ы):

Саламайкина Светлана Андреевна (RU),
Миронов Константин Олегович (RU),
Есьман Анна Сергеевна (RU),
Поздышева Елена Алексеевна (RU),
Акимкин Василий Геннадьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии" Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
(ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP 2508618 A1, 10.10.2012. US
20100324154, 23.12.2010. Thada S, Interaction of
TLR4 and TLR8 in the Innate Immune Response
against Mycobacterium Tuberculosis. Int J Mol
Sci. 2021 Feb 4;22(4):1560, 23 p., doi: 10.3390/
ijms22041560. Wang MG, Association of TLR8
and TLR9 polymorphisms with tuberculosis in a
Chinese Han population: a case-control (см.
прод.)

(54) Способ генотипирования гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 и набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для его реализации

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ генотипирования аллелей А и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880, включающий: экстракцию ДНК из биологического материала, проведение ПЦР в режиме реального времени с применением реакционной смеси, содержащей набор нуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO: 1-4, амплификацию, анализ и интерпретацию результатов, где наличие аллеля А гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 определяется посредством оценки кривых накопления

флуоресцентных сигналов по каналу для флуорофора FAM, а наличие в образце биологического материала аллели G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 определяется посредством оценки кривых накопления флуоресцентных сигналов по каналу для флуорофора R6G. Предложен набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для применения в способе генотипирования. Изобретение позволяет детектировать аллели rs3764880-А и rs3764880-G гена TLR8 в образцах биологического материала методом ПЦР в

режиме реального времени. 2 н. и 3 з.п. ф-лы, 1 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

study. BMC Infect Dis. 2018 Nov 13;18(1):561, 8 p., doi: 10.1186/s12879-018-3485-y. М.А. Карнаушкина и др., Ассоциации полиморфизмов генов толл-подобных рецепторов и активности нетоза как прогностические критерии тяжести течения пневмонии, том 13, номер 3 (2021), весь документ, <http://www.stm-journal.ru/numbers/2021/3/1723/html>. Wang MG, Association of TLR8 and TLR9 polymorphisms with tuberculosis in a Chinese Han population: a case-control study. BMC Infect Dis. 2018 Nov 13;18(1):561, 8 p., doi: 10.1186/s12879-018-3485-y.

R U 2 8 0 5 8 6 4 C 1

R U 2 8 0 5 8 6 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12Q 1/68 (2023.08)

(21)(22) Application: **2023109455, 13.04.2023**

(24) Effective date for property rights:
13.04.2023

Registration date:
24.10.2023

Priority:

(22) Date of filing: **13.04.2023**

(45) Date of publication: **24.10.2023** Bull. № 30

Mail address:

**111123, Moskva, ul. Novogireevskaya, 3A, FBUN
TSNII Epidemiologii Rospotrebnadzora,
Patentovedu pravovogo upravleniya**

(72) Inventor(s):

**Salamaikina Svetlana Andreevna (RU),
Mironov Konstantin Olegovich (RU),
Esman Anna Sergeevna (RU),
Pozdysheva Elena Alekseevna (RU),
Akimkin Vasilii Gennadevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe biudzhethnoe uchrezhdenie nauki
«Tsentralnyi nauchno-issledovatel'skii institut
epidemiologii» Federalnoi sluzhby po nadzoru
v sfere zashchity prav potrebiteli i
blagopoluchii cheloveka (FBUN TsNII
Epidemiologii Rospotrebnadzora) (RU)**

(54) **METHOD OF GENOTYPING TLR8 GENE USING RS3764880 POLYMORPHISM AND A SET OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS AND PROBES FOR ITS IMPLEMENTATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: following has been proposed: a method of genotyping A and G alleles of TLR8 gene using rs3764880 polymorphism, including DNA extraction from biological material, real-time PCR using a reaction mixture containing a set of nucleotide primers and probes of the following SEQ ID NO: 1–4, amplification, analysis and interpretation of the results, where the presence of A allele of TLR8 gene for rs3764880 polymorphism is determined by assessing the accumulation curves of fluorescent signals through

the channel for the FAM fluorophore, and the presence of G allele of TLR8 gene in the biological material sample for rs3764880 polymorphism is determined by assessing the curves accumulation of fluorescent signals through the channel for the R6G fluorophore. A set of oligonucleotide primers and probes for use in the genotyping method is proposed.

EFFECT: invention makes it possible to detect rs3764880-A and rs3764880-G alleles of TLR8 gene in samples of biological material using real-time PCR.

5 cl, 1 tbl, 6 ex

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к определению аллелей гена человека TLR8 по однонуклеотидному полиморфизму rs3764880 в образцах биологического материала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Изобретение предназначено для определения аллелей гена TLR8 по однонуклеотидному полиморфизму rs3764880 и может применяться в исследованиях по изучению влияния однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах врожденного иммунитета на возникновение и течение мультифакторных заболеваний.

Толл-подобные рецепторы (TLR) рецепторы врожденного иммунитета, располагающиеся как на поверхности, так и внутри клетки и распознающие патоген, проникающий в организм. TLR распознают не только экзогенные молекулярные паттерны, связанные с патогеном (PAMPs), но и эндогенные молекулы, связанные с повреждением (DAMPs), которые высвобождаются из поврежденных или умирающих клеток. Активированные TLR с помощью PAMPs или DAMPs инициируют сигнальные каскады, такие как ядерный фактор-каппа В (NFkB), пути митоген-ассоциированной протеинкиназы (МАРК) и интерферона (IFN), и способствуют секреции цитокинов и хемокинов, которые регулируют иммунные и воспалительные реакции, направленные на элиминацию патогенов.

Показана связь SNP в генах TLR с предрасположенностью к возникновению и тяжелому течению мультифакторных заболеваний. Определение аллелей SNP в генах TLR может использоваться для предупреждения тяжелого течения инфекционных заболеваний.

TLR8 тесно связан с грамположительными бактериями. Передача сигналов через TLR8 включает передачу сигналов по пути IRAK и активацию воспалительного сигнала внутри клетки. TLR8 обнаружен в легких, может привести к цитокиновому шторму при SARS-CoV-2 и может вызывать различные побочные эффекты. При ингибировании TLR8 изменялось количество продуктов IL-12p70 и IL-1 β , которые влияют на течение пневмонии. Было показано, что РНК SARS-CoV-2 способна стимулировать TLR8-зависимую воспалительную реакцию в макрофагах *in vitro*.

Аллель G в полиморфизме rs3764880 гена TLR8 (rs3764880-G) является протективным (защитным) аллелем от развития активной формы туберкулеза, аллель rs3764880-A, наоборот, является маркером риска возникновения активной формы и тяжелого туберкулеза [Thada S, Horvath GL, Müller MM, Dittrich N, Conrad ML, Sur S, Hussain A, Pelka K, Gaddam SL, Latz E, Slevogt H, Schumann RR, Burkert S. Interaction of TLR4 and TLR8 in the Innate Immune Response against Mycobacterium Tuberculosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 4;22(4):1560. doi: 10.3390/ijms22041560. PMID: 33557133; PMCID: PMC7913854; Wang MG, Zhang MM, Wang Y, Wu SQ, Zhang M, He JQ. Association of TLR8 and TLR9 polymorphisms with tuberculosis in a Chinese Han population: a case-control study. *BMC Infect Dis*. 2018 Nov 13;18(1):561. doi: 10.1186/s12879-018-3485-y. PMID: 30424735; PMCID: PMC6234681.].

Детекция аллелей полиморфизма rs3764880 гена TLR8 позволит на ранних этапах определить вероятность возникновения заболеваний и их диагностирование и оказывать более эффективную медицинскую помощь пациентам.

Из уровня техники известны способы диагностики и лечения иммунозависимых заболеваний [патент US 20090297563, дата подачи 27.10.2005, дата публикации 03.12.2009], при котором в биологическом образце определяют протективный аллель SNP, связанного с предрасположенностью субъекта к заболеванию, при этом одним из выбранных SNP является rs3764880.

Известны способы и реагенты для определения риска и лечения сосудистого

заболевания путем выявления присутствия полиморфизмов генов и/или генетических профилей, связанных с повышенным или сниженным риском заболевания [патент US 20100324154, дата подачи 03.11.2008, дата публикации 23.12.2010]. Изобретение раскрывает перечень олигонуклеотидных последовательностей для детекции аллелей A/G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880.

Известен способ прогнозирования развития иммунного ответа на биофармацевтическое лечение или диагностическое моноклональное антитело у субъекта путем идентификации одного или нескольких полиморфизмов, таких как SNP, присутствующих в одном или нескольких генах рецептора распознавания образов (PRR), где определяют наличие полиморфизма rs37648810 гена TLR8 посредством ПЦР, проводимой в формате мультиплекс [патент US 20100311052, дата подачи 26.06.2008, дата публикации 09.12.2010].

Также определение полиморфизма rs3764880 гена TLR8 посредством ПЦР, проводимой в формате мультиплекс реализовано в способы определения функционального полиморфизма фиколина-2 для прогнозирования исхода трансплантации почки [патент EP 2508618, дата подачи заявки 04.04.2011, дата публикации 10.10.2012].

Упомянутые выше решения реализуются в формате мультиплекс и позволяют определять ген TLR8, полиморфизм rs3764880 гена TLR8 без возможности генотипирования указанного полиморфизма отдельно.

Известны наборы реагентов для определения аллелей SNP методом ПЦР в режиме реального времени. Наборы реагентов включают в себя олигонуклеотиды для детекции нескольких специфичных аллелей в исследуемых образцах и отличаются удобством для пользователя. Для выбранных мишеней детекции не всегда подтверждена связь с заболеванием и поэтому такие наборы не всегда могут использоваться в клинической практике, но используются в научно-исследовательских целях. Из уровня техники также известен набор реагентов «ThermoFisher Scientific C_2183830 10» для определения аллелей rs3764880 гена TLR8 [https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C_2183830_10] методом секвенирования по Сэнгеру. Однако данное решение не предназначено для определения аллелей rs3764880 гена TLR8 методом ПЦР в режиме реального времени.

Также генотипирование локусов rs3764880 выполняли с применением реагентов для выделения ДНК («РИБО-преп»), амплификации и пробоподготовки («ПИРО-преп») производства Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора («АмплиСенс», Россия) методом пиросеквенирования с использованием реагентов PyroMark Q96 и системы генетического анализа PyroMark Q24 («Qiagen», Германия) [М.А. Карнаушкина, А.С. Гурьев, К.О. Миронов, Е.А. Дунаева, В.И. Корчагин, О.Ю. Бобкова, И.С. Васильева, Д.В. Кассина, М.М. Литвинова. Ассоциации полиморфизмов генов толл-подобных рецепторов и активности нетоза как прогностические критерии тяжести течения пневмонии. <http://www.stm-journal.ru/ru/numbers/2021/3/1723/html>]. Согласно описанному способу были определены rs3764880-A и rs3764880-G гена TLR8 методом пиросеквенирования, что делает его более затратным и трудоемким.

Таким образом, существует потребность в расширении точного диагностического инструментария, позволяющего в короткие сроки и с наименьшими затратами генотипировать аллели гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 для своевременного и адекватного назначения диагностических, терапевтических и профилактических мероприятий, а также для дальнейшего изучения врожденного иммунитета и механизма возникновения и течения мультифакторных заболеваний.

Технический результат заявляемого изобретения направлен на генотипирование аллелей А и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880, а именно определение rs3764880-А и rs3764880-G гена TLR8, в образцах биологического материала ДНК с использованием широко распространенных методик и доступного оборудования.

Заявленный технический результат достигается за счет проведения полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с применением реакционной смеси, содержащей набор уникальных синтезированных нуклеотидных праймеров и конформационно-блокированных зондов, а генотипирование осуществляют посредством оценки кривых накопления флуоресцентных сигналов по соответствующим каналам для флуорофоров, а именно: для rs3764880-А по каналу FAM, для rs3764880-G по каналу R6G.

Упомянутый набор синтезированных нуклеотидных праймеров и зондов позволяет эффективно детектировать полиморфный нуклеотид rs3764880 в последовательности ДНК и имеет следующий олигонуклеотидный состав:

- прямой праймер 4880-F - SEQ ID NO: 1,
- обратный праймер 4880-R - SEQ ID NO: 2,
- флуоресцентный зонд 4880-А - SEQ ID NO: 3,
- флуоресцентный зонд 4880-G - SEQ ID NO: 4.

Праймеры представляют собой последовательности олигонуклеотидов для амплификации фрагмента, включающей полиморфизм rs3764880, флуоресцентные зонды являются олигонуклеотидами, содержащими флуорофор, гаситель флуоресценции, позволяющими детектировать аллели в амплифицированный фрагмент.

Заявляемый набор олигонуклеотидных праймеров и зондов разработан на основе проведенного анализа последовательностей: гена TLR8 toll like receptor 8 [Homo sapiens (human)], Gene ID: 51311, NC_000023.11, GRCh38.p14 (GCF_000001405.40), представленных в базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) [NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51311>], и не имеющих гомологии с другими последовательностями ДНК. В результате выбран фрагмент для детекции участка, содержащего rs3764880 гена TLR8 к которому подобраны прямой и обратный праймеры для амплификации фрагмента длиной 103 пары оснований, а также флуоресцентные зонды для детекции аллелей А и G выбранного SNP: прямой праймер 4880-F - SEQ ID NO: 1; обратный праймер 4880-R - SEQ ID NO: 2; флуоресцентный зонд 4880-А - SEQ ID NO: 3; флуоресцентный зонд 4880-G - SEQ ID NO: 4.

При этом зонды содержат конформационно-блокированные нуклеотиды, которые позволяют повысить стабильность дуплекса с ДНК-мишенью. Флуоресцентный зонд 4880-А содержит 6 блокаторов, которые расположены в положении 2, 5, 8, 9, 12, 14. Флуоресцентный зонд 4880-G содержит 5 блокаторов, которые расположены в положении 2, 5, 8, 12, 14.

Для подбора мишеней мест посадки олигонуклеотидов используют фрагменты референсного генома, взятые из базы данных NCBI dbSNP [NCBI dbSNP <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> обращено 12.12.2022]. Для поиска гомологичных областей применяют современные алгоритмы in silico анализа нуклеотидных последовательностей и программы, находящиеся в открытом доступе: Primer BLAST, Unipro UGENE. Состав набора олигонуклеотидных праймеров и зондов приведен в Таблице 1.

Анализ результатов продемонстрировал, что прямой праймер 4880-F (SEQ ID NO: 1) и обратный праймер 4880-R (SEQ ID NO: 2) амплифицируют участок гена человека TLR8, содержащий полиморфизм rs3764880 со 100% специфичностью. Также

специфичность прямого и обратного праймеров подтверждена с помощью прямого метода пиросеквенирования нуклеотидных последовательностей.

Таблица 1. Оценка специфичности праймеров и флуоресцентных зондов

Длина специфичного фрагмента (п.о.)	SEQ ID NO	Название	5'-3' последовательность	Оценка специфичности
103	SEQ ID NO: 1	4880-F	GCT GCT GCA AGT TAC GGA ATG AA	100%
	SEQ ID NO: 2	4880-R	GGG TCA GAA ACC CCA TAT TCT GTT	
	SEQ ID NO: 3	4880-A	(FAM)C+AG A+AA C+A+T GG+T A+AG(BHQ1)	
	SEQ ID NO: 4	4880-G	(R6G)C+AG A+AA C+GT GG+T A+AG(BHQ1)	

где FAM – флуорофор для SEQ ID NO: 3, R6G – флуорофор для SEQ ID NO: 4,

BHQ1 – гаситель флуоресценции, соответствующие красителю каналов флуорескопов FAM и R6G, знак «+» – перед конформационно-блокированным нуклеотидом.

Заявляемое изобретение является результатом научно-исследовательской работы лаборатории молекулярных методов изучения генетических полиморфизмов «Изучение генетической предрасположенности к мультифакторным заболеваниям», проведенной ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия).

В качестве биологического материала предпочтительно использовать венозную кровь.

ПЦР-исследование проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для экстракции ДНК может быть использован комплект реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или любой аналогичный набор/комплект реагентов для выделения ДНК, в соответствии с инструкцией производителя.

Оптимальная концентрация ДНК - 10^3 - 10^5 копий в 10 мкл. ПЦР в режиме реального времени проводится с применением заявляемого набора олигонуклеотидных праймеров и зондов для детекции аллелей полиморфизма rs3764880 гена человека TLR8, представленных в Таблице 1.

ПЦР проводят при следующих условиях:

Общий объем реакционной смеси - 25 мкл.

Компоненты ПЦР смешиваются следующим образом:

(а) 10 мкл смеси, содержащей:

- олигонуклеотидные праймеры SEQ ID NO NO: 1, 2 - по 0,07 мМ; - флуоресцентные зонды SEQ ID NO NO: 3, 4 - по 0,02 мМ - dNTPs - 0,44 мМ.

(b) реактив, содержащий рекомбинантный фермент Taq ДНК-полимеразу, например, 0,5 мкл «Полимераза TaqF» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) или любого аналогичного коммерческого набора в соответствии с инструкцией производителя.

(с) ПЦР-буфер, содержащий $MgCl_2$, например, 5,0 мкл ПЦР-буфера «ОТ-ПЦР-смесь-2

FER/FRT» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) или любого аналогичного коммерческого набора в соответствии с инструкцией производителя.

- (d) экстрагированная из цельной крови человека ДНК 10 мкл. Амплификацию проводят на амплификаторе с возможностью детекции флуоресцентного сигнала как минимум по 2 каналам флуоресценции, например, «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

- Амплификацию проводят по следующей программе: 1 цикл 95°C в течение 15 минут, 45 циклов при температуре 95°C - 10 секунд / 60°C - 20 секунд. Детекция флуоресценции проводится на этапе 60°C по каналу для флуорофора FAM - для rs3764880-A, по каналу для флуорофора R6G - для rs3764880-G.

- Анализ данных проводится на основе детекции амплификатором уровня флуоресцентного сигнала. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Это определяет наличие или отсутствие для анализируемого образца значения порогового цикла. В процессе амплификации ДНК зонды конкурируют за связывание с матрицей ДНК, содержащем два праймера SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. При этом преимущество получает зонд, соответствующий представленному в образце аллели. Если присутствуют два аллеля полиморфизма, гибридизуются оба зонда.

Для каждого канала задают пороговую линию, соответствующую величине 10% от максимального сигнала флуоресценции образца среди образцов с определенным аллелем.

- Образцы, для которых кривые флуоресценции пересекают пороговую линию по каналу для детекции флуорофора FAM и при этом кинетика накопления флуоресцентного сигнала является экспоненциальной, содержат аллель А полиморфизма rs3764880 гена TLR8. Образцы, для которых кривые флуоресценции пересекают пороговую линию по каналу для детекции флуорофора R6G и при этом кинетика накопления флуоресцентного сигнала является экспоненциальной, содержат аллель G полиморфизма rs3764880 гена TLR8.

- Образцы, для которых кривые флуоресценции пересекли пороговые линии по каналам для детекции флуорофоров FAM и R6G и при этом кинетика накопления флуоресцентного сигнала является экспоненциальной, содержат rs3764880-A и rs3764880-G.

Реализация заявляемого изобретения поясняется следующими примерами:

- Пример 1. Получение набора олигонуклеотидных праймеров и зондов для генотипирования аллелей гена TLR8 по полиморфизму rs3764880

- Для подбора целевых последовательностей - мест посадки олигонуклеотидов, использовали фрагменты TLR8 toll like receptor 8 [Homo sapiens (human)], Gene ID: 51311, NC_000023.11, GRCh38.p14 (GCF_000001405.40), представленных в базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) [NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51311>], представленных в базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) [NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51311>], и не имеющих гомологии с другими последовательностями ДНК. Для поиска гомологичных областей использовали современные алгоритмы in silico анализа нуклеотидных последовательностей и программы Primer BLAST, Unipro UGENE, MEGA.

- В результате проведенного анализа выбран участок гомологичной последовательности, к которому подобрали праймеры и зонды для амплификации фрагмента длиной 103 пары оснований, а также флуоресцентные зонды для детекции аллелей А и G выбранного SNP: прямой праймер 4880-F - SEQ ID NO: 1; обратный

праймер 4880-R - SEQ ID NO: 2; флуоресцентный зонд 4880-A - SEQ ID NO: 3; флуоресцентный зонд 4880-G - SEQ ID NO: 4. При этом каждый зонд содержат конформационно заблокированные нуклеотиды, а именно: флуоресцентный зонд 4880-A содержит 6 блокаторов, которые расположены в положении 2, 5, 8, 9, 12, 14, а флуоресцентный зонд 4880-G содержит 5 блокаторов, которые расположены в положении 2, 5, 8, 12, 14.

Анализ упомянутых последовательностей с использованием ресурса Primer BLAST [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] показал, что прямой 4880-F и обратный 4880-R праймеры амплифицируют участок, содержащий полиморфизм rs3764880 в гене TLR8 со 100% специфичностью.

Пример 2. Детекция аллелей А и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 методом ПЦР в режиме реального времени.

ПЦР в режиме реального времени проводили при следующих условиях. Общий объем реакционной смеси - 25 мкл. Компоненты ПЦР смешиваются следующим образом:

(а) 10 мкл смеси, содержащей:

- олигонуклеотидные праймеры: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 по 0,07 мМ;
- флуоресцентные зонды SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 - по 0,02 мМ;
- dNTPs - 0,44 мМ.

(б) 0,5 мкл реактива «Полимераза TaqF» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), содержащего рекомбинантный фермент Taq ДНК-полимеразу.

(с) 5,0 мкл ПЦР-буфера «ОТ-ПЦР-смесь-2 FEP/FRT» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), содержащего $MgCl_2$;

(д) экстрагированная из цельной венозной крови человека ДНК - 10 мкл.

ПЦР в режиме реального времени проводили с флуоресцентной детекцией результата на приборе с 5 каналами детекции - «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия).

Подготовленный описанным способом материал, содержащий уникальные олигонуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1-4, использовали для определения аллелей rs3764880 гена TLR8 в образцах биологического материала.

Пример 3. Генотипирование аллелей А и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 в образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3764880 гена человека TLR8 в образцах биологического материала выбрано 65 проб, для исследования использовали биологический материал - венозная кровь. Выделение ДНК проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09

«Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для экстракции ДНК использовали набор реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР-РРВ проводили в условиях, описанных в Примере 2, с использованием уникальных синтезированных олигонуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO: 1-4.

Амплификацию проводили на приборе «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) по следующей программе: 1 цикл 95°C в течение 15 минут, 45 циклов при температуре 95°C 10 секунд / 60°C - 20 секунд. Детекция флуоресцентного сигнала проводилась на этапе 60°C по каналу для флуорофора FAM - для аллеля А, и по каналу для флуорофора R6G - для аллеля G.

При анализе результатов для каждого канала задали пороговую линию,

соответствующую величине 10% от максимального сигнала флуоресценции образца среди образцов с определенным аллелем.

Для 44/65 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора FAM, для 21/65 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора R6G, при этом кинетика накопления флуоресцентных сигналов была экспоненциальной.

По каналу для флуорофора FAM определили наличие аллеля rs3764880-A, по каналу для флуорофора R6G определили наличие аллеля rs3764880-G полиморфизма.

Результаты исследования были подтверждены с помощью метода пиросеквенирования нуклеотидных последовательностей, которое выполнялось посредством системы генетического анализа PyroMark Q24 («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Пример 4. Генотипирование аллелей A и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 в образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3764880 гена человека TLR8 в образцах биологического материала выбрано 31 проба, для исследования использовали биологический материал - цельная кровь. Выделение ДНК проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для экстракции ДНК использовали набор реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР-РРВ проводили в условиях, описанных в Примере 2, с использованием уникальных синтезированных олигонуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO: 1-4.

Амплификацию проводили на приборе «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) по следующей программе: 1 цикл 95°C в течение 15 минут, 45 циклов при температуре 95°C - 10 секунд / 60°C - 20 секунд. Детекция флуоресцентного сигнала проводилась на этапе 60°C по каналу для флуорофора FAM для rs3764880-A, и по каналу для флуорофора R6G для rs3764880-G.

При анализе результатов для каждого канала задали пороговую линию, соответствующую величине 10% от максимального сигнала флуоресценции образца среди образцов с определенным аллелем.

Для 31/31 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора FAM, что позволило определить наличие аллеля A полиморфизма rs3764880 гена TLR8 в 31 образце из выборки.

Результаты исследования были подтверждены с помощью метода пиросеквенирования нуклеотидных последовательностей, которое выполнялось посредством системы генетического анализа PyroMark Q24 («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Пример 5. Генотипирование аллелей A и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 в образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3764880 гена человека TLR8 в образцах биологического материала выбрано 19 проб, для исследования использовали биологический материал - венозная кровь. Выделение ДНК проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для экстракции ДНК использовали набор реагентов «РИБО-преп»

(ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР-РРВ проводили в условиях, описанных в Примере 2, с использованием уникальных синтезированных олигонуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO: 1-4.

Амплификацию проводили на приборе «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) по следующей программе: 1 цикл 95°C в течение 15 минут, 45 циклов при температуре 95°C 10 секунд / 60°C - 20 секунд. Детекция флуоресцентного сигнала проводилась на этапе 60°C по каналу для флуорофора FAM - для rs3764880-A, и по каналу для флуорофора R6G - для rs3764880-G.

При анализе результатов для каждого канала задали пороговую линию, соответствующую величине 10% от максимального сигнала флуоресценции образца среди образцов с определенным аллелем.

Для 19/19 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора R6G, что позволило определить наличие аллеля G полиморфизма rs3764880 гена TLR8 в 19 образцах из выборки.

Результаты исследования были подтверждены с помощью метода пиросеквенирования нуклеотидных последовательностей, которое выполнялось посредством системы генетического анализа PyroMark Q24 («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Пример 6. Генотипирование аллелей A и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 в образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3764880 гена человека TLR8 в образцах биологического материала выбрано 48 пробы, для исследования использовали биологический материал -цельная кровь. Выделение ДНК проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». Для экстракции ДНК использовали набор реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР в режиме реального времени проводили в условиях, описанных в Примере 2, с использованием уникальных синтезированных олигонуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO: 1-4.

Амплификацию проводили на приборе «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) по следующей программе: 1 цикл 95°C в течение 15 минут, 45 циклов при температуре 95°C - 10 секунд / 60°C - 20 секунд. Детекция флуоресцентного сигнала проводилась на этапе 60°C по каналу для флуорофора FAM для аллеля A, и по каналу для флуорофора R6G для аллеля G.

При анализе результатов для каждого канала задали пороговую линию, соответствующую величине 10% от максимального сигнала флуоресценции образца среди образцов с определенным аллелем.

Для 27/48 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора FAM, для 13/48 образцов кривые флуоресценции пересекли пороговую линию по каналу для флуорофора R6G, для 8/48 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговые линии по каналам для флуорофора FAM и R6G, при этом кинетика накопления флуоресцентных сигналов была экспоненциальной.

По каналу для флуорофора FAM определили наличие ДНК rs3764880-A, по каналу для флуорофора R6G определили наличие ДНК rs3764880-G, наличие сигналов по двум

каналам для флуорофоров FAM и R6G одновременно подтвердили присутствие ДНК двух аллелей - rs3764880-A и rs3764880-G.

Результаты исследования были подтверждены с помощью метода пиросеквенирования нуклеотидных последовательностей, которое выполнялось посредством системы генетического анализа PyroMark Q24 («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Таким образом, заявляемое изобретение позволяет детектировать аллели rs3764880-A и rs3764880-G гена TLR8 в образцах биологического материала. Набор уникальных синтезированных олигонуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO: 1-4 не дает перекрестных реакций с другими последовательностями генома, амплифицирует последовательность, включающую rs3764880, со 100% специфичностью и позволяют однозначно интерпретировать полученные результаты.

(57) Формула изобретения

1. Способ генотипирования аллелей А и G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880, включающий: экстракцию ДНК из биологического материала, проведение ПЦР в режиме реального времени с применением реакционной смеси, содержащей набор нуклеотидных праймеров и зондов SEQ ID NO: 1-4, амплификацию, анализ и интерпретацию результатов, где наличие аллеля А гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 определяется посредством оценки кривых накопления флуоресцентных сигналов по каналу для флуорофора FAM, а наличие в образце биологического материала аллели G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 определяется посредством оценки кривых накопления флуоресцентных сигналов по каналу для флуорофора R6G,

2. Способ генотипирования по п. 1, где наличие в образце биологического материала аллеля А гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 и аллеля G гена TLR8 по полиморфизму rs3764880 определяется посредством оценки кривых накопления флуоресцентных сигналов по каналам FAM и R6G одновременно.

3. Способ генотипирования по пп. 1 и 2, где для анализа результатов задают пороговую линию, соответствующую величине 10% от максимального сигнала флуоресценции образца среди образцов с определенным аллелем.

4. Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для применения в способе генотипирования по пп. 1 и 2, имеющий следующий нуклеотидный состав:

прямой праймер 4880-F - SEQ ID NO: 1;

обратный праймер 4880-R - SEQ ID NO: 2;

флуоресцентный зонд 4880-A - SEQ ID NO: 3;

флуоресцентный зонд 4880-G - SEQ ID NO: 4,

при этом флуоресцентный зонд 4880-A содержит конформационно-блокированные нуклеотиды, расположенные в положении 2, 5, 8, 9, 12, 14, а флуоресцентный зонд 4880-G содержит конформационно-блокированные нуклеотиды, расположенные в положении 2, 5, 8, 12, 14.

5. Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов по п. 4, где для создания прямого и обратного праймеров, флуоресцентных зондов используют фрагмент гена TLR8 Homo sapiens.