



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*C12Q 1/68 (2020.02)*

(21)(22) Заявка: 2019135146, 31.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.10.2019

Дата регистрации:  
29.07.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.10.2019

(45) Опубликовано: 29.07.2020 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, раб. пос. Краснообск, а/я 463, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН), ИЭВСиДВ СФНЦА РАН

(72) Автор(ы):

Нефедченко Алексей Васильевич (RU),  
Глотов Александр Гаврилович (RU),  
Глотова Татьяна Ивановна (RU),  
Котенева Светлана Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Bauermann, F. V., et al, Generation of Calves Persistently Infected with HoBi-Like Pestivirus and Comparison of Methods for Detection of These Persistent Infections, Clin Microbiol. 2014 Nov; 52(11): 3845-3852. Lihong Liu., et al, Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic characterization of a novel pestivirus, (см. прод.)

(54) Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов и способ выявления пестивируса Н крупного рогатого скота

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложены синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления РНК пестивируса Н крупного рогатого скота и мРНК гена GAPDH КРС в качестве контроля эффективности реакции и способ их применения. Предложенный способ включает выделение РНК из образцов эмбриональных сывороток и биоматериала, проведение обратной транскрипции и мультиплексной полимеразной цепной реакции с синтетическими олигонуклеотидными праймерами и зондом и оценку реакции на 2 каналах. Регистрируемое свечение на канале FAM

свидетельствует о выявлении пестивируса Н в образце, а свечение на канале HEX - о выявлении мРНК GAPDH КРС, при этом выявление мРНК GAPDH КРС используется в качестве контроля эффективности реакции. Способ может быть использован в ветеринарии для выявления возможных контаминаций эмбриональных сывороток, используемых для культивирования культур клеток и производства биопрепаратов, пестивирусом Н крупного рогатого скота, а также для диагностики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, в частности инфекции, вызванной пестивирусом Н крупного рогатого скота. 2 н.п. ф-лы, 4 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

SVA/cont-08, Arch. Virol. - 2009. - N154. - P. 1111-1116. RU 2607025 C1, 10.01.2017.

R U 2 7 2 8 3 4 2 1 C 1

R U 2 7 2 8 3 4 2 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12Q 1/68 (2020.02)*

(21)(22) Application: **2019135146, 31.10.2019**

(24) Effective date for property rights:  
**31.10.2019**

Registration date:  
**29.07.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **31.10.2019**

(45) Date of publication: **29.07.2020 Bull. № 22**

Mail address:

**630501, Novosibirskaya obl., Novosibirskij r-n, rab.  
pos. Krasnoobsk, a/ya 463, Federalnoe  
gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki  
Sibirskij federalnyj nauchnyj tsentr  
agrobiotekhnologij Rossijskoj akademii nauk  
(SFNTSA RAN), IEVSiDV SFNTSA RAN**

(72) Inventor(s):

**Nefedchenko Aleksej Vasilevich (RU),  
Glotov Aleksandr Gavrilovich (RU),  
Glotova Tatyana Ivanovna (RU),  
Koteneva Svetlana Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie nauki Sibirskij federalnyj  
nauchnyj tsentr agrobiotekhnologij Rossijskoj  
akademii nauk (SFNTSA RAN) (RU)**

(54) **SET OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS AND PROBES AND METHOD FOR DETECTING BOVINE PESTIVIRUS H**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Invention discloses synthetic oligonucleotide primers and probes for detecting RNA of bovine pestivirus H and mRNA of the bovine GAPDH gene as a control of the reaction efficiency and a method for use thereof. Proposed method involves isolation of RNA from samples of embryonal serums and biomaterial, reverse transcription and multiplex polymerase chain reaction with synthetic oligonucleotide primers and a probe and evaluation of reaction on 2 channels. Recorded fluorescence on the

FAM channel indicates the detection of pseudocolitis H in the sample, and the glow on the HEX channel - on detecting mRNA of the bovine GAPDH, wherein detecting mRNA of bovine GAPDH is used as a control of reaction efficiency.

EFFECT: method can be used in veterinary science to detect possible contamination of embryonal serums used for culturing cell cultures and producing biopreparations, bovine pestivirus H, as well as for diagnosing infectious diseases of farm animals, particularly an infection caused by bovine pestivirus H.

2 cl, 4 tbl, 4 ex

RU  
2 7 2 8 3 4 2  
C 1

RU  
2 7 2 8 3 4 2  
C 1

Изобретение относится к ветеринарной вирусологии и биотехнологии, а именно к генетической инженерии, и может быть использовано для выявления пестивируса Н крупного рогатого скота (*Pestivirus H*) в образцах эмбриональных сывороток и пробах биоматериала, полученных от крупного рогатого скота.

5 *Pestivirus H*, ранее относился к атипичным пестивирусам группе HoBi-Like *Pestivirus*, - это группа вирусов рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*, выделенных от буйволов и крупного рогатого скота, а также из эмбриональной сыворотки, используемой для культивирования культур клеток, производства вакцин и пересадки эмбрионов.

10 Инфекция КРС, вызванная данным пестивирусом, имеет большое сходство с вирусной диареей-болезнью слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС) и проявляется в виде диареи, аборт, респираторного синдрома, персистентной инфекции.

В нашей стране заболевание крупного рогатого скота, вызванное данным вирусом не регистрируется, однако вирус выявляли в эмбриональных сыворотках, культурах клеток и вирусных вакцинах, что создает угрозу для распространения возбудителя. В 15 такой ситуации, учитывая незначительную распространенность и низкую концентрацию вирус в материале, диагностическая тест-система должна обладать высокой чувствительностью и информативностью, которую можно добиться только с использованием контроля эффективности реакции, например, за счет одновременной детекции фрагментов генов домашнего хозяйства КРС.

20 Предложены различные диагностические тесты для выявления телят, персистентно инфицированных пестивирусом Н, основанные на серологических реакциях: иммунофлуоресцентный анализ, метод иммуногистохимии (Weber et al. Comparison of 'HoBi'-like viral populations among persistent infected calves generated under experimental conditions and to inoculum virus / M.N. Weber, F.V. Bauermann, D.O. Bayles, C.W. Canal, J.D. 25 Neill, J.F. Ridpath / *Virology* 492 (2016) 225-231)

Известны способы выявления РНК атипичного пестивируса в ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция (ПНР) с обратной транскрипцией (ОТ)). (Liu L. Maximum likelihood and Bayesian analyses of a combined nucleotide sequence dataset for genetic 30 characterization of a novel pestivirus, SVA/cont-08 / Lihong Liu, Hongyan Xia, Claudia Baule, Sandor Belak // *Arch. Virol.* - 2009. - №154. - P. 1111-1116; Синтетические олигонуклеотидные праймеры и способ выявления РНК атипичного пестивируса крупного рогатого скота / Котенева СВ., Максютов Р.А., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Сергеев А.Н., Агафонов А.П. // Патент на изобретение RUS 2607025 24.05.2016).

35 К недостаткам данных способов можно отнести то, что они проводится с электрофоретической детекцией результатов.

Наиболее приемлемым результатом, принятым за прототип, является способ, основанный на Реал-Тайм ПЦР с применением олигонуклеотидных праймеров T134-F (5'-GACTAGTGGTGGCAGTGAGC-3'), T220-R (5'-GAGGCATTCCTTGATGCGTC-3'), и зонда T155r-P (6-FAM-5'-ACTCGGGGCTTCGGTGGTGGTGG BHQ1. (Bauermann, F. V. 40 Generation of Calves Persistently Infected with HoBi-Like *Pestivirus* and Comparison of Methods for Detection of These Persistent Infections / F.V. Bauermann, S.M. Falkenberg, B. Vander Ley, N. Decaro, B.W. Brodersen, A. Harmon, B. Hessman, E.F. Flores, J.F. Ridpath // *J Clin Microbiol.* 2014 Nov; 52(11): 3845-3852.).

45 К недостаткам данного способа можно отнести то, что обратная транскрипция проводится непосредственно в ПЦР-смеси и не используются внутренние контроли для оценки качества постановки ПЦР.

Технической задачей изобретения являлась разработка набора специфичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации пестивируса Н крупного

рогатого скота в мультиплексной полимеразной цепной реакции с контролем эффективности реакции в пробах биоматериала, полученных от крупного рогатого скота и эмбриональных сыворотках с использованием гибридизационно-флуоресцентной детекции в режиме реального времени.

5       Сущность изобретения заключается в том, что предложены синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления пестивируса Н крупного рогатого скота, согласно изобретению, что праймеры и зонды имеют нуклеотидные последовательности: SEQ ID NO: 1-3.

10       Сущность изобретения заключается также в том, что в способе выявления пестивируса Н крупного рогатого скота, включающем выделение РНК из проб образцов эмбриональных сывороток и биоматериала от крупного рогатого скота, проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, согласно изобретению, используют одновременно синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды SEQ ID NO: 1-3 и синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонд SEQ ID NO: 4-6 для  
15       выявления мРНК гена GAPDH крупного рогатого скота в качестве контроля эффективности ПЦР, появление свечения на канале FAM свидетельствует о наличии пестивируса Н в образце, а на канале HEX - об эффективности прохождения реакции, реакцию считают положительной при выявлении свечения на двух каналах, и отрицательной при выявлении свечения только на канале HEX и сомнительной - при  
20       выявлении свечения только на канале FAM.

Способ осуществляется следующим образом.

Пример 1. Получение синтетических олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Для расчета олигонуклеотидных праймеров и зонда проводили выравнивание известных нуклеотидных последовательностей штаммов BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3  
25       (атипичный пестивирус), а также последовательности других близкородственных вирусов с помощью программы ClustalW (Thompson et al., 1994). Для BVDV-3 были найдены несколько видоспецифичных районов, внутри каждого из них с помощью программы Oligo v.6.31 были подобраны олигонуклеотидные праймеры и зонд, обеспечивающие специфическую амплификацию РНК вируса и гибридизацию пробы.

30       Окончательный выбор праймеров и зонда основывали на следующих критериях: высокий индекс сходства фрагмента и РНК различных штаммов атипичного пестивируса, высокая температура отжига (GC- метод), большая длина консенсусов, отсутствие гетеродуплексов.

35       Аналогичным образом были выбраны праймеры и зонд для амплификации и выявления мРНК гена GAPDH КРС.

Таким образом, были выбраны синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды для идентификации РНК пестивируса Н КРС и мРНК гена GAPDH КРС (таблица 1).

40

45

Таблица 1.

Ген мишень	Названия праймеров и зондов	Последовательность (5' → 3')	Т отжига (°C)	Размер ампликона (п.н.)
5'-НТО Pestivirus Н	SEQ ID NO:1	5- CCATACCTTCAGTAGGACGAGC -3	51,2	103
	SEQ ID NO:2	5- TCCTTGATGCGTCGAACCA -3	53,7	
	SEQ ID NO:3	5(FAM)- TAGTGGTAACAGTGAGCTCCTTGGAT - 3(BHQ1)	57,4	
GAPDH KPC	SEQ ID NO:4	5- CCCTTCATTGACCTTCACTACA -3	54,1	97
	SEQ ID NO:5	5- TCCATTGATGACGAGCTTCC -3	53,8	
	SEQ ID NO:6	5(R6G)- AGTATGATTCCACCCACGGCAAGT - 3(BHQ1)	59,9	

Пример 2. Способ выявления РНК пестивируса Н с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров и зондов в образцах коммерческих эмбриональных сывороток и пробах биоматериала от крупного рогатого скота.

Способ осуществляется в несколько этапов.

Этап 1. Выделение РНК атипичного пестивируса КРС.

Выделение РНК вируса осуществляют стандартным способом с использованием коммерческого набора «Рибо - сорб» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Этап 2. Проведение реакции обратной транскрипции для получения кДНК.

Осуществляют стандартным способом с использованием коммерческого набора «Реверта-Л» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

В пробирку, содержащую 9,5 мкл реакционной смеси: буфер для ОТ (50 mM Tris-HCl [pH 8.3], 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 10 mM DTT), 0,1 mM dNTP, 0,1 мкг праймера для ОТ) и 0,5 мкл ревертазы из набора «Реверта-Л», добавляют 10 мкл РНК-пробы, перемешивают и помещают в термостат 37°C на 30 минут. Затем добавляют 20 мкл ДНК-буфера, тщательно перемешивают и используют для постановки ПЦР.

Этап 3. Амплификация участка кДНК атипичного пестивируса.

Условия проведения амплификации оптимизировались по следующим параметрам: концентрация ионов магния в реакционной смеси; концентрация праймеров в реакционной смеси; температура отжига праймеров.

Оптимизированный состав реакционной смеси включал следующие компоненты: ПЦР-буфер (60 mM Tris-HCl [pH 8.5], 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 10 mM 2-

меркаптэтанол, 0,1% Тритон X-100), 0,2 mM dNTP, по 0,1 мкг каждого из предложенных праймеров и зондов (таблица 1), 1.25 U Taq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК.

Температурный режим проведения ПЦР: 95°C - 5 мин. - 1 цикл; 95°C - 15 сек., 60°C - 1 мин. - 50 циклов.

Измерение флуоресценции осуществляют при температуре 60°C на каналах FAM и HEX.

При выявлении свечения на канале FAM определяют наличие пестивируса Н в образце, а при выявлении свечения на канале HEX - наличие мРНК GAPDH КРС, что подтверждает правильность прохождения реакции.

Пример 3. Определение чувствительности и специфичности ПНР по заявленному способу.

Методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК вставки, для контроля амплификации получают положительные контрольные образцы (ПКО) отдельно для каждого анализа.

Концентрацию плазмидной ДНК определяют с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) и флуориметра QUBIT (Invitrogen, США). Концентрация плазмидной ДНК составляет 0,333 мкг/мкл, что в пересчете на количество копий соответствует  $7,4 \cdot 10^{10}$  копий/мкл.

Для определения чувствительности реакции готовят 10-кратные разведения ПКО и каждое разведение подвергают исследованию в ПЦР.

За аналитическую чувствительность принимают последнее разведение ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретируют как положительный.

Чувствительность разработанной 1ГЦР составила при выявлении РНК пестивируса Н  $5,4 \cdot 10$  копий/мкл, при выявлении мРНК GAPDH КРС -  $7,3 \cdot 10$  копий/мкл.

Результаты опытов по определению чувствительности ПЦР представлены в таблице 2.

Таблица 2.

РНК пестивируса Н		мРНК GAPDH КРС	
Концентрация плазмидной ДНК, копий/мкл	Результаты ПЦР по заявленному способу	Концентрация плазмидной ДНК, копий/мкл	Результаты ПЦР по заявленному способу
$5,4 \cdot 10^{10}$	+	$7,3 \cdot 10^{10}$	+
$5,4 \cdot 10^9$	+	$7,3 \cdot 10^9$	+
$5,4 \cdot 10^8$	+	$7,3 \cdot 10^8$	+
$5,4 \cdot 10^7$	+	$7,3 \cdot 10^7$	+
$5,4 \cdot 10^6$	+	$7,3 \cdot 10^6$	+
$5,4 \cdot 10^5$	+	$7,3 \cdot 10^5$	+
$5,4 \cdot 10^4$	+	$7,3 \cdot 10^4$	+
$5,4 \cdot 10^3$	+	$7,3 \cdot 10^3$	+
$5,4 \cdot 10^2$	+	$7,3 \cdot 10^2$	+
$5,4 \cdot 10^1$	+	$7,3 \cdot 10^1$	+
$5,4 \cdot 10^{-1}$	-	$7,3 \cdot 10^{-1}$	-

Примечание: «+»- положительный результат;  
«-» - отрицательный результат.

Таблица 3.

5	Вирус (штамм, изолят)	Результаты ПЦР по заявленному способу	
		РНК пестивируса Н	мРНК GAPDH КРС
	ПКО атипичного пестивируса	+	+
	Вирус ВД-БС КРС 1 генотипа (Oregon C24V)	-	+
	Вирус ВД-БС КРС 2 генотипа (Изолят БЛ)	-	+
10	Вирус чумы свиней	-	+
	Респираторно-синцитиальный вирус КРС (штамм «РСВ № 3»)	-	+
	Герпесвирус КРС 1-го типа (штамм «Оренбург»)	-	+
15	Аденовирус КРС 1 типа (BV-10)	-	+
	Риновирус КРС 1-го типа (SD-1)	-	+
	Культура клеток КСТ	-	+
	Эмбриональная сыворотка КРС	-	+
20	Сыворотка крови свиней	-	-
	Сыворотка крови лошади	-	-
	Деионизованная вода	-	-

Примечание: «+» - положительный результат;  
«-» - отрицательный результат.

25 Результаты опытов по определению специфичности реакции по заявленному способу представлены в таблице 3.

30 Таким образом, предлагаемый способ обладает высокой чувствительностью и специфичностью. В реакции выявляется  $5,4 \cdot 10$  копий/мкл для РНК пестивируса Н и  $7,3 \cdot 10$  копий/мкл мРНК GAPDH КРС), при этом мРНК GAPDH КРС выявляли даже в штамме вируса чумы свиней, размножение которого проводили на культуре клеток РК-15 (перевиваемая линия клеток почки поросенка) с добавлением эмбриональной сыворотки телят. Только с сыворотками крови свиньи, лошади и деионизованной водой обе реакции были отрицательными.

35 Пример 4. Выявление пестивируса Н КРС в образцах эмбриональных сывороток крупного рогатого скота и пробах биологического материала, полученного от больных и инфицированных животных.

40 Исследованию на пестивирус Н подвергают образцы коммерческих эмбриональных сывороток КРС, используемых для культивирования культур клеток и производства биопрепаратов в ветеринарии, и пробы сывороток крови, лимфатических узлов, селезенки, легких от КРС с подозрениями на инфицирование пестивирусами.

Пробы сывороток крови отбирают в объеме не менее 1 мл, из органов и тканей вырезают кусочки размером  $1 \times 1 \times 1 \text{ см}^3$ .

45 Образцы эмбриональных сывороток и сывороток крови от больных животных используют для выделения РНК без предварительной подготовки.

Пробы органов и тканей перед исследованием растирают в отдельных фарфоровых ступках со стерильным песком пестиком, добавляют 5-10 мл стерильного физиологического раствора и тщательно перемешивают. Смесь переносят в пластиковые

пробирки емкостью 1,5 мл, центрифугируют при  $10 \times 10^3$  об/мин в течение 5 минут. Для выделения РНК используют 100 мкл осветленной надосадочной жидкости.

Дальнейшая процедура согласно примеру 2.

5 Всего предлагаемым способом было исследовано 18 образцов эмбриональных сывороток, 330 проб сыворотки крови и 146 проб внутренних органов КРС.

Результаты опытов по определению эффективности реакции при исследовании эмбриональных сывороток крупного рогатого скота по заявленному способу представлены в таблице 4.

10 По заявленному способу количество положительных проб эмбриональных сывороток составило 38,89%.

Таблица 4.

№ п/п	Наименование сыворотки	Кат. №	Происхождение	Результат ПЦР на:	
				пестивирус Н	GAPDH КРС
1	Сыворотка крови эмбриональная телячья Standard PAA Laboratories	Кат. № A11-101 № партии A10109-1742	Южная Америка	+	+
2	Сыворотка крови эмбриональная телячья Standard PAA Laboratories	A15-101	Южная Америка	+	+
3	Сыворотка крови плодов коровы Биолот	Э-10-01	Южная Америка	+	+
4	Сыворотка крови эмбриональная телячья Standard PAA Laboratories	A15-101	Южная Америка	+	+
5	Сыворотка эмбриональная телячья Standard PAA Laboratories	Кат. № A15-101 № партии A10112-0130	Южная Америка	+	+
6	Сыворотка крови плодов коровы Биолот	Э-15-02	Южная Америка	+	+
7	Сыворотка крови эмбриональная телячья Standard PAA Laboratories	Кат. № A15-101 № партии A10111-1551	Южная Америка	+	+
8	Сыворотка эмбриональная телячья HyClone	RYD 35910	США	-	+
9	Сыворотка эмбриональная телячья Биолот	Б-04-27	Южная Америка	-	+
10	Сыворотка эмбриональная телячья HyClone	1516	США	-	+
11	Сыворотка крови плодов коровы Биолот	Э-14-08	Южная Америка	-	+
12	Сыворотка эмбриональная телячья HyClone	RWD 35892	США	-	+

13	Сыворотка крови эмбриональная телячья Standard PAA Laboratories	B15-011	Южная Америка	-	+
14	Сыворотка эмбриональная телячья (Gibco)	Кат. № SH30406.02	Новая Зеландия	-	+
15	Сыворотка эмбриональная телячья HyClone	RSG 30855	США	-	+
16	Сыворотка крови плодов коровы Sus-Biol (Биолот)	Э-09-05	Южная Америка	-	+
17	Сыворотка крови эмбриональная телячья Standard PAA Laboratories	B15-011	Южная Америка	-	+
18	Сыворотка эмбриональная телячья Gibco	Кат. № 26140079	США	-	+

Для подтверждения специфичности полученных фрагментов РНК определяли их нуклеотидную последовательность с использованием набора BigDye 3.1 (Applied Biosystems, США) с последующей очисткой на сефадексе G-50 superfine. Секвенирование ПНР-фрагментов проводили по обеим цепям ДНК. Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм) проводили с помощью программы Sequencher v.4.0.5 (Gene Codes Corporation, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей синтезируемых фрагментов проводили методами выравнивания с опубликованными последовательностями других штаммов BVDV-3, (в частности, BVDV3 D32/00 и BVDV3\_Th/04\_Khonkaen) с помощью программы ClustalW (Thompson et al., 1994).

Результаты исследования проб сыворотки крови и биоматериала от животных в ПЦР на пестивирус Н были отрицательны.

Таким образом, предлагаемый способ обладает высокой чувствительностью ( $5,4 \cdot 10^5$  копий/мкл), специфичностью и эффективностью при выявлении пестивируса Н в образцах эмбриональных сывороток крупного рогатого скота.

Перечень последовательностей

<110> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный н

<120> Синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды, способ выявления пестивируса

<130>

<160> 3

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Pestivirus H

<400> 1

ccataccttc agtaggacga gc 22

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Pestivirus H

<400>

tccttgatgc gtcgaacca 19

<210> 3

<211> 26

<212> RNA  
 <213> Pestivirus H  
 <400>  
 tagtggtaac agtgagctcc ttggat 26  
 5 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> RNA  
 <213> Bos taurus  
 <400>  
 10 cccttcattg accttcaacta ca 22  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Bos taurus  
 15 <400>  
 tccattgatg acgagcttcc 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 20 <213> Bos taurus  
 <400>  
 agtatgattc cacccacggc 20  
 <210> 7  
 <400> 7

25

## (57) Формула изобретения

1. Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для выявления пестивируса Н крупного рогатого скота, отличающийся тем, что праймеры и зонды имеют нуклеотидные последовательности: SEQ ID NO: 1-3.

30

2. Способ выявления пестивируса Н крупного рогатого скота, включающий выделение РНК из проб образцов эмбриональных сывороток и биоматериала от крупного рогатого скота, проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, отличающийся тем, что используют одновременно синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды по п. 1 и синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды SEQ ID NO: 4-6 для выявления мРНК гена GAPDH крупного рогатого скота в качестве контроля эффективности ПЦР, появление свечения на канале FAM свидетельствует о наличии пестивируса Н в образце, а на канале HEX - об эффективности прохождения реакции, реакцию считают положительной при выявлении свечения на двух каналах, отрицательной при выявлении свечения только на канале HEX и сомнительной - при выявлении свечения только на канале FAM.

35

40

45

## Перечень последовательностей

<110>	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН)	
<120>	Синтетические олигонуклеотидные праймеры и зонды, способ выявления пестивируса Н крупного рогатого скота	
<130>		
<160>	3	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Pestivirus H	
<400>	1	
	ccataccttc agtaggacga gc	22
<210>	2	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Pestivirus H	
<400>		
	tccttgatgc gtcgaacca	19
<210>	3	
<211>	26	
<212>	RNA	
<213>	Pestivirus H	
<400>		
	tagtggaac agtgagctcc ttggat	26
<210>	4	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Bos taurus	
<400>		
	cccttcattg acctcacta ca	22
<210>	5	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Bos taurus	
<400>		
	tccattgatg acgagctcc	20

<210>	6	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Bos taurus	
<400>		
	agtatgattc caccacggc	20
<210>	7	
<400>	7	