



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/6804 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023109451, 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,  
Патентоведу правового управления ФБУН  
ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

(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: WO 2008107377 A2, 12.09.2008. WO  
2007025989 A2, 08.03.2007. 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/ru/numbers/  
2021/3/1723/html](http://www.stm-journal.ru/ru/numbers/2021/3/1723/html). Барбараш О.Л. и др. РОЛЬ  
ПОЛИМОРФИЗМА (см. прод.)

(54) Способ генотипирования гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 и набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для его реализации

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ генотипирования аллелей С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100, 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 С гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 определяется посредством оценки кривых накопления

флуоресцентных сигналов по каналу для флуорофора FAM, а наличие в образце биологического материала аллели Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 определяется посредством оценки кривых накопления флуоресцентных сигналов по каналу для флуорофора R6G. Предложен набор праймеров для осуществления заявленного способа. Изобретение позволяет детектировать аллели rs3804100-С и rs3804100-Т гена TLR2 в образцах биологического материала методом ПЦР в режиме реального времени. 2 н. и 3 з. п. ф-лы, 1

табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

**ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ АТЕРОСКЛЕРОЗА,**  
Российский кардиологический журнал N 12 (128), 2015, с.72-79.

R U 2 8 0 5 8 6 0 C 1

R U 2 8 0 5 8 6 0 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12Q 1/6804* (2023.08)

(21)(22) Application: **2023109451, 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,  
Patentovedu pravovogo upravleniya FBUN TSNII  
Epidemiologii Rospotrebnadzora**

(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 TLR2 GENE USING RS3804100 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 C and T alleles of TLR2 gene using rs3804100 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 C allele of TLR2 gene for rs3804100 polymorphism is determined by assessing the accumulation curves of fluorescent signals through

the channel for the FAM fluorophore, and the presence in the biological material of T allele of TLR2 gene for rs3804100 polymorphism is determined by assessing the curves accumulation of fluorescent signals through the channel for the R6G fluorophore. A set of primers for implementing the claimed method is proposed.

EFFECT: invention makes it possible to detect rs3804100-C and rs3804100-T alleles of TLR2 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 TLR2 по однонуклеотидному полиморфизму rs3804100 в образцах биологического материала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и может применяться в исследованиях по изучению влияния

5 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах врожденного иммунитета на возникновение и течение мультифакторных заболеваний, а также в практической деятельности при диагностировании генетических заболеваний, обусловленных таким влиянием.

Толл-подобные рецепторы (TLR) - рецепторы врожденного иммунитета,

10 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

15 каскады, такие как ядерный фактор - каппа В (NFkB), пути митоген-ассоциированной протеинкиназы (MAPK) 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

20 тяжелому течению мультифакторных заболеваний. Определение аллелей SNP в генах TLR может использоваться для предупреждения тяжелого течения инфекционных заболеваний.

В исследованиях однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с туберкулезом легких, наиболее распространены полиморфизмы гена TLR2, что доказывает связь

25 этого рецептора с распознаванием бактерий. Наиболее распространенные SNP, которые связывают с развитием туберкулеза - rs3804099 и rs3804100 (TLR2). В частности, связь rs3804100-C (TLR2) с тяжестью туберкулеза была показана у пациентов с множественной лекарственной устойчивостью. Полиморфизм rs3804100-T (TLR2) связывают с высокой вероятностью возникновения пневмонии на фоне COVID-19.

Из уровня техники известны решения, направленные на выявление специфических нуклеотидных последовательностей полиморфизма rs3804100 в генах TLR2, в частности:

30 комбинации маркеров для оценки риска сепсиса [заявка WO 2008107377, дата подачи заявки 29.02.2008, дата публикации 12.09.2008, дата приоритета 02.03.2007], варианты нуклеиновых кислот в генах толл-подобных рецепторов, ассоциированные с измененным

35 врожденным иммунитетом [заявка WO 2007025989, дата подачи 30.08.2006, дата публикации 08.03.2007, дата приоритета 02.09.2005], способы и средства 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 решения реализуются в формате мультиплекс,

40 определяют полиморфизм rs3804100 гена TLR2 среди прочих, и их применение для целей генотипирования указанного полиморфизма является затратным и малоинформативным.

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

45 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\_30687121\_20» для определения

аллелей rs5743565 гена TLR1 [[https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C\\_30687121\\_20?CID=&ICID=&subtype=#more-information-section](https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C_30687121_20?CID=&ICID=&subtype=#more-information-section)]. Однако данное решение не предназначено для определения аллелей rs3804100 гена TLR2.

Также генотипирование локусов rs3804100 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 rs3804100-С и rs3804100-Т гена TLR2 методом пиросеквенирования, который 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 TLR2 по полиморфизму rs3804100 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 С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100, а именно определение rs3804100-С и rs3804100-Т гена TLR2, в образцах биологического материала с использованием широко распространенных методик и доступного оборудования.

Заявленный технический результат достигается за счет проведения полимеразной цепной реакции 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 rs3804100-С по каналу FAM, для rs3804100-Т по каналу R6G.

Упомянутый набор синтезированных нуклеотидных праймеров и зондов позволяет эффективно детектировать полиморфный нуклеотид rs3804100 в последовательности ДНК и имеет следующий олигонуклеотидный состав:

- прямой праймер 4100-F - SEQ ID NO: 1,
- обратный праймер 4100-R - SEQ ID NO: 2,
- флуоресцентный зонд 4100-С - SEQ ID NO: 3,
- флуоресцентный зонд 4100-Т - SEQ ID NO: 4.

Праймеры представляют собой последовательности олигонуклеотидов для амплификации фрагмента, включающей полиморфизм rs3804100, 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 TLR2 toll like receptor 2 (Homo sapiens (human)), Gene ID: 7097 NC\_000004.12 GRCh38.p14 (GCF\_000001405.40), представленных в базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) [[NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7097](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7097)], и не имеющих гомологии с другими последовательностями ДНК. В результате выбран фрагмент для детекции участка,

содержащего rs3804100 гена TLR2 к которому подобраны прямой и обратный праймеры для амплификации фрагмента длиной 95 пар оснований, а также флуоресцентные зонды для детекции аллелей С и Т выбранного SNP: прямой праймер 4100-F - SEQ ID NO: 1; обратный праймер 4100-R - SEQ ID NO: 2; флуоресцентный зонд 4100-C - SEQ ID NO: 3; флуоресцентный зонд 4100-T - SEQ ID NO: 4.

При этом зонды содержат конформационно-блокированные нуклеотиды, которые позволяют повысить стабильность дуплекса с ДНК-мишенью. Флуоресцентный зонд 4100-C содержит 5 блокаторов, которые расположены в положении 2, 4, 8, 12, 14. Флуоресцентный зонд 4100-T содержит 6 блокаторов, которые расположены в

положении 2, 4, 8, 10, 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 4100-F (SEQ ID NO: 1) и обратный праймер 4100-R (SEQ ID NO: 2) амплифицируют участок гена человека TLR2, содержащий полиморфизм rs3804100 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
95	SEQ ID NO: 1	4100-F	CTG AAA CTT GTC AGT GGC CAG AA	100%
	SEQ ID NO: 2	4100-R	TTC CAG TGT CTT GGG AAT GCA	
	SEQ ID NO: 3	4100-C	(FAM)T+AC +ACA G+CG TA+A C+AG(BHQ1)	
	SEQ ID NO: 4	4100-T	(R6G)T+AC +ACA G+TG +TA+A C+AG (BHQ1)	

где FAM - флуорофор для SEQ ID NO: 3, R6G - флуорофор для SEQ ID NO: 4, BHQ1 - гаситель флуоресценции, соответствующие красителю каналов флуороворов 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 rs3804100 гена человека TLR2, 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  $95^{\circ}C$  в течение 15 минут, 45 циклов при температуре  $95^{\circ}C$  - 10 секунд /  $60^{\circ}C$  - 20 секунд. Детекция флуоресценции проводится на этапе  $60^{\circ}C$  по каналу для флуорофора FAM для rs3804100-С, по каналу для флуорофора R6G - для rs3804100-Т.

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 С полиморфизма rs3804100 гена TLR2. 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 Т полиморфизма rs3804100 гена TLR2.

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 rs3804100-С и rs3804100-Т.

Реализация заявляемого изобретения поясняется следующими примерами: Пример

- 5 1. Получение набора олигонуклеотидных праймеров и зондов для генотипирования аллелей гена TLR2 по полиморфизму rs3804100

Для подбора целевых последовательностей - мест посадки олигонуклеотидов, использовали фрагменты гена TLR2 toll like receptor 2 (*Homo sapiens* (human)), Gene ID: 7097 NC\_000004.12 GRCh38.p14 (GCF\_000001405.40), представленных в базе данных  
10 National Center for Biotechnology Information (NCBI) [NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7097>], 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  
15 последовательности, к которому подобрали праймеры и зонды для амплификации фрагмента длиной 95 пар оснований, а также флуоресцентные зонды для детекции аллелей С и Т выбранного SNP: прямой праймер 41001-F - SEQ ID NO: 1; обратный праймер 4100-R - SEQ ID NO: 2; флуоресцентный зонд 4100-С - SEQ ID NO: 3; флуоресцентный зонд 4100-Т - SEQ ID NO: 4. При этом каждый зонд содержат  
20 конформационно заблокированные нуклеотиды, а именно: флуоресцентный зонд 4100-С содержит 5 блокаторов, которые расположены в положении 2, 4, 8, 12, 14, а флуоресцентный зонд 4100-Т - 6 блокаторов, которые расположены в положении 2, 4, 8, 10, 12, 14.

Анализ упомянутых последовательностей с использованием ресурса Primer BLAST  
25 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] показал, что прямой 4100-F и обратный 4100-R праймеры амплифицируют участок, содержащий полиморфизм rs3804100 в гене TLR2 со 100% специфичностью.

Пример 2. Детекция аллелей С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 методом ПЦР в режиме реального времени.

- 30 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;  
35 - флуоресцентные зонды SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 - по 0,02 мМ;  
- dNTPs - 0,44 мМ.

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

- 40 (с) 5,0 мкл ПЦР-буфера «ОТ-ПЦР-смесь-2 FEP/FRT» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), содержащего MgCl<sub>2</sub>;

(d) 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).

- 45 Подготовленный описанным способом материал, содержащий уникальные олигонуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1-4, использовали для определения аллелей rs3804100 гена TLR2 в образцах биологического материала.

Пример 3. Генотипирование аллелей С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 в



образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3804100 гена человека TLR2 в образцах биологического материала выбрано 71 проба, для исследования использовали биологический материал - венозная кровь. Выделение ДНК проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09

5 «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.

10 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 15 - 10 секунд / 60°C - 20 секунд. Детекция флуоресцентного сигнала проводилась на этапе 60°C по каналу для флуорофора FAM для аллеля С, и по каналу для флуорофора R6G для аллеля Т.

При анализе результатов для каждого канала задали пороговую линию, соответствующую величине 10% от максимального сигнала флуоресценции образца 20 среди образцов с определенным аллелем.

Для 13/71 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора FAM, для 58/71 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора R6G, при этом кинетика накопления флуоресцентных сигналов была экспоненциальной.

25 По каналу для флуорофора FAM определили наличие аллеля rs3804100-С, по каналу для флуорофора R6G определили наличие аллеля rs3804100-Т 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 30 производителя.

Пример 4. Генотипирование аллелей С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 в образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3804100 гена человека TLR2 в образцах биологического материала выбрано 11 проб, для исследования использовали биологический материал 35 - 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 40 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 45 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 rs3804100-С, и по каналу для флуорофора R6G - для rs3804100-Т.

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

Для 11/11 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора FAM, что позволило определить наличие аллеля С полиморфизма rs3804100 гена TLR2 в 11 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 5. Генотипирование аллелей С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 в образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3804100 гена человека TLR2 в образцах биологического материала выбрано 16 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 rs3804100-С, и по каналу для флуорофора R6G для rs3804100-Т.

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

Для 16/16 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора R6G, что позволило определить наличие аллеля Т полиморфизма rs3804100 гена TLR2 в 16 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 С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 в образцах биологического материала.

Для определения аллелей rs3804100 гена человека TLR2 в образцах биологического материала выбрано 52 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 С, и по каналу для флуорофора R6G - для аллеля Т.

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

Для 11/52 образцов кривая флуоресценции пересекла пороговую линию по каналу для флуорофора FAM, для 29/52 образцов кривые флуоресценции пересекли пороговую линию по каналу для флуорофора R6G, для 12/37 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 rs3804100-С, по каналу для флуорофора R6G определили наличие ДНК rs3804100-Т, наличие сигналов по двум каналам для флуорофоров FAM и R6G одновременно подтвердили присутствие ДНК двух аллелей - rs3804100-С и rs3804100-Т.

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 rs3804100-С и rs3804100-Т гена TLR2 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 rs3804100, со 100% специфичностью и позволяют однозначно интерпретировать полученные результаты.

```
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_2" fileName="rs3804100"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="1.0.0"
productionDate="2023-04-12">
```

```
<ApplicationIdentification>
```

```
<IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
```

```
<ApplicationNumberText>no</ApplicationNumberText>
```

```
<FilingDate>2023-04-11</FilingDate>
```

```
</ApplicationIdentification>
```

```
<ApplicantFileReference>01</ApplicantFileReference>
```

```
<ApplicantName languageCode="ru">ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора</ApplicantName>
```

```
<ApplicantNameLatin>FBUN CRIE</ApplicantNameLatin>
```

```
<InventionTitle languageCode="ru">Способ генотипирования гена TLR2 по
полиморфизму rs3804100 и набор олигонуклеотидных праймеров и зондов
для его реализации</InventionTitle>
```

```
<SequenceTotalQuantity>4</SequenceTotalQuantity>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="1">
```

```
<INSDSeq>
```

```

<INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
5  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
10  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
15  <INSDQualifier_value>rs3804100</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
20  <INSDSeq_sequence>ctgaaacttgctcagtgccagaa</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="2">
    <INSDSeq>
25  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
30  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
35  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>rs3804100</INSDQualifier_value>
40  </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ttccagtgctcttgggaatgca</INSDSeq_sequence>
45  </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="3">
    <INSDSeq>

```

```

<INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
5  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
10  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
15  <INSDQualifier_value>rs3804100</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
20  <INSDSeq_sequence>tacacagcgtaacag</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="4">
    <INSDSeq>
25  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
30  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
35  <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>rs3804100</INSDQualifier_value>
40  </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>tacacagtgtaacag</INSDSeq_sequence>
45  </INSDSeq>
    </SequenceData>
    </ST26SequenceListing>

```

## (57) Формула изобретения

1. Способ генотипирования аллелей С и Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100, 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 С гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 определяется посредством оценки кривых накопления флуоресцентных сигналов по каналу для флуорофора FAM, а наличие в образце биологического материала аллели Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 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 С гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 и аллеля Т гена TLR2 по полиморфизму rs3804100 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 4100-F - SEQ ID NO: 1;

обратный праймер 41001-R - SEQ ID NO: 2;

флуоресцентный зонд 4110-C - SEQ ID NO: 3;

флуоресцентный зонд 4100-T - SEQ ID NO: 4,

при этом флуоресцентный зонд 4100-C содержит конформационно-блокированные нуклеотиды, расположенные в положении 2, 4, 8, 12, 14, а флуоресцентный зонд 4100-T содержит конформационно-блокированные нуклеотиды, расположенные в положении 2, 4, 8, 10, 12, 14.

5. Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов по п. 4, где для создания прямого и обратного праймеров, флуоресцентных зондов используют фрагмент гена TLR2 Homo sapiens.