



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/6806 (2021.05); C12N 15/11 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2021101361, 22.01.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.01.2021

Дата регистрации:
11.08.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.01.2021

(45) Опубликовано: 11.08.2021 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4,
ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава
России, В.Г. Савченко

(72) Автор(ы):

Абдуллаев Адхамжон Одилович (UZ),
Макарик Татьяна Викторовна (RU),
Судариков Андрей Борисович (RU),
Февралёва Ирина Серафимовна (RU),
Глинщикова Ольга Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр гематологии"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ФГБУ "НМИЦ гематологии"
Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2732608 C1, 21.09.2020. US
10689716 B1, 23.06.2020. RU 2720713 C1,
12.05.2020.

(54) Набор олигонуклеотидов и способ мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для выявления РНК SARS-CoV-2

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и молекулярной биологии, а именно к молекулярно-генетической диагностике COVID-19 на основе выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2. Синтезированные олигонуклеотиды праймеры и флуоресцентные зонды являются комплементарными исключительно нуклеотидной последовательности (ORF1ab и N участка) генома коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена ABL1. А также разработан способ детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью мультиплексной ПЦП-РВ, основанной на амплификации ORF1ab и N участков гена

коронавируса SARS-CoV-2 и человеческой РНК гена ABL1 в качестве внутреннего контроля. Изобретение позволяет достоверно подтвердить клинический диагноз COVID-19 с минимальным количеством исследуемого материала, 10 мкл, путем контроля качества отбора пробы и выделения РНК по амплификации РНК человеческого гена ABL1 и определения присутствия/отсутствия РНК коронавируса SARS-CoV-2 по амплификации относительно контрольных образцов. 2 н.п. ф-лы, 5 ил., 6 табл., 5 пр.

RU 2 752 902 C1

RU 2 752 902 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/6806 (2021.05); C12N 15/11 (2021.05)(21)(22) Application: **2021101361, 22.01.2021**(24) Effective date for property rights:
22.01.2021Registration date:
11.08.2021

Priority:

(22) Date of filing: **22.01.2021**(45) Date of publication: **11.08.2021** Bull. № 23

Mail address:

**125167, Moskva, Novyj Zykovskij pr-d, 4, FGBU
"NMITS gematologii" Minzdrava Rossii, V.G.
Savchenko**

(72) Inventor(s):

**Abdullaev Adkhamzhon Odilovich (UZ),
Makarik Tatyana Viktorovna (RU),
Sudarikov Andrej Borisovich (RU),
Fevraleva Irina Serafimovna (RU),
Glinshchikova Olga Anatolevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr gematologii" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBU
"NMITS gematologii" Minzdrava Rossii) (RU)**(54) **SET OF OLIGONUCLEOTIDES AND METHOD OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION
IN REAL TIME FOR DETECTION OF RNA SARS-COV-2**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine and molecular biology, namely to the molecular genetic diagnosis of COVID-19 based on the detection of RNA of the SARS-CoV-2 coronavirus. The synthesized oligonucleotide primers and fluorescent probes are complementary exclusively to the nucleotide sequence (ORF1ab and N region) of the genome of the SARS-CoV-2 coronavirus and the human ABL1 gene. Also developed a method for detecting SARS-CoV-2 coronavirus RNA using multiplex RT-PCR based on

amplification of ORF1ab and N regions of the SARS-CoV-2 coronavirus gene and human RNA ABL1 gene as an internal control.

EFFECT: invention allows reliably confirming the clinical diagnosis of COVID-19 with a minimum amount of the test material, 10 mcl, by monitoring the quality of sampling and RNA isolation by amplifying the RNA of the human ABL1 gene and determining the presence/absence of SARS-CoV-2 coronavirus RNA by amplification relative to control samples.

2 cl, 5 dwg, 6 tbl, 5 ex

Изобретение относится к области медицины и молекулярной биологии, а именно к молекулярно-генетической диагностике COVID-19 на основе выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале пациентов с подозрением на COVID-19.

5 В конце декабря 2019 г. в городе Ухань (КНР) были отмечены первые случаи пневмонии, возбудителем которой оказался новый коронавирус 2019-nCoV. В начале февраля 2020 г. международный комитет по таксономии вирусов дал официальное название новому коронавирусу, как SARS-CoV-2 {Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), а заболевание получило название COVID-19 (Coronavirus disease 2019).

10 Выявление РНК вируса SARS-CoV-2 основано на постановке полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с обратной транскрипцией и рекомендовано Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в качестве молекулярно-генетического метода диагностики COVID-19 [1].

Известен «Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления РНК коронавируса» [2], состоящий из 6 пар синтетических олигонуклеотидов. Однако, предлагаемый набор имеет ряд недостатков, заключающихся в том, что все 6 пар предлагаемых синтетических олигонуклеотидов являются специфичными только одному ORF1b участку генома коронавируса SARS-CoV-2 и предназначены для анализа ПЦР реакции по температуре плавления ПЦР продукта с присутствием интеркалирующего красителя SYBR Green или методом горизонтального гель-электрофореза. Таким образом, они не соответствуют критериям, рекомендованным ВОЗ для выявления РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР-РВ. Также представленный способ обладает относительно низкой чувствительностью.

Известен «Способ выявления кДНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции» [3]. Вышеуказанный способ имеет ряд недостатков, а именно: способ имеет низкую чувствительность, обусловленную электрофоретической детекцией ПЦР продуктов в 1,5%-ном агарозном геле, также отсутствует возможность контроля эффективности прохождения ПЦР реакции, что отражено на рисунке 1 в описании к изобретению, где количество ПЦР продукта значительно меньше в реакции с праймерами на участок ORF1ab по сравнению с праймерами на участок N1. Кроме того, имеется высокий риск контаминации при работе с ПЦР продуктом на этапах электрофоретической детекции и необходимость наличия достаточного количества исходного материала, так как реакция для исследования одного образца должна проходить в 4-х отдельных пробирках.

35 Известен метод обнаружения коронавируса [4]. Основным недостатком предложенного способа обнаружения коронавируса является низкая чувствительность, обусловленная использованием для визуализации продукта амплификации тест полосок (из фильтровальной бумаги или хитозана, пропитанных стрептавидином) по сравнению с рекомендованной ВОЗ.

40 Известны «Тест-система и способ для выявления РНК коронавируса SARS-COV-2, вируса-возбудителя коронавирусного заболевания 2019 COVID-19 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (варианты)» [5]. Основным недостатком описанного способа является использование в качестве положительного контроля праймеров специфичных для мРНК человеческих генов GAPDH (SBT0014 и SBT0015) и АСТВ (SBT0011 и SBT0012), амплифицирующих в реакции ПЦР также геномные последовательности ДНК GAPDH (NG_007073.2) и АСТВ (NG_007992.1). Учитывая, что в исходном материале мРНК всегда присутствуют примеси человеческой ДНК, использование этих праймеров в качестве внутреннего контроля прохождения

реакции обратной транскрипции (получения кДНК) не корректно. Более того, сравнение уровней экспрессии GAPDH в 72 различных тканях человека показало относительно низкую экспрессию его в органах дыхательной системы [6].

Также, Ishige Т. и соавторами была опубликована статья о высокочувствительной мультиплексной RT-PCR для молекулярной диагностики COVID-19 в клинических лабораториях с использованием ранее известных праймеров, в том числе для человеческой мРНК гена ABL1 [7]. Однако, нуклеотидные последовательности праймеров и зонда для мРНК ABL1, заимствованные из работ Veillard, E и соавторов, могут также амплифицировать геномную нуклеотидную последовательность ABL1 человека [8] и не эффективны для контроля прохождения реакции обратной транскрипции.

Основной задачей, решаемой настоящим изобретением является синтез специфических синтетических олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов, амплифицирующих в реакции ПЦР-РВ только нуклеотидные последовательности генома коронавируса SARS-CoV-2 и человеческой мРНК со стабильной экспрессией в различных клетках человека. А также разработка способа мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для выявления РНК SARS-CoV-2, гарантирующего надежный результат анализов по двум областям генома коронавируса, и не имеющего перечисленных выше недостатков.

Поставленная задача решается данной группой изобретений. В рамках данной разработки сконструированы синтетические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды с оригинальной нуклеотидной последовательностью специфичной двум (ORF1ab и N) генам SARS-CoV-2 и разработан надежный способ мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для выявления РНК SARS-CoV-2. Разработанный способ из-за мультиплексности (все реакция по трем каналам проходят в одной пробирке с 10 мкл кДНК) процесса амплификации требует малое количество исследуемого материала и содержит в качестве внутреннего контроля синтезированные олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентный зонд человеческого гена ABL1, позволяющие контролировать качество и количество исследуемого образца, при этом не имеет риска контаминации при использовании.

Технический результат изобретения заключается в расширении арсенала средств молекулярно-генетической диагностики коронавирусной болезни COVID-19, а также в повышении достоверности и надежности диагностики новой инфекции, за счет гарантированного определения наличия в образце достаточного количества генетического материала человека.

Дополнительным техническим результатом является возможность проведения анализа с относительно низким количеством исследуемого материала за счет совмещенности ПЦР-РВ в одной пробирке, и использования внутреннего контроля определения высококопийной мРНК человека, позволяющий оценить наличие человеческого биологического материала в мазке и, таким образом, исключить ложно-отрицательные результаты, связанные с некачественным взятием мазка или попыткой фальсификации пробы.

Сущность изобретения пояснена на графических материалах: Фиг. 1 - где число циклов (Ct) и кривые накопления продуктов мультиплексной ПЦР-РВ представлены по трем разным каналам детекции: человеческой кДНК ABL1 в желтом (RG) и генов ORF1ab и гена N коронавируса SARS-CoV-2 в оранжевом (ROX) и красном каналах (Cy5); Фиг. 2 - Схематическое представление графических кривых и пороговых циклов мультиплексной ПЦР-РВ по трем каналам амплификации и варианты интерпретации

результатов анализа;

Фиг. 3 - Графики кривых мультиплексной ПЦР-РВ и значение пороговых циклов человеческого гена ABL1 и ORF1ab коронавируса SARS-CoV-2 в материале от пациентов с COVID-19 и здоровых доноров;

5 Фиг. 4 - Графики кривых ПЦР-РВ и значение пороговых циклов человеческого гена ABL1 и ORF1ab коронавируса SARS-CoV-2

Примечание:

№536 и 537 образцы мазков, взятых из носовой полости и ротоглотки пациентов с подозрением на COVID-19,

10 ПКО - положительный контрольный образец, содержащий кДНК SARS-CoV-2, выделенную из мазка носовой полости пациента с COVID-19,

ОКО - отрицательный контрольный образец, содержащий кДНК ABL1, выделенную из мазка носовой полости здорового человека;

15 Фиг. 5 - Хроматограмма прямого секвенирования по Сэнгеру ORF1a участка генома SARS-CoV-2.

Сущность изобретения пояснена следующими перечнями последовательностей нуклеотидов, комплементарных участкам генома коронавируса SARS-CoV-2 (NC_045512.2) и ABL1 (NM_005157.6):

20 SEQ ID NO: 1 последовательность нуклеотидов комплементарная 3211-3234 нуклеотидам генома коронавируса SARS-CoV-2;

SEQ ID NO: 2 последовательность нуклеотидов комплементарная 3307-3328 нуклеотидам генома коронавируса SARS-CoV-2;

SEQ ID NO: 3 последовательность нуклеотидов комплементарная 3240-3262 нуклеотидам генома коронавируса SARS-CoV-2;

25 SEQ ID NO: 4 последовательность нуклеотидов комплементарная 28715-28734 нуклеотидам генома коронавируса SARS-CoV-2;

SEQ ID NO: 5 последовательность нуклеотидов комплементарная 28774-28793 нуклеотидам генома коронавируса SARS-CoV-2;

30 SEQ ID NO:6 последовательность нуклеотидов комплементарная 28735-28759 нуклеотидам генома коронавируса SARS-CoV-2;

SEQ ID NO:7 последовательность нуклеотидов комплементарная 684-703 нуклеотидам мРНК ABL1;

SEQ ID NO: 8 последовательность нуклеотидов комплементарная 748-768 нуклеотидам мРНК ABL1;

35 SEQ ID NO: 9 последовательность нуклеотидов комплементарная 777-796 нуклеотидам мРНК ABL1;

Конкретная реализация заявляемого изобретения представлена созданием синтетических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов для детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2, комплементарных уникальным нуклеотидным 40 последовательностям генов коронавируса SARS-CoV-2, нуклеотидные последовательности которых представлены в таблице 1, и мРНК человеческого гена ABL1, нуклеотидные последовательности которого представлены в таблице 2, а также разработкой способа мультиплексной ПЦР-РВ.

45

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности синтетических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов для детекции РНК коронавируса SARS-CoV-2

Ген-мишень	Название	5' → 3' последовательность
ORF1ab	ORF1ab_Fv	TGATAGTCAACAAACTGTTGGTCA
	ORF1ab_Rv	CTGAACAACCTGGTGTAAAGTTCC
	ORF1ab_Pr	ROX 5' - ACGGCAGTGAGGACAATCAGACA -3' BQH1
N	N_Fv	ACCCGCAATCCTGCTAACAA
	N_Rv	CTGCGTAGAAGCCTTTTGGC
	N_Pr	Cy5 5' - TGCTGCAATCGTGCTACAACCTCCT -3' BQH2

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности синтетических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда мРНК человеческого гена ABL1

Ген-мишень	Название	5' → 3' последовательность
ABL1	ABL1_Fv	CGCTGAGATACGAAGGGAGG
	ABL1_Rv	ATGATGAACCAACTCGGCCA
	ABL1_Pr	R6G 5' - CGTCTCCTCCGAGAGCCGCT -3' BQH1

Способ выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью мультиплексной ПЦР-РВ осуществляется с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов (таблица 1), 10^x ПЦР буфера, смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, MgCl₂, Taq полимеразы, положительного (ПКО) и отрицательного (ОКО) контрольных образцов, внутреннего контроля, в виде олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда человеческого гена ABL1 (таблица 2). Перечень, концентрация и объем компонентов представлены в таблице 3.

Таблица 3. Состав смеси мультиплексной ПЦР-РВ на одну реакцию в объеме 25 мкл

Название	Состав	Объем, мкл
Раствор 1	Смесь праймеров и флуоресцентных зондов для ORF1ab и N генов коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена ABL1	7,5
Раствор 2	10 ^x ПЦР буфер, эквивалентная смесь четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, Taq-полимеразы, MgCl ₂ 25мМ	7,5
Образец	кДНК из мазков носовой полости или ротоглотки	10
ПКО	кДНК SARS-CoV-2	10 *
ОКО	кДНК из мазка носовой полости здорового человека	10 *

Примечание. * ПКО и ОКО набирают по 10 мкл в отдельную пробирку.

Сущность группы изобретений пояснена примерами конкретной реализации, которые не ограничивают объем изобретения. Пример 1. Постановка мультиплексной ПЦР-РВ.

Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 осуществляют с помощью мультиплексной ПЦР-РВ в одной пробирке, способ включает следующие этапы.

Отбор исследуемого материала. Исследуемый материал отбирается из носоглотки или ротоглотки с использованием специальных тампонов и полным соблюдением требований безопасности при работе с инфекционными агентами 2-3 группы патогенности.

5 Выделение РНК исследуемого материала. Выделение РНК из содержимого осуществляется общепринятым стандартным методом с использованием реагентов, предназначенных для этой цели.

Получение кДНК исследуемого материала. Получение кДНК осуществляется путем реакции обратной транскрипции (ОТ) общепринятым стандартным методом с наборами реагентов, предназначенных для этой цели. Для проведения реакции необходима РНК 10 исследуемого образца в объеме по крайней мере 10 мкл.

Проведение реакции. Компоненты реакционной смеси и их количество для одной реакции мультиплексной ПЦР-РВ представлены в таблице 3. Для одной реакции мультиплексной ПЦР-РВ с объемом 25 мкл готовят смесь раствора 1 (смесь праймеров и флуоресцентных зондов для ORF1ab и N генов коронавируса SARS-CoV-2 и человеческого гена ABL1) и раствора 2 (10x ПЦР буфер, эквивалентная смесь четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов, Taq-полимераза, MgCl₂ 25 мМ) по 7,5 мкл каждого, соответственно. Смесь реагентов готовят с учетом еще двух (ПКО и ОКО) контрольных образцов. В микропробирки с реагентами для исследуемых образцов вносят по 10 мкл кДНК, а в микропробирки для ПКО и ОКО вносят по 10 мкл положительный и отрицательный контрольные образцы. Мультиплексную ПЦР-РВ проводят в амплификаторе "Rotor-Gene Q" («Qiagen», USA) или CFX96 Touch ("Bio-Rad" США) в температурном профиле: 95°C - 600 с, 45 циклов 95°C - 20 с, 60°C - 45 с.

Интерпретация результатов мультиплексной ПЦР-РВ. Принцип оценки анализа 25 заключается в определении значений порогового числа (Ct) циклов амплификации по каждому из трех каналов (Фиг. 1). Критерии оценки представлены в таблице 4 и пояснены на Фиг. 2.

Таблица 4. Интерпретация результатов мультиплексной ПЦР-РВ.

№ п/п	Желтый (ABL1)	Оранжевый (ORF1ab)	Красный (N)	Интерпретация результатов
1.	+	+	+	Положительный
2.	+	-	-	Отрицательный

3.	-	-	-	Нет / недостаточно материала для исследования
4.	+	+	-	Сомнительный результат
5.	+	-	+	Сомнительный результат

40 Примечание. Сомнительный результат требует повторной перестановки мультиплексной ПЦР-РВ с имеющейся кДНК. В случае повторного получения сомнительного результата рекомендуется постановка реакции другими наборами.

Пример 2. Поступили образцы мазков №536 и №537 из носоглотки от двух пациентов с подозрением на COVID-19. Выделение РНК в объеме 30 мкл и получение кДНК осуществлено с использованием набора реагентов для выделения РНК «Амплисorb» и «Reverta L» компании Интерлабсервис (Россия), согласно инструкции производителя.

Далее собрана реакционная смесь в объеме 25 мкл для мультиплексной ПЦР-РВ в

соответствии с таблицей 3.

Мультиплексная ПЦР-РВ осуществлена в амплификаторе «Rotor-Gene Q («Qiagen», USA) в температурном профиле: 95°C - 600 с, 45 циклов 95°C -20 с, 60°C-45 с.

Обработанные результаты представлены на Фиг 4.

5 Интерпретация результатов. Образцы мазков №536 и №537 содержат достаточное количество исходного материала, на что указывает значение Ct амплификации РНК человеческого гена ABL1 в контрольных (ПКО и ОКО) и анализируемом образце, по желтому (yellow) каналу. В оранжевом (orange) и красном (red) канале отражается Ct ORFlab и N генов коронавируса SARS-CoV-2 в исследуемом и ПКО образцах. Результат
10 мультиплексной ПЦР-РВ показал присутствие РНК коронавируса SARS-CoV-2 в исследуемых образцах.

Пример 3. Для проверки аналитической возможности предлагаемого способа из мазков носоглотки и ротоглотки 32 пациентов с COVID-19 и 22 здоровых доноров
15 крови были выделены РНК и ДНК. Все образцы предварительно анализированы с использованием набора реагентов "ПЦР-РВ -2019-nCov" (ФГБУ "48 ЦНИИ" МО РФ) на наличия РНК SARS-COV-2. Выделение РНК и получения кДНК осуществлено с использованием набора реагентов "РИБО-преп" и "Реверта-L" ("Интерлабсервис" Россия), согласно инструкции производителя. Мультиплексная ПЦР-РВ проведена на амплификаторе "Rotor-Gene Q" («Qiagen», USA) в режиме: 95°C - 600 с, 45 циклов 95°C -
20 20 с, 60°C - 45 с. Среднее значение пороговых циклов (Ct) в условиях конкурентной амплификации по различным каналам приведены в таблице 5.

25 Таблица 5. Среднее значение пороговых циклов (Ct) в условиях конкурентной амплификации по различным каналам с различными биоматериалами

Образцы кДНК/ДНК	Число циклов	Ct(ABL1)	Ct(ORFlab)	Ct(N)
РНК из мазка носоглотки больных с COVID-19	32	25,70	17,69	16,03
30 РНК из мазка ротоглотки больных с COVID-19	32	24,14	18,05	15,61
ДНК из мазка носоглотки больных с COVID-19	32	-	-	-
ДНК из мазка ротоглотки больных с COVID-19	32	-	-	-
РНК из мазка носоглотки здоровых доноров	22	27,13	-	-
35 РНК из мазка ротоглотки здоровых доноров	22	28,04	-	-
ДНК из мазка носоглотки здоровых доноров	22	-	-	-
ДНК из мазка ротоглотки здоровых доноров	22	-	-	-

40 Как видно, из таблицы 5, разработанный набор синтетических олигонуклеотидов и флюоресцентных зондов для контрольного гена является исключительно РНК специфичным, что делает возможными его применение в качестве внутреннего контроля прохождения реакции обратной транскрипции.

Пример 4. Специфичность набора предлагаемых синтетических олигонуклеотидов и флюоресцентных зондов исключительно в отношении РНК вируса SARS-CoV-2 была
45 проверена методом прямого секвенирования по Сэнгеру полученных продуктов мультиплексной ПЦР-РВ с использованием праймеров представленных в таблице 6.

Таблица 6. Нуклеотидные последовательности синтетических олигонуклеотидных праймеров для секвенирования участка генов ORFlab и N коронавируса SARS-CoV-2

Ген-мишень	Название	5' → 3' последовательность
ORF1ab	ORF1ab_F	5'- CCCTCCAGATGAGGATGAAGAAG- 3'
	ORF1ab_F	5'- TGCAACACCTCCTCCATGTTT- 3'
N	NF_seq	5'- CGAGGACAAGGCGTTCCAAT - 3'
	NR_seq	5' - АСТГСТГСТГГГГТТГААТ - 3'

Хроматограмма прямого секвенирования по Сэнгеру ORF1a участка генома SARS-CoV-2 представлена на Фиг. 5. Согласно сравнению с базой данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/coronaviruses/genomes/> прочитанные нуклеотидные последовательности 100% соответствуют только различным изолятам SARS-CoV-2. Таким образом, изобретение позволяет достоверно подтвердить клинический диагноз COVID-19 путем контроля качества отбора пробы и выделения РНК по амплификации РНК человеческого гена ABL1 и присутствия/отсутствия РНК коронавируса SARS-CoV-2 относительно контрольных образцов и может быть использовано в молекулярно-генетической диагностике.

Пример 5. Специфичность предлагаемого способа ПЦР-РВ исследовали на образцах мазков из носоглотки 133 пациентов с клиническим диагнозом COVID-19, подтвержденным зарегистрированными в РФ наборами для выявления коронавируса SARS-CoV-2 компании «BIONEER» (Южная Корея) и ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Россия). Контрольной группой послужили 69 образцов мазков из носоглотки и ротоглотки здоровых доноров крови, SARS-CoV-2 негативность которых также подтверждена вышеуказанными наборами. Специфичность способа оказалась равной 98,5% (SARS-CoV-2 положительными были 131 из 133 образцов). Результаты части исследований представлены на Фиг 3.

Источники информации, принятые во внимание при составлении описания изобретения к заявке на выдачу патента РФ на изобретение «Набор олигонуклеотидов и способ мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для выявления РНК SARS-CoV-2»:

1. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>.
2. Патент RU 2720713 «Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления РНК коронавируса», С12Q 1/6806, опубликован 12.05.2020 г.
3. Патент RU 2727054 «Способ выявления кДНК коронавируса SARS-CoV-2 с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции», С12Q 1/6806, опубликован 17.07.2020 г.
4. Патент US 10689716 «Materials and methods for detecting coronavirus», С12Q 1/68, С12Q1/70, опубликован 23.06.2020 г.
5. Патент RU 2731390 «Тест-система и способ для выявления РНК коронавируса SARS-COV-2, вируса-возбудителя коронавирусного заболевания 2019 COVID-19, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Варианты)», С12Q 1/6806, опубликован 02.09.2020 г.
6. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389-395. doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005.
7. Ishige T, Murata S, Taniguchi T, Miyabe A, Kitamura K, Kawasaki K, Nishimura M, Igari H, Matsushita K. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for

molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. Clin Chim Acta. 2020 Aug;507:139-142. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.023. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32335089; PMCID: PMC7179514.

8. Beillard, E., Pallisgaard, N., van der Velden, V. et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 17, 2474-2486 (2003). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403136>.

Перечень последовательностей

- <110> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России)
- Federal Governmental Budgetary Institution «National Research Center for Hematology»
- <120> Набор олигонуклеотидов и способ мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для выявления РНК SARS-CoV-2
- <160> 9
- <210> 1
- <211> 24
- <212> RNA
- <213> Betacoronavirus
- <400> 1
- TGATAGTCAA CAAACTGTTC GTCA
- <210> 2
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Betacoronavirus
- <400> 2
- CTGAACAACCT GGTGTAAGTT CC
- <210> 3
- <211> 23
- <212> RNA
- <213> Betacoronavirus
- <400> 3
- ACGGCAGTGA GGACAATCAG ACA
- <210> 4
- <211> 20
- <212> RNA
- <213> Betacoronavirus
- <400> 4
- ACCCGCAATC CTGCTAACAA
- <210> 5
- <211> 20
- <212> RNA
- <213> Betacoronavirus
- <400> 5
- CTGCGTAGAA GCCTTTTGGC
- <210> 6
- <211> 25

<212> RNA
 <213> Betacoronavirus
 <400> 6
 TGCTGCAATC GTGCTACAAC TTCCT
 5 <210> 7
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Homo
 <400> 7
 10 CGCTGAGATA CGAAGGGAGG
 <210> 8
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Homo
 15 <400> 8
 ATGATGAACC AACTCGGCCA
 <210> 9
 <211> 20
 <212> RNA
 20 <213> Homo
 <400> 9
 CGTCTCCTCC GAGAGCCGCT

(57) Формула изобретения

25 1. Набор синтетических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов, комплементарных нуклеотидной последовательности генов ORF1ab и N коронавируса SARS-CoV-2, для использования в способе мультиплексной ПЦР-РВ для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2:

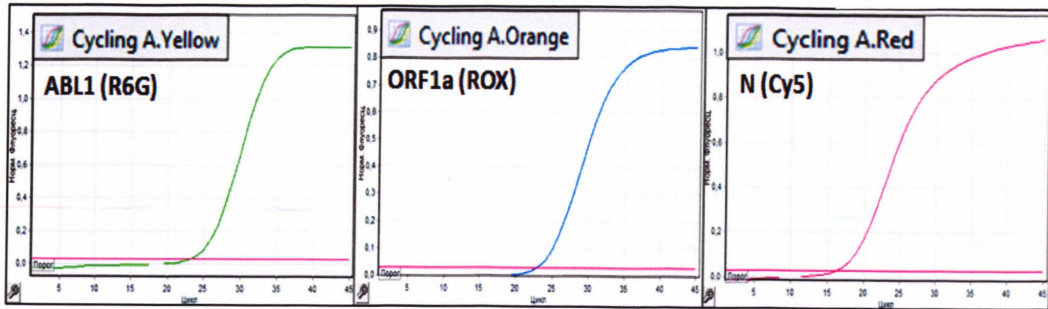
ORF1ab_Fv: 5'-TGATAGTCAACAACCTGTTGGTCA-3';
 30 ORF1ab_Rv: 5'-CTGAACAACCTGGTGTAAAGTTCC-3';
 ORF1ab_Pr: FAM 5'-ACGGCAGTGAGGACAATCAGACA-3' BQH1;
 N_Fv: 5'-ACCCGCAATCCTGCTAACA-3';
 N_Rv: 5'-CTGCGTAGAAGCCTTTTGGC-3';
 N_Pr: ROX 5'-TGCTGCAATCGTGCTACAACCTCCT-3' BQH2.

35 2. Способ мультиплексной ПЦР-РВ для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 с использованием набора синтетических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов по п.1, 10х ПЦР буфера, смеси четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов, Taq-полимеразы, MgCl₂, внутреннего контроля качества и количества исследуемого образца в виде, при этом реакция проходит в одной пробирке

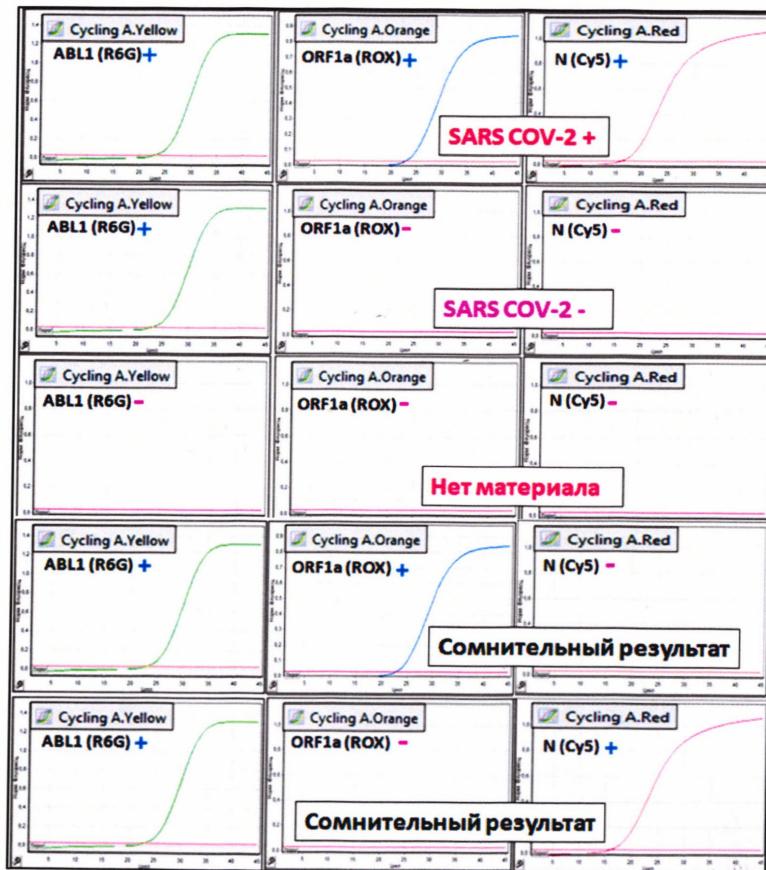
40 с кДНК в объеме 10 мкл анализируемого синтетических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда, комплементарных нуклеотидной последовательности человеческой мРНК гена ABL1:

ABL1_Fv: 5'-CGCTGAGATACGAAGGGAGG-3';
 ABL1_Rv: 5'-ATGATGAACCAACTCGGCCA-3';
 45 ABL1_Pr: R6G 5'-CGTCTCCTCCGAGAGCCGCT-3' BQH1;
 характеризующийся также тем, что реакция проходит в одной пробирке.

1

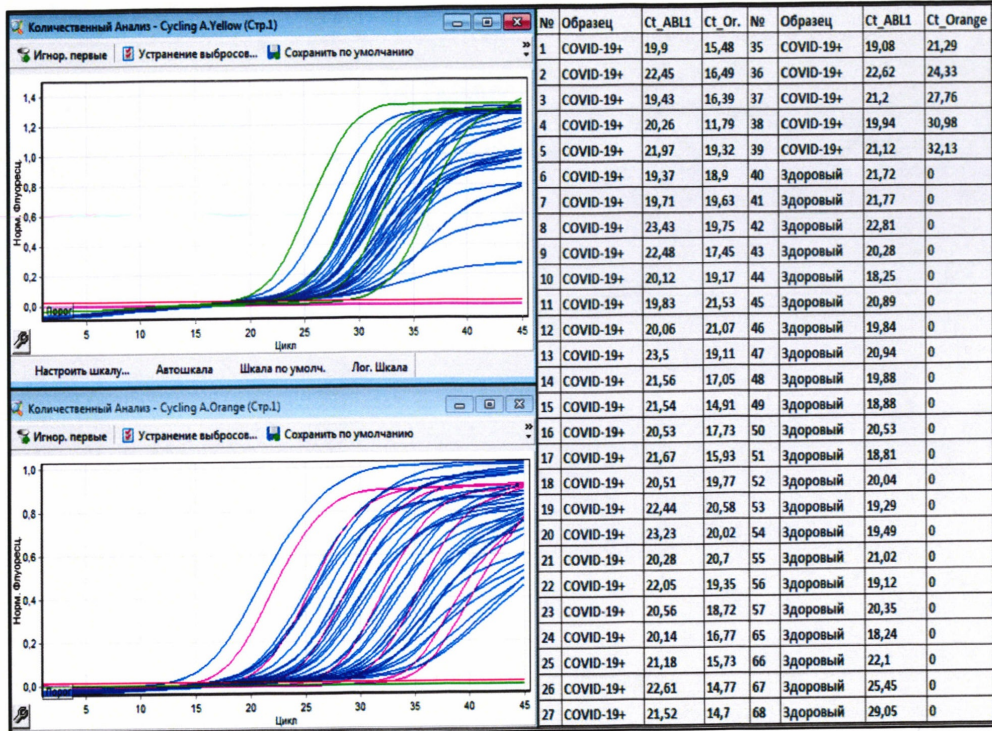


Фиг. 1

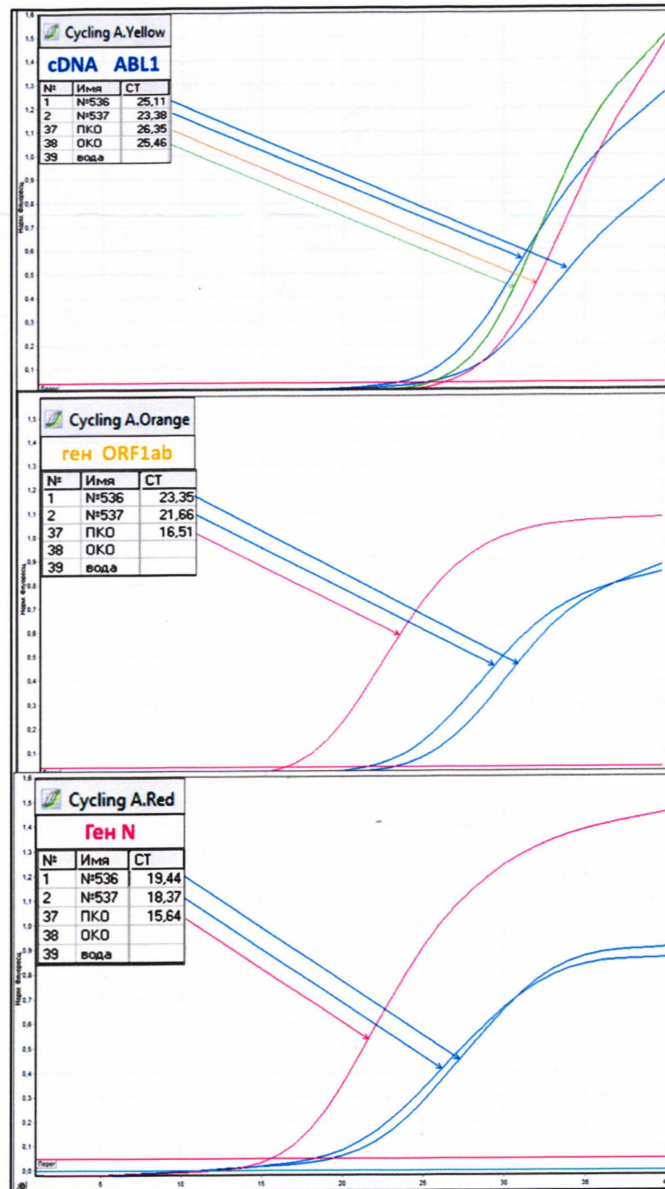


Фиг. 2

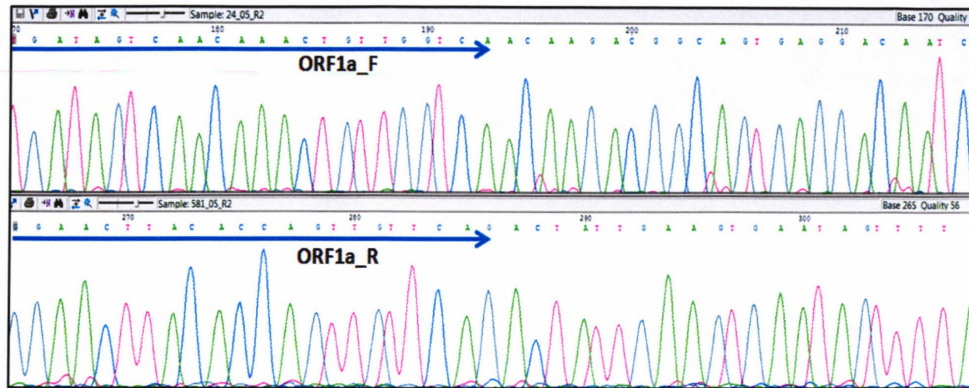
2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5