



(51) МПК
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/68 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022126124, 06.10.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.10.2022

Дата регистрации:
27.04.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.10.2022

(45) Опубликовано: 27.04.2023 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Есьман Анна Сергеевна (RU),
 Миронов Константин Олегович (RU),
 Черкашина Анна Сергеевна (RU),
 Саламайкина Светлана Андреевна (RU),
 Голубева Анна Геннадьевна (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: US 20220290221 A1, 15.09.2022. WO
 2021211331 A1, 21.10.2021. WO 2021211332 A2,
 21.10.2021. Немного о мутациях SARS-CoV-2,
 19.01.2022, найдено в интернет 07.12.2022
<https://habr.com/ru/post/646487/>. RU 2772362 C1,
 19.05.2022.

(54) Олигонуклеотиды для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описаны олигонуклеотиды для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2, прямой праймер d6Acv-F, обратный праймер d6Acv-R, флуоресцентный зонд d6Ocv-Z1Y, представлены уникальными последовательностями SEQ ID NO: 1-3 соответственно. При этом для создания прямого и обратного праймеров, флуоресцентного зонда используют фрагменты референсных геномов

SARS-CoV-2 дикого типа, Alpha (B. 1.1.7), Omicron (B.1.1.529), Eta (B.1.525), B. 1.620, C.36.3. Синтезированные олигонуклеотиды SEQ ID NO NO: 1-3 не дают перекрестных реакций с другими протестированными образцами, амлифицируют заданный участок со 100% специфичностью и позволяют определять наличие или отсутствие в образцах биологического материала значимой мишени S:delHV69-70. 2 з.п. ф-лы, 1 табл., 5 пр.

R U 2 7 9 5 0 1 4 C 1

R U 2 7 9 5 0 1 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12Q 1/68 (2023.02)

(21)(22) Application: 2022126124, 06.10.2022

(24) Effective date for property rights:
06.10.2022

Registration date:
27.04.2023

Priority:

(22) Date of filing: 06.10.2022

(45) Date of publication: 27.04.2023 Bull. № 12

Mail address:
111123, Moskva, ul. Novogireevskaya, 3A,
Patentovedu pravovogo upravleniya FBUN TSNII
Epidemiologii Rospotrebnadzora

(72) Inventor(s):

Mironov Konstantin Olegovich (RU),
Cherkashina Anna Sergeevna (RU),
Salamaikina Svetlana Andreevna (RU),
Golubeva Anna Gennadevna (RU),
Akimkin Vasilii Gennadevich (RU),
Akimkin Vasilij Gennadevich (RU)

(73) Proprietor(s):

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

(54) OLIGONUCLEOTIDES FOR DETECTION OF SARS-CoV-70 MUTATION S:delHV69

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: oligonucleotides for detection of SARS-CoV-2 mutation S:delHV69-70, forward primer d6Acy-F, reverse primer d6Acy-R, fluorescent probe d6Ocv-Z1Y, are presented by unique sequences SEQ ID NO: 1-3 respectively. At the same time, to create forward and reverse primers and a fluorescent probe, use fragments of the reference genomes of SARS-CoV-2 wild type, Alpha (B. 1.1.7), Omicron

(B.1.1.529), Eta (B.1.525), B. 1.620, C.36.3. Synthesized oligonucleotides SEQ ID NO NO: 1-3 do not form cross-reactions with other tested samples, selected site is amplified with 100% specificity allowing to determine presence or absence of a significant target S:delHV69 in the samples of biological material.

EFFECT: determination of SARS-CoV-2 mutation S:delHV69-70.

3 cl, 1 tbl, 5 ex

C1
2795014
RU

R U
2 7 9 5 0 1 4

C 1

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к определению мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и может применяться для идентификации геновариантов S ARS-CoV-2 при эпидемиологических исследованиях.

- 5 Коронавирусная инфекция (COVID-19) это инфекционное заболевание, вызванное SARS-CoV-2. Вирус передается от человека к человеку воздушно-капельным путем. Изменения в структуре генома SARS-CoV-2 приводят к возникновению вариантов, которые ВОЗ обозначила как вызывающие интерес (VOIs, Variants of Interest), вызывающие озабоченность (VOCs, Variants of Concern) и линии VOC под мониторингом
 10 (VOC lineages under monitoring (VOC-LUM). Определение мутаций в геноме SARS-CoV-2 и их классификация на VOIs и VOCs и VOC-LUM является важным элементом молекулярно-генетического мониторинга штаммов новой коронавирусной инфекции. Мутации, детекция которых необходима, перечислены в докладах Технической
 15 консультативной группы по эволюции вируса SARS-CoV-2 (TAG-VE) ВОЗ [[https://www.who.int/publications/m/item/terms-of-reference-for-the-technicls-advisory-group-on-sars-cov-2-virus-evolution-\(tag-ve\)](https://www.who.int/publications/m/item/terms-of-reference-for-the-technicls-advisory-group-on-sars-cov-2-virus-evolution-(tag-ve))].

Для определения геновариантов вируса и проведения молекулярно-генетического мониторинга SARS-CoV-2 используются методы полногеномного и фрагментного секвенирования, которые являются дорогостоящими, трудоемкими методами. С целью
 20 выявления SARS-CoV-2 Всемирной организацией здравоохранения предложено выделение РНК возбудителя с последующим проведением полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>].

Известные протоколы исследования направлены на выявление специфических
 25 нуклеотидных последовательностей в генах и межгенных промежутках:

- ORF1ab, N [http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html];
- RdRP, E, N [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2];
- ORF1b-nsp14, N [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4];
- S, N [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/method-niid-20200123-2.pdf?sfvrsn=fbf75320_7];
- N [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-pcr-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-nat-inst-health-t.pdf?sfvrsn=42271c6d_4];

35 -N
 [<https://www.fda.gov/media/134922/download>, https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcrt-pcr-panel-primer-probes.pdf?sfvrsn=fa29cb4b_2];
 - RdRP [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2].

40 При этом, проведенный анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей SARS-CoV-2 показал частое наличие мутаций (в особенности делеций) в геномах данного коронавируса. В связи с этим основным недостатком приведенных выше аналогов является риск получения ложно отрицательных результатов ОТ-ПЦР, обусловленных блокированием реакции при наличии мутаций в области амплифицируемого участка.

45 Из уровня техники известна стратегия скрининга для выявления доминирующего варианта SARS-CoV-2 [A screening strategy for identifying the dominant variant of S ARS-COV-2 in the fifth peak of Kurdistan- Iran population using HRM and Probe-based RT-PCR assay. Mohammad Moradzadac, Hasan Soltani, Hamid Salehi, Khaled Rahmani, Dariush Khateri,

Mohammad Zaid Rahimi, Diman Az, Shohreh Fakhari, Journal of Virological Methods, Volume 304, June 2022, 114514, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114514>. где детекцию мутации S-белка S:delHV69-70 осуществляют с использованием анализа плавления с высоким разрешением.

- 5 Мультиплексные наборы реагентов для определения геновариантов вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР, разработаны несколькими компаниями-производителями. Предложенная компанией ThermoFisher Scientific методика основана на использовании зондов типа TaqMan для определения сразу нескольких мутаций, специфичных для разных геновариантов [SARS-CoV-2 Variants Detection Using TaqMan SARS-CoV-2 Mutation
- 10 Panel Molecular Genotyping Assays. Puja Neopane, Jerome Nypaver, Rojeet Shrestha, Safedin Sajo Beqaj, <https://doi.org/10.2147/IDR.S3355831>. Наборы, в которых предусмотрена мультиплексная ПЦР-РВ после проведения обратной транскрипции отличаются удобством для пользователя [1] Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69-V70, France, August to
- 15 December 2020. Antonin Bal, Gregory Destras, Alexandre Gaymard, Karl Stefic, Julien Marlet, Sebastien Eymieux, Hadrien Regue, Quentin Semanas, Constance d'Aubarede, Genevieve Billaud, Frederic Laurent, Claudia Gonzalez, Yahia Mekki, Martine Valette, Maude Bouscambert, Catherine Gaudy-Graffin, Bruno Lina, Florence Morfin, Laurence Josset, Jean-Sebastien Casalegno, Emilie Frobert, Vanessa Escuret, Vinca Icard, Marion Jeannoel, Marie-Paule Milon, Christophe Ramiere,
- 20 Caroline Scholtes, Jean-Claude Tardy, Mary-Anne Trabaud, Isabelle Schuffenecker, DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.3.2100008; 2) Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B. 1.1.7. Bo Meng, Steven A Kemp, Guido Papa, Rawlings Datir, Isabella ATM Ferreira, Sara Marelli, William T Harvey, Spyros Lytras, Ahmed Mohamed, Giulia Gallo, Nazia Thakur, Dami A Collier, Petra Mlcochova, COVID-19 Genomics UK (COG-
- 25 UK) Consortium, Lidia M Duncan, Alessandro M Carabelli, Julia C Kenyon, Andrew M Lever, Anna De Marco, Christian Saliba, Katja Culap, Elisabetta Cameroni, Nicholas J Matheson, Luca Piccoli, Davide Corti, Leo C James, David L Robertson, Dalan Bailey, Ravindra K Gupta, DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109292; 3) Whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 showed wide spread of B. 1.525 in February 2021 in Libya. Inas M Alhudiri, Ahmad M Ramadan, Khaled M Ibrahim,
- 30 Adel Abdalla, Mouna Eljilani, Mohamed Ali Salem, Hajar Mohamed Elgheriani, Salah Edin El Meshri, Adam Elzagheid, <https://doi.org/10.1080/19932820.2021.2001210>; 4) The challenge of screening SARS-CoV-2 variants of concern with RT-qPCR: One variant can hide another. Jose Valter Joaquim Silva Junior, higryd Merchioratto, Pablo Sebastian Britto de Oliveira, Thaisa Regina Rocha Lopes, Patricia Chaves Brites, Elehu Moura de Oliveira, Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114248>; 5) Rapid and simultaneous identification of three mutations by the Novaplex™ SARS-CoV-2 variants I assay kit. Wakaki Kami, Takeshi Kinjo, Wakako Arakaki, Hiroya Oki, Daisuke Motoooka, Shota Nakamura, Jiro Fujita, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104877>; 6) Патент CN 113817868, 08.07.2021, 21.12.2021; 7) Патент CN 113215312, 28.04.2021, 06.08.2021; 8) Патент CN 113005226, 07.02.2021, 22.06.2021]. Однако, использование данных наборов не предполагает быстрой возможности замены мишеней для детекции новых геновариантов, содержащих миссенс мутации или замены.

Детекция дополнительных специфичных для возникающих геновариантов мишеней, так же, как и исключение из анализа мишеней для циркулирующих геновариантов позволяет повысить эффективность лабораторного исследования в целом. В связи с этим существует потребность в разработке олигонуклеотидов для выявления мутации S:delHV69-70 в биологических образцах с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2: праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для проведения ПЦР-РВ.

Технический результат заявляемого изобретения направлен на выявление мутации S:delHV69-70 в биологических образцах с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2 с высокой степенью специфичности посредством таких олигонуклеотидов - праймеров и флуоресцентно-меченого зонда, которые позволяют эффективно определять

5 геновариант SARS-CoV-2 с использованием широко доступных методик и материалов.

Технический результат достигается за счет применения химически-синтезированных олигонуклеотидов для определения наличия мутации S:delHV69-70 в биологическом образце с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2, имеющих следующий олигонуклеотидный состав:

- 10 прямой праймер d6Acv-F - SEQ ID NO: 1;
обратный праймер d6Acv-R - SEQ ID NO: 2;
флуоресцентный зонд d60cv-Z1Y - SEQ ID NO: 3.

Праймеры представляют собой последовательности олигонуклеотидов для амплификации фрагмента, содержащего мутацию S:delHV69-70 в биологических образцах
15 с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2, флуоресцентно-меченный конформационно-блокированный зонд является олигонуклеотидом, содержащим флуорофор и гаситель флуоресценции, позволяющим детектировать амплифицированный фрагмент.

Заявляемые олигонуклеотиды разработаны на основе известной последовательности
20 S-гена SARS-CoV-2, взятых из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), в результате которого выбран фрагмент для детекции мутации S-гена S:delHV69-70. К выбранному фрагменту подобраны праймеры и зонд для амплификации 133/127 пар оснований: прямой праймер d6Acv-F - SEQ ID NO: 1; обратный праймер d6Acv-R - SEQ ID NO: 2 и флуоресцентный зонд d60cv-Z1Y - SEQ ID NO: 3.

25 Заявляемое изобретение является результатом работы в рамках совершенствования молекулярно-генетического мониторинга вариантов SARS-CoV-2, проведенной в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва, Россия).

Для подбора целевых последовательностей - мест посадки олигонуклеотидов, используют фрагменты референсных геномов, взятые из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), как SARS-CoV-2 дикого типа, так и тех геновариантов, в которых встречается мутация S:delHV69-70 (Alpha (B. 1.1.7), Omicron (B. 1.1.529), Eta (B. 1.525),
30 B. 1.620, C.36.3.). Для поиска консервативных последовательностей применяют современные алгоритмы *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей и программы, находящиеся в открытом доступе, включая AlignX, SnapGene Viewer, MEGA,
35 Unipro UGENE. Составляют перечень значимых мутаций, характерных для геновариантов. Затем подбирают олигонуклеотидные последовательности прямого и обратного праймеров, а также флуоресцентно-меченого зонда. Для детекции образцов, содержащих мутацию S:delHV69-70, используют канал для детекции флуорофора R6G. Упомянутые олигонуклеотидные последовательности приведены в Таблице 1.

40 Анализ заявляемых последовательностей с использованием ресурса Primer BLAST продемонстрировал, что прямой праймер d6Acv-F (SEQ ID NO: 1) и обратный праймер d6Acv-R (SEQ ID NO: 2) амплифицируют участок, в котором располагается мутация S: delHV69-70 со 100% специфичностью.

Таблица 1. Оценка специфичности праймеров и зонда для мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2.

Длина специфического фрагмента (п.о.)	SEQ ID NO	Название	5'-3' последовательность	Оценка специфичности для мутации S:delHV69-70
133/127	SEQ ID NO: 1	d6Acv-F	GGA CTT GTT CTT ACC TTT CTT TTC CAA TG	100%
	SEQ ID NO: 2	d6Acv-R	CTC AGT GGA AGC AAA ATA AAC ACC ATC	
	SEQ ID NO: 3	d6Ocv-Z1Y	(R6G)C+CC +A+G+A GAT A+AC +AT (BHQ1)	

Где R6G - флуорофор, BHQ1 – гаситель флуоресценции, + перед нуклеотидом- модификация LNA.

В качестве биологического материала используются мазки/отделяемое носоглотки и ротоглотки, с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2 (например, после проведения анализа на наборе реагентов АмплиСенс® COVTD-19-FL).

Выделение РНК из биологического материала 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». Выделение РНК из биологического материала производят с помощью комплекта реагентов в соответствии с инструкцией производителя. Для выделения РНК может быть использован комплект реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или любой аналогичный набор для

выделения РНК. Оптимальная концентрация РНК 10^3 - 10^5 копий в 10 мкл. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводят с помощью комплекта реагентов в соответствии с инструкцией производителя. Для проведения реакции ОТ может быть использован комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) или любой аналогичный набор. Готовый препарат кДНК может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16°C в течение 6 мес.и при температуре не выше минус 68°C в течение года.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей. Их амплификация осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса.

Процесс ПЦР-амплификации заключается в многократном повторении процессов денатурации, ренатурации и синтеза. Денатурация (95°C) - термическое воздействие на молекулу ДНК с целью получения одноцепочечной структуры. Ренатурация (55-60°C) -праймеры, добавленные в реакцию спариваются с разделенными цепями. Синтез (70-75°C) - синтез второй цепи ДНК. Каждый цикл длится 3-5 мин.

Анализ данных проводится на основе детекции амплификатором уровня флуоресцентного сигнала испускаемого интеркалирующим красителем. При увеличении числа копий анализируемого участка детектируется экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала. В результате наблюдается S-образная кривая в случае наличия

специфичного флуоресцентному зонду сигнала, или ее отсутствие, в случае неспецифичной для зонда последовательности. Анализ кривых позволяет судить об отсутствии или наличии мутации в исследуемых образцах.

ПЦР-РВ проводится с применением заявляемых, представленных в Таблице 1,

⁵ олигонуклеотидов - праймеров и зонда, для детекции мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2.

ПЦР-РВ проводят при следующих условиях:

Общий объем реакционной смеси - 25 мкл.

Компоненты ПЦР смешиваются следующим образом:

¹⁰ (а) 10 мкл смеси, содержащей:

- олигонуклеотидные праймеры SEQ ID NO NO: 1, 2 - по 0,7 мМ;

- флуоресцентный зонд SEQ ID NO: 3 - 0,2 мМ;

- dNTPs - 0,44 мМ.

¹⁵ (б) реактив, содержащий рекомбинантный фермент Таq ДНК-полимеразы, например, 0,5 мкл «Полимераза ТаqF» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) или любого аналогичного коммерческого набора в соответствии с инструкцией производителя.

²⁰ (с) ПЦР-буфер, содержащий MgCl₂, например, 5,0 мкл ПЦР-буфера «ОТ-ПЦР-смесь-2 FEP/FRT» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) или любого аналогичного коммерческого набора в соответствии с инструкцией производителя.

(d) полученная методом обратной транскрипции кДНК - 10 мкл.

Амплификацию проводят на приборе с возможностью флуоресцентной детекции, например, «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) или на любом другом приборе с 2-5 ²⁵ каналами детекции 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 R6G.

³⁰ Для анализа результатов задают пороговую линию, соответствующую величине 10% от среднего сигнала флуоресценции образца с наличием мутации S:delHV69-70. Образцы, для которых кривые флуоресценции пересекают пороговую линию, и, при этом кинетика накопления флуоресцентного сигнала является экспоненциальной, являются положительными, то есть содержат мутацию S:delHV69-70 SARS-CoV-2.

Реализация заявляемого изобретения поясняется следующими примерами:

³⁵ Пример 1. Получение олигонуклеотидов для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2.

Для подбора последовательностей-мишеней - мест посадки олигонуклеотидов использованы фрагменты референсных геномов из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) дикого типа SARS-CoV-2 и геновариантов Alpha (B. 1.1.7), refseq ⁴⁰ MZ344997 (NCBI); Omicron (B. 1.1.529), refseq OL672836 (NCBI). Для поиска мутаций использованы современные алгоритмы *in silico* анализа нуклеотидных последовательностей и программы, находящиеся в открытом доступе, включая Unipro UGENE, олигокалькулятор (Oligo Calculators) Integrated DNA Technologies, Inc. (Oligo Analyzer (idtdna.com)). Подобран участок S-гена, характерного только для мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2, к которому подобраны олигонуклеотидные последовательности прямого d6Acv-F и обратного d6Acv-R праймеров, а также флуоресцентный зонд d60cv-Z1Y.

Анализ упомянутых последовательностей с использованием ресурса Primer BLAST

показал, что прямой d6Acv-F и обратный d6Acv-R праймеры амлифицируют участок с мутацией S:delHV69-70 со 100% специфичностью.

Олигонуклеотиды для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2- прямой праймер d6Acv-F, обратный праймер d6Acv-R, флуоресцентный зонд d6Ocv-Z1Y,

5 представлены уникальными последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно.

Пример 2. Детекция мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ.

Определение мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 проводят методом ПЦР-РВ при следующих условиях:

10 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 0,7 мМ;

- флуоресцентный зонд: SEQ ID NO: 3 - 0,2 мМ;

15 - dNTPs - 0,44 мМ.

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

(с) 5,0 мкл ПЦР-буфера «ОТ-ПЦР-смесь-2 FEP/FRT» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

20 Роспотребнадзора, Россия), содержащего MgCl₂.

(д) полученная после реакции обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) кДНК - 10 мкл.

ПЦР-РВ проводили с флуоресцентной детекцией на приборе с 5 каналами детекции - «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия).

25 Подготовленный описанным способом материал, содержащий уникальные олигонуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1-3, используют для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 в образцах биологического материала.

Пример 3. Обнаружение мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 в образцах биологического материала.

30 Для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 выбрано 88 образцов, с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2.

Для исследования использовали клинический материал - мазки/отделяемое носоглотки и ротоглотки, содержащие РНК SARS-CoV-2. Наличие РНК вируса SARS-CoV-2 подтверждено лабораторно с применением набора реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия).

35 Выделение РНК из биологического материала 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». Выделение РНК осуществляли методом нуклеопреципитации с применением набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией к набору. Обратную транскрипцию проводили с применением набора реагентов «РЕВЕРТА-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией к набору.

40 45 Наличие РНК SARS-CoV-2 подтверждено лабораторно с применением набора реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия). Чувствительность данного набора в отношении мазков/отделяемых носоглотки и ротоглотки, согласно инструкции, составляет $1*10^4$. Специфичность-

100%. ПЦР-РВ проводили в условиях, описанных в Примере 2, с использованием уникальных олигонуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1-3.

Амплификацию проводили на приборе «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 1 цикл 95°C в течение 15 минут, 45 циклов при температуре 95°C

5 -10 секунд / 60°C - 20 секунд. Детекция флуоресценции проводилась на этапе 60°C по каналу для флуорофора R6G. Для анализа результатов задали пороговую линию, соответствующую величине 10% от среднего сигнала флуоресценции образца с наличием мутации S:delHV69-70. Для 87 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию и, при этом кинетика накопления флуоресцентного сигнала была

10 экспоненциальной, что свидетельствует о том, что данные образцы содержат мутацию S:delHV69-70 SARS-CoV-2.

Для данных 87 образцов наличие мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 подтверждено фрагментным секвенированием с использованием метода секвенирования по Сэнгеру.

15 Фрагментное секвенирование выполнялось на генетическом анализаторе ABI 3500xL (Applied Biosystems, США), выравнивание и анализ полученных последовательностей выполнялось с помощью программы AlignX («Thermo Fisher Scientific», США).

Отсутствие мутации в 1 образце без флуоресцентного сигнала также подтверждено фрагментным секвенированием.

Таким образом, из всей выборки выявлено 87 образца, содержащих мутацию S:

20 delHV69-70 SARS-CoV-2.

Пример 4. Обнаружение мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 в образцах биологического материала.

Для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 выбрано 96 образцов, с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2.

25 Для исследования использовали клинический материал - мазки/отделяемое носоглотки и ротоглотки, содержащие РНК SARS-CoV-2.

Выделение РНК из биологического материала проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нукleinовых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV

30 групп патогенности». Выделение РНК осуществляли методом нуклеопреципитации с применением набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией к набору. Обратную транскрипцию проводили с применением набора реагентов «РЕВЕРТА-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) в соответствии с

35 инструкцией к набору. Наличие РНК вируса SARS-CoV-2 подтверждено лабораторно с применением набора реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия). Чувствительность данного набора в отношении мазков/отделяемых носоглотки и ротоглотки, согласно инструкции, составляет $1*10^4$ копий/мл. Специфичность - 100%.

40 ПЦР-РВ проводили в условиях, описанных в Примере 2, с использованием уникальных олигонуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1-3.

Амплификацию проводили на приборе «Real-time CFX96 Touch» («Bio-Rad», США) 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 проводилась на этапе 60°C

45 по каналу для флуорофора R6G. Для анализа результатов задали пороговую линию, соответствующую величине 10% от среднего сигнала флуоресценции образца с наличием мутации S:delHV69-70. Для 71 образца кривая флуоресценции пересекла пороговую линию и, при этом кинетика накопления флуоресцентного сигнала была

экспоненциальной, что свидетельствует о том, что данные образцы содержат мутацию S:delHV69-70 SARS-CoV-2. Отсутствие мутации в 25 образцах без флуоресцентного сигнала также подтверждено фрагментным секвенированием.

Таким образом, из всей выборки выявлен 71 образец, содержащий мутацию S:delHV69-70 SARS-CoV-2.

Пример 5. Обнаружение мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 в образцах биологического материала.

Для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 выбрано 5 образцов, с подтвержденным наличием РНК SARS-CoV-2.

Для исследования использовали клинический материал - мазки/отделяемое носоглотки и ротоглотки, содержащие РНК SARS-CoV-2. Выделение РНК из биологического материала 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». Выделение РНК осуществляли методом нуклеопреципитации с применением набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией к набору. Обратную транскрипцию проводили с применением набора реагентов «РЕВЕРТА-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией к набору. Наличие РНК SARS-CoV-2 подтверждено лабораторно с применением набора реагентов АмплиСенс® COVID-19-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия). Чувствительность данного набора в отношении мазков/отделяемых носоглотки и ротоглотки, согласно инструкции, составляет $1*10^4$. Специфичность - 100%.

ПЦР-РВ проводили в условиях, описанных в Примере 2, с использованием уникальных олигонуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1-3.

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 флуоресценции проводилась на этапе 60°C по каналу для флуорофора R6G. Для анализа результатов задали пороговую линию, соответствующую величине 10% от среднего сигнала флуоресценции образца с наличием мутации S:delHV69-70. Кривая флуоресценции не пересекла пороговую линию, что свидетельствовало о том, что в выборке отсутствуют образцы, содержащие мутацию S:delHV69-70 вируса SARS-CoV-2.

Наличие других мутаций вируса SARS-CoV-2 в данных 5 образцах и отсутствие мутации S:delHV69-70 подтверждено фрагментным секвенированием с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Фрагментное секвенирование выполнялось на генетическом анализаторе ABI 3500xL (Applied Biosystems, США), выравнивание и анализ полученных последовательностей выполнялось с помощью программы AlignX («Thermo Fisher Scientific»), США.

Заявляемое изобретение позволяет выявлять мутацию S:delHV69-70 SARS-CoV-2 в биологических образцах с подтвержденным наличием РНК вируса SARS-CoV-2. Синтезированные олигонуклеотиды SEQ ID NO NO: 1-3 не дают перекрестных реакций с другими протестированными образцами, амплифицируют заданный участок со 100% специфичностью и позволяют определять наличие или отсутствие в образцах биологического материала значимой мишени S:delHV69-70.

(57) Формула изобретения

1. Набор праймеров и зонда для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2,

имеющий следующий состав:

прямой праймер d6Acv-F - SEQ ID NO: 1;
обратный праймер d6Acv-R - SEQ ID NO: 2;
флуоресцентный зонд d6Ocv-Z1Y - SEQ ID NO: 3.

5 2. Набор праймеров и зонда для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 по
п. 1, где для создания прямого и обратного праймеров, флуоресцентного зонда
используют фрагменты референсных геномов SARS-CoV-2 дикого типа, Alpha (B.1.1.7),
Omicron (B.1.529), Eta (B.1.525), B.1.620, C.36.3.

10 3. Набор праймеров и зонда для определения мутации S:delHV69-70 SARS-CoV-2 по
п. 1, где флуоресцентный зонд является олигонуклеотидом, содержащим флуорофор
R6G и гаситель флуоресценции BHQ1, позволяющий детектировать амплифицированный
фрагмент.

15

20

25

30

35

40

45