

ТОО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР БИОТЕХНОЛОГИИ»  
(ТОО «НЦБ»)

УДК 606:616-056.7  
МРНТИ 76.03.00  
№ госрегистрации 0124РК01157

УТВЕРЖДАЮ

И.о. генерального директора  
ТОО «Национальный центр  
биотехнологии»,  
к.б.н., профессор



В.Б. Огай  
2024 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ, ГЕНОМНЫХ И ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ  
ДИАГНОСТИКИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН  
(промежуточный)  
Шифр программы Ф.1350

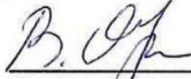
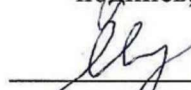
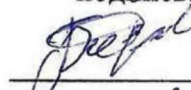
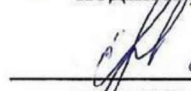
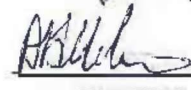
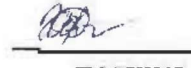
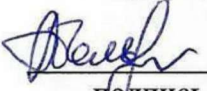
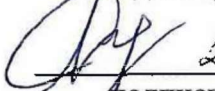
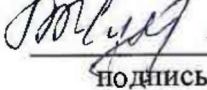
Подпрограмма 101 «Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или  
научно-технической деятельности»  
Приоритетное направление «Наука о жизни и здоровье»

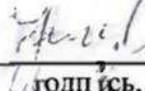
Руководитель НИР,  
зав. лаб., Ph.D., ассоц. проф.

П.В. Тарлыков

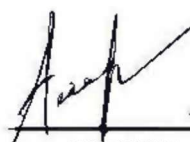
Астана 2024

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

|                                                        |                                                                                                                    |                                                         |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Руководитель НИР:<br>Зав. лаб., Ph.D., ассоц. проф.    | <br>22.11.24<br>подпись, дата     | П.В. Тарлыков<br>(введение, основная часть, заключение) |
| Исполнители:<br>Гл. науч. сотр., канд.биол.наук, проф. | <br>22.11.24<br>подпись, дата     | В.Б. Огай<br>(основная часть)                           |
| Гл. науч. сотр., д-р биол.наук, доц.                   | <br>22.11.24<br>подпись, дата     | К.Н. Мукантаев<br>(раздел 3.6-3.7)                      |
| Гл. науч. сотр., канд.хим.наук, проф.                  | <br>22.11.24<br>подпись, дата     | Б.Б. Хасенов<br>(раздел 3.11)                           |
| Гл. науч. сотр., канд.биол.наук, ассоц. проф.          | <br>22.11.24<br>подпись, дата     | Е.В. Жолдыбаева<br>(раздел 3.1-3.2)                     |
| Гл. науч. сотр., канд.биол.наук, ассоц. проф.          | <br>22.11.24<br>подпись, дата     | А.Б. Шевцов<br>(раздел 3.1-3.2)                         |
| Гл. науч. сотр., канд.биол.наук                        | <br>22.11.24<br>подпись, дата    | О.Н. Хапилина<br>(раздел 3.12-3.13)                     |
| Гл. науч. сотр., Ph.D                                  | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | С.К. Абельденов<br>(раздел 3.8)                         |
| Гл. науч. сотр., канд.хим.наук, ассоц. проф.           | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | А.Т. Кулыясов<br>(раздел 3.4-3.5)                       |
| Гл. науч. сотр., Ph.D., ассоц. проф.                   | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | Г.Н. Кулмамбетова<br>(раздел 3.1-3.2)                   |
| Гл. науч. сотр., Ph.D., ассоц. проф.                   | <br>22.11.2024<br>подпись, дата | Е.О. Остапчук<br>(раздел 3.9)                           |
| Вед. науч. сотр., канд.вет.наук                        | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | М.А. Куйбагаров<br>(раздел 3.1-3.2)                     |
| Вед. науч. сотр., д-р биол. наук                       | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | М.И. Филипенко<br>(раздел 3.1-3.2)                      |
| Вед. науч. сотр., проф., доц. генетики                 | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | Р.Н. Календарь<br>(раздел 3.1-3.2)                      |
| Вед. науч. сотр., канд.биол.наук, ассоц. проф.         | <br>22.11.2024<br>подпись, дата | А.С. Низкородова<br>(раздел 3.9)                        |
| Вед. науч. сотр., канд.хим.наук                        | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | М.Б. Жумабекова<br>(раздел 3.3-3.4)                     |

|                                                |                                                                                                                  |                                       |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Вед. науч. сотр., канд.биол.наук               | <br>22.11.2024<br>подпись, дата | Ю.А. Скиба<br>(раздел 3.9)            |
| Вед. науч. сотр., PhD, ассоц.проф.             | <br>22.11.2024<br>подпись, дата | Ю.В. Перфильева<br>(раздел 3.9)       |
| Ст.науч. сотр., PhD                            | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | К.А. Турсунов<br>(раздел 3.1-3.2)     |
| Ст. науч. сотр.                                | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | Ж. Әдіш<br>(раздел 3.6-3.7)           |
| Ст. науч. сотр., PhD                           | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | А.М. Тургимбаева<br>(раздел 3.8)      |
| Ст. науч.сотр., канд.биол.наук,<br>ассоц.проф. | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | С.С. Кожаметова<br>(раздел 3.1-3.2)   |
| Ст. науч. сотр.                                | <br>22.11.24<br>подпись, дата   | А.С. Мусахметов<br>(раздел 3.11)      |
| Ст. науч. сотр.,                               | <br>22.11.24<br>подпись, дата  | Ж.Д. Акишев<br>(раздел 3.11)          |
| Ст. науч. сотр.,                               | <br>22.11.24<br>подпись, дата | С.А. Актаева<br>(раздел 3.11)         |
| Научн. сотр.                                   | <br>22.11.24<br>подпись, дата | С.Ш. Атавлиева<br>(раздел 3.3)        |
| Научн.сотр.                                    | <br>22.11.24<br>подпись, дата | Д.С. Баянбек<br>(раздел 3.1-3.2)      |
| Научн. сотр.                                   | <br>22.11.24<br>подпись, дата | М.А. Мамлин<br>(раздел 3.2)           |
| Научн. сотр.                                   | <br>22.11.24<br>подпись, дата | Л.А. Тохтарова<br>(раздел 3.6-3.7)    |
| Научн. сотр., PhD                              | <br>22.11.24<br>подпись, дата | А.Д. Каиржанова<br>(раздел 3.1-3.2)   |
| Научн. сотр.                                   | <br>22.11.24<br>подпись, дата | Д.С. Тагиманова<br>(раздел 3.12-3.13) |
| Научн. сотр.                                   | <br>22.11.24<br>подпись, дата | О.Б. Райзер<br>(раздел 3.12-3.13)     |

Научн. сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

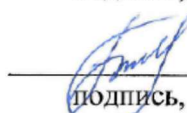
А.О. Амиргазин  
(раздел 3.1-3.2)

Научн.сотр.

  
22.11.2024  
подпись, дата

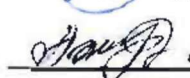
Д.А. Найзабаева  
(раздел 3.9)

Научн. сотр.

  
22.11.2024  
подпись, дата

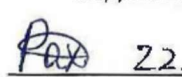
А.О. Бисенбай  
(раздел 3.9)

Мл. научн.сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

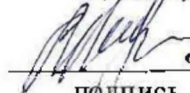
А.Ж. Аюпова  
(введение, реферат)

Мл. научн.сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

М.А. Рахимбергенова  
(введение, реферат)

Мл. научн.сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

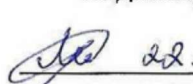
М. Нуртлеу  
(раздел 3.6-3.7)

Мл. научн.сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

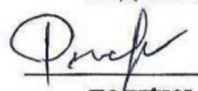
Б.Е. Абирбеков  
(раздел 3.6-3.7)

Мл. научн.сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

М.Ж. Аманжолова  
(раздел 3.8)

Мл. научн. сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

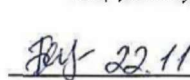
А.Ж. Рыскельдина  
(раздел 3.1)

Мл. научн. сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

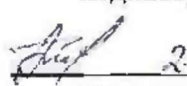
А.А. Романова  
(раздел 3.1-3.2)

Мл. научн. сотр.,  
канд.с.-х.наук

  
22.11.24  
подпись, дата

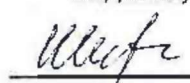
С.Д. Бадуанова  
(введение, заключение)

Мл. научн. сотр.

  
23.11.24  
подпись, дата

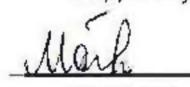
А. Бекбаева  
(раздел 3.1-3.2)

Мл. научн. сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

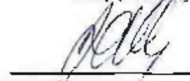
В.А. Шевцов  
(раздел 3.12-3.13)

Мл. научн. сотр.

  
22.11.24  
подпись, дата

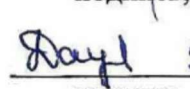
С.М. Магзумова  
(раздел 3.12)

Лаборант

  
22.11.24  
подпись, дата

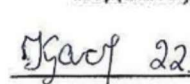
Т. Жумадилов  
(раздел 3.6-3.7)

Лаборант

  
22.11.24  
подпись, дата

А.Е. Даулетов  
(раздел 3.2)

Лаборант

  
22.11.24  
подпись, дата

Ә.М. Қасен  
(раздел 3.2)

|                |                                             |                                       |
|----------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| Лаборант       | <u>Чар/ 22.11.24</u><br>подпись, дата       | С.А. Махсатова<br>(раздел 3.4-3.5)    |
| Лаборант       | <u>Курманбай, 22.11.24</u><br>подпись, дата | А.Б. Курманбай<br>(раздел 3.4-3.5)    |
| Лаборант       | <u>Кы 12.11.24</u><br>подпись, дата         | А.Б. Төлеужанова<br>(раздел 3.1-3.2)  |
| Лаборант       | <u>Жамшитова, 22.11.24</u><br>подпись, дата | Д. Жамшитова<br>(раздел 3.1-3.2)      |
| Лаборант       | <u>Курунтай, 22.11.24</u><br>подпись, дата  | Б.А. Курентай<br>(раздел 3.1-3.2)     |
| Лаборант       | <u>Гусмаулемова</u><br>подпись, дата        | А.Д. Гусмаулемова<br>(раздел 3.1-3.2) |
| Лаборант       | <u>Турсунбай, 22.11.24</u><br>подпись, дата | Н.Е. Турсунбай<br>(раздел 3.1-3.2)    |
| Лаборант       | <u>Кулигин, 22.11.2024</u><br>подпись, дата | А.В. Кулигин<br>(раздел 3.9)          |
| Нормоконтролер | <u>Конарбаева</u><br>подпись, дата          | А.А. Конарбаева                       |

## РЕФЕРАТ

Отчет 104 с., 18 рис., 3 табл., 80 источн, 6 прил.

СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ, ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА, МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА, ГЕНОМИКА, ПРОТЕОМИКА

Объекты исследования – фенилкетонурия, MODY-диабет, синдром Альпорта, болезнь Гоше, инсульт, колоректальный рак, *Acinetobacter baumannii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*.

Цель работы – разработать клеточные, геномные и протеомные технологии для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан.

Методы исследования: в процессе работы использовались клеточные, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические методы.

Полученные результаты: проведен дизайн панелей праймеров. Проведен обзор существующих методик диагностики болезни Гоше. Оптимизирован метод иммунодеплеции плазмы крови. Получены экспрессионные генетические конструкции, несущие ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса. Проведен сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов *A. baumannii*. Проведён патентный поиск и спроектированы праймеры и пробы для определения ДНК *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*. В составе экспрессионного вектора был клонирован ген обратной транскриптазы. Проведен анализ лекарственных растений.

Новизна полученных результатов – была показана возможность применения клеточных, геномных и протеомных технологий для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан.

Степень внедрения – в первый год выполнения программы внедрение результатов не планировалось.

Основные, основные конструктивные и технико-экономические показатели – разрабатываемые высокочувствительные и точные методы диагностики социально-значимых заболеваний с использованием современных клеточных, геномных и протеомных технологий и инструментальных методов не только улучшат качество медицинского обслуживания в Казахстане, но и повысят его конкурентоспособность на международном уровне.

Экономическая эффективность – использование разрабатываемых методов диагностики непосредственно связано с улучшением качества жизни пациентов, снижением затрат на лечение пациентов, уровня инвалидизации пациентов.

Область применения – медицина и здравоохранение.

## ТҰЖЫРЫМ

Есеп 104 бет, 18 сурет, 3 кесте, 80 әдебиет көзі, 6 қосымша

ӘЛЕУМЕТТІК МАҢЫЗЫ БАР АУРУ, ДЕРБЕСТЕНДІРІЛГЕН МЕДИЦИНА, МЕДИЦИНАЛЫҚ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА, ГЕНОМИКА, ПРОТЕОМИКА

Зерттеу нысаны – фенилкетонурия, MODY-диабеті, Альпорт синдромы, Гоше ауруы, инсульт, колоректальды қатерлі ісік, *Acinetobacter baumannii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*.

Жұмыстың мақсаты – Қазақстан Республикасындағы әлеуметтік-маңызы бар ауруларды анықтауға бағытталған жасушалық, геномдық және протеомдық технологияларды әзірлеу.

Зерттеу әдістері: жұмыс барысында жасушалық, молекулалық-генетикалық және масс-спектрометриялық әдістер қолданылды.

Зерттеулер нәтижелері: праймер панельдерінің жобасы жүргізілді. Гошер ауруын және ҚЖА диагностикасының қолданыстағы әдістеріне шолу жасалды. Қан плазмасының иммундық деплеция әдісі оңтайландырылды. Аденовирустың 3-типті гексондық генін және ротавирус антигенінің VP4 генін тасымалдайтын экспрессиялық-генетикалық құрылымдар жасалынды. Антибиотиктерге төзімді *A. baumannii* изоляттарынан ДНҚ жинау және идентификациялау жүргізілді. Патенттік іздеу жүргізіліп *B. burgdorferi* s.l. және *B. miyamotoi* ДНҚ анықтау үшін праймерлер мен үлгілер жобасы жасалды. Кері транскриптаза гені экспрессия векторының бөлігі ретінде клондалды. Дәрілік өсімдіктерге талдау жасалды.

Алынған нәтижелердің жаңалығы - Қазақстан Республикасында әлеуметтік маңызы бар ауруларды диагностикалау үшін жасушалық, геномдық және протеомдық технологияларды қолдану мүмкіндігі бар екендігі көрсетілді.

Орындалу дәрежесі – бағдарламаны орындаудың бірінші жылында нәтижелерді іске асыру жоспарланбады.

Негізгі, негізгі-конструктивтік және техника-экономикалық көрсеткіштері – заманауи жасушалық, геномдық, протеомдық технологияларды және аспаптық әдістерді пайдалана отырып, әлеуметтік маңызы бар ауруларды диагностикалаудың жоғары сезімталдық және нақты әзірленген әдістер Қазақстандағы медициналық көмектің сапасын арттырып қана қоймай, оның халықаралық деңгейде бәсекеге қабілеттілігін арттырады.

Экономикалық тиімділігі – әзірленген диагностикалық әдістерді қолдану пациенттердің өмір сүру сапасын жақсартуға, науқастарды емдеуге кететін шығындарды азайтуға және науқастардың мүгедектік деңгейін төмендетуге тікелей байланысты.

Қолдану саласы – медицина және денсаулық сақтау.

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ .....                                                                                                               | 10 |
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....                                                                                                   | 11 |
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                             | 12 |
| ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР.....                                                                                                          | 15 |
| 1 Выбор направления исследований .....                                                                                                    | 15 |
| 2 Материалы и методы исследования .....                                                                                                   | 20 |
| 2.1 Объекты исследований.....                                                                                                             | 20 |
| 2.2 Дизайн панелей праймеров.....                                                                                                         | 20 |
| 2.3 Выделение ДНК.....                                                                                                                    | 21 |
| 2.4 Патентно-информационный поиск.....                                                                                                    | 21 |
| 2.5 Пробоподготовка образцов для масс-спектрометрического анализа.....                                                                    | 21 |
| 2.6 Масс-спектрометрический анализ.....                                                                                                   | 22 |
| 2.7 Разработка иммунохроматографического анализа.....                                                                                     | 22 |
| 2.8 Секвенирование гена 16S рРНК.....                                                                                                     | 22 |
| 2.9 ПЦР в реальном времени.....                                                                                                           | 23 |
| 2.10 Биоинформатический анализ и выбор последовательностей.....                                                                           | 23 |
| 2.11 Клонирование, модификация и секвенирование генов.....                                                                                | 23 |
| 2.12 Разработка базы данных и программного обеспечения .....                                                                              | 23 |
| 3 Результаты и их обсуждение .....                                                                                                        | 25 |
| 3.1 Дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов человека.....                                                         | 25 |
| 3.2 Формирование коллекции контрольных образцов.....                                                                                      | 28 |
| 3.3 Обзор существующих методик диагностики болезни Гоше.....                                                                              | 29 |
| 3.4 Патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК.....                                                       | 31 |
| 3.5 Оптимизация метода иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных.....                                                        | 33 |
| 3.6 Дизайн и синтез кодоноптоимизированных генов гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса человека.....                   | 35 |
| 3.7 Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса человека..... | 37 |
| 3.8 Идентификации бактерий с помощью секвенирования.....                                                                                  | 38 |
| 3.9 Подбор праймеров для разработки тест-систем на основе ПЦР-в-РВ.....                                                                   | 40 |

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.10 Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз.....                    | 42  |
| 3.11 Клонирование гена обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора.....                            | 45  |
| 3.12 Составление аннотированных списков лекарственных растений, распространенных в Казахстане.....              | 46  |
| 3.13 Составление списков лекарственных препаратов на основе растительного сырья.....                            | 48  |
| 3.14 Разработка базы данных лекарственных растений Казахстана.....                                              | 49  |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....                                                                                                 | 51  |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....                                                                           | 55  |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А – Календарный план работ на 2024-2026 гг.....                                                      | 62  |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Последовательности праймеров.....                                                                | 75  |
| ПРИЛОЖЕНИЕ В – Отчет о патентных исследованиях.....                                                             | 91  |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Распределение видов лекарственных растений по регионам Казахстана.....                           | 96  |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Список лекарственных растений, включенных в государственную фармакопею Республики Казахстан..... | 101 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Е – Нуклеотидная последовательность гена обратной транскриптазы после кодоноптоимизации.....         | 104 |

## ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями

|                             |                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Антиген                     | – вещество, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ                                                                                                       |
| Антитела                    | – синтезируемые В-лимфоцитами белки в ответ на попадание в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующие с образованием комплекса «антиген – антитело»                        |
| Ген                         | – транскрибируемый участок хромосомы, кодирующий функциональный белок либо тРНК или рРНК                                                                                                             |
| Генотипирование             | – метод, основанный на новейших достижениях в области биотехнологии, позволяющий проводить индивидуальное сравнение генотипов разных людей                                                           |
| Мутация                     | – стойкое (то есть такое, которое может быть унаследовано потомками данной клетки или организма) изменение генотипа, происходящие под влиянием внешней или внутренней среды                          |
| Настой                      | – водная вытяжка лекарственного сырья преимущественно из мягких частей растений (травы, листьев, цветков)                                                                                            |
| Полимеразная цепная реакция | – метод амплификации фрагментов нуклеиновых кислот <i>in vitro</i>                                                                                                                                   |
| Праймер                     | – короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК или РНК мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы, а также при репликации ДНК |
| Сбор лекарственный          | – фармацевтический препарат, представляющий собой смесь нескольких видов измельченного или цельного лекарственного растительного сырья                                                               |
| Секвенирование              | – определение первичной структуры ДНК, то есть последовательности расположения нуклеотидных остатков в полинуклеотидной цепи ДНК                                                                     |
| Экстракт                    | – концентрированное извлечение из лекарственного растительного сырья                                                                                                                                 |

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения

|       |                                                 |
|-------|-------------------------------------------------|
| БГ    | – болезнь Гоше                                  |
| БСК   | – болезни системы кровообращения                |
| ВОЗ   | – Всемирная организация здравоохранения         |
| ВЭЖХ  | – высокоэффективная жидкостная хроматография    |
| ГФА   | – гиперфенилаланинемия                          |
| ДНК   | – дезоксирибонуклеиновая кислота                |
| дНТФ  | – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты                |
| ИФА   | – иммуноферментный анализ                       |
| ИХА   | – иммунохроматографический анализ               |
| кДа   | – обозначение молекулярного веса белков         |
| KRP   | – колоректальный рак                            |
| ПААГ  | – полиакриламидный гель                         |
| П.н.  | – пара нуклеотидов                              |
| ПЦР   | – полимеразная цепная реакция                   |
| РНК   | – рибонуклеиновая кислота                       |
| РНКП  | – РНК полимераз                                 |
| СД    | – сахарный диабет                               |
| СД2   | – сахарный диабет второго типа                  |
| ТЛЧ   | – тест на лекарственную чувствительность        |
| ФАГ   | – фенилаланингидроксилаза                       |
| ФКУ   | – фенилкетонурия                                |
| FDR   | – false discovery rate                          |
| LB    | – Lysogeny broth                                |
| NCBI  | – National Center for Biotechnology Information |
| NGS   | – next-generation sequencing                    |
| MODY  | – maturity-onset diabetes of the young          |
| PAH   | – phenylalaninehydroxylase gene                 |
| pET28 | – plasmid for expression by T7 RNA polymerase   |
| pET32 | – plasmid for expression by T7 RNA polymerase   |
| PBS   | – phosphate buffered saline                     |
| TFA   | – trifluoroacetic acid                          |
| TOF   | – time of flight                                |

## ВВЕДЕНИЕ

В Республике Казахстан особое внимание со стороны государства уделяется разработке высокочувствительных и точных методов диагностики различных заболеваний. Министерством здравоохранения Республики Казахстан утвержден перечень социально-значимых заболеваний, включающий орфанные заболевания, злокачественные новообразования, диабет, ряд сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний, болезни нервной системы и другие заболевания (Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 23 сентября 2020 года № ҚР ДСМ-108/2020). В рамках данной научно-технической программы запланировано разработать методы и технологии для эффективной диагностики ряда социально-значимых заболеваний, используя современные клеточные, геномные, протеомные технологии и инструментальные методы, такие как NGS, масс-спектрометрия, цифровая ПЦР, ПЦР в реальном времени, технология CRISPR/Cas, ДНК-баркодирование и другие. В рамках программы планируется разработать методы ранней диагностики орфанных заболеваний, включая фенилкетонурию и болезнь Гоше, диагностики синдрома Альпорта, MODY диабета, ишемического инсульта, колоректального рака, а также технологии и тест-системы для детекции ряда инфекционных заболеваний, вызываемых возбудителями как бактериального (*Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*, *Acinetobacter baumannii*), так и вирусного происхождения (рота- и аденовирусы). Для последующего обеспечения производства отечественных тест-систем предлагается разработать технологию получения термостабильных РНК и ДНК зависимых полимераз, используемых в ПЦР тест-системах, а также высокоточную ДНК-технологию аутентификации фитопрепаратов. Эти разработки не только улучшат качество медицинского обслуживания в Казахстане, но и повысят его конкурентоспособность на международном уровне, способствуя широкому применению современных диагностических технологий в клинической практике и лабораторной диагностике, а также улучшит качество жизни пациентов.

Таким образом, для достижения прогресса в этом актуальном направлении была сформулирована главная цель нашего исследования и определены его задачи.

Цель – разработать клеточные, геномные и протеомные технологии для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан.

Задачи программы:

1. Разработка метода таргетного секвенирования гена фенилаланингидроксилазы для диагностики фенилкетонурии, а также разработка таргетных панелей для диагностики MODY диабета, и диагностики синдрома Альпорта на основе секвенирования нового поколения. Изучение распределения мутаций в генах KRAS/BRAF при колоректальном

раке на основе высокочувствительного метода диагностики редких мутаций.

2. Разработка метода диагностики болезни Гоше; разработка метода определения протеомных биомаркеров инсульта на основе масс-спектрометрии.

3. Разработка метода иммунохроматографического анализа для определения иммунного статуса против рота- и аденовирусных инфекций с применением коллоидного золота и квантовой точки. Разработка технологии детекции антибиотикорезистентности внутрибольничных инфекций на основе CRISPR/Cas для *Acinetobacter baumannii*. Разработка отечественной тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации возбудителей Лайм-боррелиоза (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) и клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *Borrelia miyamotoi*.

4. Разработка технологии получения термостабильных РНК и ДНК зависимых полимераз для молекулярно-генетической детекции возбудителей урогенитальных инфекций. Разработка технологии аутентификации фитопрепаратов, используемых в педиатрической практике, с использованием ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования.

В соответствии с поставленной целью и задачами, на 2024 год были запланированы следующие работы (Приложение А):

1. Дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PАН, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WFS1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез. Начало формирования коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Анализ и формирование группы исследования по колоректальному раку согласно критериям.

2. Обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов. Патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Оптимизация метода иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.

3. Дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса. Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса. Сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов *A. baumannii*. Формирование коллекции ДНК изолятов *A. baumannii*. Провести патентный поиск и спроектировать праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК *B. burgdorferi s.l.* и *B. miyamotoi*. Синтезировать и очистить праймеры и флуоресцентные пробы. Провести

проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.

4. Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определение оптимальной последовательности фермента. Клонирование гена обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора. Составление аннотированных списков лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан.

Метрологическая обеспеченность НИР: все средства измерений и испытательное оборудование, использованные при проведении научных исследований, прошли процедуры поверки и аттестации в соответствующих аккредитованных органах, а именно, ТОО «XRAY». Исследования проводятся на базе лаборатории протеомики и масс-спектрометрии, Национальной научной лаборатории биотехнологии коллективного пользования, лаборатории прикладной генетики, лаборатории генетики и биохимии микроорганизмов, лаборатории иммунохимии и иммунобиотехнологии, лаборатории молекулярной биотехнологии, лаборатории геномики растений и биоинформатики ТОО «Национальный центр биотехнологии», а также в филиале ТОО «Национальный центр биотехнологии» в г. Алматы. Для выполнения данной программы имеются необходимые соответствующие помещения и коммуникации. Лаборатории исполнителя оснащены всем необходимым оборудованием: ламинарные боксы, ПЦР-амплификаторы, термостаты, центрифуги, секвенаторы, масс-спектрометры, камеры для электрофореза, холодильники и морозильные камеры. В выполнении запланированных работ принимали участие врачи Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии, ТОО «Национальный научный онкологический центр», Национального научного центра материнства и детства, и другие специалисты.

Патентные исследования. В результате проведенного патентного поиска на веб-ресурсе [www.kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz), содержащего реестр казахстанских патентов, сходства с предлагаемыми задачами обнаружено не было.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА О НИР

### 1 Выбор направления исследований

Современные достижения в области молекулярной медицины и генетики создают возможности для точной диагностики и персонализированного лечения многих заболеваний, что особенно важно в контексте наследственных патологий и онкологических заболеваний. Выбор направления исследований в данной научно-технической программе базируется на необходимости разработки высокоточных методов диагностики заболеваний, способных удовлетворить актуальные запросы здравоохранения в Республике Казахстан.

Одним из ключевых приоритетов является использование методов NGS для разработки таргетных панелей диагностики моногенных заболеваний, таких как ФКУ, MODY-диабет и синдром Альпорта. Эти заболевания имеют значительные клинические и социально-экономические последствия, что делает своевременное генетическое тестирование важнейшей задачей. Применение NGS позволяет выявлять как известные, так и новые мутации в генах, ассоциированных с этими патологиями, что повышает точность диагностики и улучшает прогнозирование.

В случае ФКУ разработка таргетного секвенирования гена PАН обеспечивает возможность точной дифференциальной диагностики и улучшает генетическое консультирование [1-10]. Благодаря идентификации редких мутаций можно оптимизировать лечение, включая применение препаратов, таких как тетрагидробиоптерин, для пациентов с определёнными генотипами. Аналогично, панели для диагностики MODY-диабета фокусируются на выявлении мутаций в ключевых генах (HNF1A, HNF4A, GCK и других), что позволяет персонализировать лечение, включая отказ от инсулинотерапии в ряде случаев [11-15]. Для синдрома Альпорта разработка панелей диагностики на основе NGS способствует выявлению мутаций в генах коллагена IV типа (COL4A3, COL4A4, COL4A5), что особенно важно для раннего выявления клинического течения заболевания [16-22].

Не менее важным направлением является изучение онкогенетики. Анализ распределения мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* при колоректальном раке, третьем по распространенности онкологическом заболевании в мире, направлен на улучшение диагностики и прогнозирования [23-27]. Использование таких технологий как цифровой ПЦР, обеспечивает высокую чувствительность в обнаружении редких мутаций, что имеет решающее значение для выбора подходящего лечения. Кроме того, исследование этнических и географических особенностей появления мутаций способствует разработке диагностических протоколов, учитывающих этнические особенности популяции Казахстана.

В рамках данной научной программы будут разработаны методы диагностики болезни Гоше и инсульта с использованием масс-спектрометрии, передового и высокоточного метода диагностики и раннего выявления заболеваний. БГ, наследственное заболевание из группы лизосомных болезней накопления, основными методами диагностики которой являются биохимические анализы оценки активности ферментов, молекулярно-генетическое тестирование и измерение уровней биомаркеров [1, 28-33]. Однако традиционные методы часто сталкиваются с ограничениями в чувствительности и специфичности. Использование масс-спектрометрии стало важным дополнением к существующим подходам, позволяя выявлять биомаркеры, такие как Lyso-Gb1, на самых ранних стадиях заболевания. Данный метод отличается высокой точностью и скоростью, что делает его особенно перспективным для ранней диагностики и предотвращения осложнений.

Инсульт, являющийся одной из ведущих причин смертности и инвалидности, требует высокочувствительных методов диагностики, которые позволят обнаруживать заболевание на самых ранних этапах. Протеомика, изучающая белковый состав биологических образцов, открывает новые горизонты в поиске биомаркеров инсульта [34-40]. Основным инструментом в данном подходе является масс-спектрометрия, которая обеспечивает высокую точность идентификации белков [41, 42]. Современный масс-спектрометр позволяет получать детализированные данные об аминокислотных последовательностях и структурных особенностях белков [38, 43]. Особые трудности в этом направлении связаны с необходимостью пробоподготовки образцов, так как наличие даже минимальных концентраций посторонних веществ может снижать точность анализа. Поэтому разработка методов очистки плазмы крови становится ключевым этапом в исследовании. В отличие от традиционных методов, которые могут быть менее специфичными и давать ложноположительные результаты, масс-спектрометрия обеспечивает уникальную точность и позволяет выявлять биомаркеры, полезные не только для диагностики, но и для мониторинга эффективности лечения. Интеграция масс-спектрометрии в клиническую практику позволит ускорить процесс диагностики и снизить нагрузку на здравоохранение, что делает данное направление приоритетным.

Выбранные направления исследований научно-технической программы объединяет цель улучшения качества медицинской помощи через внедрение высокоточных методов диагностики. Эти подходы имеют значительный потенциал для оптимизации персонализированного лечения, повышения доступности диагностики и снижения расходов на здравоохранение за счет ранней диагностики инвалидизирующих заболеваний.

Стоит отметить, что современная медицинская наука сталкивается с необходимостью разработки инновационных подходов для диагностики инфекционных заболеваний, антибиотикорезистентности и зоонозных инфекций, что обусловлено ростом глобальных угроз общественному здравоохранению. В рамках данной программы исследования планируется разработать тест-системы и новые технологии, основанные на иммунохроматографии, CRISPR/Cas и полимеразной цепной реакции в реальном времени, что позволит улучшить диагностику и контроль инфекционных заболеваний.

Ротавирусные и аденовирусные инфекции являются одной из ведущих причин гастроэнтеритов и других осложнений, особенно у детей младшего возраста и пациентов с ослабленным иммунитетом. Несмотря на существующие методы диагностики, такие как ИФА и ПЦР, существует необходимость создания более доступных, быстрых и точных решений, позволяющих проводить анализы в полевых условиях или без специализированного оборудования. Введение методов ИХА с применением коллоидного золота и квантовых точек обеспечивает возможность оперативного выявления патогенов и оценки иммунного статуса пациентов. Современные технологии, такие как синтез ДНК-последовательностей *de novo* и получение моноклональных антител, значительно расширяют возможности оптимизации тест-систем. Это позволяет не только повысить точность диагностики, но и создать доступные решения для использования в регионах с ограниченными медицинскими ресурсами.

Проблема антибиотикорезистентности, особенно у внутрибольничных патогенов, таких как *Acinetobacter baumannii*, представляет собой одну из самых серьёзных угроз современной медицины. Этот патоген, устойчивый к множественным классам антибиотиков, входит в группу ESKAPE, представляющую глобальную угрозу здравоохранению [44-46]. Традиционные методы детекции генов резистентности, такие как изотермическая амплификация, часто сталкиваются с проблемами специфичности и генерируют ложные результаты. Введение технологии CRISPR/Cas для диагностики резистентности *A. baumannii* предлагает революционный подход [47-51]. Технология позволяет быстро и точно выявлять гены резистентности, используя эндонуклеазу Cas12a и флуоресцентные зонды. Преимущества CRISPR/Cas включают простоту в использовании, высокую чувствительность и возможность масштабирования для детекции различных патогенов. Эти разработки обеспечат возможность эффективного контроля антибиотикорезистентности, что особенно важно в условиях роста резистентных штаммов и ограниченности терапевтических возможностей.

Еще одним актуальным направлением исследований является диагностика зоонозных инфекций, таких как Лайм-боррелиоз и клещевая возвратная лихорадка,

эндемичных для юго-восточных и южных регионов Казахстана [52-58]. Текущая диагностика этих заболеваний ограничена доступностью коммерческих тест-систем, что создает необходимость разработки отечественного решения [59-64]. Разработка тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для одновременной детекции *Borrelia burgdorferi sensu lato* и *Borrelia miyamotoi* не только повысит точность и доступность диагностики, но и обеспечит возможности для дальнейшего эпидемиологического мониторинга. Это особенно важно для Казахстана, где мониторинг распространения данных патогенов может существенно повлиять на стратегии профилактики и обеспечения контроля над возникающими инфекционными угрозами.

Данная программа направлена на разработку инновационных решений, которые позволят улучшить диагностику возбудителей урогенитальных инфекций, а также обеспечить точную аутентификацию фитопрепаратов, используемых в педиатрической практике. Оба направления объединены стремлением внедрить передовые биотехнологии, обеспечивающие точность, надежность и доступность.

Урогенитальные инфекции остаются одной из наиболее распространенных групп заболеваний, требующих точной и оперативной диагностики. Основой молекулярно-генетической детекции патогенов являются полимеразы, такие как обратная транскриптаза, выполняющая синтез комплементарной ДНК на матрице РНК [65-68]. Однако природные ферменты, такие как ревертазы из вирусов лейкемии мышей или иммунодефицита человека, имеют ограниченную термостабильность и невысокую точность полимеризации, что снижает их эффективность в современных диагностических тестах [12, 69-71]. Разработка термостабильных ферментов с температурным оптимумом 68–72°C и сниженной рибонуклеазной активностью станет важным шагом в создании одношаговых ПЦР-систем. Такие ферменты обеспечат более точную амплификацию ДНК, минимизируют деградацию РНК и повысят надежность диагностики на ранних стадиях заболеваний. Внедрение технологий, основанных на искусственной эволюции и сайт-направленном мутагенезе, позволит разработать ферменты нового поколения, соответствующие требованиям как научных исследований, так и клинической практики.

В Республике Казахстан остро стоит проблема обеспечения качества лекарственных средств растительного происхождения, особенно актуальная в педиатрической практике [72]. Растительные препараты приобретают всё большую популярность благодаря их мягкому действию и минимизации побочных эффектов [73, 74]. Однако фальсификация сырья, ошибки в идентификации видов растений и примеси представляют серьёзную угрозу здоровью потребителей, особенно детей [75, 76]. В ответ на эти вызовы технологии ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования предлагают эффективные

решения для аутентификации растительного сырья [77-80]. ДНК-штрихкодирование позволяет идентифицировать растения на видовом уровне, даже в измельченных смесях, где традиционные методы анализа неэффективны. Создание базы данных ваучерных образцов лекарственных растений, применяемых в фитотерапии, станет важным инструментом для контроля качества фитопрепаратов. Такие базы данных позволят исключить использование малоэффективных заменителей и вредных примесей, что обеспечит безопасность потребителей и соответствие препаратов международным стандартам качества. Интеграция геномных и биоинформатических технологий в процесс аутентификации фитопрепаратов не только повысит их надежность, но и будет способствовать развитию системы менеджмента качества растительного сырья, что особенно актуально в условиях растущего спроса на фитопрепараты.

Задачи по разработке термостабильных ферментов и технологии аутентификации фитопрепаратов, объединены общей целью: внедрением высокотехнологичных решений для улучшения здоровья населения. Эти исследования позволят не только повысить эффективность диагностики инфекционных заболеваний, но и обеспечить безопасность использования растительных лекарственных средств.

## **2 Материалы и методы исследования**

### **2.1 Объекты исследований**

Для реализации задач были включены следующие объекты исследований: фенилкетонурия, MODY-диабет, синдром Альпорта, болезнь Гоше, инсульт, колоректальный рак, *A. baumannii*, *B. burgdorferi*, *B. miyamotoi*. В рамках разработки таргетных панелей секвенирования гена *PAH* для диагностики фенилкетонурии формировалась коллекция ДНК контрольных образцов, собранных от здоровых взрослых добровольцев. Анкетирование участников проводилось после получения информированного согласия, одобренного локальной этической комиссией. Для анализа было собрано по 10 мл венозной крови с использованием вакуумных систем с ЭДТА.

В исследование MODY-диабета включались пациенты с клинически верифицированным диагнозом, установленным эндокринологом. Критерии включали раннее начало заболевания, отсутствие ожирения и наличие диабета у родственников. Образцы венозной крови собирались после получения информированного согласия или согласия законных представителей детей. Для изучения синдрома Альпорта привлекались пациенты с клинически и генетически подтверждённым диагнозом. Использовались архивные образцы ДНК, а также проводился дополнительный набор пациентов на базе медицинских учреждений. В исследовании применялись образцы крови, собранные после информированного согласия участников. Для выполнения задачи изучения мутаций в генах *KRAS/BRAF* при колоректальном раке материалы собирались из образцов тканей опухолей казахстанских пациентов. Анкетирование и забор материала проводились с соблюдением этических норм, в соответствии с протоколом, утверждённым этической комиссией ТОО «Национальный центр биотехнологии».

### **2.2 Дизайн и синтез панели праймеров**

Для разработки таргетных панелей праймеры проектировались с использованием специализированного программного обеспечения. В задаче фенилкетонурии применялась программа NGS-PrimerPlex, а для MODY-диабета и синдрома Альпорта использовалась программа TileAmpDesigner. Синтез праймеров осуществлялся на автоматическом синтезаторе ДНК с использованием фосфитамидных мономеров и пористых полимерных носителей.

Для разработки отечественной ПЦР-тест-системы для *Borrelia* на основе данных из базы NCBI были разработаны праймеры и зонды, специфичные для генов *flaB* у *Borrelia burgdorferi sensu lato* и *B. miyamotoi*. Праймеры синтезировались в лаборатории ТОО «Национальный центр биотехнологии» и проверялись на образование дуплексов с помощью RNAstructure 5.0.

### 2.3 Выделение ДНК

ДНК из образцов крови и тканей выделялась с использованием коммерческих наборов. Для фенилкетонурии применялись наборы QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США), а концентрация ДНК измерялась с помощью флуориметра Qubit 2.0 с набором Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo, США). Для MODY-диабета и синдрома Альпорта использовались наборы GeneJET (Thermo, США), а концентрация также определялась с использованием Qubit dsDNA HS Assay Kit (Qiagen, Германия).

Для выполнения задачи изучения мутаций KRAS/BRAF экстракция ДНК из опухолевых тканей проводилась методом высаливания. Образцы биопсий подвергались лизису с использованием буферов с протеиназой К и SDS. После осаждения белков насыщенным раствором NaCl ДНК выделялась при помощи холодного изопропанола и очищалась этанолом. Конечный продукт растворяли в буфере Tris-EDTA для дальнейшего анализа.

Для работы с ДНК *A. baumannii* геномная ДНК выделялась с использованием набора Monarch (New England Biolabs, США) с модификацией протокола для увеличения выхода ДНК. Чистота выделенной ДНК проверялась электрофорезом в агарозном геле и спектрофотометрическим анализом на NanoDrop 2000 (Thermo, США).

ДНК из образцов гомогенатов клещей выделяли с помощью наборов AmpliSens RIBO-prep (AmpliSens, Россия) и МАГНО-сорб (AmpliSens, Россия). Концентрация и чистота ДНК определялись на NanoDrop 2000, используя отношение A260/A280 для оценки уровня белковых загрязнений.

### 2.4 Патентно-информационный поиск

Для выполнения задач, связанных с диагностикой болезни Гоше и разработкой методов определения биомаркеров инсульта, был проведён систематический обзор литературы. Использовались базы данных Web of Science и Scopus. Ключевые слова (Gaucher Disease, Diagnostics, Newborn Screening, Proteomics, Stroke Biomarkers) комбинировались с логическими операторами (AND, OR, NOT). Фильтрация включала временные рамки (последние 7 лет), языковые ограничения (английский, русский), типы публикаций (оригинальные исследования и обзоры) и предметные области. После получения начального списка статей проводился отбор на основе заголовков и аннотаций. Анализ отобранных статей включал изучение целей, методологии, результатов и выводов, что позволило структурировать информацию по ключевым темам. Для оформления библиографии применялись стандарты ГОСТ 7.32-2017.

## **2.5 Пробоподготовка образцов для масс-спектрометрического анализа**

Образцы крови для масс-спектрометрического анализа готовились с использованием стандартных протеомных методов. Забор крови проводился с последующим отделением плазмы методом центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут. Белковый комплекс фракционировался с использованием градиентного электрофореза в полиакриламидном геле Novex NuPAGE (Thermo, США). Белки визуализировались трифенилметановым красителем Coomassie Brilliant Blue R-250, что позволило оценить их качество и количественный состав. Удаление основных белков (альбумина и иммуноглобулинов) из плазмы осуществлялось методом иммунодеплеции, что повышало чувствительность последующего анализа низкоконцентрированных биомаркеров. Подготовка белков к масс-спектрометрическому анализу включала восстановление и алкилирование с использованием дитиотреитола и йодацетамида, трипсинолиз и обессаливание на колонках micro Zip-Tip (Millipore, Великобритания).

## **2.6 Масс-спектрометрический анализ**

Для анализа протеомных биомаркеров использовался масс-спектрометр QTOF Impact II (Bruker, Германия). Образцы подвергались трипсинолизу, а пептиды анализировались в режиме градиентного разделения, что обеспечивало высокую точность идентификации и количественную оценку белков. Анализ данных проводился с использованием специализированного программного обеспечения для интерпретации масс-спектров, идентификации белков и их посттрансляционных модификаций. Каждый этап работы был стандартизирован для обеспечения высокой воспроизводимости экспериментов.

## **2.7 Разработка иммунохроматографического анализа**

Для создания диагностического инструмента использовались плазмиды и бактериальные штаммы *E. coli* DH5α и BL21(DE3). Гены синтезировали методом ПЦР с использованием полимеразы Phusion. После двухраундовой амплификации фрагменты анализировались гель-электрофорезом. Полученные продукты клонировали в плазмиды с применением T4-ДНК-лигазы и проверяли правильность сборки с использованием рестрикции и секвенирования по методу Сэнгера.

Для выделения и очистки плазмидной ДНК применялись наборы PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep (Thermo, США), обеспечивающие высокую чистоту образцов. Разделение фрагментов ДНК проводилось электрофорезом в агарозных гелях с последующим препаративным выделением фрагментов с использованием GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo, США).

## **2.8 Секвенирование гена 16S рРНК**

Фрагменты бактериального гена 16S рРНК амплифицировались методом ПЦР с универсальными праймерами. Амплификаты анализировались методом электрофореза, а для дальнейшего подтверждения их идентичности проводилось секвенирование по методу Сэнгера с использованием ABI 3730xl (Thermo, США). Полученные данные анализировались в программном обеспечении Vector NTI v.11.

## **2.9 ПЦР в реальном времени**

Разработанные праймеры и зонды тестировались в режиме реального времени на матрицах ДНК, выделенных из клещей. Оптимизация температур отжига праймеров и концентраций зондов позволила достичь высокой специфичности и чувствительности. Использовалась Taq-ДНК-полимераза (АлкорБио, Россия).

## **2.10 Биоинформатический анализ и выбор последовательностей**

Для выполнения задач по разработке термостабильных полимераз и технологии аутентификации фитопрепаратов был проведён комплексный анализ данных с использованием международных баз данных и специализированного программного обеспечения. Последовательности ферментов для создания модифицированных РНК и ДНК-зависимых полимераз анализировались с использованием UniProt и NCBI GenBank. Аминокислотные последовательности изучались в контексте их структуры и функциональности с применением Vector NTI Advanced 11, а кодоноптоптимизация нуклеотидных последовательностей осуществлялась через инструмент IDT Codon Optimization Tool. Для выполнения задачи по фитопрепаратам для составления аннотированных списков лекарственных растений, распространённых в Казахстане, использовались национальные базы данных kazgenbank.kz и kazflora.kz, а также международные ресурсы, такие как GBIF и iNaturalist. Интеграция этих данных позволила уточнить ареалы лекарственных растений и определить их ключевые характеристики.

## **2.11 Клонирование, модификация и секвенирование генов**

Для разработки термостабильных полимераз генно-инженерные конструкции собирались методом безрестрикционного клонирования. После сборки конструкции нуклеотидные последовательности проверялись методом Сэнгера с использованием праймеров T7fw и T7rv. Анализ мутаций в аминокислотных последовательностях ферментов проводился для оптимизации их термостабильности и каталитической активности. Были выбраны и протестированы 25 ключевых мутаций, влияющих на эффективность обратной транскриптазы. В исследованиях по аутентификации фитопрепаратов коллекция фармакопейных стандартных образцов формировалась с использованием гербарного фонда Национального центра биотехнологии. Это позволило

создать высокоточные эталонные данные для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

## **2.12 Разработка базы данных и программного обеспечения**

Для систематизации данных лекарственных растений использовались современные инструменты разработки программного обеспечения. База данных создавалась с использованием GraphQL для управления запросами, фреймворка ASP.NET Core v.7.0 и Vue.js для интерфейса, а также PostgreSQL для управления реляционными данными. Разработка серверной части выполнялась на языке программирования C#.

### 3 Результаты и их обсуждение

#### 3.1 Дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов человека

В рамках выполнения программы проведен дизайн панели праймеров к кодирующей и регулирующим областям гена *PAH*, а именно к 13 экзонам и интронной части, задействованной в сплайсинге. Процедура подбора праймеров включала следующие этапы: (1) выбор участков генома для гена *PAH* (список или диапазон номеров экзонов и/или кодонов); (2) многоэтапный дизайн праймеров, который позволяет эффективно оптимизировать параметры дизайна праймеров (содержание GC, Tm, длина ампликона и т. д.); (3) проверка праймеров на нецелевую гибридизацию в геноме; (4) проверка праймеров на перекрытие с переменными участками генома, например, однонуклеотидными полиморфизмами; (5) автоматическое распределение пар праймеров между мультиплексными реакциями на основе вторичных структур и ампликонов, не являющихся мишенями, которые могут быть образованы праймерами из разных пар. В результате проведенных исследований были подобраны 19 пар праймеров (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры подобранные для таргетного секвенирования гена *PAH*

| Последовательность прямого праймера | Последовательность обратного праймера | Целевая область гена | Длина ПЦР п.н. |
|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------|
| accacattctgtccatggct                | gctctggcattttctaaacatg                | PAH_ex13             | 250            |
| gaaggtcaaaggaaaaaggacacaa           | gacaatacccagcagcttaagattt             | PAH_ex12_1           | 250            |
| aaattacttactgttaatggaatcagc         | ctgttgaagaccctgtcttag                 | PAH_ex12_2           | 256            |
| tccaacagagaacggaagaaaag             | atccaaaattacactgtcacgga               | PAH_ex11_1           | 250            |
| ccttactttctccttggcatcatt            | atgtagaaggaatcggtgtaga                | PAH_ex11_2           | 250            |
| ccacttttaaatctatccttgggtcc          | gacacaccccaataatgcttt                 | PAH_ex10             | 250            |
| actgcttaaaatttaagagatgtaaca         | cattgaaaagctcgccacagtaa               | PAH_ex9_1            | 249            |
| tccaccaggaggagagaagg                | tgattctataacatatgggcagga              | PAH_ex9_2            | 250            |
| atttgagaaattcaggtcacagac            | agggatcataagcctaaaagagt               | PAH_ex8              | 250            |
| gcaactggtagctggagga                 | atgtgtactactccactacctaagg             | PAH_ex7              | 254            |
| aatcaacctgcatgcattcctac             | tgtataaaacccatgctgctatgag             | PAH_ex6_1            | 250            |
| tcaagaagtggaaaatgtgattgt            | actgtagcaagtgtggcag                   | PAH_ex6_2            | 250            |
| tttctcttccccctcaacaagc              | tttaaccgagacttttagtttaggt             | PAH_ex5              | 250            |
| caataaagtctgtcaattttccc             | ttcccaagaaccattcaagagct               | PAH_ex4_1            | 250            |
| tcacagggtggtcagcatc                 | aaaatggagttaactttgaacgat              | PAH_ex4_2            | 254            |
| tctaaaataaccaggcacttgc              | taagaagaaagacacaggtgaagaatt           | PAH_ex3_1            | 254            |
| agttacttatgtgcaaaattcctct           | tctctcaccctccccattc                   | PAH_ex3_2            | 250            |
| cgacattatccaagacaaacatg             | ctagaagaaagattcatgcttgc               | PAH_ex2              | 250            |
| aaattcccctaactgagcagct              | gtgcggagatgcaccacg                    | PAH_ex1              | 248            |

Сконструированные праймеры позволяют амплифицировать экзоны и интронную часть включающую зону сплайсинга. Синтез подобранных праймеров проводили с включением якорных последовательностей для последующего «баркодирования» образцов. К последовательности прямого праймера была добавлена последовательность 1st\_PCR\_for 5'-tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacag-3', к последовательности обратного праймера была добавлена последовательность 1st\_PCR\_rev 5'-gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacag-3'. Суммарный выход праймеров после синтеза варьировал от 10 до 27 нмоль. В таблице 2 представлена информация о генах, которые были выбраны для разработки таргетной панели для MODY диабета.

Таблица 2 – Характеристика генов, выбранных для таргетной панели MODY диабета

| Ген       | Название гена                                               | Хромосома | Локализация | Количество экзонов | Длина, нуклеотид |
|-----------|-------------------------------------------------------------|-----------|-------------|--------------------|------------------|
| HNF4A     | hepatocyte nuclear factor 4 alpha                           | 20        | 20q13.12    | 15                 | 78,898           |
| GCK       | glucokinase                                                 | 7         | 7p13        | 15                 | 46,227           |
| HNF1A     | HNF1 homeobox A                                             | 12        | 12q24.31    | 9                  | 23,970           |
| IPF1/PDX1 | pancreatic and duodenal homeobox 1                          | 13        | 13q12.2     | 2                  | 6,314            |
| HNF1B     | HNF1 homeobox B                                             | 17        | 17q12       | 11                 | 58,629           |
| NEUROD1   | neuronal differentiation 1                                  | 2         | 2q31.3      | 4                  | 12,223           |
| KLF11     | KLF transcription factor 11                                 | 2         | 2p25.1      | 7                  | 11,287           |
| CEL       | carboxyl ester lipase                                       | 9         | 9q34.13     | 11                 | 9,881            |
| PAX4      | paired box 4                                                | 7         | 7q32.1      | 12                 | 7,851            |
| INS       | insulin                                                     | 11        | 11p15.5     | 3                  | 1,431            |
| BLK       | BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase              | 8         | 8p23.1      | 16                 | 70,213           |
| ABCC8     | ATP binding cassette subfamily C member 8                   | 11        | 11p15.1     | 38                 | 83,961           |
| KCNJ11    | potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11 | 11        | 11p15.1     | 4                  | 3,412            |
| APPL1     | adaptor protein, phosphotyrosine                            | 3         | 3p14.3      | 23                 | 45,743           |
| WSF1      | wolframin                                                   | 4         | 4p16.1      | 8                  | 33,416           |

Ампликонные панели для генов человека (*HNH4A*, *GCK*, *HNH1A*, *IPF1/PDX1*, *HNH1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *APPL1*, *WSF1*) основаны на стандартной процедуре NGS для равномерного покрытия и качества данных NGS на платформах секвенирования Illumina®.

Разработаны первичные наборы с использованием технологии мультиплексной ПЦР для большого числа ПЦР праймеров, позволяющие создавать библиотеки для генов с использованием чередующихся пар праймеров (Приложение Б). Эти пары праймеров подобраны на все экзоны этих целевых генов, и для каждого из генов с использованием двух пулов мультиплексных пар праймеров (таблица Б.1). Такой подход позволяет добиться более сбалансированной глубины считывания последовательностей для каждого экзона.

Разработка ампликонных панелей проводилась с помощью программы TileAmpDesigner. Информация по панели для генов (*HNH4A*, *GCK*, *HNH1A*, *IPF1/PDX1*, *HNH1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *APPL1*, *WSF1*), состоит из 50 праймеров для каждого пула, средний размер ампликона около 400 п.н. и размер ампликонов варьирует от 150 до 600 п.н. Панели могут быть настроены на дополнительные гены генома человека, что позволяет одновременно проводить идентификацию и функциональный анализ для большего числа задач. Праймеры включают неспецифические для целевой последовательности 5'-хвосты, используемые для первого этапа ПЦР. Последовательности 5'-хвостов, рекомендованы Illumina Nextera Library Prep Kits (Nextera Transposase Adapters): 1st\_PCR\_for TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence] и 1st\_PCR\_rev GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence]. Проведён синтез подобранных праймеров. Необходимо отметить, что проведен синтез первоначальных праймеров, которые в последующем будут оптимизироваться.

Ампликонные панели для генов человека (*COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *COL4A6*) основаны на стандартной процедуре секвенирования следующего поколения (NGS) для равномерного покрытия и качества данных NGS на платформах секвенирования Illumina®. Информация по панели для генов (*COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *COL4A6*), состоит из 50 праймеров для каждого пула, средний размер ампликона около 400 п.н. и размер ампликонов варьирует от 150 до 600 п.н. (таблица Б.2). Панели могут быть настроены на дополнительные гены генома человека, что позволяет одновременно проводить идентификацию и функциональный анализ для большего числа задач. В таблице 3 представлена информация о генах, которые были выбраны для разработки таргетной панели к наследственному заболеванию синдрому Альпорта.

Таблица 3 – Характеристика генов, выбранных для разработки таргетной панели Альпорта

| Ген    | Название гена                  | Хромосома | Локализация | Количество экзонов | Длина, нуклеотид |
|--------|--------------------------------|-----------|-------------|--------------------|------------------|
| COL4A3 | collagen type IV alpha 3 chain | 2         | 2q36.3      | 54                 | 150,169          |
| COL4A4 | collagen type IV alpha 4 chain | 2         | 2q36.3      | 57                 | 161,492          |
| COL4A5 | collagen type IV alpha 5 chain | X         | Xq22.3      | 57                 | 257,708          |
| COL4A6 | collagen type IV alpha 6 chain | X         | Xq22.3      | 50                 | 282,809          |

Проведён синтез подобранных праймеров на базе лаборатории центра. Необходимо отметить, что проведен синтез первоначальных праймеров, которые в последующем будут оптимизироваться и возможно будут подбираться другие нуклеотидные последовательности праймеров. Праймеры подбирались эмпирические и работоспособность праймеров будет проверяться при постановке мультиплексной ПЦР.

### 3.2 Формирование коллекции контрольных образцов

В ходе работ были начато формирование коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия. На первом этапе была отобрана цельная кровь от 10 добровольцев различной этнической принадлежности. Выбранные добровольцы были условно здоровы, каждый доброволец пописали информированное согласие. Из цельной крови добровольцев была выделена ДНК, при этом выделение ДНК осуществляли с использованием колоночного метода и методом преципитации используя коммерческие наборы. Суммарный выход ДНК с использованием QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) варьировал от 6,3 до 14,5 мкг, при выделении ДНК из 3 мл с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) выход ДНК варьировал от 56 до 160 мкг. Полученная концентрация ДНК достаточна для отработки условий таргетного секвенирования кодирующей последовательности гена *PAH*. Начаты работы по формированию коллекции контрольных образцов для секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия. Коллекция была пополнена 4 образцами ДНК от пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия.

За отчетный период собран биоматериал от трех пациентов (пробандов) и членов их семей с верифицированным диагнозом MODY диабет и неуточненным подтипом для валидации разработанной таргетной панели для NGS. Диагнозы верифицированы только

клинически, генетического тестирования пациентам ранее не проводилось. Возраст пациентов составлял до 10 лет.

За отчетный период собран биоматериал от трех пациентов (пробандов) из архивной коллекции и от одного пациента с клиническим диагнозом синдром Альпорта, но не подтвержденным генетическим тестированием.

Анализ и формирование группы исследования пациентов с колоректальным раком проходило согласно критериям. Пациенты с КРР (стадия II - III, согласно TNM), перенесшие хирургическую резекцию опухоли, в Национальном научном онкологическом центре г. Астаны с июня по сентябрь 2024 г, включены в настоящее исследование. Критерии включения следующие: а) подтвержденный гистологией КРР, б) наличие достаточного количества образцов тканей из первичных очагов для мутационного анализа; и в) наличие клинической информации. Биопсии были получены из тканей карциномы, соседних нормальных тканей и отдаленных нормальных тканей ( $\geq 10$  см от краев опухоли) пациентов с КРР. Парные ткани опухоли и слизистой оболочки были быстро микропрепарированы и хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  до анализа. Были зарегистрированы клинко-патологические параметры, включая возраст, пол и этническую принадлежность пациентов, место опухоли, степень гистологической дифференциации и гистологический тип (муцинозный или немучинозный). Исследование было одобрено этической комиссией ТОО «Национальный центр биотехнологии» (Выписка из протокола №5 от 14.05.2024 г.), и от всех участников было получено информированное согласие. Всего было собрано 66 образцов биопсии тканей в пробирки, содержащиеся в растворе 20 % сахарозы. Экстракция ДНК для ддПЦР были выполнены в течение 2 часов после сбора ткани, а оставшиеся ткани хранились в морозильной камере ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) до использования. Все пациенты были включены в исследование. Концентрация ДНК согласно показаниям Nanodrop составляла 500-1000 нг/мкл с отношением дин волн 260/280 1,8-1,9.

В ходе выполнения данной работы было получено 34 изолята *A. baumannii*, из которых была выделена геномная ДНК.

### **3.3 Обзор существующих методик диагностики болезни Гоше**

Был проведен обзор методов диагностики БГ. Одним из основных методов диагностики БГ является масс-спектрометрия, которая измеряет активность фермента бета-глюкоцереброзидазы GCase, дефицит которого наблюдается у людей с этим заболеванием. Кроме того, активность бета-глюкоцереброзидазы измеряется с использованием искусственных субстратов, которые при гидролизе излучают флуоресценцию, таким образом происходит анализ активности ферментов. К дополнительным методам диагностики БГ относят иммуноферментные анализы, которые обычно используются для

количественной оценки биомаркеров, связанных с БГ.

Использование масс-спектрометрии в диагностике БГ стало возможным благодаря высокой чувствительности метода. Одной из общепринятых методик стало использование глюкозилсфингозина Lyso-Gb1 как биомаркера, образующегося в результате деацетилирования глюкоцереброзида. Этот маркер является наиболее специфичным и чувствительным для болезни Гоше. Повышенные уровни Lyso-Gb1 в плазме коррелируют с тяжестью заболевания и ответом на терапию, что делает его ценным для начальной диагностики и мониторинга. HPLC-MS/MS является распространённым методом для точного определения уровня Lyso-Gb1 в образцах крови или плазмы. Масс-спектрометрия особенно подходит для неонатального скрининга благодаря высокой пропускной способности и минимальной подготовке образцов. Эти методы масс-спектрометрии позволяют проводить раннее и точное обнаружение болезни Гоше в рамках неонатального скрининга, а также мониторинг прогрессирования болезни и ответа на терапию у уже диагностированных пациентов. Этот метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя выявлять даже низкие уровни активности ферментов, характерные для болезни Гоше. Кроме того, использование масс-спектрометрии позволяет одновременно тестировать несколько ферментов, что может быть полезно при скрининге новорожденных, где одновременно проверяются несколько лизосомных болезней накопления. Данные масс-спектрометра анализируются для определения уровня активности ферментов и эти результаты сравниваются с установленными референтными значениями для постановки диагноза.

Иммуноферментный анализ используется для количественной оценки биомаркеров, связанных с БГ чаще для проведения мониторинга, а не первичной диагностики. Основными биомаркерами при БГ являются хитотриозидаза и CCL18. Уровень хитотриозидазы повышается у пациентов с БГ, так как фермент выделяется активированными макрофагами (клетками Гоше). Однако хитотриозидаза не является специфичной для болезни Гоше, так как её уровень также может повышаться при других лизосомных болезнях накопления и воспалительных заболеваниях. Хемокин CCL18 также полезен для мониторинга, особенно у пациентов с дефицитом хитотриозидазы, вызванным генетическим полиморфизмом, и даёт точное отражение активности заболевания и реакции на лечение.

Помимо хитотриозидазы и CCL18, дополнительные маркеры, такие как ангиотензин-превращающий фермент ACE и белки, выделяемые макрофагами, например, MIP-1 $\beta$ , также могут служить вспомогательными биомаркерами для оценки тяжести заболевания и реакции на лечение. Количественная оценка биомаркеров с использованием иммуноферментного анализа позволяет отслеживать реакцию на ферментозаместительную

терапию и дополняет результаты масс-спектрометрии, хотя не обладает такой же высокой специфичностью. Важно отметить, что иммуноферментный анализ требует наличия плазмы или сыворотки, и результаты могут зависеть от правильности хранения и обработки образцов.

Оценка активности бета-глюкоцереброзидазы в лейкоцитах или сухих пятнах крови предоставляет функциональную оценку для подтверждения диагноза болезни Гоше. Традиционно активность бета-глюкоцереброзидазы измеряется с использованием искусственных субстратов, которые при гидролизе излучают флуоресценцию. Сниженная флуоресценция указывает на ферментативную недостаточность, характерную для БГ. В некоторых лабораториях используется массовая спектрометрия для количественного анализа ферментативных продуктов, что обеспечивает более высокую специфичность и чувствительность по сравнению с флуориметрическими методами. Эти тесты напрямую оценивают функциональность фермента, что имеет решающее значение для диагностики болезни Гоше. Ферментные анализы часто используются вместе с генетическими тестами для подтверждения диагноза, особенно когда уровни биомаркеров по результатам МС неоднозначны.

### **3.4 Патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК**

Показатель заболеваемости БСК по Республике Казахстан в 2022 году составил 2759,6 на 100 тыс. населения (3000,6 в 2021 году). Острый инсульт делится на два основных подтипа. Первый и наиболее распространённый тип — ишемический инсульт, который составил 80-85% всех случаев. С другой стороны, 15-20% случаев связаны с кровоизлияниями в мозг, как следствие разрыва артерии. Инсульт, вызванный сердечным эмболизмом (закупоркой кровеносного сосуда), составляет около 20% всех ежегодных случаев инсульта. При этом 6-12% пациентов сталкиваются с повторным эпизодом в течение двух недель после первого эмболического события.

В последние годы биомаркеры приобрели важное значение в диагностике инсульта, поскольку они помогают выявить заболевание на ранних стадиях, прогнозировать его исход и отслеживать эффективность терапии. Биомаркеры позволяют оценивать как ишемические, так и геморрагические формы инсульта, что значительно улучшает качество диагностики и лечения.

Биомаркеры инсульта можно разделить на несколько категорий в зависимости от их роли в патофизиологии заболевания: маркеры воспаления, маркеры повреждения тканей, маркеры оксидативного стресса и маркеры коагуляции.

Воспаление играет ключевую роль в патогенезе инсульта, особенно в ишемической

форме. Одним из наиболее исследуемых воспалительных биомаркеров является С-реактивный белок CRP. Исследования показали, что повышенный уровень CRP связан с повышенным риском инсульта и неблагоприятным исходом. Важным маркером воспаления является интерлейкин-6 IL-6, который также ассоциирован с неблагоприятным прогнозом при инсульте.

Нейрон-специфическая NSE энлаза и протеин S100B являются биомаркерами, которые отражают повреждение нейронов и астроцитов соответственно. Уровень этих белков в плазме крови коррелирует с объемом поврежденной мозговой ткани и тяжестью инсульта. Например, высокий уровень энлазы может указывать на значительное повреждение мозгового вещества при ишемическом инсульте. Протеин S100B используется для мониторинга кровоизлияний в мозг.

Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе ишемического инсульта, способствуя гибели клеток и усилению воспалительных процессов. Одним из важных биомаркеров окислительного стресса является малоновый диальдегид, повышенный уровень которого свидетельствует о наличии окислительного стресса и повреждении клеток.

Инсульт часто сопровождается нарушениями в системе свертывания крови, что приводит к образованию тромбов и нарушению кровообращения в мозге. Фибриноген является одним из ключевых биомаркеров коагуляции, уровень которого повышается при ишемическом инсульте. Исследования показали, что повышенный уровень фибриногена связан с повышенным риском повторных инсультов и неблагоприятным исходом. D-димер, продукт распада фибрина, также используется для предсказания риска тромбообразования и может указывать на повышенный риск инсульта.

Раннее выявление инсульта и прогнозирование его исхода имеют решающее значение при выборе терапевтической стратегии. Биомаркеры могут помочь в прогнозировании долгосрочных последствий инсульта и восстановительных процессов. Например, повышение уровня энлазы и S100B ассоциируется с худшими неврологическими исходами и повышенной смертностью. Высокий уровень CRP и IL-6 также является индикатором неблагоприятного исхода, указывая на интенсивное воспаление и возможные осложнения.

На рисунке 1 приведена динамика роста публикаций по теме болезни системы кровообращения и инсульт по базе данных PubMed, включающей более 6500 статей, наглядно показывающих насколько данная тема исследований является актуальной.

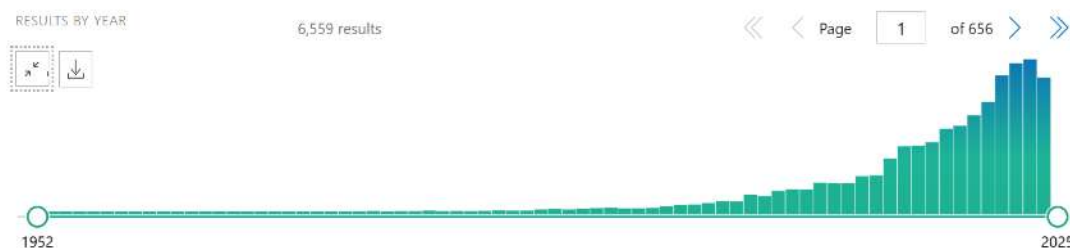


Рисунок 1 – Динамика публикаций по теме «cardiovascular diseases and stroke» в PubMed

### 3.5 Оптимизация метода иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных

В ходе работы на этапе визуализации продукта электрофореза напротив белкового маркера с молекулярной массой в 100 кДа в образце с белками плазмы крови кролика наблюдали две полосы белков, а с сывороткой крови человека – одну полосу (рисунок 2). Для дальнейшего анализа отобрали верхнюю полосу белка плазмы крови кролика и идентифицировали его как белок histidine-rich glycoprotein (рисунок 3). Забор крови лабораторных животных и человека проводили в разных условиях (кролика и крысы - с использованием антикоагулянта гепарина, а человека – с использованием коагулянта – вещества-стимулятора свертывания крови).



Примечание - слева расположена электрофореграмма сыворотки крови человека, справа – плазмы крови кролика, стрелка на кружок справа указывает на фракцию белков, содержащую histidine-rich glycoprotein кролика

Рисунок 2 – Визуализированные белки, разделенные с помощью электрофореза

## Protein View: HRG\_RABIT

Histidine-rich glycoprotein (Fragment) OS=Oryctolagus cuniculus GN=HRG PE=1 SV=1

Database: SwissProt  
Score: 1556  
Monoisotopic mass ( $M_r$ ): 58840  
Calculated pI: 7.27  
Taxonomy: Oryctolagus cuniculus

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of HRG\\_RABIT against nr.](#)

### Search parameters

MS data file: ProteinAnalysisResults.mgf  
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.  
Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

### Protein sequence coverage: 24%

Matched peptides shown in **bold red**.

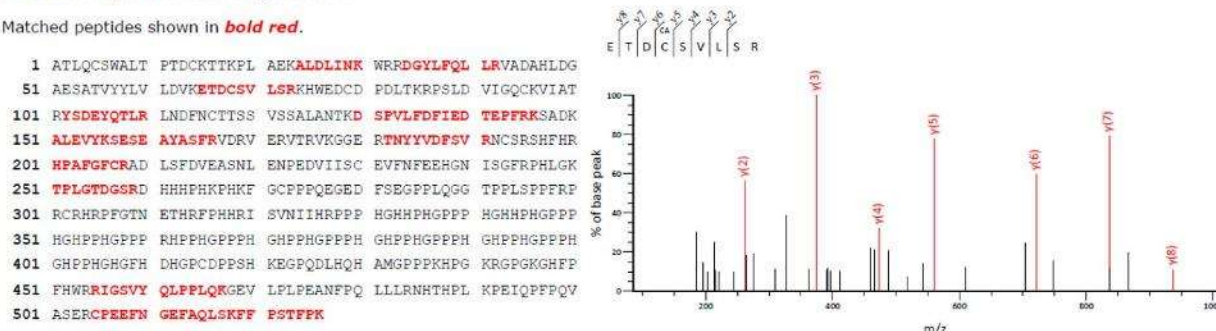


Рисунок 3 – Идентификация белка Histidine-rich glycoprotein с помощью Mascot

Для оценки качества проведения методов восстановления дисульфидных связей дитиотреитолом и алкилирования цистеиновых остатков йодацетамидом были обработаны данные по модификациям пептидов (карбамидометилирование). Исключением являются пептиды с немодифицированным цистеином альбумина плазмы крови кролика, количество которых от общего числа аминокислот (23 из 610) в данном образце составило 3,8%.

Важным критерием оценки качества проделанной работы является степень контаминации исследуемых образцов. Для масс-спектрометрии, как правило, требуется тщательно очищенный образец. Основным источником загрязнения является кератин, который был обнаружен в некоторых образцах, но в незначительном количестве. В четырех образцах, кроме кератина, был найден также трипсин из *Sus scrofa*, являющийся продуктом автотрипсинолиза.

Проводилась оценка эффективности электрофоретического разделения белков. Электрофоретическое разделение белков плазмы/сыворотки крови проводили в полиакриламидном геле. Особенно четкие полосы белков наблюдали на геле третьего разведения плазмы/сыворотки крови (14-16 полос белков).

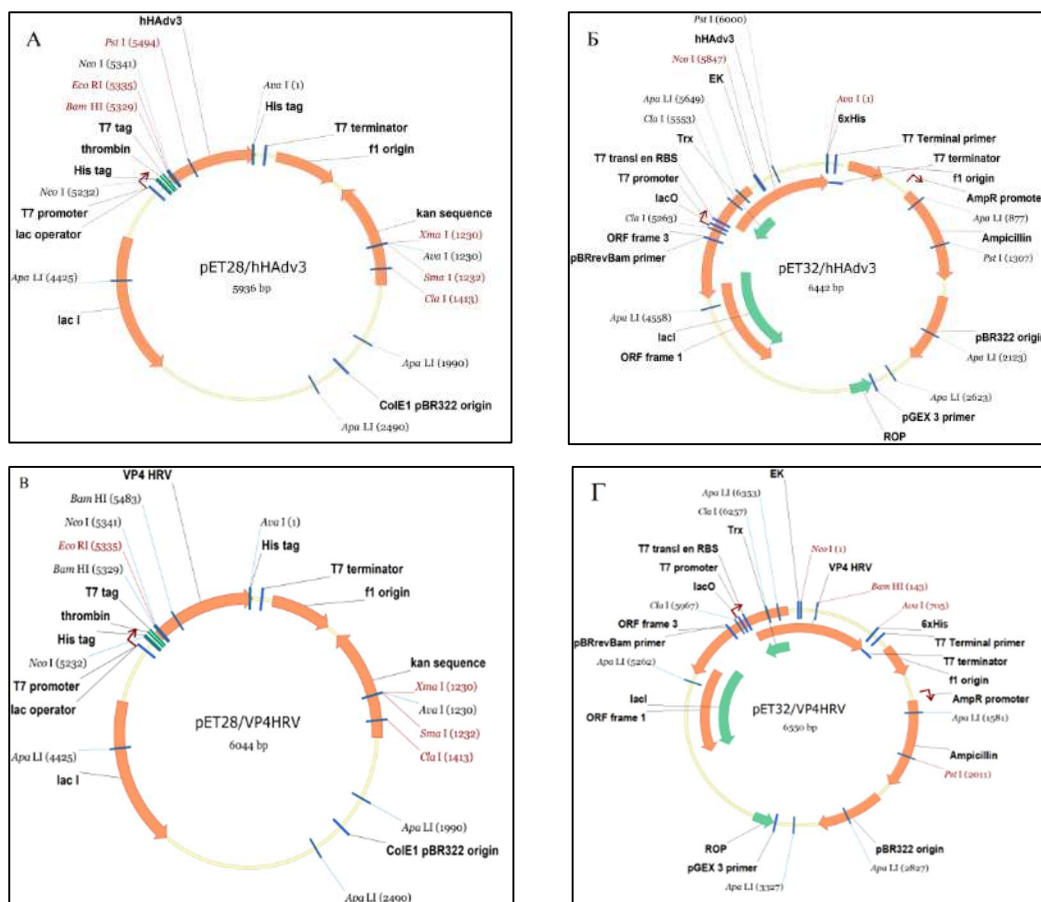
В трех образцах фракции альбуминов (соответственно кролика, крысы и человека) обнаружили гемопиксин, который движется при электрофорезе с фронтом полос

альбуминов. В образцах фракции иммуноглобулинов был обнаружен Alpha-2-HS-glycoprotein, который движется при электрофорезе с фронтом полос иммуноглобулинов.

Электрофоретический метод разделения белков показал относительно низкое разрешение, что свидетельствует о необходимости использования методов, способствующих удалению из проб основных белков крови (альбуминов, иммуноглобулинов и др.), не представляющих большого клинического интереса. Проведены работы по удалению альбумина из плазмы крови человека с использованием набора для удаления альбумина в соответствии с инструкциями производителя

### 3.6 Дизайн и синтез кодоноптоимизированных генов гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса человека

В результате, на основе pET28 и pET32 плазмид, были разработаны две генетические конструкции, несущие ген гексона аденовируса человека 3-го типа и две конструкции, несущие ген VP4 ротавируса человека в соответствии с рисунком 4.



А – pET28/hHAdv3; Б – pET32/hHAdv3; В – pET28/VP4HRV; Г – pET32/VP4HRV  
Рисунок 4 – Схемы генетических конструкций на основе pET28 и pET32 плазмид несущих ген гексона аденовируса человека 3-го типа и VP4 антигена ротавируса человека

Экспрессионный регион плазмидного вектора pET28 вместе со встроенным геном включает гены 6His-Tag, тромбиновый сайт, ген фрагмента гена вируса и 6His-Tag.

Прогнозируемая молекулярная масса рекомбинантного гексона и VP4 антигена в экспрессионной плазмиде составляет 24 и 29 кДа, соответственно. В отличие от вектора рЕТ28 экспрессионный регион плазмидного вектора рЕТ32 включает гены тиоридоксиназного белка, His-Tag, S-Tag, тромбина и энтерокиназы, His и S меток после выделения и очистки белка, гена вируса и 6His-Tag. Прогнозируемая молекулярная масса гексона и VP4 антигена в экспрессионной плазмиде составляет 39 и 45 кДа, соответственно. К полученным кодоноптоимизированным генам со стороны 3'-конца добавлена нуклеотидная последовательность сайта XhoI рестриктазы, со стороны 5'-конца построены сайты *NcoI*, *EcoRI* и *BamHI* рестриктаз в соответствии с рисунком 5.

|     |                 |            |                 |             |                |                |
|-----|-----------------|------------|-----------------|-------------|----------------|----------------|
| A   | EcoRI<br>GAATTC |            | BamHI<br>GGATCC |             | NcoI<br>CCATGG |                |
|     | 1               | TCGGATCCGA | ATTCCCATGG      | GTGCGTATAA  | CAGCCTGGCG     | CGGAAAGGCG     |
|     |                 | AGCCTAGGCT | TAAGGGTACC      | CACGCATATT  | GTGCGGACCG     | GGCTTTCCGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGGCGTTGTG     |
|     |                 |            |                 |             |                | GTGCGTACCC     |
|     |                 |            |                 |             |                | TAACACTGGT     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGTTGGCGCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | ATTGCGCCAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | PstI<br>CTGCAG |
|     |                 |            |                 |             |                | TTGGCAAAGA     |
|     |                 |            |                 |             |                | TATTACCACC     |
|     |                 |            |                 |             |                | ACCAGAGGCG     |
| 101 | ACCACCACCA      | CCAACACCTT | TGGCATTGCG      | AGCATGAAAG  | GGGATAACAT     | TACCAAAGAA     |
|     | TGGTGGTGGT      | GGTTGTGGAA | ACCGTAACGC      | TCGTACTTTC  | CGCTATTGTA     | ATGGTTTCTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | CCGGACGTCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | AACCGTTTCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | ATAATGGTGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGCTTCCGC     |
| 201 | AAGAAAAACC      | GATTTATGCG | GATAAAACCT      | ATCAGCCGGA  | ACCGCAGGTG     | GGCGAGAGAA     |
|     |                 |            |                 |             |                | GCTGGACCGA     |
|     |                 |            |                 |             |                | TACCGATGTG     |
|     |                 |            |                 |             |                | ACCACAGAAA     |
|     |                 |            |                 |             |                | AATTTGGCGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | TTCTTTTGGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | CTAATAACGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CTATTTTGGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | TAGTCGGCCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGCGTCCAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGGCTTCTTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGACCTGGCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | ATGGGTACAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGTTGCTTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | TTAAACCGCC     |
| 301 | CGCGCGCGTG      | AAACCGGCGA | CCAACATGAA      | ACCGTGTCTAT | GGCAGCTTTG     | CGCGCCCGAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CAACATTAAA     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCGGCCAGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGAAAAACCG     |
|     |                 |            |                 |             |                | CAAAGTGAAA     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCGCGCGAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | TTTGGCGGCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGTTGTACTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGCACGATA     |
|     |                 |            |                 |             |                | CCGTCGAAAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCGGGGCTG     |
|     |                 |            |                 |             |                | GTGTGTAATT     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGCGCGGTCC     |
|     |                 |            |                 |             |                | GCTTTTGGC      |
|     |                 |            |                 |             |                | GTTCACATT      |
| 401 | CCGACCAACG      | AAGGCGGCGT | GGAAATTGAA      | GAACCGGATA  | TTGATATGGA     | ATTTTTTGAT     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCCGCGATG     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGGTGGCGGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGCGCTGGCG     |
|     |                 |            |                 |             |                | CCGGAATTG      |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCTGGTGGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | TTCCGCGCGA     |
|     |                 |            |                 |             |                | CCTTTAACTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | CTTGGCCTAT     |
|     |                 |            |                 |             |                | AACTATACCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | TAAAAAATA      |
|     |                 |            |                 |             |                | CCGGCGCTAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | GCCACGCCCC     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCGGACCGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCCTTTAAC     |
| 501 | TGCTGTATAC      | CGAAAACTG  | AACCTGGAAA      | CCCGGATAG   | CCATGTGGTG     | TATAAACCGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | GCACCAGCGA     |
|     |                 |            |                 |             |                | TAACAGCCAT     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGGAACCTGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | GCCAGCAGGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | ACGACATATG     |
|     |                 |            |                 |             |                | GCTTTTGCAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | TTGGACCTTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGGGCCTATC     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGTACACCAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | ATATTTGGCC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGTGGTGGCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | ATTGTGCGTA     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGCTTGAACC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGGTGCTCCG     |
|     |                 |            |                 |             |                | XhoI<br>CTGCAG |
|     |                 |            |                 |             |                | TTGGCAAAGA     |
|     |                 |            |                 |             |                | TATTACCACC     |
|     |                 |            |                 |             |                | ACCAGAGGCG     |
|     |                 |            |                 |             |                | GGCTTCCGC      |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGCTTCCGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | ATAATGGTGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGCTTCCGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | AATTTGGCGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | TTCTTTTGGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | CTAATAACGC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CTATTTTGGG     |
|     |                 |            |                 |             |                | TAGTCGGCCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGCGTCCAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGGCTTCTTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | CGACCTGGCT     |
|     |                 |            |                 |             |                | ATGGGTACAC     |
|     |                 |            |                 |             |                | TGGTTGCTTT     |
|     |                 |            |                 |             |                | TTAAACCGCC     |
| 601 | GATGCGGAAT      | CTCGAGC    |                 |             |                |                |
|     | CTACGGCTTA      | GAGCTCG    |                 |             |                |                |

|     |                 |            |                 |            |                |                 |
|-----|-----------------|------------|-----------------|------------|----------------|-----------------|
| Б   | EcoRI<br>GAATTC |            | BamHI<br>GGATCC |            | NcoI<br>CCATGG |                 |
|     | 1               | GTGCGATCCG | AATTCCTATG      | GGTCGATATC | AGCCGACCCAC    | CTTTACCCCG      |
|     |                 | CAGCCTAGGC | TTAAGGGTAC      | CCAGGCATAG | TCGGCTGGTG     | GAAATGGGGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGCTGGCTAA      |
|     |                 |            |                 |            |                | TAACCTAAGA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CTAATTGTGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | TTGTGGTTGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCACCACAT      |
|     |                 |            |                 |            |                | BamHI<br>GGATCC |
|     |                 |            |                 |            |                | TCGGTGGAT       |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCCAGTATA      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACGTGTTTGG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGAAAAACAA      |
| 101 | TGAAAGCAAC      | AACAACAGCG | ATTTTGGAC       | CGCGGTGATT | CGCGTGGAAC     | CGCATGTGGA      |
|     | ACITTTGTTG      | TTGTTGTGCG | TAAAAACCTG      | CGGCCACTAA | CGCCACCTTG     | GGGTACACCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | AGGCCACCTA      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGGTACATAT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TGCACAAACC      |
|     |                 |            |                 |            |                | GCTTTTGTIT      |
| 201 | CAGTTTAAAG      | TGCGCAACGA | TAGCGATATA      | TGGAAATTTT | TGGAAATGTT     | TCGCGGCAGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | AGCCAGAGCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | ATTTTATATA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCCGCGACC      |
|     |                 |            |                 |            |                | CTGACCAGCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | GTCAATTTGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACGGGTTGCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | ATCGCTATTT      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACCTTTAAAG      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACCTTTACAA      |
|     |                 |            |                 |            |                | AGCGCGCTCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | TCGGTCTCGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | TAAATAATTT      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGCGGCGTGG      |
|     |                 |            |                 |            |                | GACTGGTCTG      |
| 301 | ATACCAAACT      | GGTGGGCAAT | CTGAAATATG      | CGCGCGCGAT | TTGGACCTTT     | CATGGCGAAA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CCCGCGCGCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | GACCACCGAT      |
|     |                 |            |                 |            |                | AGCAGCAACA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCGAACCT       |
|     |                 |            |                 |            |                | TATGGTTTGA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CCACCGGTAA      |
|     |                 |            |                 |            |                | GACTTTATAC      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCCGCGGTA      |
|     |                 |            |                 |            |                | AACTGGGAAA      |
|     |                 |            |                 |            |                | GTACCGCTTT      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGGGCGCGCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CTGGTGGCTA      |
|     |                 |            |                 |            |                | TCGTGCTTGT      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGCGCTTGGG      |
| 401 | GAACGGCAAT      | AGCAATACCA | TTCCATAGCGA     | ATTTTATATT | ATTCGCGGCA     | CAAAATGCAAC     |
|     |                 |            |                 |            |                | GAATATATTA      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACAACGGGCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | GCGCGCGATT      |
|     |                 |            |                 |            |                | CTTGCGGTAA      |
|     |                 |            |                 |            |                | TCGTAATGCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | AAGTATCGCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TAAAAATATA      |
|     |                 |            |                 |            |                | TAAGCGCGGT      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGGTCTTTTC      |
|     |                 |            |                 |            |                | GTTTACGTTG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CTTATATAAT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TGTTGCCGGA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCGGCGTAA      |
| 501 | CAGAACACCC      | GCACAGTGGT | GCGGCTGAGC      | CTGAGCAGCC | GCAGCATTCA     | GTATACCGCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCGAGGTGA      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACGAAGATAT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TACCATAGC       |
|     |                 |            |                 |            |                | AAAACGAGCC      |
|     |                 |            |                 |            |                | GTCTTGTGGG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGTTGCACCA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCGGACTCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | GACTCGTCTG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGTGTAACT       |
|     |                 |            |                 |            |                | CATATGGGCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGCGTCCACT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TGCTTCTATA      |
|     |                 |            |                 |            |                | ATGGTAATCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | TTTTGGTCTG      |
| 601 | TGTGGAAAGA      | AATGCAGTAT | AACCGCGATA      | TTATTATTCG | CTTTAAATTT     | GGCAACAGCA      |
|     |                 |            |                 |            |                | TTATTAAACT      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGCGCGCCTG      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGCTATAAAT      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGAGCGAAAT      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACACCTTTCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TTACGTCATA      |
|     |                 |            |                 |            |                | TTGGGCGCTAT     |
|     |                 |            |                 |            |                | AATAATAAGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | GAAATTTTAA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGTGTGCTGT      |
|     |                 |            |                 |            |                | AATAATTTGA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CCCGCGCGAC      |
|     |                 |            |                 |            |                | CCGATATTTA      |
|     |                 |            |                 |            |                | CCTCGCTTTA      |
|     |                 |            |                 |            |                | XhoI<br>CTGCAG  |
|     |                 |            |                 |            |                | TTGGCAAAGA      |
|     |                 |            |                 |            |                | TATTACCACC      |
|     |                 |            |                 |            |                | ACCAGAGGCG      |
|     |                 |            |                 |            |                | GGCTTCCGC       |
|     |                 |            |                 |            |                | TGGCTTCCGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | ATAATGGTGG      |
|     |                 |            |                 |            |                | TGGCTTCCGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | AATTTGGCGG      |
|     |                 |            |                 |            |                | TTCTTTTGGG      |
|     |                 |            |                 |            |                | CTAATAACGC      |
|     |                 |            |                 |            |                | CTATTTTGGG      |
|     |                 |            |                 |            |                | TAGTCGGCCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TGGCGTCCAC      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGGCTTCTTT      |
|     |                 |            |                 |            |                | CGACCTGGCT      |
|     |                 |            |                 |            |                | ATGGGTACAC      |
|     |                 |            |                 |            |                | TGGTTGCTTT      |
|     |                 |            |                 |            |                | TTAAACCGCC      |
| 701 | TAGCTATAAA      | GCGGCGAACC | TCGAGGAC        |            |                |                 |
|     | ATCGATATTT      | CGCGGCTTGG | AGCTCTGT        |            |                |                 |

А – кодоноптоимизированный ген гексона аденовируса человека 3 типа с сайтами рестрикции; Б - кодоноптоимизированный ген VP4 антигена ротавируса человека с сайтами рестрикции

Рисунок 5 – Нуклеотидная последовательность кодоноптоимизированных генов гексона аденовируса человека 3-го типа и VP4 антигена ротавируса человека

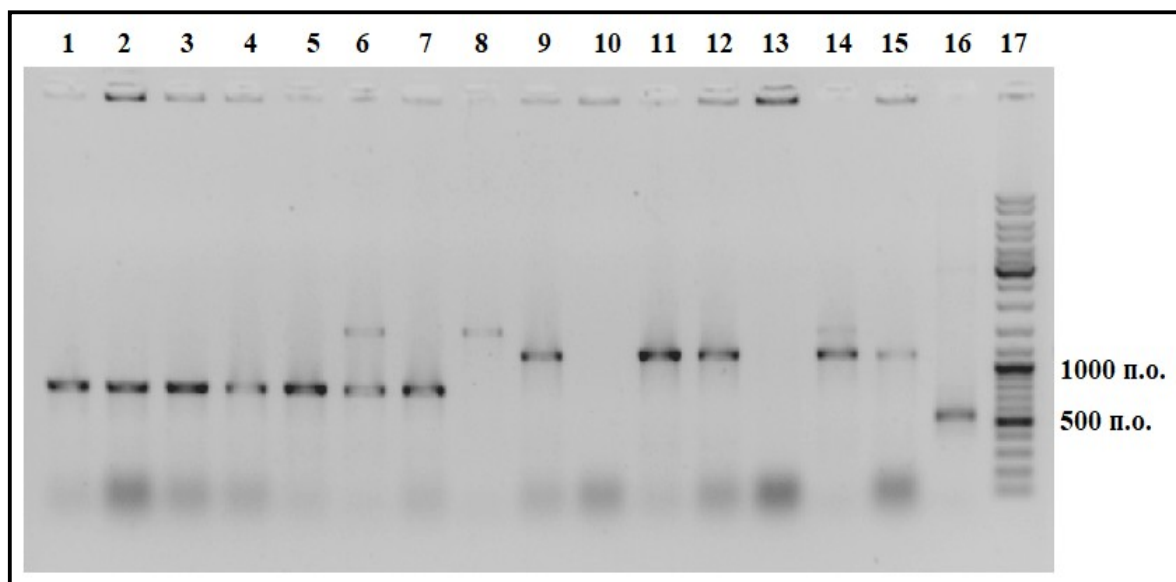
Аминокислотная последовательность отобранных фрагментов гексона аденовируса и VP4 антигена ротавируса получены из базы данных PubMed: BAF42828+ и QPL18150.1.

На основе отобранной аминокислотной последовательности гексона аденовируса и VP4 антигена ротавируса человека разработана нуклеотидная последовательность, оптимизированная для экспрессии в кишечной палочке. Кодоноптимизацию проводили с использованием программ Vector NTI.

### **3.7 Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса человека**

На основе разработанных кодоноптимизированных генов синтезированы ген гексона аденовируса человека 3 типа и ген VP4 антигена ротавируса человека. Молекулярная масса генов с сайтами рестрикции составила 617 п.о. для гексона аденовируса человека 3 типа и 728 п.о. для VP4 ротавируса человека.

С целью наработки препаративного количества полученного гена и дальнейшего определения наличия ошибок в синтезированном гене, полученный ген клонирован в плазмиду pGEM-T согласно инструкции pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, США). Полученный вектор был трансформирован в *E.coli* штамма DH5α. Выросшие на твердой питательной среде клоны кишечной палочки скринировались методом ПЦР с использованием Taq-полимеразы и M13 праймеров на наличие плазмиды со вставкой гена фрагмента гексона. Результаты скрининга колоний представлены на рисунке 6.



1-7 – клоны клеток *E.coli* штамма DH5α несущие ген hNA<sub>Adv3</sub>; 8-15 – клоны клеток *E.coli* штамма DH5α несущие ген VP4HRV; 16 – отрицательный контроль; 17 – молекулярные маркеры

Рисунок 6 – Электрофорез продуктов ПЦР скрининга колоний трансформированных клеток

Для определения нуклеотидной последовательности ДНК были отобраны клетки 4-х колоний, а очищенная ДНК анализировалась путем секвенирования. Секвенирование

показало, что в нуклеотидные последовательности генов не содержали делеций, вставок и замен. Полученные гены по сайтам рестрикции *EcorI* и *XhoI* клонированы в экспрессионную плазмиду рЕТ28. По сайтам рестрикции *NcoI* и *XhoI* полученные гены клонированы в экспрессионную плазмиду рЕТ32. Полученные конструкции трансформированы методом электропорации в экспрессионные штаммы *E.coli* BL21, колонии клеток методом ПЦР скринировались на наличие экспрессионных векторов. Результаты скрининга показали высокую эффективность трансформации. До 80% клонов несли плазмиды со вставками генов гексона аденовируса человека 3-го типа VP4 антигена ротавируса человека. В данной работе в условиях *in vitro* синтезированы экспрессионные генетические конструкции несущие гены гексона аденовируса человека 3 типа и VP4 ротавируса человека. Генетические конструкции были созданы на основе экспрессионных плазмид рЕТ28 и рЕТ32 и соответствуют аналогичными результатами отечественных и зарубежных работ. Полученные генетические конструкции могут быть использованы для создания микроорганизмов, которые способны синтезировать рекомбинантный гексон аденовируса человека 3 типа и рекомбинантный VP4 антиген ротавируса человека. Полученные рекомбинантные антигены открывают возможности для создания биотехнологического производства диагностических препаратов и моноклональных антител.

### 3.8 Идентификации бактерий с помощью секвенирования

Для последующей идентификации с помощью секвенирования нуклеотидной последовательности по методу Сэнгера был амплифицирован фрагмент гена 16S рРНК, а именно вариабельные участки V1-V5, из геномной ДНК полученных изолятов патогена. Для проверки наличия ПЦР-продукта был проведен электрофорез в 1% агарозном геле (рисунок 7).

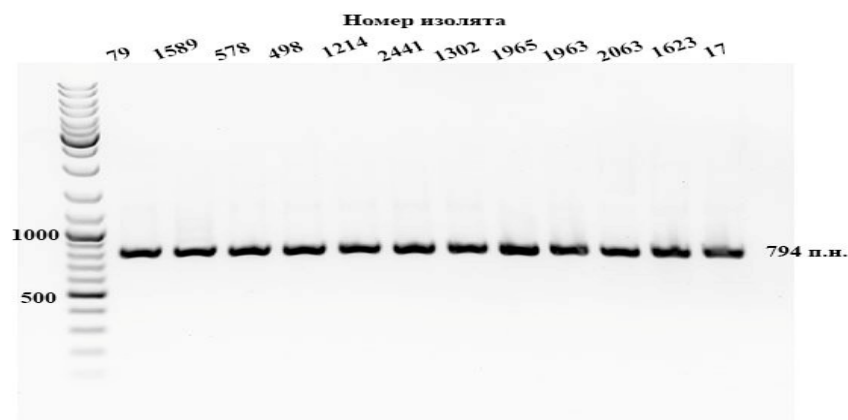


Рисунок 7 – Амплифицированный фрагмент гена 16S рРНК изолятов *A. baumannii*

Согласно рисунку 7, длина амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК (V1-V5) составляет 794 п.н., что соответствует нуклеотидной последовательности между

праймерами 27F и 806R. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили со всеми имеющимися изолятами *A. baumannii*.

Полученные ПЦР-продукты были подвержены гидролизу щелочной фосфатазой FastAP (0,5 ед.), экзонуклеазой ExoI (5 ед.) при +37°C в течение 30 минут. После чего ферменты были ингибированы в результате инкубирования смеси при +85°C в течение 15 минут. Обработанный амплифицированный продукт фрагмента 16S рРНК был использован в качестве матричной ДНК для определения прямой нуклеотидной последовательности по методу Сэнгера.

Провели сравнение первичных нуклеотидных последовательностей варьируемых участков V1-V5 гена 16S рРНК с гомологичными нуклеотидными последовательностями, имеющихся в базе данных NCBI с помощью инструмента BLAST (рисунок 8).

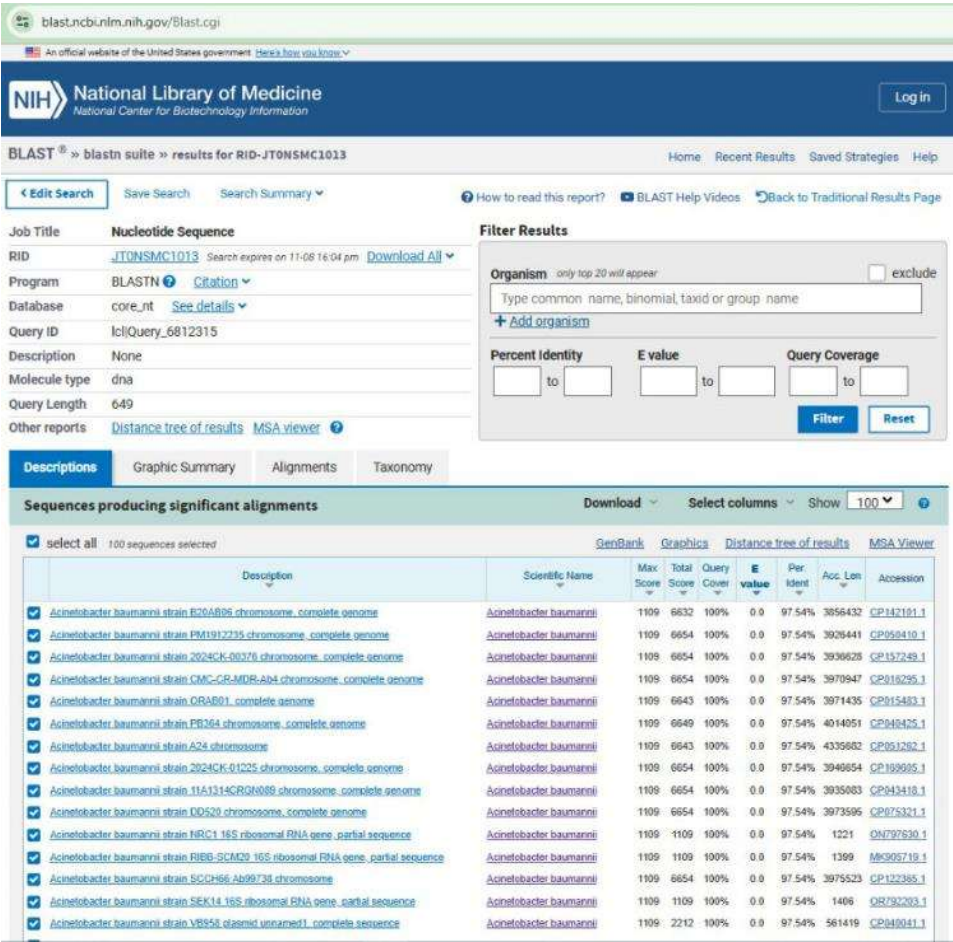


Рисунок 8 – BLAST-анализ нуклеотидной последовательности 16S рРНК изолятов *A. Baumanii*

Согласно рисунку 8, сравниваемые нуклеотидные последовательности фрагмента V1-V5 гена 16S рРНК идентичны на 97,54%, что подтверждает принадлежность выделенных геномных ДНК бактерии *A. baumannii*. Все имеющиеся 34 изолята были подтверждены посредством секвенирования гена 16S рРНК. Таким образом, для

дальнейших этапов работы была собрана коллекция геномной ДНК из 34 изолятов *A. baumannii*, подтвержденная секвенированием гена 16S рРНК по методу Сэнгера.

### 3.9 Подбор праймеров для разработки тест-систем на основе ПЦР-в-РВ

Для разработки отечественной тест-системы на основе ПЦР-в-РВ для выявления и дифференциации возбудителей Лайм боррелиоза (*B. burgdorferi* s.l.) и клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *B. miyamotoi* был проведен патентный поиск (Приложение В) и проанализированы полногеномные последовательности *B. miyamotoi* и генов *B. burgdorferi* s.l. из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, период обращения сентябрь-октябрь 2024 г.). Гены *fla*, в частности *flaB*, играют ключевую роль в инфицировании клеток хозяина, в частности, они кодируют поверхностные белки флагеллины, которые обеспечивают инвазию спирохет в эндотелиальные клетки хозяина.

Нуклеотидная последовательность гена *fla* видов спирохет, входящих в группу *B. burgdorferi* s.l. идентичны на 94-99%, при этом она достаточно вариабельна для дифференциации данной группы патогенов от *B. miyamotoi*, а также спирохет других видов. Были подобраны участки гена флагеллина *fla B* с наибольшим полиморфизмом для *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* (рисунок 9).

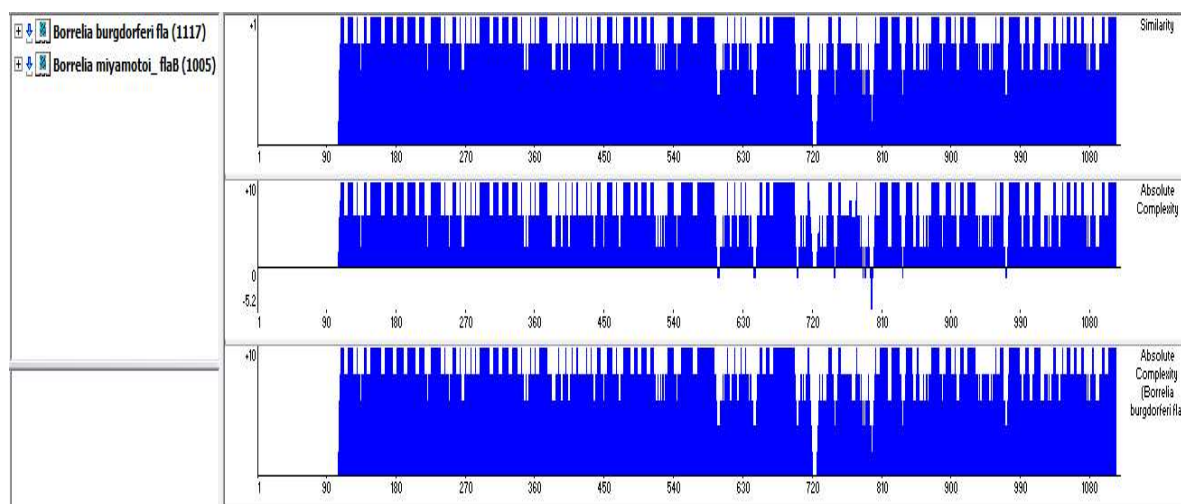


Рисунок 9 – Результат «выравнивания» (align) гена *fla B* для *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* (VectorNTI11.5.1/AlignX)

Для выявленных полиморфных участков гена *flaB* подбирали праймеры и пробы таким образом, чтобы двуцепочечные взаимодействия были минимальными как внутри одного сета, так и между обоими сетами (для *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*). Взаимодействия между парами праймеров/проб показано на рисунке 10.

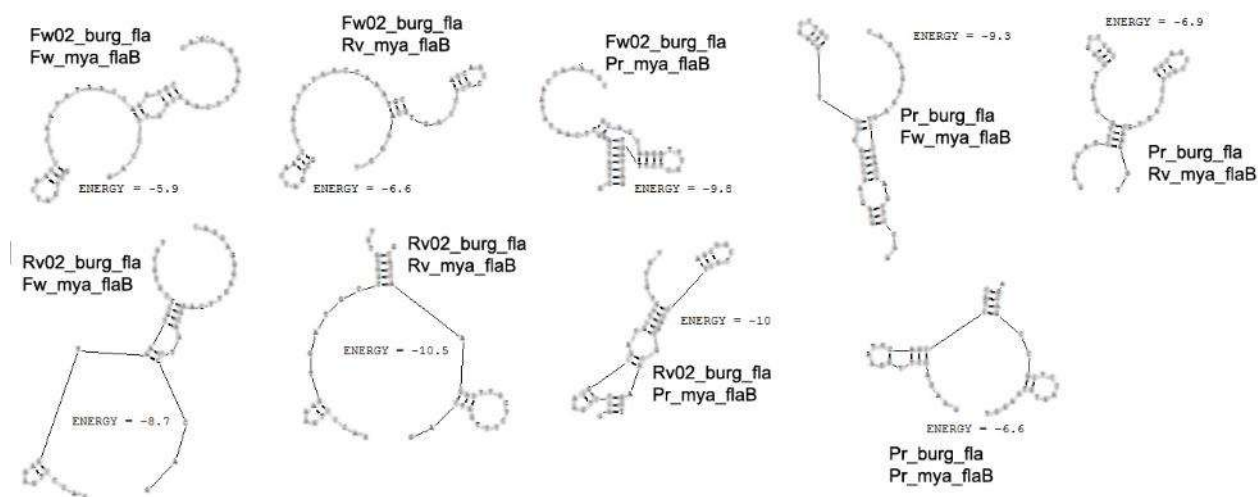


Рисунок 10 – Двучепочечные взаимодействия праймеров и зондов на фрагменты гена *flaB* (RNAstructure 5.0)

Таким образом, для создания тест-набора, детектирующего и дифференцирующего *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*, были разработаны праймеры и зонды к локусам генов *flaB* *B. burgdorferi* s.l. и *flaB* *B. miyamotoi*. Разработанные праймеры и зонды были синтезированы и очищены для дальнейшей работы.

Для проверки качества разработанных праймеров и зондов использовали архивные образцы гомогенатов клещей вида *I. persulcatus*, собранных в эпидемиологический сезон 2023 и 2024 г. *Ixodes persulcatus* являются основным резервуаром и вектором *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* в Азии, в том числе в южном и восточном регионах Казахстана. Исследовательской группой в рамках выполнения предыдущих проектов был сформирован архив гомогенатов клещей, содержащих ДНК данных патогенов. Всего для проверки праймеров и зондов было использовано шесть образцов гомогенатов *I. persulcatus*, в двух из которых было установлено наличие ДНК *B. afzelii*, в одном ДНК *B. garini*, в одном ДНК *B. miyamotoi*, также два образца отрицательных по присутствию ДНК *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*. ДНК боррелий в образцах была детектирована как было описано ранее с применением классической ПЦР и праймеров, нацеленных на гены *flaB*, *glpQ* и *P66*, а также с помощью ПЦР-в-РВ с использованием коммерческого набора «АмплиСенс® вирус клещевого энцефалита, *B. burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris*-FL» (ИнтерЛабСервис, Россия) согласно инструкции производителя.

Из архивных гомогенатов были выделены образцы ДНК. ПЦР проводили по температуре отжига праймеров и программе ПЦР циклирования, а также составу ПЦР реакции. Оптимизация температуры отжига праймеров проводилась в ПЦР в режиме реального времени с градиентом температур в диапазоне 52-59°C. Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения QuantStudio 6 Pro («Applied

Biosciences»).

По результатам ПЦР-в-РВ неспецифический отжиг праймеров локусам генов *fla* и *flaB* боррелий отсутствовал в отрицательных образцах ДНК. Все положительных по ДНК *B. afzelii*, *B. garini* и *B. miyamotoi* образцы дали специфические кривые амплификации по генам *fla* и *flaB*, соответственно, при этом результат амплификации положительного образца по содержанию ДНК *B. miyamotoi* был отрицательным по гену *fla*, а положительные образцы по присутствию ДНК *B. burgdorferi* s.l. – отрицательными по *flaB*. Оптимальная температура отжига праймеров составила 55°C. Репрезентативные результаты амплификации двух отрицательных образцов и двух положительных образцов ДНК по присутствию *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* представлены на рисунке 11.

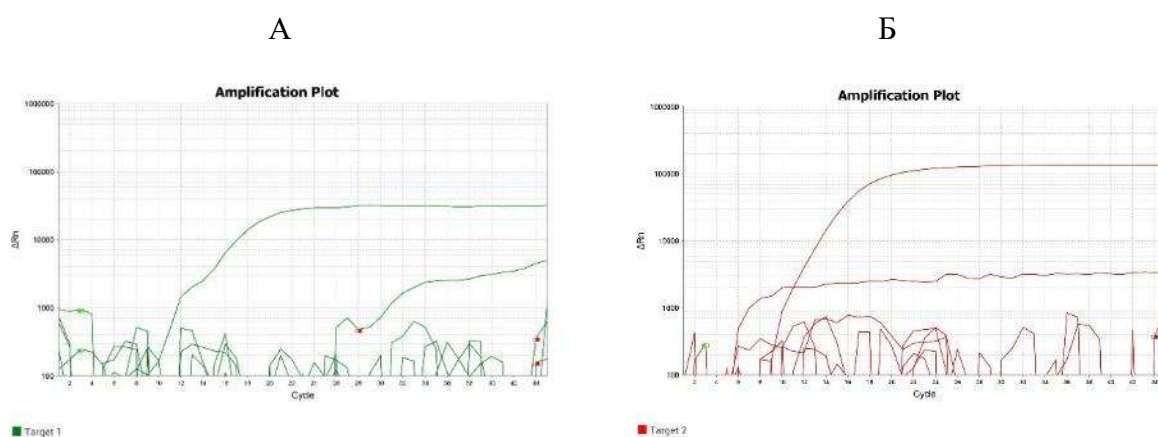


Рисунок 11 – Репрезентативные результаты амплификации при 55°C по локусам генов *fla* (А) и *flaB* (Б) боррелий

Таким образом разработанные праймеры и зонды могут быть использованы для дальнейшей разработки тест-системы для выявления и дифференциации возбудителей Лайм боррелиоза (*B. burgdorferi* s.l.) и клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *B. miyamotoi*.

### 3.10 Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз

Аминокислотная последовательность обратной транскриптазы была подобрана с использованием баз данных UniProt и NCBI GenBank и результатов патентного поиска. Последовательность ревертазы из ВИЧ1 группы М входит в состав гена *gag-pol* полипротеина, который состоит из 2 доменов, кодирующего структурные белки *gag*-домена и полимеразного *pol*-домена. Из анализа аминокислотной последовательности белка следует, что введение ряда мутаций может потенциально сказаться на увеличении эффективности фермента. Было выбрано 25 мутации, которые указаны на рисунке 12, где

представлен сравнительный анализ двух последовательностей: нативной обратной транскриптазы из ВИЧ и ОТ с введенными мутациями.

|          |       |                                                        |     |     |     |     |     |
|----------|-------|--------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|          |       | Section 1                                              |     |     |     |     |     |
|          | (1)   | 1                                                      | 10  | 20  | 30  | 40  | 52  |
| Original | (1)   | -PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIG  |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (1)   | MPISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEEKIKALTEICTEMEKEGKISKIG  |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 2                                              |     |     |     |     |     |
|          | (53)  | 53                                                     | 60  | 70  | 80  | 90  | 104 |
| Original | (52)  | PENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKK   |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (53)  | PENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKK   |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 3                                              |     |     |     |     |     |
|          | (105) | 105                                                    | 110 | 120 | 130 | 140 | 156 |
| Original | (104) | KSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWWG  |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (105) | KSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWWG  |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 4                                              |     |     |     |     |     |
|          | (157) | 157                                                    | 170 | 180 | 190 |     | 208 |
| Original | (156) | SPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDLDLYVGSdleIGQHRTKIEELRQ  |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (157) | SPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDLDLYVGSdleIGQHRTKIEELRE  |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 5                                              |     |     |     |     |     |
|          | (209) | 209                                                    | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
| Original | (208) | HLIRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQK   |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (209) | HLIRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIQLPEKDSWTVNDIQK   |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 6                                              |     |     |     |     |     |
|          | (261) | 261                                                    | 270 | 280 | 290 | 300 | 312 |
| Original | (260) | LVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGTKALTEVPLTEEALELEAENREILK    |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (261) | LVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGAKALTDVVPLTEEALELEAENREILK   |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 7                                              |     |     |     |     |     |
|          | (313) | 313                                                    | 320 | 330 | 340 | 350 | 364 |
| Original | (312) | EPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGAHTN    |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (313) | EPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYAKMRSAHTN    |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 8                                              |     |     |     |     |     |
|          | (365) | 365                                                    | 370 | 380 | 390 | 400 | 416 |
| Original | (364) | DVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWE   |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (365) | DVKQLTEVVQKIATESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWE   |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 9                                              |     |     |     |     |     |
|          | (417) | 417                                                    | 430 | 440 | 450 |     | 468 |
| Original | (416) | FVNTPLVLKWLWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTNRGRQKVV  |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (417) | FVNTPLVLKWLWYQLETETPIVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTDGRGRQVV |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 10                                             |     |     |     |     |     |
|          | (469) | 469                                                    | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 |
| Original | (468) | TLTDTTNQKTELQAIYLALQDSGLEVNIVTDSQYALGIIQAQPDQSESELVN   |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (469) | SLTETTNQKTELQAIQLALQDSGSEVNIVTDSQYALGIIQAQPDKSESELVN   |     |     |     |     |     |
|          |       | Section 11                                             |     |     |     |     |     |
|          | (521) | 521                                                    | 530 | 540 | 550 | 562 |     |
| Original | (520) | QIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSAQIRKVL-             |     |     |     |     |     |
| Mutated  | (521) | QIIEQLIKKEKVYLSWVPAHKGIGGNEQVDKLVSSGIRKVL-             |     |     |     |     |     |

Рисунок 12 – Мутации в гене обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека

Как видно из рисунка 12 модифицированная последовательность обратной транскриптазы содержит аминокислотные замены в следующих положениях: V36T, E123K, D178E, Q208E, R112K, L215F, V246Q, R278K, T287A, E292D, E294V, R357K, G360S, A372V, T377A, K391R, K432T, N461D, T469S, D472E, Y484Q, L492S, Q513K, A535S, A555S.

Известно, что частота встречаемости кодон, кодирующих белки млекопитающих и человека для одних и тех же аминокислот различна, поэтому была проведена процедура кодоноптимизации, в ходе которой, триплеты были заменены на другие, но без изменения аминокислотной последовательности. Процедура замена кодонов на оптимальный состав

для экспрессии гена обратной транскриптазы в клетках *E. coli* была проведена с использованием ресурса IDT Codon Optimization Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool>). В приложении Е приведена нуклеотидная последовательность обратной транскриптазы, оптимизированная под экспрессию в *E. coli*.

В качестве бактериального экспрессионного вектора был выбран вектор pET-28c(+) (Novagen, США), который содержит индуцибельный промотор бактериофага T7 и селективный маркер в виде гена устойчивости к канамицину. Для сборки генно-инженерной конструкции с геном обратной транскриптазы был выбран протокол безрестрикционного клонирования. Основываясь на последовательности гена, были подобраны и синтезированы олигонуклеотиды RT1-Hisfw (5'–TGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCCCATTAGTCCTATTGAAA–3') и RT1rv (5'–GGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCACAGTACTTTTCTGATTCCA–3'). Моделирование показало, что результирующий вектор будет имеет следующий вид (рисунок 13).

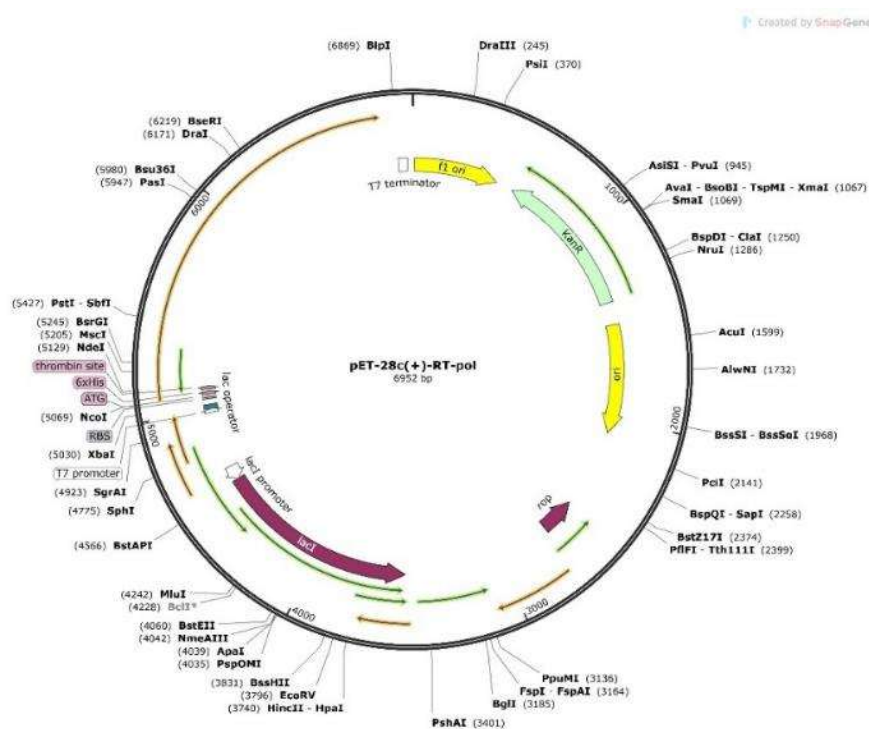


Рисунок 13 – Плазмидная карта вектора pET-28c(+) с интегрированным геном обратной транскриптазы

Как следует из рисунка 13 в составе данного вектора модифицированный ген обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека будет встроен под контроль РНК полимеразы бактериофага T7. В открытой рамке считывания последовательность белка насчитывает 562 п.о. С N-конца обратная транскриптаза содержит гексагистидиновую метку. Расчетная масса рекомбинантного белка составляет 61,8 кДа.

### 3.11 Клонирование гена обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора

Синтезированный ген модифицированной и кодоноптоимизированной обратной транскриптазы представлен в составе высококопийного плазмидного вектора pTOP\_Blunt\_V2. Плазмидную ДНК нарабатывали путем трансформации данным вектором компетентных клеток *Escherichia coli* штамма DH5α по протоколу температурного шока. В качестве селективного маркера pTOP\_Blunt\_V2 содержит ген устойчивости к антибиотику ампициллину. Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили по протоколу Miniprep с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, США). Ген обратной транскриптазы был амплифицирован с использованием ПЦР-праймеров: RT-Fw и RT-Rv. Результаты амплификации представлены на рисунке 14.

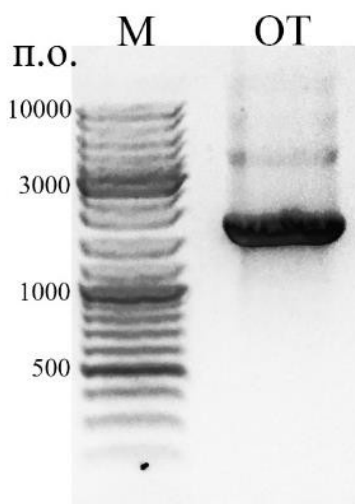


Рисунок 14 – Результаты ПЦР амплификации гена обратной транскриптазы, где ОТ – обратная транскриптаза, М – ДНК маркер

Очистку амплифицированного гена проводили с использованием смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт с последующим осаждением ДНК в этаноле. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре, в результате получен амплифицированный ген обратной транскриптазы в количестве 1,34 мкг.

Для проведения безрестрикционного клонирования проводили ПЦР с 50 нг амплифицированного гена обратной транскриптазы, 30 нг вектора pET-28c(+) и высокоточной Phusion ДНК полимеразы в соответствующем буфере. Условия реакции были следующие: 98°C в течение 3 мин; 25 циклов - 98°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 3 мин; 1 цикл - 72°C в течение 10 минут. Для дегградации исходной (метирированной) плазмидной ДНК амплифицированный продукт обрабатывали эндонуклеазой DpnI в буфере Tango 1X при 37°C в течение 2 часов. После инактивации рестриктазы полученной смесью обрабатывали компетентные клетки DH5α по протоколу

температурного шока. Отбор положительных клонов проводили на ЛБ-агаре с канамицином. Клоны-трансформанты проверяли на наличие целевой конструкции при помощи ПЦР-скрининга по Т7 региону. Результаты скрининга приведены на рисунке 15.

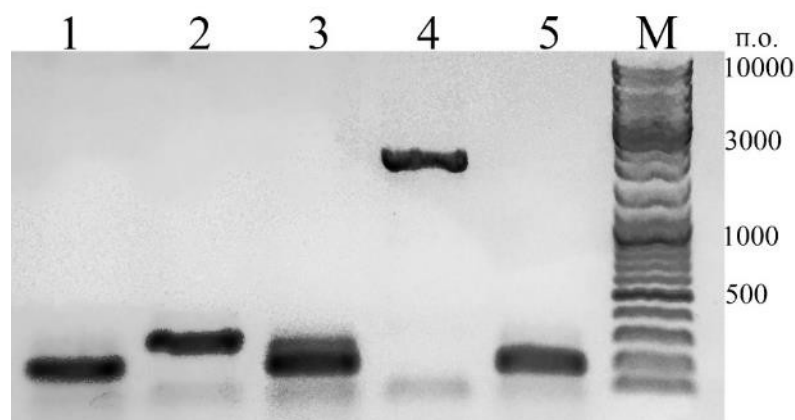


Рисунок 15 – Результаты ПЦР-скрининга клонов-трансформантов на наличие встроенного гена обратной транскриптазы, где 1-4 клоны, М – ДНК маркер

Как следует из рисунка из пяти клонов клон № 4 содержал ген с ожидаемой протяженностью 1686 п.о. в Т7 регионе. Клон культивировали в 5 мл ЛБ бульона, из клеток выделяли плазмидную ДНК, которую потом секвенировали на проверку наличие/отсутствие мутаций. Анализ хроматограмм показал, что в результирующей конструкции отсутствуют какие-либо мутации и она полностью совпадает заданным вектором.

### 3.12 Составление аннотированных списков лекарственных растений, распространенных в Казахстане

Большой терапевтический диапазон многих фитотерапевтических средств в сочетании с хорошей переносимостью является предпосылкой для использования их в педиатрии. По данным различных источников, флора Казахстана насчитывает более 1400 дикорастущих лекарственных растений. В традиционной медицине используется только 230 видов, из которых 29 зарегистрированы в Государственной фармакопее Республики Казахстан, а также 92 вида растений включены в Государственный реестр лекарственных средств Казахстана.

В Казахстане в 2023 г. был утвержден Перечень лекарственных растений, произрастающих на территории Республики, который содержит 278 видов, с указанием видовых названий и применения в официальной/народной медицине.

Распределение лекарственных растений по территории Казахстана неравномерное (рисунок 16).

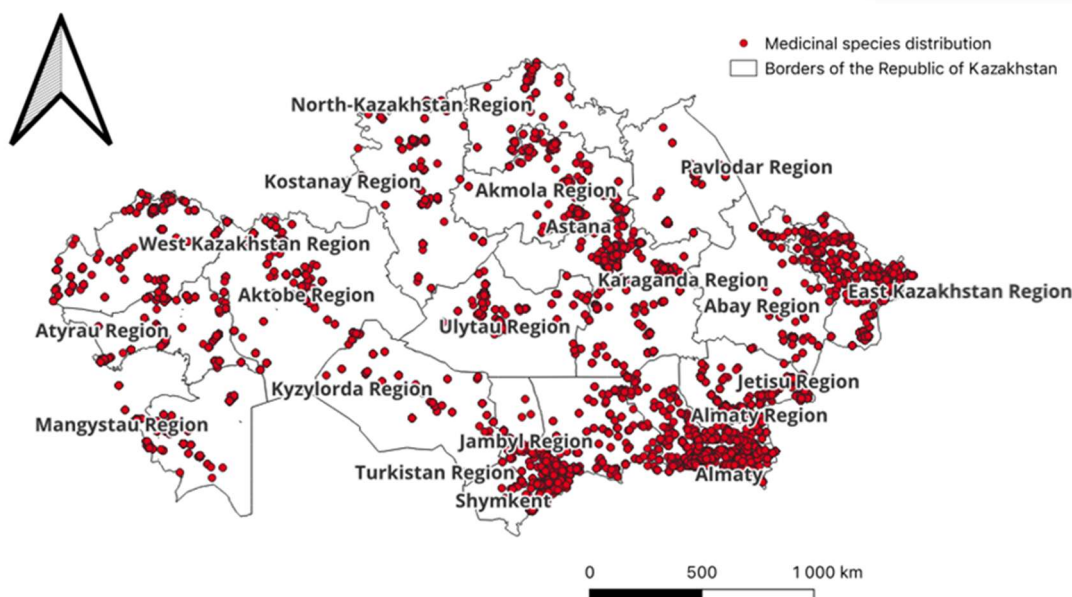


Рисунок 16 – Карта распространения лекарственных растений Казахстана

Анализ распределения лекарственных видов растений из указанного Перечня на территории Казахстана был сделан на основании 25 235 записей интегрированных данных из авторитетных биоинформационных ресурсов, включая Глобальный информационный фонд биологического разнообразия (GBIF), платформу iNaturalist, базу данных USDA Plants Database, а также данные Московского государственного университета. Наибольшее количество лекарственных видов из аннотированного списка расположены в южной части страны, особенно в Туркестанской, Жамбылской и Алматинской областях, а также в Восточно-Казахстанской области, что свидетельствует о разнообразии флоры этих регионов.

В таксономическом плане, наибольшее количество видов лекарственных растений из утвержденного перечня находится в Восточно-Казахстанской области – тут произрастает 121 вид из 49 семейств (рисунок 17). Далее по убыванию следуют Жетысуская и Алматинская области, на территории которых произрастает 116 и 110 видов соответственно (Приложение Г).

Наиболее распространёнными являются такие семейства как *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Polygonaceae*, *Fabaceae*, *Apiaceae*, *anunculaceae* и *Lamiaceae*. Схожесть морфологических критериев в пределах семейства является наиболее частой причиной ботанических фальсификаций при использовании лекарственного растительного сырья как в официальной, так и народной медицине. В этой связи ДНК-штрихкодирование может гарантировать подлинность и безопасность лекарственного сырья.

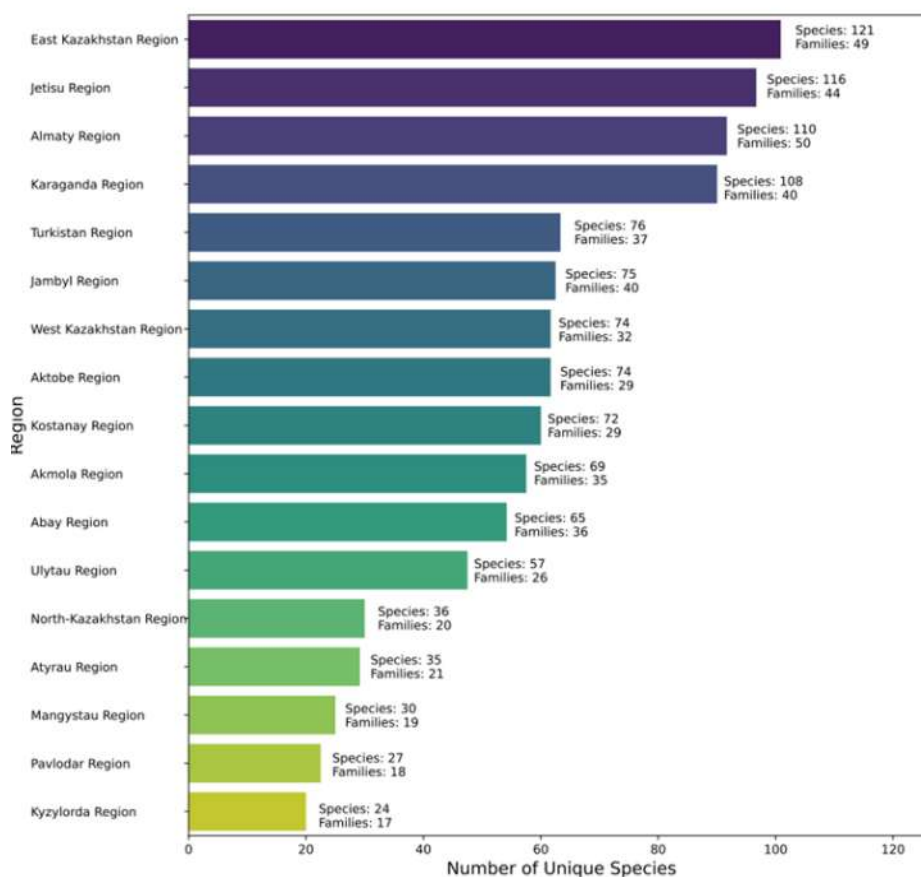


Рисунок 17 – Статистика распределения видов лекарственных растений по регионам Казахстана

Таким образом, в результате анализа литературных источников, информации на доступных интернет-ресурсах, а также нормативной документации составлен аннотированный список лекарственных растений, которые разрешены к использованию на территории Казахстана.

### 3.13 Составление списков лекарственных препаратов на основе растительного сырья

Несмотря на низкую частоту осложнений, возникающих при использовании лекарственных растений, необходимо тщательно подходить к вопросам аутентификации ЛРС. Имеется несколько важных моментов, которые следует учитывать при использовании ЛРС для лечения детей. Прежде всего, исключено применение растений с токсическими свойствами, а также растений с сильнодействующими свойствами (например, полынь, имбирь, мята, сенна), также нежелательно использование спиртовых настоек спиртовых настоек из растений.

В Государственном реестре лекарственных средств и медицинских изделий представлен 181 препарат на основе растительного сырья (Приложение Д). Анализ показал, что в Перечне лекарственных средств растительного происхождения представлены

препараты казахстанского производства (90,7%), Пакистан (2,8%), Россия (2,2%). Остальные страны представлены менее 1% препаратов.

В соответствии с анатомо-терапевтическо-химической классификацией препаратов в перечне представлено 12 групп препаратов. Препараты растительного происхождения используются для лечения ЖКТ (41,2%), в качестве противопростудных средств (27,5%), противовоспалительных средств – 14,8%. Более 88% лекарственных препаратов представлено в виде сборов.

По форме выпуска доминируют травы, листья, побеги, плоды и цветы, которые в сумме составляют 75,3%, менее представлены такие формы как гранулы, кора, настойки, экстракты, масло и сиропы (рисунок 18).

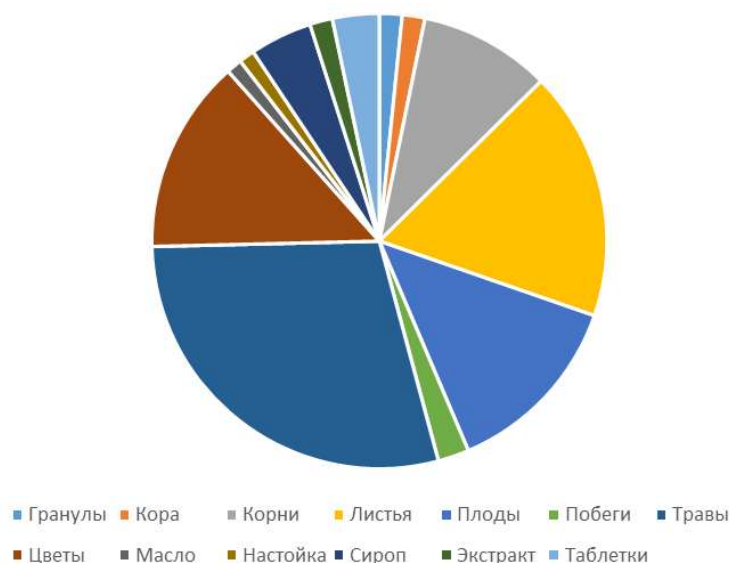


Рисунок 18 – Классификация ЛРС в зависимости от формы выпуска

По форме выпуска доминируют травы, листья, побеги, плоды и цветы, которые в сумме составляют 75,3%, менее представлены такие формы как гранулы, кора, настойки, экстракты, масло и сиропы.

В связи с тем, что значительная доля лекарственных препаратов представлена в виде высушенных частей растений, имеется возможность проводить эффективную экстракцию ДНК и использовать методы ДНК-штрихкодирования для аутентификации лекарственных средств.

### 3.14 Разработка базы данных лекарственных растений Казахстана

Для разработки веб-приложения для базы данных лекарственных растений Казахстана были выбраны следующие фреймворки, библиотеки, языки программирования и инструменты. В качестве языка запросов был выбран GraphQL, ASP.NET Core версии 7.0 был выбран как фреймворк для разработки серверной части веб-приложения, а для управления данными была выбрана PostgreSQL. Для разработки интерфейса веб-

приложения была выбрана библиотека Vue.js, а для дизайна – онлайн-инструмент Figma. Основным языком программирования для серверной части был выбран C#, разработка велась в среде Visual Studio, для работы с веб-интерфейсом использовалась среда Visual Studio Code.

Был определен список полей для проектирования базы данных лекарственных растений Казахстана, включая: ID, научное название (*scientific\_name*), русское название (*common\_name*), семейство (*family*), род (*genus*), местные названия (*local\_names*), описание (*description*), лекарственные свойства (*medicinal\_properties*), используемые части растения (*used\_parts*), способ применения (*usage*), ареал произрастания (*distribution*), координаты (*latitude* и *longitude*), высота над уровнем моря (*altitude*), статус охраны (*conservation\_status*), сезон сбора (*harvest\_season*), методы сбора и хранения (*harvesting\_storage*), изображение (*image\_url* или *image\_data*), источники информации (*sources*), дата последнего обновления (*last\_updated*). Эти поля обеспечивают структурированное хранение данных о лекарственных растениях и поддерживают дальнейший анализ.

На основе интеграции данных из различных биоинформационных ресурсов, включая Глобальный информационный фонд биологического разнообразия (GBIF), платформу iNaturalist, базу данных USDA Plants Database, подготовлены детализированные и точные карты, отражающие природное ареальное распространение для 244 видов из 80 семейств, входящих в Перечень лекарственных растений Казахстана.

В перспективе, разработанная база данных позволит по каждому виду лекарственного растения указать его распространение на территории Казахстана, морфологические критерии стандартных образцов (цифровой гербарий), вид лекарственного сырья, а также ДНК-штрихкод для точной аутентификации лекарственного растения. В настоящий момент подготовлены цифровые карты для 248 видов из Перечня лекарственных видов растений, в т.ч. входящих в Государственную фармакопею Республики Казахстан.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно поставленной цели и задачам исследования в 2024 г. были получены следующие основные результаты:

1. Проведен дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PAX, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез. Начато формирование коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Проведен анализ и сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям.

2. Проведен обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов. Проведен патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Оптимизирован метод иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.

3. Проведен дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса. Получены экспрессионные генетические конструкции, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса. Проведен сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов *A. baumannii*. Проведено формирование коллекции ДНК изолятов *A. baumannii*. Проведён патентный поиск и спроектированы праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*. Синтезированы и очищены праймеры и флуоресцентные пробы. Проведены проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.

4. Проведен биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определена оптимальная последовательность фермента. Клонирован ген обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора. Проведен анализ нормативной документации и составлены аннотированные списки лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан. Определены ареалы распространения лекарственных растений для отбора и формирования коллекции фармакопейных стандартных образцов.

В рамках реализации научной программы достигнуты результаты, направленные на разработку высокоточных методов диагностики генетических заболеваний и изучение мутаций, связанных с онкологическими процессами. Важной составляющей работы стало

создание методов таргетного секвенирования, включающих дизайн и синтез праймеров для амплификации генов, связанных с фенилкетонурией, MODY диабетом и синдромом Альпорта. Были сформированы коллекции контрольных образцов ДНК от пациентов с подтвержденными диагнозами и здоровых добровольцев, что создает прочную основу для дальнейшего тестирования диагностических панелей. Клинический отбор пациентов, проведение лабораторных анализов и получение этических согласий обеспечили соответствие существующим требованиям.

Проведено изучение мутаций в генах *KRAS* и *BRAF*, ассоциированных с колоректальным раком. Собранный биоматериал от пациентов с различными стадиями заболевания из нескольких локализаций кишечника позволил сформировать базу данных с клиническими и демографическими характеристиками, что существенно расширяет возможности для изучения роли редких мутаций в патогенезе заболевания.

Проведены комплексные исследования, направленные на разработку методов диагностики болезни Гоше и определения протеомных биомаркеров инсульта с использованием современных технологий масс-спектрометрии. Эти задачи выполнены с высоким научно-техническим уровнем, что подтверждается применением передовых методов пробоподготовки, анализа белковых структур и оценки биомаркеров. Обзор существующих методов диагностики болезни Гоше выявил преимущества масс-спектрометрии, которая обеспечивает точное измерение уровней активности ключевых ферментов и биомаркеров, таких как бета-глюкоцереброзидаза и Lyso-Gb1. Эти технологии становятся необходима для высокоточной диагностики заболевания, мониторинга его прогрессирования и оценки эффективности лечения. Проведенный анализ закладывает основу для отечественных разработок в этой области.

В рамках задачи по разработке метода определения протеомных биомаркеров инсульта была оптимизирована методика пробоподготовки плазмы крови для масс-спектрометрического анализа. Выделены и идентифицированы основные белки, включая альбумин, серотрансферрин и С3-комplement, что позволило подтвердить их соответствие теоретическим данным и продемонстрировало высокую эффективность применяемых технологий, таких как электроспрей-ионизация. Эти результаты закладывают основу для дальнейших исследований, направленных на выявление биомаркеров, связанных с инсультом.

В рамках научной программы достигнуты результаты, направленные на разработку новых диагностических методов для инфекционных заболеваний. Разработаны и протестированы генетические конструкции, позволяющие синтезировать рекомбинантные антигены для иммунохроматографического анализа, направленного на определение

иммунного статуса против рота- и аденовирусных инфекций. Эти конструкции соответствуют лучшим мировым аналогам и являются основой для создания штаммов-продуцентов, что закладывает фундамент для внедрения нового подхода к диагностике вирусных инфекций.

В области изучения антибиотикорезистентности внутрибольничных инфекций была сформирована коллекция изолятов *A. baumannii*, включающая 34 штамма, детально охарактеризованных на уровне ДНК. Эта коллекция станет основой для разработки технологии детекции антибиотикорезистентности с использованием CRISPR/Cas и анализа устойчивости циркулирующих штаммов, что открывает новые возможности для борьбы с резистентными патогенами.

Для выявления и дифференциации возбудителей Лайм-боррелиоза и клещевой возвратной лихорадки была проведена разработка и тестирование специфичных праймеров и зондов для гена *flaB* соответствующих патогенов. Их эффективность подтверждена с использованием архивных образцов, что позволяет перейти к созданию отечественной ПЦР-тест-системы для высокоточной диагностики данных заболеваний.

Проведенные исследования по созданию термостабильных ферментов для молекулярной диагностики инфекций привели к получению оптимизированной последовательности РНК-зависимой ДНК-полимеразы из вируса иммунодефицита человека. В результате биоинформатического анализа и генно-инженерного конструирования была создана экспрессионная система, обеспечивающая синтез модифицированного фермента с улучшенными характеристиками. Данный результат является ключевым шагом для дальнейшего внедрения высокоточных методов диагностики урогенитальных инфекций.

Параллельно была разработана технология аутентификации фитопрепаратов, используемых в педиатрической практике, с использованием ДНК-баркодинга. Создан аннотированный список лекарственных растений Казахстана, которые могут быть использованы в педиатрии, выявлены их ареалы распространения и доминирующие семейства. Показано, что основная часть препаратов, используемых в педиатрии, представлена казахстанским производством, а более 88% из них состоят из растительных сборов, что делает их идентификацию с помощью ДНК-технологий высокоэффективной. На основе интеграции данных из международных биоинформационных ресурсов были подготовлены точные карты ареалов распространения 244 видов лекарственных растений, что закладывает основу для создания коллекции стандартных образцов для дальнейшей работы.

Таким образом, согласно запланированным задачам, исследования выполнены в

полном объеме.

Научно-технический уровень исследований является высоким, не уступает передовым исследованиям в исследуемой области знаний.

Технико-экономическая эффективность разрабатываемых высокочувствительных и точных методы диагностики социально-значимых заболеваний с использованием современных клеточных, геномных и протеомных технологий и инструментальных методов непосредственно связана с улучшением качества жизни пациентов, снижением затрат на лечение пациентов, уровня инвалидизации пациентов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Marsden D., Levy H. Newborn Screening of Lysosomal Storage Disorders // *Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol.56, №7. – P.1071-1079.
- 2 Trujillano D., Perez B., González J. et al. Accurate molecular diagnosis of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-deficient hyperphenylalaninemias using high-throughput targeted sequencing // 2014. – Vol.22, №4. – P.528-534.
- 3 Gundorova P., Stepanova A.A., Kuznetsova I.A. et al. Genotypes of 2579 patients with phenylketonuria reveal a high rate of BH4 non-responders in Russia // 2019. – Vol.14, №1. – P.e0211048.
- 4 Alonso-Fernández J.R.J.I.j.o.n.s. Dr. Louis Isaac Woolf: At the Forefront of Newborn Screening and the Diet to Treat Phenylketonuria—Biography to Mark His 100th Birthday // *Book Dr. Louis Isaac Woolf: At the Forefront of Newborn Screening and the Diet to Treat Phenylketonuria—Biography to Mark His 100th Birthday* / Editor MDPI, 2020. – P. 61.
- 5 Hillert A., Anikster Y., Belanger-Quintana A. et al. The genetic landscape and epidemiology of phenylketonuria // 2020. – Vol.107, №2. – P.234-250.
- 6 Tresbach R.H., Sperb-Ludwig F., Ligabue-Braun R. et al. Phenylketonuria Diagnosis by Massive Parallel Sequencing and Genotype-Phenotype Association in Brazilian Patients // *Genes*. – 2021. – Vol.12, №1.
- 7 Elhawary N.A., AlJahdali I.A., Abumansour I.S. et al. Genetic etiology and clinical challenges of phenylketonuria // 2022. – Vol.16, №1. – P.22.
- 8 Gao J.S., Li X.L., Guo Y.Q. et al. Identification of phenylketonuria patient genotypes using single-gene full-length sequencing // *Human Genomics*. – 2022. – Vol.16, №1.
- 9 Vinueza A.M.Z.J.C. Recent advances in phenylketonuria: A review // . – 2023. – Vol.15, №6.
- 10 Zhang C., Yan Y.S., Zhou B.B. et al. Identification of deep intronic variants of PAH in phenylketonuria using full-length gene sequencing // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2023. – Vol.18, №1.
- 11 Bansal V., Gassenhuber J., Phillips T. et al. Spectrum of mutations in monogenic diabetes genes identified from high-throughput DNA sequencing of 6888 individuals // *BMC Med*. – 2017. – Vol.15, №1. – P.213.
- 12 Malik O., Khamis H., Rudnizky S. et al. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res*. – 2017. – Vol.45, №22. – P.12954-12962.
- 13 Harris A., Naylor R.N. Pediatric Monogenic Diabetes: A Unique Challenge and Opportunity // *Pediatr Ann*. – 2019. – Vol.48, №8. – P.e319-e325.
- 14 Alvelos M.I., Gonçalves C.I., Coutinho E. et al. Maturity-Onset Diabetes of the Young

(MODY) in Portugal: Novel GCK, HNFA1 and HNFA4 Mutations // J Clin Med. – 2020. – Vol.9, №1.

15 Yahaya T.O., Ufuoma S.B. Genetics and Pathophysiology of Maturity-onset Diabetes of the Young (MODY): A Review of Current Trends // Oman Med J. – 2020. – Vol.35, №3. – P.e126.

16 Hudson B.G., Tryggvason K., Sundaramoorthy M. et al. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen // N Engl J Med. – 2003. – Vol.348, №25. – P.2543-2556.

17 Kashtan C.E., Ding J., Garosi G. et al. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV  $\alpha 345$ : a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group // Kidney Int. – 2018. – Vol.93, №5. – P.1045-1051.

18 Gibson J., Fieldhouse R., Chan M.M.Y. et al. Prevalence Estimates of Predicted Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in a Population Sequencing Database and Their Implications for Alport Syndrome // J Am Soc Nephrol. – 2021. – Vol.32, №9. – P.2273-2290.

19 Savige J., Lipska-Zietkiewicz B.S., Watson E. et al. Guidelines for Genetic Testing and Management of Alport Syndrome // Clin J Am Soc Nephrol. – 2022. – Vol.17, №1. – P.143-154.

20 Savige J., Renieri A., Ars E. et al. Digenic Alport Syndrome // Clin J Am Soc Nephrol. – 2022. – Vol.17, №11. – P.1697-1706.

21 Zacchia M., Capolongo G., Del Vecchio Blanco F. et al. Next-Generation Sequencing (NGS) Analysis Illustrates the Phenotypic Variability of Collagen Type IV Nephropathies // Genes (Basel). – 2023. – Vol.14, №3.

22 Galán Carrillo I., Galbis Martínez L., Martínez V. et al. Multidisciplinary management improves the genetic diagnosis of hereditary kidney diseases in the next generation sequencing (NGS) era // Nefrologia (Engl Ed). – 2024. – Vol.44, №1. – P.69-76.

23 Zhylkaidarova A., Kaidarova D., Batyrbekov K. et al. Trends of Colorectal Cancer Prevalence in Kazakhstan Related to Screening // Clin Endosc. – 2021. – Vol.54, №1. – P.32-37.

24 Mauyenova D., Axarin A., Telmanova Z. et al. Colorectal Cancer Mortality in Kazakhstan: Spatio-Temporal Epidemiological Assessment // Asian Pac J Cancer Prev. – 2022. – Vol.23, №3. – P.953-960.

25 Wang C., Pan D. Mutation patterns and prognostic analysis of BRAF/KRAS/PIK3CA in colorectal cancer // J Clin Lab Anal. – 2022. – Vol.36, №6. – P.e24444.

26 Potocki P.M., Wójcik P., Chmura Ł. et al. Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer-A Nation-Wide Study // Int J Mol Sci. – 2023. – Vol.24, №10.

27 Siegel R.L., Giaquinto A.N., Jemal A. Cancer statistics, 2024 // CA Cancer J Clin. –

2024. – Vol.74, №1. – P.12-49.

28 Gelb M.H., Turecek F., Scott C.R. et al. Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2006. – Vol.29, №2. – P.397-404.

29 Nakamura K., Hattori K., Endo F. Newborn screening for lysosomal storage disorders // *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. – 2011. – Vol.157, №1. – P.63-71.

30 Elliott S., Buroker N., Cournoyer J.J. et al. Pilot study of newborn screening for six lysosomal storage diseases using Tandem Mass Spectrometry // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2016. – Vol.118, №4. – P.304-309.

31 Tortorelli S., Turgeon C.T., Gavrilov D.K. et al. Simultaneous Testing for 6 Lysosomal Storage Disorders and X-Adrenoleukodystrophy in Dried Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry // *Clinical Chemistry*. – 2016. – Vol.62, №9. – P.1248-1254.

32 Nalysnyk L., Rotella P., Simeone J.C. et al. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature // *Hematology*. – 2017. – Vol.22, №2. – P.65-73.

33 Dardis A., Michelakakis H., Rozenfeld P. et al. Patient centered guidelines for the laboratory diagnosis of Gaucher disease type 1 // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2022. – Vol.17, №1. – P.442.

34 Mohr J.P., Caplan L.R., Melski J.W. et al. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry // *Neurology*. – 1978. – Vol.28, №8. – P.754-762.

35 Gao S., Wang Y.J., Xu A.D. et al. Chinese ischemic stroke subclassification // *Front Neurol*. – 2011. – Vol.2. – P.6.

36 Mukherjee D., Patil C.G. Epidemiology and the global burden of stroke // *World Neurosurg*. – 2011. – Vol.76, №6 Suppl. – P.S85-90.

37 Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L. et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*. – 2013. – Vol.127, №1. – P.143-152.

38 Llombart V., Garcia-Berrocoso T., Bustamante A. et al. Cardioembolic stroke diagnosis using blood biomarkers // *Curr Cardiol Rev*. – 2013. – Vol.9, №4. – P.340-352.

39 Montellano F.A., Ungethum K., Ramiro L. et al. Role of Blood-Based Biomarkers in Ischemic Stroke Prognosis: A Systematic Review // *Stroke*. – 2021. – Vol.52, №2. – P.543-551.

40 Anagianakis G., Daios S., Topouzis N. et al. Current Trends in Stroke Biomarkers: The Prognostic Role of S100 Calcium-Binding Protein B and Glial Fibrillary Acidic Protein // *Life (Basel)*. – 2024. – Vol.14, №10.

41 Mesaros C., Blair I.A. Mass spectrometry-based approaches to targeted quantitative

proteomics in cardiovascular disease // Clin Proteomics. – 2016. – Vol.13. – P.20.

42 Uzozie A.C., Aebersold R. Advancing translational research and precision medicine with targeted proteomics // J Proteomics. – 2018. – Vol.189. – P.1-10.

43 Shen M., Tastet L., Bergler-Klein J. et al. Blood, tissue and imaging biomarkers in calcific aortic valve stenosis: past, present and future // Curr Opin Cardiol. – 2018. – Vol.33, №2. – P.125-133.

44 Kyriakidis I., Vasileiou E., Pana Z.D. et al. Acinetobacter baumannii Antibiotic Resistance Mechanisms // Pathogens. – 2021. – Vol.10, №3.

45 Lee C.R., Lee J.H., Park M. et al. Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options // Front Cell Infect Microbiol. – 2017. – Vol.7. – P.55.

46 Lam M.M.C., Hamidian M. Examining the role of Acinetobacter baumannii Plasmid Types in Disseminating Antimicrobial Resistance // bioRxiv. – 2023.10.1101/2023.09.03.556112. – P.2023.2009.2003.556112.

47 Kiga K., Tan X.E., Ibarra-Chávez R. et al. Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria // Nat Commun. – 2020. – Vol.11, №1. – P.2934.

48 Ooi K.H., Liu M.M., Tay J.W.D. et al. An engineered CRISPR-Cas12a variant and DNA-RNA hybrid guides enable robust and rapid COVID-19 testing // Nat Commun. – 2021. – Vol.12, №1. – P.1739.

49 Wu Y., Battalapalli D., Hakeem M.J. et al. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections // J Nanobiotechnology. – 2021. – Vol.19, №1. – P.401.

50 Zheng L., Jiang Y., Huang F. et al. A colorimetric, photothermal, and fluorescent triple-mode CRISPR/cas biosensor for drug-resistance bacteria detection // J Nanobiotechnology. – 2023. – Vol.21, №1. – P.493.

51 Cao Y., Tian Y., Huang J. et al. CRISPR/Cas13-assisted carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae detection // J Microbiol Immunol Infect. – 2024. – Vol.57, №1. – P.118-127.

52 Noppa L., Burman N., Sadziene A. et al. Expression of the flagellin gene in Borrelia is controlled by an alternative sigma factor // Microbiology (Reading). – 1995. – Vol.141 ( Pt 1). – P.85-93.

53 Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. et al. Humans infected with relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi, Russia // Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol.17, №10. – P.1816-1823.

- 54 Wodecka B. *flaB* gene as a molecular marker for distinct identification of *Borrelia* species in environmental samples by the PCR-restriction fragment length polymorphism method // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – Vol.77, №19. – P.7088-7092.
- 55 Stanek G., Wormser G.P., Gray J. et al. Lyme borreliosis // *Lancet.* – 2012. – Vol.379, №9814. – P.461-473.
- 56 Krause P.J., Narasimhan S., Wormser G.P. et al. *Borrelia miyamotoi* sensu lato seroreactivity and seroprevalence in the northeastern United States // *Emerg Infect Dis.* – 2014. – Vol.20, №7. – P.1183-1190.
- 57 Sato K., Takano A., Konnai S. et al. Human infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan // *Emerg Infect Dis.* – 2014. – Vol.20, №8. – P.1391-1393.
- 58 Waindok P., Schicht S., Fingerle V. et al. Lyme borreliæ prevalence and genospecies distribution in ticks removed from humans // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2017. – Vol.8, №5. – P.709-714.
- 59 Karan L., Makenov M., Kolyasnikova N. et al. Dynamics of Spirochetemia and Early PCR Detection of *Borrelia miyamotoi* // *Emerg Infect Dis.* – 2018. – Vol.24, №5. – P.860-867.
- 60 Middelveen M.J., Shah J.S., Fesler M.C. et al. Relapsing fever *Borrelia* in California: a pilot serological study // *Int J Gen Med.* – 2018. – Vol.11. – P.373-382.
- 61 Ostapchuk Y.O., Perfilyeva Y.V., Zhigailov A.V. et al. Monitoring of pathogenic *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Almaty oblast, Kazakhstan // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2021. – Vol.12, №4. – P.101725.
- 62 Zhigailov A.V., Neupokoyeva A.S., Maltseva E.R. et al. The prevalence of *Borrelia* in *Ixodes persulcatus* in southeastern Kazakhstan // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2021. – Vol.12, №4. – P.101716.
- 63 Ostapchuk Y.O., Dmitrovskiy A.M., Pak E.A. et al. A Case of Combined Infection with Tick-Borne Encephalitis and Lyme Borreliosis with Severe Meningoencephalitis and Complete Recovery // *J Glob Infect Dis.* – 2023. – Vol.15, №2. – P.81-83.
- 64 Ostapchuk Y.O., Bissenbay A.O., Kuligin A.V. et al. Survey of tick-borne relapsing fever borreliæ in southern and southeastern Kazakhstan // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2024. – Vol.15, №6. – P.102398.
- 65 Baranauskas A., Paliksa S., Alzbutas G. et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants // *Protein Eng Des Sel.* – 2012. – Vol.25, №10. – P.657-668.
- 66 Zimmerly S., Wu L. An Unexplored Diversity of Reverse Transcriptases in Bacteria // *Microbiol Spectr.* – 2015. – Vol.3, №2. – P.0058-2014.
- 67 Baba M., Kakue R., Leucht C. et al. Further increase in thermostability of Moloney

murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination // Protein Eng Des Sel. – 2017. – Vol.30, №8. – P.551-557.

68 Katano Y., Li T., Baba M. et al. Generation of thermostable Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase variants using site saturation mutagenesis library and cell-free protein expression system // Biosci Biotechnol Biochem. – 2017. – Vol.81, №12. – P.2339-2345.

69 Moelling K. Half a century of the reverse transcriptase-happy birthday! // Genome Biol. – 2021. – Vol.22, №1. – P.31-36.

70 Luo Z., Xue Y., Chen X. et al. Manganese-independent Reverse Transcriptase Activity of Tth DNA Polymerase with Two Amino Acid Substitutions // Protein Pept Lett. – 2023. – Vol.30, №3. – P.193-200.

71 Sen S., Bhowmik P., Tiwari S. et al. Versatility of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) from diagnosis of early pathological infection to mutation detection in organisms // Mol Biol Rep. – 2024. – Vol.51, №1. – P.211.

72 Hensel A., Bauer R., Heinrich M. et al. Consensus Statement on the Outcome of a Workshop on Paediatric Phytotherapy: Rationalising Optimal Dosing for Use in Children by Real-World Data // Planta Medica. – 2023. – Vol.80.

73 Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety // Frontiers in pharmacology. – 2014. – Vol.4. – P.177.

74 Al-Worafi Y.M. Herbal medicines safety issues // Drug safety in developing countries Elsevier, 2020. – C. 163-178.

75 Sucher N.J., Carles M.C. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants // Planta medica. – 2008. – Vol.74, №06. – P.603-623.

76 Singh D., Mittal N., Verma S. et al. Applications of some advanced sequencing, analytical, and computational approaches in medicinal plant research: a review // Molecular Biology Reports. – 2024. – Vol.51, №1. – P.23.

77 Howard C., Lockie-Williams C., Slater A. Applied barcoding: the practicalities of DNA testing for herbals // Plants. – 2020. – Vol.9, №9. – P.1150.

78 Cottenet G., Cavin C., Blancpain C. et al. A DNA metabarcoding workflow to identify species in spices and herbs // Journal of AOAC International. – 2023. – Vol.106, №1. – P.65-72.

79 Lee H.B. J.D.H., Cho B.C., Park J.S. Comparative analyses of eight primer sets commonly used to target the bacterial 16S rRNA gene for marine metabarcoding-based studies // Front. Mar. Sci. – 2023. – Vol.10.

80 Patil S., Imran M., Jaqueline R.S.M. et al. Standardization of Euphorbia tithymaloides (L.) Poit.(root) by conventional and DNA barcoding methods // ACS omega. – 2023. – Vol.8, №32. – P.29324-29335.



## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Календарный план работ на 2024-2026 гг.

7

Приложение 1  
к настоящему договору  
№ \_\_\_\_\_ от « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 года

#### КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

##### 1. ТОО «Национальный центр биотехнологий»

1.1 По приоритету: Наука о жизни и здоровье.

1.2 По подприоритету: 7. Молекулярно-генетические и мультиомные исследования в области медицины и биологии.

1.3 По теме программы: №BR24992881 «Разработка клеточных, геномных и протеомных технологий для диагностики социально-значимых заболеваний в Республике Казахстан».

1.4 Общая сумма программы 918 000 000 тенге (девятьсот восемнадцать миллионов) тенге, в том числе с разбивкой по годам, для выполнения работ согласно пункту 3:

- на 2024 год - в сумме 218 000 000 (двести восемнадцать миллионов) тенге;
- на 2025 год - в сумме 300 000 000 (триста миллионов) тенге;
- на 2026 год - в сумме 400 000 000 (четыреста миллионов) тенге.

##### 2. Характеристика научно-технической продукции по квалификационным признакам и экономические показатели

2.1 Направление работы: Медицина и биология.

2.2 Область применения: Медицина и здравоохранение.

2.3 Конечный результат:

- за 2024 год в результате реализации Программы будут получены следующие результаты:

- Проведен дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PАН, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCG8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез.
- Проведен анализ и сформирована группа исследования по колоректальному раку.
- Проведен обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов.
- Проведен патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Оптимизирован метод иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.
- Проведен дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса.
- Получены экспрессионные генетические конструкции, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса.
- Проведен сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов *A. baumannii*.
- Проведено формирование коллекции ДНК изолятов *A. baumannii*.
- Проведен патентный поиск и спроектированы праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*. Синтезированы и очищены праймеры и флуоресцентные пробы. Проведены проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.
- Проведен биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определена оптимальная последовательность фермента. Ген

обратной транскриптазы клонирован в составе экспрессионного вектора.

- Проведен анализ нормативной документации и составлены аннотированные списки лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан.

- за 2025 год в результате реализации Программы будут получены следующие результаты:

- Проведена проверка работоспособности праймеров и оптимизированы условия ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов.

- Собран биоматериал от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.

- Получен рекомбинантный гексон аденовируса типа 3 и отработаны условия его очистки.

- Разработан и оптимизирован состав реакционной смеси тест-системы. Отработан режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.

- Ген обратной транскриптазы экспрессирован в клетках *E. coli* и получен штамм-продуцент. Нарботана рекомбинантная обратная транскриптаза в клетках *E. coli*, фермент выделен и очищен.

- Проведен подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений.

- Сформирована коллекция образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям. Проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF.

- Подготовлены иммунодеплецированные образцы из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

- Проведено определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам.

- Сформирована ДНК коллекция ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.

- за 2026 год в результате реализации Программы будут получены следующие результаты:

- Проведено таргетное секвенирование генов на основе секвенирования нового поколения образцов ДНК, собранных от пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Проведена валидация выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру.

- Разработан метод диагностики болезни Гоше на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии, а также проведено его сравнение с коммерческим набором. Применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови пациентов, страдающих БСК.

- Определена эффективность конъюгата коллоидного золота на образцах сыворотки от больных детей. Определена эффективность конъюгата квантовой точки на образцах сыворотки от больных детей.

- Оценена чувствительность и специфичность разработанной тест-системы. Оценена стабильность разработанной тест-системы.

- Ген модифицированной ДНК полимеразы экспрессирован в клетках *E. coli* и получен штамм-продуцент модифицированной ДНК полимеразы. Рекомбинантная модифицированная ДНК полимеразы наработана в клетках *E. coli*, фермент выделен и

очищен.

- Созданы тестовые образцы, содержащие смесь ДНК различных лекарственных растений для NGS-секвенирования. Создана электронная база данных ваучерных образцов основных лекарственных растений, используемых в педиатрической практике, для аутентификации растительного сырья.

- Сформирована группа исследования по колоректальному раку. Проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF. Проведена валидация результатов скрининга мутаций. Проведен анализ данных.

- Подготовлены иммунодеплетированные образцы из плазмы крови пациентов, страдающих БСК для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

- Проведена оценка аналитической чувствительности и специфичности. Проведен анализ полученных результатов, проведена оценка диагностической ценности разработанной панели таргетного секвенирования генов.

- Опубликовано монография или учебное пособие по диагностике болезни Гоше на основе масс-спектрометрии, рекомендованное ученым советом организации. Подготовлены иммунодеплетированные образцы для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.

- Определена эффективность комбинированного конъюгата на образцах сыворотки от больных детей. Разработан дизайн набора и упаковки тест-системы. Разработана нормативно-техническая документация на тест-систему.

- Оптимизированы условия получения рекомбинантной модифицированной Taq ДНК полимеразы в полупромышленных условиях.

- Проверена работоспособность разработанной технологии аутентификации фитопрепаратов на основе ДНК-баркодирования и высокопроизводительного секвенирования на сформированной коллекции ДНК лекарственных трав, тестовых образцов, а также доступных коммерческих фитопрепаратах.

- Опубликовано не менее 9 (девятой) статей и (или) обзоров в рецензируемых научных изданиях по научному направлению программы, входящих в 1 (первый), 2 (второй) и (или) 3 (третий) квартиль по импакт-фактору в базе данных Web of Science и (или) имеющих процентиль по CiteScore в базе данных Scopus не менее 50 (пятидесяти).

- Опубликовано не менее 10 (десятой) статей в журналах, рекомендованных КОКНВО.

- Опубликовано не менее 1 (одной) монографии или учебных пособия в зарубежных и (или) казахстанских издательствах, рекомендованных ученым советом и (или) научно-техническим советом организации заявителя.

- Получено не менее 2 (двух) патентов в зарубежных патентных бюро (европейском, американском, японском) или не менее 2 (двух) зарубежных или международных патентов, включенных в базу данных Derwent Innovations Index (Web of Science, Clarivate Analytics) либо не менее 5 (пяти) объектов интеллектуальной собственности (патент; для заявок в области информационных технологий - авторское свидетельство), зарегистрированных в Национальном Институте интеллектуальной собственности Республики Казахстан.

2.4 Патентоспособность: Патентоспособны

2.5 Научно-технический уровень (новизна): разработка передовых отечественных технологий для диагностики ряда социально-значимых заболеваний на основе современных клеточных, геномных и протеомных методов и подходов, таких как секвенирование нового поколения (NGS), масс-спектрометрия, цифровой ПЦР, технология CRISPR/Cas, ДНК-баркодирование.

2.6 Использование научно-технической продукции осуществляется: медицинские учреждения и клиничко-диагностические лаборатории

2.7 Вид использования результата научной и (или) научно-технической деятельности:

отчеты, публикации, объекты интеллектуальной собственности.

### 3. Наименование работ, сроки их реализации и результаты

| Шифр задания, этапа | Наименование работ по Договору и основные этапы его выполнения*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Срок выполнения* |                   | Ожидаемый результат*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | начало           | окончание         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 2024 год            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 1                   | <p>Дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез.</p> <p>Начало формирования коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта.</p> <p>Анализ и формирование группы исследования по колоректальному раку согласно критериям.</p> | Август 2024      | До 1 декабря 2024 | <p>Будет проведен дизайн панели праймеров для амплификации целевых регионов генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 и их синтез.</p> <p>Будет начато формирование коллекции контрольных образцов для отработки условий таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта.</p> <p>Будет проведен анализ и сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям.</p> |
| 2                   | <p>Обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов. Патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Оптимизация метода иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.</p>                                                                                                                                                                                                                                                            | Август 2024      | До 1 декабря 2024 | <p>Будет проведен обзор существующих методик диагностики болезни Гоше на основе масс-спектрометрии и других высокоточных методов.</p> <p>Будет проведен патентно-информационный поиск по методам пробоподготовки и биомаркерам БСК. Будет оптимизирован метод иммунодеплеции плазмы крови экспериментальных животных для удаления основных белков.</p>                                                                                                                                                                                                                                                    |

|   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |             |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 | <p>Дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса.</p> <p>Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса.</p> <p>Сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов <i>A. baumannii</i>.</p> <p>Формирование коллекции ДНК изолятов <i>A. baumannii</i>.</p> <p>Провести патентный поиск и спроектировать праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК <i>B. burgdorferi</i> s.l. и <i>B. miyamotoi</i>.</p> <p>Синтезировать и очистить праймеры и флуоресцентные пробы. Провести проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.</p> | Август 2024 | До 1 декабря 2024 | <p>Будет проведен дизайн и синтез генов гексона аденовируса типа 3 и VP4 антигена ротавируса.</p> <p>Будут получены экспрессионные генетические конструкции, несущих ген гексона аденовируса типа 3 и ген VP4 антигена ротавируса.</p> <p>Будет проведен сбор и идентификация ДНК антибиотикорезистентных изолятов <i>A. baumannii</i>.</p> <p>Будет проведено формирование коллекции ДНК изолятов <i>A. baumannii</i>.</p> <p>Будет проведен патентный поиск и спроектированы праймеры и флуоресцентные пробы для определения специфичных участков геномной ДНК <i>B. burgdorferi</i> s.l. и <i>B. miyamotoi</i>.</p> <p>Будут синтезированы и очищены праймеры и флуоресцентные пробы. Будут проведены проверочные ПЦР с архивными образцами бактерий.</p> |
| 4 | <p>Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определение оптимальной последовательности фермента. Клонирование гена обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора.</p> <p>Составление аннотированных списков лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан.</p>                                                                                                                                                                                         | Август 2024 | До 1 декабря 2024 | <p>Будет проведен биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей обратных транскриптаз и определена оптимальная последовательность фермента. Будет клонирован ген обратной транскриптазы в составе экспрессионного вектора. Будет проведен анализ нормативной документации и составлены аннотированные списки лекарственных растений, препаратов на основе растительного сырья и готовых лекарственных форм растительных препаратов, разрешенных к использованию в официальной и народной медицине на территории Республики Казахстан. Будут определены ареалы распространения лекарственных растений для отбора и формирования коллекции фармакопейных стандартных образцов.</p>                                                              |

| 2025 год |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |             |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5        | Проверка работоспособности праймеров и оптимизация условий ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов PАН, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.                                                               | Январь 2025 | Июнь 2025 | Будет проведена проверка работоспособности праймеров и оптимизированы условия ПЦР реакции для амплификации целевых регионов генов PАН, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.                                                                     |
| 6        | Сбор биоматериала от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Использование оптимизированной методики иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.                                                                            | Январь 2025 | Июнь 2025 | Будет собран биоматериал от условно-здоровых людей, а также пациентов с диагнозом болезнь Гоше для последующего масс-спектрометрического анализа. Будет применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови у экспериментальных животных.                                                                                            |
| 7        | Получение рекомбинантного гексона аденовируса типа 3 и отработка условий его очистки. Разработать и оптимизировать состав реакционной смеси тест-системы. Отработать режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.                                                                                       | Январь 2025 | Июнь 2025 | Будет получен рекомбинантный гексон аденовируса типа 3 и отработаны условия его очистки. Будет разработан и оптимизирован состав реакционной смеси тест-системы. Будет отработан режим термоциклирования для выбранного состава тест-системы.                                                                                                    |
| 8        | Экспрессия гена обратной транскриптазы в клетках <i>E. coli</i> и получение штамм-продуцента. Нарботка рекомбинантной обратной транскриптазы в клетках <i>E. coli</i> , выделение и очистка фермента. Подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений. | Январь 2025 | Июнь 2025 | Будет экспрессирован ген обратной транскриптазы в клетках <i>E. coli</i> и получен штамм-продуцент. Будет наработана рекомбинантная обратная транскриптаза в клетках <i>E. coli</i> , фермент выделен и очищен. Будет проведен подбор универсальных праймеров для амплификации генетических маркеров используемых в ДНК-баркодировании растений. |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |             |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9  | Продолжение работ по формированию коллекции образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Продолжение формирования группы исследования по колоректальному раку согласно критериям. Скрининг мутаций KRAS/BRAF. | Январь 2025 | До 1 ноября 2025 | Будет сформирована коллекция образцов для таргетного секвенирования и выявления мутаций у пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Будет сформирована группа исследования по колоректальному раку согласно критериям. Будет проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF. |
| 10 | Подготовка иммунодеплементированных образцов из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.                                                                                                                                | Январь 2025 | До 1 ноября 2025 | Будут подготовлены иммунодеплементированные образцы из плазмы крови экспериментальных животных для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.                                                                                                                   |
| 11 | Определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам. Пополнение коллекции фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений. Формирование ДНК коллекции ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.                                                     | Январь 2025 | До 1 ноября 2025 | Будет проведено определение генетических маркеров устойчивости к антибиотикам. Будет продолжен сбор и пополнены коллекции фармакопейных стандартных образцов лекарственных растений. Будет сформирована ДНК коллекция ваучерных (фармакопейных стандартных образцов), а также образцов из лекарственного сырья и фитопрепаратов.   |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |           |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12 | <p>Апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК и оценка покрытия секвенирования целевых участков генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.</p> <p>Валидация результатов скрининга мутаций KRAS/BRAF.</p>                                                                                                    | Июль 2025 | До 1 ноября 2025 | <p>Будет проведена апробация отработанных условий на контрольных образцах ДНК и оценка покрытия секвенирования целевых участков генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.</p> <p>Будет проведена валидация результатов скрининга мутаций KRAS/BRAF.</p>                                                                                                        |
| 13 | <p>Определение активности фермента <math>\beta</math>-глюкоцереброзидазы в контрольных и экспериментальных образцах на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии.</p> <p>Подготовка иммунодеплетированных образцов для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.</p>                                                                              | Июль 2025 | До 1 ноября 2025 | <p>Будет определена активность фермента <math>\beta</math>-глюкоцереброзидазы в контрольных и экспериментальных образцах на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии.</p> <p>Будет подготовлены иммунодеплетированные образцы для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.</p>                                                                                                      |
| 14 | <p>Получение рекомбинантного VP4 антигена ротавируса человека и отработка условий его очистки. Определение иммунохимических и диагностических свойств рекомбинантных антигенов.</p> <p>Дизайн и синтез CRISPR-PHK. Проведение CRISPR-детекция генетических детерминант резистентности.</p> <p>Клонировать последовательности выбранных для тест-системы фрагментов в плазмиды для получения образцов положительного контроля.</p> | Июль 2025 | До 1 ноября 2025 | <p>Будет получен рекомбинантный VP4 антигена ротавируса человека и отработаны условия его очистки. Будут определены иммунохимические и диагностические свойства рекомбинантных антигенов.</p> <p>Будет проведен дизайн и синтез CRISPR-PHK. Будет проведена CRISPR-детекция генетических детерминант резистентности.</p> <p>Будут клонированы последовательности выбранных для тест-системы фрагментов в плазмиды для получения образцов положительного контроля.</p> |

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |             |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 15       | Проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы, подбор буфера хранения и оптимизация состава реакционного буфера. Оптимизация условий получения рекомбинантной обратной транскриптазы в полупромышленных условиях. Оптимизация условий ПЦР амплификации на коллекции ДНК лекарственных видов растений, приготовления библиотек и высокопроизводительного секвенирования.                                         | Июль 2025   | До 1 ноября 2025 | Будет проведена проверка активности рекомбинантной обратной транскриптазы, подобран буфер хранения и оптимизирован состав реакционного буфера. Будут оптимизированы условия получения рекомбинантной обратной транскриптазы в полупромышленных условиях. Будет проведена оптимизация условий ПЦР амплификации на коллекции ДНК лекарственных видов растений, оптимизированы условия приготовления библиотек и высокопроизводительного секвенирования.    |
| 2026 год |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |             |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 6        | Таргетное секвенирование генов PAX, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WFS1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 на основе секвенирования нового поколения образцов ДНК, собранных от пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Валидация установленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру. | Январь 2026 | Июнь 2026        | Будет проведено таргетное секвенирование генов PAX, HNF4A, GSK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WFS1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6 на основе секвенирования нового поколения образцов ДНК, собранных от пациентов с установленным диагнозом фенилкетонурия, MODY диабет и неуточненным подтипом, синдром Альпорта. Будет проведена валидация выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру. |
| 17       | Разработка метода диагностики болезни Гоше на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии и его сравнение с коммерческим набором. Использование оптимизированной методики иммунодеплеции плазмы крови пациентов, страдающих БСК.                                                                                                                                                                                  | Январь 2026 | Июнь 2026        | Будет разработан метод диагностики болезни Гоше на основе квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии, а также проведено его сравнение с коммерческим набором. Будет применена оптимизированная методика иммунодеплеции плазмы крови пациентов, страдающих БСК.                                                                                                                                                                                       |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |             |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 18 | <p>Определение эффективности ИХА с конъюгатом коллоидного золота на образцах сыворотки от больных детей. Определение эффективности ИХА с конъюгатом квантовой точки на образцах сыворотки от больных детей.</p> <p>Оценить чувствительность и специфичность разработанной тест-системы. Оценить стабильность разработанной тест-системы.</p>                                                                                                                                                                                                                 | Январь 2026 | Июнь 2026        | <p>Будет определена эффективность ИХА конъюгата коллоидного золота на образцах сыворотки от больных детей. Будет определена эффективность ИХА конъюгата квантовой точки на образцах сыворотки от больных детей.</p> <p>Будет оценена чувствительность и специфичность разработанной тест-системы. Будет оценена стабильность разработанной тест-системы.</p>                                                                                                                                                                                                                  |
| 19 | <p>Экспрессия гена модифицированной ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i> и получение штамма-продуцента модифицированной ДНК полимеразы.</p> <p>Наработка рекомбинантной модифицированной ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i>, выделение и очистка фермента.</p> <p>Создание тестовых образцов, содержащих смесь ДНК различных лекарственных растений для NGS-секвенирования. Создание электронной базы данных ваучерных образцов основных лекарственных растений, используемых в педиатрической практике, для аутентификации растительного сырья.</p> | Январь 2026 | Июнь 2026        | <p>Будет экспрессирован ген модифицированной ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i> и получен штамм-продуцент модифицированной ДНК полимеразы.</p> <p>Будет наработана рекомбинантная модифицированная ДНК полимеразы в клетках <i>E. coli</i>, фермент выделен и очищен.</p> <p>Будут созданы тестовые образцы, содержащие смесь ДНК различных лекарственных растений для NGS-секвенирования. Будет создана электронная база данных ваучерных образцов основных лекарственных растений, используемых в педиатрической практике, для аутентификации растительного сырья.</p> |
| 20 | <p>Продолжение формирования группы исследования по колоректальному раку.</p> <p>Скрининг мутаций KRAS/BRAF. Валидация результатов скрининга мутаций. Анализ данных.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Январь 2026 | До 1 ноября 2026 | <p>Будет сформирована группа исследования по колоректальному раку.</p> <p>Будет проведен скрининг мутаций KRAS/BRAF. Будет проведена валидация результатов скрининга мутаций. Будет проведен анализ данных.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 21 | <p>Подготовка иммунодеплептированных образцов из плазмы крови пациентов, страдающих БСК для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Январь 2026 | До 1 ноября 2026 | <p>Будут подготовлены иммунодеплептированные образцы из плазмы крови пациентов, страдающих БСК для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                     |             |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 22 | Оценка аналитической чувствительности и специфичности.                                                                                                                                                                                                              | Январь 2026 | До 1 ноября 2026 | Будет проведена оценка аналитической чувствительности и специфичности.                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 23 | Анализ полученных результатов, оценка диагностической ценности разработанной панели таргетного секвенирования генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.      | Июль 2026   | До 1 ноября 2026 | Будет проведен анализ полученных результатов, проведена оценка диагностической ценности разработанной панели таргетного секвенирования генов PAX, HNF4A, GCK, HNF1A, IPF1/PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11, APPL1, WSF1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6.                                       |
| 24 | Подготовка монографии или учебного пособия по диагностике болезни Гоше на основе масс-спектрометрии. Подготовка иммунодеплементированных образцов для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта. | Июль 2026   | До 1 ноября 2026 | Будет опубликована монография или учебное пособие по диагностике болезни Гоше на основе масс-спектрометрии, рекомендованное ученым советом организации. Будут подготовлены иммунодеплементированные образцы для анализа с помощью хромато-тандемной масс-спектрометрии LC-MS/MS на наличие и количество биомаркеров инсульта. |
| 25 | Определение эффективности ИХА с комбинированным конъюгатом на образцах сыворотки от больных детей. Разработать дизайн набора и упаковки тест-системы. Разработать нормативно-техническую документацию на тест-систему.                                              | Июль 2026   | До 1 ноября 2026 | Будет определена эффективность комбинированного конъюгата на образцах сыворотки от больных детей. Будет разработан дизайн набора и упаковки тест-системы. Будет разработана нормативно-техническая документация на тест-систему.                                                                                              |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 26 | <p>Оптимизация условий получения рекомбинантной модифицированной Taq ДНК полимеразы в полупромышленных условиях. Оптимизация работы двух ферментов: обратной транскриптазы и модифицированной ДНК полимеразы в едином реакционном буфере и в одном температурном режиме. Тестирование ферментов в диагностических экспериментах по выявлению возбудителей урогенитальных инфекций. Проверка работоспособности разработанной технологии аутентификации фитопрепаратов на основе ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования на сформированной коллекции ДНК лекарственных трав, тестовых образцов, а также доступных коммерческих фитопрепаратах.</p> | Июль 2026 | До 1 ноября 2026 | <p>Будут оптимизированы условия получения рекомбинантной модифицированной Taq ДНК полимеразы в полупромышленных условиях. Будет оптимизирована работа двух ферментов: обратной транскриптазы и модифицированной ДНК полимеразы в едином реакционном буфере и в одном температурном режиме. Будет проведено тестирование ферментов в диагностических экспериментах по выявлению возбудителей урогенитальных инфекций. Будет проверена работоспособность разработанной технологии аутентификации фитопрепаратов на основе ДНК-баркодинга и высокопроизводительного секвенирования на сформированной коллекции ДНК лекарственных трав, тестовых образцов, а также доступных коммерческих фитопрепаратах.</p> |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |           |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 27 | <p>Опубликовать не менее 9 (девяти) статей и (или) обзоров в рецензируемых научных изданиях по научному направлению программы, входящих в 1 (первый), 2 (второй) и (или) 3 (третий) квартиль по импакт-фактору в базе данных Web of Science и (или) имеющих процентиль по CiteScore в базе данных Scopus не менее 50 (пятидесяти).</p> <p>Опубликовать не менее 10 (десять) статей в журналах, рекомендованных КОКНВО.</p> <p>Опубликовать не менее 1 (одной) монографии или учебных пособия в зарубежных и (или) казахстанских издательствах, рекомендованных ученым советом и (или) научно-техническим советом организации заявителя;</p> <p>Опубликовать не менее 2 (двух) патентов в зарубежных патентных бюро (европейском, американском, японском) или не менее 2 (двух) зарубежных или международных патентов, включенных в базу данных Derwent Innovations Index (Web of Science, Clarivate Analytics) либо не менее 5 (пяти) объектов интеллектуальной собственности (патент; для заявок в области информационных технологий - авторское свидетельство), зарегистрированных в Национальном Институте интеллектуальной собственности Республики Казахстан.</p> | Июль 2026 | До 1 ноября 2026 | <p>Будет опубликовано не менее 9 (девяти) статей и (или) обзоров в рецензируемых научных изданиях по научному направлению программы, входящих в 1 (первый), 2 (второй) и (или) 3 (третий) квартиль по импакт-фактору в базе данных Web of Science и (или) имеющих процентиль по CiteScore в базе данных Scopus не менее 50 (пятидесяти).</p> <p>Будет опубликовано не менее 10 (десять) статей в журналах, рекомендованных КОКНВО.</p> <p>Опубликовано не менее 1 (одной) монографии или учебных пособия в зарубежных и (или) казахстанских издательствах, рекомендованных ученым советом и (или) научно-техническим советом организации заявителя;</p> <p>Будет опубликовано не менее 2 (двух) патентов в зарубежных патентных бюро (европейском, американском, японском) или не менее 2 (двух) зарубежных или международных патентов, включенных в базу данных Derwent Innovations Index (Web of Science, Clarivate Analytics) либо не менее 5 (пяти) объектов интеллектуальной собственности (патент; для заявок в области информационных технологий - авторское свидетельство), зарегистрированных в Национальном Институте интеллектуальной собственности Республики Казахстан.</p> |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Примечание:** \* - указываются работы, сроки и их результаты за 2024, 2025, 2026 годы по каждому году, согласно календарному плану конкурсной заявки.

От Заказчика:  
Председатель  
ГУ «Комитет науки Министерства науки и высшего образования РК»



Жанкуатов Г.Ж.

От Исполнителя:  
И.о. генерального директора  
ТОО «Национальный центр биотехнологий»



Огай В.Б.

Ознакомлен:  
Научный руководитель программы  
Тарлыков П.В.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### Последовательности праймеров

Таблица Б.1 – Нуклеотидные последовательности праймеров к генам *HNFA4*, *GCK*, *HNFA1A*, *IPF1/PDX1*, *HNFA1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, *APPL1*, *WSF1*

| Экзоны и название праймеров | Нуклеотидная последовательность                         | Температура отжига |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|
| exon:1 1-531                |                                                         |                    |
| Forward:                    |                                                         |                    |
| NG_008847:F_52-70           | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaagcaggctaggatgtga    | 60,5               |
| NG_008847:F_78-96           | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatcacctgcagcctaatt     | 60,1               |
| NG_008847:F_128-148         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagagacatttccactgaat    | 60,1               |
| NG_008847:F_243-261         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaacatccaggctcagtga    | 60,7               |
| NG_008847:F_252-269         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggctcagtgaaggggt       | 62,9               |
| NG_008847:F_267-285         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggctccagaaggggaatgctt  | 61,1               |
| NG_008847:F_278-295         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaatgcttcccactcgt      | 62,0               |
| NG_008847:F_287-306         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccactcgttgagaacaat     | 61,4               |
| NG_008847:F_350-368         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccaggagaaccacattct     | 60,4               |
| NG_008847:F_359-376         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaccattctcccaggga       | 61,7               |
| NG_008847:F_404-425         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggagaagccttggaatttcca  | 61,2               |
| Reverse:                    |                                                         |                    |
| NG_008847:R_546-529         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtggaggcgagatacctt     | 61,4               |
| NG_008847:R_443-425         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcccagtaggcttctgaagt   | 60,1               |
| NG_008847:R_427-406         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagtggaaatccaaggcttct  | 60,4               |
| NG_008847:R_371-353         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggggagaatgtggttctcct   | 60,2               |
| NG_008847:R_302-285         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagttctccaacgagtcggca    | 62,7               |
| NG_008847:R_296-279         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaacgagtcggcaagcatt    | 61,3               |
| NG_008847:R_287-269         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcaagcattcccttctgga   | 61,7               |
| NG_008847:R_262-244         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcactgagcctggatgtt   | 60,7               |
| NG_008847:R_252-235         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctggatgttctccaggca    | 60,5               |
| NG_008847:R_169-150         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggcttagtgtcttcagaca   | 60,5               |
| NG_008847:R_150-130         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagattcagtgggaaatgtcct | 60,1               |
| NG_008847:R_96-78           | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaattaggctgcaggtgact   | 60,1               |
| NG_008847:R_71-53           | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcacatcctagcctgctt   | 60,5               |
| exon:2 35977-36139          |                                                         |                    |
| exon:3 37015-37169          |                                                         |                    |
| Forward:                    |                                                         |                    |
| NG_008847:F_36919-36939     | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttgtataatccgggctcagt   | 60,1               |
| Reverse:                    |                                                         |                    |

Продолжение таблицы Б.1

|                         |                                                        |      |
|-------------------------|--------------------------------------------------------|------|
| NG_008847:R_37259-37242 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggtagacaggtggcacct   | 62,9 |
| NG_008847:R_37243-37226 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcccgtcaggactagct   | 61,9 |
| NG_008847:R_37218-37201 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggagatcctgcatggcctt   | 61,0 |
| exon:4 38365-38484      |                                                        |      |
| Forward:                |                                                        |      |
| NG_008847:F_38268-38287 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtgtccctgaggaatagctt  | 60,4 |
| NG_008847:F_38330-38347 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcatgccagatggcacca     | 61,2 |
| NG_008847:F_38336-38353 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagatggtcacatggcgt     | 62,9 |
| NG_008847:F_38343-38360 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcaccatggcgtgcatctt    | 62,4 |
| Reverse:                |                                                        |      |
| NG_008847:R_38558-38538 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacattgaaggcagagtccct | 60,8 |
| exon:5 39376-39471      |                                                        |      |
| Forward:                |                                                        |      |
| NG_008847:F_39288-39305 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttatggccctgtgcagga    | 62,7 |
| NG_008847:F_39294-39311 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccctgtgcaggaggtagt    | 62,6 |
| NG_008847:F_39304-39321 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaggtagtgcaggccct     | 62,3 |
| NG_008847:F_39323-39341 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggcaccctgcctccagtata   | 62,8 |
| NG_008847:F_39348-39365 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcagccacgaggcctatct    | 63,0 |
| Reverse:                |                                                        |      |
| NG_008847:R_39571-39554 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagcacagaagctgcagtg   | 61,9 |
| NG_008847:R_39558-39541 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcagtgctggaagccaagg   | 62,7 |
| exon:6 39581-39680      |                                                        |      |
| Forward:                |                                                        |      |
| NG_008847:F_39541-39558 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccttggtccagcactg      | 62,7 |
| NG_008847:F_39552-39569 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagcactgcagcttctgtg    | 61,9 |
| NG_008847:F_39564-39581 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtctgtgcttcttggcagg    | 61,4 |
| Reverse:                |                                                        |      |
| NG_008847:R_39749-39730 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccctgaagcctgtgtaca   | 61,4 |
| NG_008847:R_39737-39720 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggtgtacacaggagcct     | 60,4 |
| NG_008847:R_39724-39707 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagcctcagcagctctggaa  | 62,2 |
| exon:7 41607-41790      |                                                        |      |
| Forward:                |                                                        |      |
| NG_008847:F_41522-41539 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggagagggactcctgtgg     | 63,0 |
| NG_008847:F_41542-41559 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaggaaccaggccctactc    | 62,4 |
| NG_008847:F_41570-41587 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcagctctcgtgacagtc     | 61,6 |
| Reverse:                |                                                        |      |
| NG_008847:R_41875-41857 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcattatctgcaatggcccg  | 60,5 |
| exon:8 42822-42977      |                                                        |      |
| Forward:                |                                                        |      |

Продолжение таблицы Б.1

|                         |                                                       |      |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|------|
| NG_008847:F_42784-42802 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcgtgcctgctgatgaat   | 60,4 |
| NG_008847:F_42803-42820 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggacctgcctatgtcca     | 62,7 |
| Reverse:                |                                                       |      |
| NG_008847:R_43050-43033 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctgagaccaagtctgca  | 60,4 |
| exon:9 43710-43943      |                                                       |      |
| Forward:                |                                                       |      |
| NG_008847:F_43720-43738 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaccgcaagcagatctaca  | 61,0 |
| NG_008847:F_43737-43754 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcaacatcctgagcacgct   | 61,7 |
| NG_008847:F_43900-43917 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatcactgtggcgctggat   | 62,9 |
| Reverse:                |                                                       |      |
| NG_008847:R_43933-43916 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggctgtacacggagccat   | 61,4 |
| NG_008847:R_43917-43900 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagatccacgcccacagtgtat | 62,9 |
| NG_008847:R_43753-43735 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcgtgctcaggatgttgta | 61,5 |
| exon:10 44160-45165     |                                                       |      |
| Forward:                |                                                       |      |
| NG_008847:F_44151-44168 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcgtcccagcttcaagga   | 62,6 |
| NG_008847:F_44157-44174 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcagcttcaaggagcgggt   | 61,7 |
| NG_008847:F_44204-44221 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggctgcgagatcaccttca   | 61,1 |
| NG_008847:F_44214-44231 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcacttcatcgagtcgga    | 60,1 |
| NG_008847:F_44287-44304 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgatgtctggccagtga    | 62,6 |
| NG_008847:F_44549-44568 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagacctttctcgtggaatcaa  | 60,6 |
| NG_008847:F_44574-44592 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcagaaggagttgctcact   | 60,7 |
| NG_008847:F_44588-44608 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcactcaggactttgatgat | 60,5 |
| NG_008847:F_44617-44634 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgctcagagctgttgccct  | 62,8 |
| NG_008847:F_44687-44705 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcacttccctgggaactcat  | 60,5 |
| NG_008847:F_44723-44741 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctccaacagcttgaccaga  | 60,9 |
| NG_008847:F_44741-44758 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagacctagacctgggcca     | 62,0 |
| NG_008847:F_44774-44791 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgctcatcaccagctct    | 61,9 |
| NG_008847:F_44799-44816 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttcttgctgaggctcaa    | 60,1 |
| NG_008847:F_44854-44874 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaggtgtccaagctttgaata | 60,6 |
| NG_008847:F_44897-44917 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcataccatcactgagtggtt | 61,1 |
| NG_008847:F_45008-45027 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccctacatcttcagctcca  | 62,6 |
| NG_008847:F_45027-45044 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatagcgctggctcaggaa   | 62,6 |
| Reverse:                |                                                       |      |
| NG_008847:R_45131-45112 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacacaatcttaggtgggca | 60,6 |
| NG_008847:R_45051-45034 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggggttcttctcagcca    | 60,8 |
| NG_008847:R_45044-45027 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagttcttgagccagcgctat  | 62,6 |
| NG_008847:R_45032-45014 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcgctatgggagctgaagat | 60,6 |
| NG_008847:R_45024-45006 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggagctgaagatgtagggt  | 60,2 |

Продолжение таблицы Б.1

|                         |                                                         |      |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|------|
| NG_008847:R_44918-44899 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcaagccactcagtgatggta  | 60,9 |
| NG_008847:R_44877-44857 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggggtattcaagcttgggaca  | 61,7 |
| NG_008847:R_44868-44851 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaagcttgggacacctct     | 62,3 |
| NG_008847:R_44817-44800 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcttgagcctcaggcaaga    | 60,8 |
| NG_008847:R_44791-44774 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaggactgggtgatgagca    | 61,9 |
| NG_008847:R_44758-44741 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtttggcccaggctaggt     | 62,0 |
| NG_008847:R_44738-44721 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggtcaagctgttggagct    | 61,4 |
| NG_008847:R_44706-44688 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggatgagttcccagggaagt   | 60,2 |
| NG_008847:R_44634-44617 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaggccaacagctctgaca    | 62,8 |
| NG_008847:R_44615-44594 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtggtgaaatgcatcaaatgct | 61,5 |
| NG_008847:R_44587-44568 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcaactcccttctgggaaat  | 61,6 |
| NG_008847:R_44567-44549 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgattccagcgaaaggt     | 60,1 |
| NG_008847:R_44545-44527 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggggcttccagagtctctgt   | 62,7 |
| NG_008847:R_44306-44289 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcactggcccagcata     | 62,0 |
| NG_008847:R_44296-44279 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccagcatacaggccttct    | 60,6 |
| NG_008847:R_44233-44215 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctccgactcgatgaaggt   | 62,6 |
| NG_008847:R_44220-44203 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggaaggtgatctcgcagct    | 60,8 |

Таблица Б.2 – Нуклеотидная последовательность праймеров к гену *COL4A6*

| Экзоны и название праймеров | Нуклеотидная последовательность                          | Температура отжига |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------|
| exon:1 1-237                |                                                          |                    |
| Forward:                    |                                                          |                    |
| NG_012059:F_14-31           | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgcaagttgaacgggca       | 50,0               |
| NG_012059:F_46-66           | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcctttggagcacttctat     | 42,9               |
| NG_012059:F_56-79           | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggcacttctatctagaagcagtgt | 41,7               |
| NG_012059:F_69-92           | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagaagcagtgtttagtttctcca | 37,5               |
| NG_012059:F_91-108          | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcaaacctgggccacttctgt    | 55,6               |
| NG_012059:F_108-130         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcacactactctgttctgagtaa | 43,5               |
| NG_012059:F_120-141         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggttctgagtaaggaaacagcct  | 45,5               |
| NG_012059:F_131-149         | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggaacagcctccaagcat      | 52,6               |
| Reverse:                    |                                                          |                    |
| NG_012059:R_142-121         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggaggctgttcttactcagaa   | 45,5               |
| NG_012059:R_128-108         | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagactcagaacagagtagtgga   | 47,6               |
| NG_012059:R_109-92          | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggacgaagtggcccagttt     | 55,6               |
| NG_012059:R_101-80          | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggcccagtttgaagaactaa   | 45,5               |
| NG_012059:R_74-52           | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcttctagataagaagtgtcca | 43,5               |
| NG_012059:R_60-42           | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagtgtctcaagggaaca      | 47,4               |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                           |      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|------|
| exon:2 430-481            |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_397-415       | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagagccattactcacct        | 52,6 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_536-516       | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggatggtagagggtcaaagga    | 47,6 |
| exon:3 127595-127675      |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_127516-127537 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaagctaagagttaggctctgt   | 45,5 |
| NG_012059:F_127526-127544 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtaggtctgtctgggacaa      | 52,6 |
| NG_012059:F_127538-127558 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggggacaacattgcttcttgggt   | 47,6 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_127729-127711 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggataacagctcccatgcca     | 52,6 |
| NG_012059:R_127717-127694 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcatgccactatttgccttcaaca | 37,5 |
| exon:4 217049-217183      |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_216955-216978 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgaagttatgacagtgcctttgt  | 37,5 |
| NG_012059:F_216970-216988 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggctcttggctgtgggaaa       | 52,6 |
| NG_012059:F_217018-217039 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtactaattgcactcctctgt     | 40,9 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_217273-217252 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtcataaatgacagaactggga   | 40,9 |
| NG_012059:R_217240-217219 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgtatctttacatttggccca   | 40,9 |
| NG_012059:R_217228-217211 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagttgtggcccatgcatcaa      | 50,0 |
| NG_012059:R_217209-217189 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggagaaatcaagcttggctggt   | 42,9 |
| exon:5 218681-218725      |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_218590-218610 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaatgtaggccattgactctca    | 42,9 |
| NG_012059:F_218620-218643 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgaagctaaacacatcagttgga  | 37,5 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_218822-218803 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcttgcagagacaggatgt     | 50,0 |
| NG_012059:R_218808-218788 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggatgtgtgctgaggtcaaagt   | 47,6 |
| NG_012059:R_218781-218759 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaatatgaggcagaacctaagga  | 39,1 |
| exon:6 224195-224311      |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_224124-224141 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcgctgtggagccattta       | 50,0 |
| NG_012059:F_224135-224158 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccatttagaatagtgacagtcct  | 41,7 |
| NG_012059:F_224148-224168 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcgacagtccttggctaact     | 47,6 |
| NG_012059:F_224160-224181 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtggttaacttgatccctcttt    | 40,9 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_224364-224343 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcgtagagacaagcaagccatt   | 45,5 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                              |      |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------|------|
| exon:7 226683-226751      |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_226586-226603 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaggctcttgctgtcccat          | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_226850-226828 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacagatgctagtctggaatgt      | 39,1 |
| NG_012059:R_226800-226780 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggggaaccagcttatagccta       | 52,4 |
| NG_012059:R_226779-226757 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcagctatctgacttacaggtt    | 43,5 |
| exon:8 228419-228454      |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_228351-228376 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggttagttatctgaaattgcaggc    | 38,5 |
| NG_012059:F_228380-228405 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatttataaaccttcagtgctctgc    | 34,6 |
| NG_012059:F_228400-228419 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcctgcctttgttctcagg        | 50,0 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_228496-228475 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtttagtcaacactgagagctca     | 40,9 |
| exon:9 231843-231905      |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_231755-231777 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctgtacagttctcgtggacata      | 43,5 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_232005-231982 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggaggacctaaattacacaggttt   | 41,7 |
| exon:10 232728-232763     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_232656-232675 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcaacatgccgtgtcttt         | 45,0 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_232826-232805 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctctgggaaatccagagtactt     | 45,5 |
| exon:11 232943-232984     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_232873-232894 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtccaatttaagttcccagagct      | 40,9 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_233072-233054 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctcttacacaagcaggca        | 52,6 |
| NG_012059:R_233048-233025 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggtgtaatcagacacatttcttgca   | 37,5 |
| NG_012059:R_233024-233001 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcatatggaaggcagactgtattt   | 41,7 |
| exon:12 234011-234103     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_233919-233941 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatttgtagttacatccagagga      | 39,1 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_234198-234172 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctctccagattgtctggttattagag | 37,0 |
| exon:13 235442-235495     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_235356-235376 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcagccaagtacatgtgga        | 47,6 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                              |      |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:F_235371-235389 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgtggagagccatcctact         | 52,6 |
| NG_012059:F_235380-235398 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccatcctactgtgcgttca         | 52,6 |
| NG_012059:F_235392-235410 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggcgttactgtcttctgat          | 52,6 |
| NG_012059:F_235414-235435 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagacttactaaccttgggctgatt      | 40,9 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_235594-235572 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcaatccatgggaagaggtctt      | 43,5 |
| NG_012059:R_235582-235561 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggagaggtcttctgttagcct       | 45,5 |
| NG_012059:R_235572-235549 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtctgttagccttattgtctaca     | 37,5 |
| NG_012059:R_235545-235522 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgttccaatcagaccctgtata     | 37,5 |
| exon:14 241844-241912     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_241763-241782 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaatagcctcctgtcttggga        | 45,0 |
| NG_012059:F_241782-241799 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatgaagccaggagaccga          | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_241941-241922 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcccaggcaagtaacattcga       | 50,0 |
| exon:15 243297-243341     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_243200-243223 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaatcctgaactcagttggataact    | 37,5 |
| NG_012059:F_243252-243272 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaggtagcctattgtctgttct       | 42,9 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_243432-243415 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaatgtctcccttggcca          | 50,0 |
| NG_012059:R_243425-243404 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcccttggccatgttaggtaaa      | 45,5 |
| exon:16 243836-243889     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_243738-243756 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccaagatccctgtgccatt         | 52,6 |
| NG_012059:F_243758-243777 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggccctggcttaatccaaaga        | 50,0 |
| NG_012059:F_243790-243813 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatgctctatactttccacttagt     | 37,5 |
| NG_012059:F_243811-243834 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagtggtaactatgttctgtcaca     | 37,5 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_243946-243923 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgttgtaattcactcttctacct    | 37,5 |
| exon:17 244726-244795     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |
| NG_012059:F_244639-244660 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtctcctagggatgggctttaat      | 40,9 |
| NG_012059:F_244658-244678 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaatggcacatagatcttgggt       | 42,9 |
| Reverse:                  |                                                              |      |
| NG_012059:R_244894-244867 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcaatcgagtaactaacaagtatcctt | 32,1 |
| NG_012059:R_244822-244798 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtccactcaaattaatgagaagttgc  | 36,0 |
| exon:18 245843-245950     |                                                              |      |
| Forward:                  |                                                              |      |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                            |      |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:F_245746-245763 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaatgccaggacagctcct        | 55,6 |
| NG_012059:F_245784-245801 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgtacatctgtgggcct         | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_246036-246017 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcccacccagaggtatagaa      | 55,0 |
| NG_012059:R_246010-245991 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggctgggaaccacagtgtata     | 50,0 |
| NG_012059:R_246002-245979 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccacagtgtatagaggactgatct | 45,8 |
| exon:19 246890-247030     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_246801-246823 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggatttgttccaacatatgcca    | 39,1 |
| NG_012059:F_246820-246840 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggccacagataggaataactcca    | 47,6 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_247130-247111 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagctgtttcacctgtgagat     | 45,0 |
| NG_012059:R_247098-247078 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagatcatgactgttctgcagtct    | 42,9 |
| NG_012059:R_247089-247070 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggttctgcagtctggatcaca     | 50,0 |
| NG_012059:R_247074-247052 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtcacatctgaatcttgagaccaa  | 39,1 |
| exon:20 247927-248031     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_247869-247889 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcaggggaagtcatcaggcttat    | 47,6 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_248130-248111 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggttctgttaggttccga        | 50,0 |
| NG_012059:R_248122-248105 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagttaggttcccgaggctgt       | 55,6 |
| NG_012059:R_248082-248062 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggccttcttaaggagttgga      | 47,6 |
| NG_012059:R_248069-248049 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagtttgaggaccaagaaact     | 42,9 |
| exon:21 249746-249906     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_249648-249670 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtctatggagttgtcaagtcaca    | 39,1 |
| NG_012059:F_249708-249729 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaatgaccacttcgttctatgt     | 40,9 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_249961-249942 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaggcacttgaaagattcca      | 45,0 |
| NG_012059:R_249944-249927 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccattgcttctcagggt        | 55,6 |
| NG_012059:R_249930-249908 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggtcaaagttggcaagactta    | 43,5 |
| exon:22 250396-250575     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_250299-250317 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtaccaaggttctgctct        | 52,6 |
| NG_012059:F_250307-250330 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggttctgctctaagtcataatgct  | 41,7 |
| NG_012059:F_250328-250345 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggctaggtgccggaattct        | 55,6 |
| NG_012059:F_250335-250357 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggccggaattctatgaagtctaca   | 43,5 |
| Reverse:                  |                                                            |      |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                            |      |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:R_250666-250648 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccctgtttcatgggtccagt     | 52,6 |
| NG_012059:R_250611-250589 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtctgtagagctaatacacctagga | 43,5 |
| NG_012059:R_250600-250578 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaatacacctaggaacgatcaactt | 39,1 |
| exon:23 251144-251327     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_251053-251072 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtcacactggctacctttt       | 50,0 |
| NG_012059:F_251068-251089 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtctttctgtagtcagaggact     | 45,5 |
| NG_012059:F_251082-251105 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagaggactgtccagataaatctct  | 41,7 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_251395-251373 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctgagtcataaccactctacaa  | 43,5 |
| NG_012059:R_251357-251336 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagtccaagccatctgattcta    | 40,9 |
| exon:24 257455-257526     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_257391-257413 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcgtactaggagaaatcttcct     | 47,8 |
| NG_012059:F_257402-257423 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaaatcttcctaactctgggt     | 45,5 |
| NG_012059:F_257417-257435 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtctgggttactgaatgca        | 47,4 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_257613-257592 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccaaataactactgggtatcct   | 45,5 |
| NG_012059:R_257577-257557 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtatggcccttacaagagtgt     | 42,9 |
| NG_012059:R_257566-257544 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacaagagtgttagtggtttct    | 39,1 |
| exon:25 257801-257908     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_257705-257725 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggctctccaagagactgggatt     | 52,4 |
| NG_012059:F_257719-257740 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgggattcttgactgaacatca    | 40,9 |
| NG_012059:F_257742-257762 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaaatcatactagcacaccga      | 42,9 |
| NG_012059:F_257751-257769 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctagcacaccgactttcct       | 52,6 |
| NG_012059:F_257773-257794 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccctcattgcttacatttgggt    | 45,5 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_258004-257987 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtggcagaggactaccaca       | 55,6 |
| NG_012059:R_257933-257915 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggtgaggagacactccttt      | 52,6 |
| exon:26 258985-259206     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_258978-258998 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcgtttaggatttctggacct      | 47,6 |
| NG_012059:F_259061-259079 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggattggcagtcaggctta        | 52,6 |
| NG_012059:F_259072-259090 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcaggcttacctggttccaa       | 52,6 |
| NG_012059:F_259093-259111 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggagccactggtgacatctt       | 52,6 |
| NG_012059:F_259102-259122 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtgacatctttggtgctgaaa     | 42,9 |
| NG_012059:F_259145-259165 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctacaaggattaacagggca     | 47,6 |
| NG_012059:F_259161-259181 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggggcacaaaggatttcttggga    | 47,6 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                           |      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|------|
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_259216-259196 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaaagattcaccttgagtcct    | 42,9 |
| NG_012059:R_259204-259187 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagttgagtcctggaaggcca      | 55,6 |
| NG_012059:R_259198-259181 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctggaaggccagagtct      | 61,1 |
| NG_012059:R_259180-259160 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccaagaatcctttgtgcct     | 47,6 |
| NG_012059:R_259162-259142 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctgttaatcctttaggcct    | 47,6 |
| NG_012059:R_259112-259094 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaaagatgtcaccagtggct     | 47,4 |
| NG_012059:R_259095-259077 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcccttgaaccaggtaa      | 52,6 |
| NG_012059:R_259087-259070 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggaaccaggtaagcctgga      | 55,6 |
| NG_012059:R_259080-259062 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggttaagcctggactgccaat    | 52,6 |
| NG_012059:R_259072-259055 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggactgccaatcatcca       | 55,6 |
| NG_012059:R_259058-259041 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcccaggcaagccatcttt      | 55,6 |
| exon:27 259578-259739     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_259488-259506 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggcacctgggataagtcct      | 57,9 |
| NG_012059:F_259514-259531 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggtttgcctgacctca         | 55,6 |
| NG_012059:F_259540-259559 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtccaggctgtgatcatt        | 45,0 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_259790-259773 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagggcctagctgaagtct      | 55,6 |
| NG_012059:R_259771-259753 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtcaaggtgggactcttct      | 52,6 |
| exon:28 261412-261582     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_261316-261338 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggccaaaccaatcagaagctatga | 43,5 |
| NG_012059:F_261362-261379 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccagagcctcacttgaca       | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_261675-261657 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtccattcctaggcagaga      | 52,6 |
| NG_012059:R_261641-261623 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcgcagctgaatgctcct       | 52,6 |
| NG_012059:R_261622-261605 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtttggaaccactgtgca       | 50,0 |
| exon:29 262626-262769     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_262530-262550 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggctgtatgactttgggcaagt    | 47,6 |
| NG_012059:F_262542-262560 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgggcaagttactcaacct      | 47,4 |
| NG_012059:F_262565-262583 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggagcctccatttcctggta      | 52,6 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_262867-262846 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagatttggtacaaaccacagga  | 40,9 |
| NG_012059:R_262854-262834 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaccacaggaataaccaagtca   | 42,9 |
| exon:30 263208-263333     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_263135-263154 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgtgtgaaaggtcagcctt      | 45,0 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                             |      |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:F_263144-263161 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaggtcagcctttgcctga         | 55,6 |
| NG_012059:F_263159-263176 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtaccctgcgtctaagct          | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                             |      |
| NG_012059:R_263426-263409 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggctgtacttgagggcctt        | 55,6 |
| NG_012059:R_263417-263400 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggaggcctttgctcaaga         | 55,6 |
| NG_012059:R_263393-263371 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccaagtgttgatgaagcctct     | 43,5 |
| NG_012059:R_263372-263350 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcttgagcatttctcctatcca   | 43,5 |
| exon:31 263802-263983     |                                                             |      |
| Forward:                  |                                                             |      |
| NG_012059:F_263733-263750 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctgcatttggaagct           | 55,6 |
| NG_012059:F_263739-263756 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcttggcaagctgggttt          | 50,0 |
| Reverse:                  |                                                             |      |
| NG_012059:R_264082-264062 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggagaagtaagctgggcatcaga    | 47,6 |
| NG_012059:R_264007-263985 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagacaaagatctggtcacactta   | 39,1 |
| exon:32 265891-265954     |                                                             |      |
| Forward:                  |                                                             |      |
| NG_012059:F_265850-265868 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggagctctgggcagaaatga        | 52,6 |
| NG_012059:F_265857-265880 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggggcagaaatgatgattcccatat   | 41,7 |
| Reverse:                  |                                                             |      |
| NG_012059:R_266022-266003 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcttggcctgctagaatct        | 50,0 |
|                           |                                                             |      |
| exon:33 266962-267036     |                                                             |      |
| Forward:                  |                                                             |      |
| NG_012059:F_266926-266947 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcctggccatttaacaatgt      | 40,9 |
| Reverse:                  |                                                             |      |
| NG_012059:R_267076-267057 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagctgtgaggcaacaaga        | 45,0 |
| exon:34 267506-267613     |                                                             |      |
| Forward:                  |                                                             |      |
| NG_012059:F_267414-267437 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcctcagcaattcagaatctact   | 37,5 |
| NG_012059:F_267441-267463 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcccatagaggaatacactgcta   | 43,5 |
| NG_012059:F_267455-267475 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagactgctagaaatatggcct        | 42,9 |
| NG_012059:F_267470-267489 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgccctaactcactcagcatt      | 45,0 |
| Reverse:                  |                                                             |      |
| NG_012059:R_267708-267687 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctcctaaatgtgaaccaaggca    | 40,9 |
| NG_012059:R_267696-267679 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaaccaaggcagagggtca        | 50,0 |
| NG_012059:R_267668-267647 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtggttggaagctaatacctaact   | 40,9 |
| NG_012059:R_267643-267620 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtcagaataagggttatcatgtggca | 37,5 |
| exon:35 267707-267814     |                                                             |      |
| Forward:                  |                                                             |      |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                           |      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:F_267620-267643 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgccacatgataaccttattctga | 37,5 |
| NG_012059:F_267647-267668 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatttgattgcttcaagcca      | 40,9 |
| NG_012059:F_267683-267705 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctctgccttggttcacattta   | 43,5 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_267914-267896 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcatggcttaacctagct      | 52,6 |
| NG_012059:R_267877-267857 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggtagttggtgtccttcacga    | 47,6 |
| NG_012059:R_267868-267849 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggctcctcatcgagggaaga     | 50,0 |
| NG_012059:R_267837-267820 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgctcgtcccaataca        | 50,0 |
| exon:36 268407-268478     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_268311-268328 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggacctcgcaatgccttt        | 55,6 |
| NG_012059:F_268359-268379 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcattgattcagagttgctgga   | 42,9 |
| NG_012059:F_268368-268385 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagagttgctggagccatt       | 50,0 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_268569-268548 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggatacaccacagtcgagaatt  | 45,5 |
| NG_012059:R_268558-268540 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagtcgagaattcatggcca     | 47,4 |
| NG_012059:R_268551-268534 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaattcatggccagccctt      | 50,0 |
| NG_012059:R_268534-268517 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgccaggcttctggaaga      | 55,6 |
| NG_012059:R_268523-268506 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtggaagagctgatgcctt      | 55,6 |
| NG_012059:R_268505-268488 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctcttcacctgagggt       | 61,1 |
| NG_012059:R_268498-268480 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaccctgagggtcttcttaa     | 52,6 |
| exon:37 268803-268928     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_268728-268745 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccacaggcgagtgaagta       | 55,6 |
| NG_012059:F_268758-268775 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcacctccactgaggtct       | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_269021-269004 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcaacctgtgagccacat       | 55,6 |
| NG_012059:R_268986-268969 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaacctgactctccagca       | 55,6 |
| NG_012059:R_268955-268937 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctctacaaggcctgactt     | 52,6 |
| NG_012059:R_268947-268930 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaggcctgacttggactca      | 55,6 |
| exon:38 272937-273053     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_272873-272890 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaaagagcctggccatctt       | 50,0 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_273151-273134 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgctccagcaacagggact     | 55,6 |
| NG_012059:R_273137-273120 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggacttggctgcgctgtat      | 55,6 |
| exon:39 273385-273546     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_273291-273309 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaatgggcttggagctct       | 52,6 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                            |      |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:F_273314-273331 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtccctaggccttctgca        | 61,1 |
| NG_012059:F_273323-273340 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccttctgcagtggctact        | 55,6 |
| NG_012059:F_273330-273349 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcagtggtgctactacctgttca    | 50,0 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_273610-273593 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagactgcaggaaggagtcct       | 55,6 |
| exon:40 273725-273823     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_273628-273647 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtggtgatgttcttccta         | 50,0 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_273922-273905 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagactttcttggcgtggt       | 50,0 |
| NG_012059:R_273915-273898 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcttggcgtggtgagcaat       | 55,6 |
| NG_012059:R_273908-273891 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtggtgagcaatgatgcct       | 50,0 |
| NG_012059:R_273865-273848 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccctcagctctggatca        | 61,1 |
| NG_012059:R_273845-273825 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccagcacatgctctcaacta     | 47,6 |
| exon:41 275385-275531     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_275296-275319 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggattgcaagtagtaagaaggct    | 37,5 |
| NG_012059:F_275345-275366 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggcctcagcctgatgttcttatt    | 45,5 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_275615-275597 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcttggagggtggacatccaa     | 52,6 |
| exon:42 276688-276804     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_276594-276614 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagtcttggcatgacacataa      | 42,9 |
| NG_012059:F_276657-276674 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtaccctccttgggct          | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_276830-276813 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcgccctcctaattgtggcat     | 55,6 |
| exon:43 277769-277960     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_277673-277696 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtggtataacatgccttggacaatgt | 37,5 |
| NG_012059:F_277699-277722 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggtacaatgtgagtagctgatgtt  | 41,7 |
| NG_012059:F_277719-277738 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtggtgtcattagctgcacca      | 45,0 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_278054-278036 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagtggacctagaagggt        | 52,6 |
| NG_012059:R_277981-277962 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggctgtcagagctgttaccta     | 55,0 |
| exon:44 278675-278961     |                                                            |      |
| Forward:                  |                                                            |      |
| NG_012059:F_278712-278731 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggcccttcatctactgcaaca      | 50,0 |
| NG_012059:F_278723-278741 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagactgcaacatcaacaggt        | 47,4 |
| NG_012059:F_278746-278763 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcactatgccaggcgcaat        | 55,6 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                           |      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:F_278753-278776 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccaggcgcaatgataaatcttact | 41,7 |
| NG_012059:F_278834-278851 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagatcatcagccgctgct         | 55,6 |
| NG_012059:F_278868-278885 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcgcaagccattgctgt       | 55,6 |
| Reverse:                  |                                                           |      |
| NG_012059:R_278975-278957 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggtcaggaccttaccatga     | 52,6 |
| NG_012059:R_278962-278942 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccatgaggaaagagtacccaa   | 47,6 |
| NG_012059:R_278950-278932 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagtacccaatccagaggct     | 52,6 |
| NG_012059:R_278886-278869 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcacagcaatggcttgcca      | 55,6 |
| NG_012059:R_278851-278834 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagagcagcggtgatgtact       | 55,6 |
| NG_012059:R_278778-278755 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccagtaagatttatctgcgcct  | 41,7 |
| NG_012059:R_278764-278747 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcattgcgcctggcatagt      | 55,6 |
| NG_012059:R_278752-278734 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcatagtggcacacctcggt     | 52,6 |
| NG_012059:R_278741-278722 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacctggtgatgttcagta      | 45,0 |
| NG_012059:R_278729-278710 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagttgcagtagtaagggcat      | 45,0 |
| NG_012059:R_278721-278704 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggatgaagggcatggtgct      | 55,6 |
| exon:45 281163-282809     |                                                           |      |
| Forward:                  |                                                           |      |
| NG_012059:F_281212-281231 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggctcctgcctagaggacttt     | 55,0 |
| NG_012059:F_281221-281238 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtagaggactttcgggcca       | 55,6 |
| NG_012059:F_281238-281258 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagactcctttcatcgaatgcagt    | 42,9 |
| NG_012059:F_281293-281313 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagtacagtttctggtgacca     | 42,9 |
| NG_012059:F_281303-281320 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctggttgaccacagtgga       | 55,6 |
| NG_012059:F_281413-281430 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaaagcctgtagggtggca       | 55,6 |
| NG_012059:F_281476-281496 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctcacaacctaagtgtct      | 47,6 |
| NG_012059:F_281518-281540 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcttgcctgtcaagttgtacatt   | 39,1 |
| NG_012059:F_281542-281562 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggagtctcatttgggctagact    | 47,6 |
| NG_012059:F_281551-281568 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttgggctagactaccgga       | 55,6 |
| NG_012059:F_281558-281575 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagactaccggacactcgt       | 55,6 |
| NG_012059:F_281585-281604 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctcgggtccatagagatga     | 55,0 |
| NG_012059:F_281639-281658 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtcaagctggtgctactgttt     | 45,0 |
| NG_012059:F_281685-281706 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtggtctacctcagaaagatttga  | 40,9 |
| NG_012059:F_281708-281726 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggggccacaactgtctttaga     | 52,6 |
| NG_012059:F_281750-281771 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttgatcggaagctcttcttaa    | 40,9 |
| NG_012059:F_281789-281809 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcttcatgtacagaggtcagca    | 47,6 |
| NG_012059:F_281819-281837 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtggtctaaaccagaaccca      | 47,4 |
| NG_012059:F_281833-281855 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaccagtggttccacacttaaat   | 39,1 |
| NG_012059:F_281875-281892 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagggatggctcaagtctgca       | 55,6 |
| NG_012059:F_281881-281899 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcaagtctgcacagagca      | 52,6 |
| NG_012059:F_281893-281912 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcagagcaagtctcactctt      | 50,0 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                            |      |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:F_281911-281928 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttcaaggaggccactgt         | 55,6 |
| NG_012059:F_281950-281967 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggaatgaggtgccacca          | 55,6 |
| NG_012059:F_282077-282098 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcatatggctctagacaaacca     | 45,5 |
| NG_012059:F_282087-282108 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtagacaaacctctcctctt       | 45,5 |
| NG_012059:F_282130-282147 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagagacagaggatgtggcct        | 55,6 |
| NG_012059:F_282136-282153 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaggatgtggcctggttca        | 55,6 |
| NG_012059:F_282147-282169 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtggttcaagtaagcagaggat     | 39,1 |
| NG_012059:F_282176-282194 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaatgtggccaagcctatca       | 47,4 |
| NG_012059:F_282183-282206 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccaagcctatcaaggaaatgaga   | 41,7 |
| NG_012059:F_282196-282217 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagaggaatgagaatgacagcctt     | 40,9 |
| NG_012059:F_282221-282238 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtctgggccagaagtaga         | 55,6 |
| NG_012059:F_282242-282259 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtgggtgcgtaaggatgt        | 55,6 |
| NG_012059:F_282300-282320 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccatcccagtttctcagaa       | 47,6 |
| NG_012059:F_282315-282338 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttagaagtcctgtttattccaaa   | 37,5 |
| NG_012059:F_282327-282350 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggtttattccaaatgccatccagat  | 37,5 |
| NG_012059:F_282356-282375 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcaatgtggcaaatgaagct       | 45,0 |
| NG_012059:F_282376-282398 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacaggcacagtgtgtttccttctgtat   | 43,5 |
| NG_012059:F_282432-282453 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtccaattgctctttcacaggta    | 40,9 |
| NG_012059:F_282514-282535 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcttgagcagttagcagacctaa    | 45,5 |
| NG_012059:F_282542-282563 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctgaattggctatgcagtaca    | 45,5 |
| NG_012059:F_282615-282638 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttccagaacactcttagctatgt   | 37,5 |
| NG_012059:F_282638-282656 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagttgacatgaggcagttcct       | 47,4 |
| NG_012059:F_282658-282681 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagccaggtgattctgttcttaagt    | 41,7 |
| NG_012059:F_282693-282713 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagtgccaatacagacaaagca       | 42,9 |
| NG_012059:F_282748-282770 | tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagctcctgagtaataagcatggtgt   | 43,5 |
| Reverse:                  |                                                            |      |
| NG_012059:R_282767-282744 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccatgcttattactcaggaggtaa | 41,7 |
| NG_012059:R_282712-282691 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccttctgtattggcacagt      | 45,5 |
| NG_012059:R_282677-282657 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaaggaacagaatcacctgga     | 42,9 |
| NG_012059:R_282657-282639 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaaggaactgcctcatgtca      | 47,4 |
| NG_012059:R_282640-282617 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcaacatagctaagagtgttctgga | 41,7 |
| NG_012059:R_282558-282540 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgcatagccaattcaggct      | 47,4 |
| NG_012059:R_282551-282530 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccaattcaggcttgctttaggt   | 45,5 |
| NG_012059:R_282537-282516 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcttaggtctgctaactgtca     | 45,5 |
| NG_012059:R_282456-282435 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggtacctgtgaaagagcaatt    | 45,5 |
| NG_012059:R_282407-282385 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagatcctcagaatacaaggaaacca  | 39,1 |
| NG_012059:R_282387-282369 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccaacactgtgcagcttca      | 52,6 |
| NG_012059:R_282376-282357 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcagcttcagttgccacatt      | 45,0 |
| NG_012059:R_282342-282320 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggcatttgaataaacagggact   | 43,5 |

Продолжение таблицы Б.2

|                           |                                                            |      |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|------|
| NG_012059:R_282323-282302 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggacttctgagaaactgggatgt   | 45,5 |
| NG_012059:R_282260-282243 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcacatccttacgaccca        | 55,6 |
| NG_012059:R_282237-282219 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctacttctggcccaggaaa      | 52,6 |
| NG_012059:R_282194-282176 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgtataggcttgccacatt      | 47,4 |
| NG_012059:R_282175-282155 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgtgcatcctctgctttact     | 42,9 |
| NG_012059:R_282157-282139 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacttgaaccaggccacat       | 47,4 |
| NG_012059:R_282102-282082 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggagatggttgtctaggacca     | 47,6 |
| NG_012059:R_282093-282070 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgtctaggaccatatgccattaat | 37,5 |
| NG_012059:R_282014-281994 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcccagtcttgctcattctaga    | 47,6 |
| NG_012059:R_281966-281948 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggttgccacctcattcaa       | 52,6 |
| NG_012059:R_281935-281918 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcctagacacagtgggcct       | 61,1 |
| NG_012059:R_281928-281911 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacagtgggcctccttgaa       | 55,6 |
| NG_012059:R_281922-281905 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcctccttgaaagtga         | 55,6 |
| NG_012059:R_281913-281894 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggaagagtgaggacttgctct     | 50,0 |
| NG_012059:R_281904-281887 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagggacttgctctgtgcaga       | 55,6 |
| NG_012059:R_281894-281877 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgtgcagacttgagccat       | 50,0 |
| NG_012059:R_281848-281830 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgtggaacactgggttct       | 47,4 |
| NG_012059:R_281837-281816 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgggttctggttaagccaaat    | 40,9 |
| NG_012059:R_281808-281788 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggctgacctgtgtacatgaaga    | 47,6 |
| NG_012059:R_281772-281751 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagattaggaagagcttccgatca    | 40,9 |
| NG_012059:R_281762-281743 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggcttccgatcaagacggtga     | 50,0 |
| NG_012059:R_281752-281731 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcaagacggtaggagaaaagcta   | 45,5 |
| NG_012059:R_281725-281707 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagctaagacagtgtggccca       | 52,6 |
| NG_012059:R_281706-281685 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtcaaatcttctgaggtagcca    | 40,9 |
| NG_012059:R_281694-281673 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggtagccatgaatagtcaca      | 45,5 |
| NG_012059:R_281657-281639 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagaacagtagcaccagcttga      | 47,4 |
| NG_012059:R_281606-281587 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggctcatctctatggaccga      | 55,0 |
| NG_012059:R_281575-281557 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagacagtgtccggtagtcta       | 52,6 |
| NG_012059:R_281566-281547 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcggtagttagcccaaatga      | 50,0 |
| NG_012059:R_281542-281521 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccaatgtacaacttgacaggca   | 45,5 |
| NG_012059:R_281501-281480 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtcttcagaccattcaggtttgt   | 40,9 |
| NG_012059:R_281430-281413 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgccaccctacaggcttt       | 55,6 |
| NG_012059:R_281360-281341 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcgtttcagacacaggcaact     | 50,0 |
| NG_012059:R_281313-281292 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagtgggtcaaccagaaactgtactt  | 40,9 |
| NG_012059:R_281260-281240 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagccactgcattcgatgaaagga    | 47,6 |
| NG_012059:R_281248-281231 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagatgaaaggagtggccga        | 55,6 |
| NG_012059:R_281235-281217 | gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagcccgaagtctctaggca        | 57,9 |

# **ПРИЛОЖЕНИЕ В** **Отчет о патентных исследованиях**

Отчет о патентных исследованиях

УТВЕРЖДАЮ  
 Руководитель АФ НЦБ,  
 к.б.н.  
  
 Скба Ю.А.  
 « 08 » ноября 2024 г.

## **ОТЧЕТ**

о патентных исследованиях для выполнения проекта «Разработка отечественной тест-системы на основе ПЦР в реальном времени для выявления и дифференциации возбудителей Лайм-боррелиоза (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) и клещевой возвратной лихорадки, вызываемой *Borrelia miyamotoi* по программе «РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНЫХ, ГЕНОМНЫХ И ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН», в соответствии с Патентным Законом Республики Казахстан и СТ РК ГОСТ Р 15.011-2005 «Система разработки и постановки продукции на производство. Патентные исследования. Содержание и порядок проведения», а также с Межгосударственным стандартом "Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу" ГОСТ 7.32-2017.

Этап работы: промежуточный (2024 год)

Начало поиска 21.10.2024

Окончание поиска 07.11.2024

Исполнитель: Низкородова А.С.

Регламент поиска выполнен без отступлений.

Таблица Б.1 – Патентная документация

| Предмет поиска<br>(объект исследования, его<br>составные части)                                                                                                        | Страна выдачи, вид и<br>номер охранного<br>документа. Клас-<br>сификационный индекс              | Заявитель (патентообладатель), страна.<br>Номер заявки, дата приоритета,<br>конвенционный приоритет, дата<br>публикации                                                                                              | Название изобретения<br>(полной модели, образца)                                                                                                                                                                              | Сведения о дей-<br>ствии охранного<br>документа или<br>причина его анну-<br>лирования (для<br>анализа патентной<br>чистоты) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                                                                                      | 2                                                                                                | 3                                                                                                                                                                                                                    | 4                                                                                                                                                                                                                             | 5                                                                                                                           |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.<br>and/or <i>Borrelia miyamotoi</i><br>detection /<br>детекция<br><i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.<br>и/или <i>Borrelia miyamotoi</i> | US6087097A<br>C12Q1/689;<br>C07K14/20                                                            | David H. Persing // Mayo Foundation for<br>Medical Education and Research<br>Appl. No.: US08/642,807 1996-05-03                                                                                                      | PCR detection of <i>Borrelia burgdorferi</i>                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                        | WO2018083491A1<br>WIPO (PCT)<br>C12Q1/689;<br>C12Q1/6811;<br>C12Q1/6888;<br>G01N2333/20          | Rebecca Jane Martha CLOKIE, Jinyu SHAN //<br>University Of Leicester, Phelix Research And<br>Development Limited<br>Appl. No.: PCT/GB2017/053323 2017-11-03                                                          | Phage-based detection of<br>borreliosis and means thereof                                                                                                                                                                     |                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                        | US11326213B2 (United<br>States)<br>C12Q1/689;<br>C12N15/1013                                     | Thomann U.H., Neely L.A., Dhanda R.K.,<br>Sweeney F., Lowery JR T.J., Townsend J.A.,<br>Snyder J.L., Giese H.S., Bandoski-Gralinski<br>C.A., Logan D.L. // T2 Biosystems, Inc.<br>Appl. No.: US15/545,663 2015/01/21 | NMR methods and systems for<br>the rapid detection of tick-<br>borne pathogens                                                                                                                                                |                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                        | RU2629604C1 (Россия)<br>C12Q1/6844;<br>C12Q1/686;<br>C12Q1/6881;<br>C12Q2561/113;<br>C12Q2600/16 | А.О. Семенцова, В.А. Терновой, Е.В. Чуб,<br>М.Ю. Карташов, В.Б. Локтев // ФБУН ГНЦ<br>ВБ "Вектор"<br>Appl. No.: RU2016125498A 2016-06-24                                                                             | Набор олигонуклеотидных<br>праймеров и зондов для<br>идентификации вируса<br>клещевого энцефалита,<br>вируса лихорадки Западного<br>Нила, боррелий и риккетсий<br>методом мультиплексной<br>ПЦР в режиме реального<br>времени |                                                                                                                             |

| 1 |                                                                      |                                                                                                                                          |                                                                                                                                    | 5 |
|---|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|   | RU2763595C1<br>C12Q1/68                                              | Ю.Ю. Комаровский, А.С. Горбенко, И.А. Ольховский, М.А. Столяр, Д.И. Васильева<br>Appl. No.: RU2021120350A 2021-07-10                     | Набор реагентов для обнаружения возбудителей клещевых боррелиозов                                                                  |   |
|   | RU2289627C2<br>Y02A50/30                                             | Иванчук И.И. // Сибирский государственный медицинский университет ГОУ ВПО СибГМУ<br>Appl. No.: RU2004105688 2004-02-25                   | Способ и набор для обнаружения ДНК бактерии заболевания лаймского боррелиоза - <i>Borrelia burgdorferi</i>                         |   |
|   | CA 2209991<br>C07H 21/00<br>C12P 19/34                               | Hogan, J.J., Yang, Y., Carter, N. // GEN-PROBE INCORPORATED<br>Appl. No.: 08/374,863 1995-01-19                                          | NUCLEIC ACID AMPLIFICATION OLIGONUCLEOTIDES AND PROBES TO LYME DISEASE ASSOCIATED BORRELIA                                         |   |
|   | CA 3039102<br>C12Q 1/68                                              | Auvray P., Dessauge E., Fritz D. // D.F. CONSEILS (France)<br>Appl. No.: 1659525 2016-10-03                                              | Method and kit for detecting, discriminating and identifying <i>Borrelia</i> species present in a sample of human or animal origin |   |
|   | CA 2960776<br>C12Q 1/68<br>C12Q 1/02<br>C12Q 1/04                    | Parveen N.T, Marras S.A.E. // RUTGERS, The State university of New Jersey (United States of America)<br>Appl. No.: 61/877,479 2013-09-13 | Multiplex diagnostic assay for Lyme disease and other tick-borne diseases                                                          |   |
|   | US20100278866<br>C12Q 1/68<br>G01N 33/53<br>G01N 33/68<br>G01N 33/50 | Alan G. Barbour, Philip L. Felgner // The Regents of the University of California (Oakland, CA)<br>Appl. No.: 12/676,794 Sep 8, 2008     | <i>Borrelia</i> diagnostics and screening methods                                                                                  |   |

| 1 | 2                                                      | 3                                                                                                | 4                                                                                                 | 5 |
|---|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|   | US20030108875<br>C12Q001/68<br>C07H021/04              | M. Exner, H. Hamdan, M.I Lewinski<br>Appl. No.: 10011340 Dec 4, 2001                             | Oligonucleotides and methods for detecting <i>Borrelia burgdorferi</i>                            |   |
|   | US20070172829<br>C12Q 1/68<br>C12P 19/34<br>C07H 21/04 | M. Exner, H. Hamdan, M.I Lewinski<br>Appl. No.: 10/764,186 Jan 23, 2004                          | Oligonucleotides and methods for detecting <i>Borrelia burgdorferi</i>                            |   |
|   | US6074826<br>C12Q 168<br>C12P 1934<br>C07H 2104        | Hogan, J.J., Yang, Y., Carter, N. // GEN-PROBE INCORPORATED<br>Appl. No.: 8/953,094 Oct 17, 1997 | Nucleic acid amplification oligonucleotides and probes to Lyme disease associated <i>Borrelia</i> |   |

Таблица Б.2 – Научно-техническая, конъюнктурная, нормативная документация и материалы государственной регистрации (отчеты о научно-исследовательских работах)

| Предмет поиска                       | Наименование источника информации с указанием страницы источника                                                                                                                                                                          | Автор, фирма (держатель технической информации)                           | Год. Место и орган издания (учреждения. Депонирования источника)     |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1                                    | 2                                                                                                                                                                                                                                         | 3                                                                         | 4                                                                    |
| Боррелиоз и/или <i>Borrelia spp.</i> | Особенности распространения трансмиссивных природно-очаговых заболеваний в Казахстане<br>Руководитель проекта: Егембердиева Р.А.<br>Исполнитель проекта: Шаппева Ж.Ж.                                                                     | Казахский национальный медицинский университет им. С.Д.Асфендиярова       | Инвентарный номер: 0212PK02363<br>Регистрационный номер: 0112PK01622 |
|                                      | Молекулярная эпидемиология вирусов Крым-Конго геморрагической лихорадки, лихорадки Западного Нила, клещевого энцефалита и возбудителей клещевого боррелиоза<br>Руководитель проекта: Атшабар Б.Б.<br>Исполнитель проекта: Сансызбаев Е.Б. | Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева | Инвентарный номер: 0215PK00968<br>Регистрационный номер: 0115PK02229 |

| 1 | 2                                                                                                                                                                                                                                                             | 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 4                                                                                                             |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | Идентификация и молекулярно-генетическая характеристика штаммов <i>Borrelia</i> sp., распространенных в различных регионах Казахстана, для усовершенствования системы эпидемиологического надзора за клещевым боррелиозом<br>Руководитель проекта: Скиба Ю.А. | РГП на ПХВ "Национальный центр биотехнологии"                                                                                                                                                                                                                                                    | Инвентарный номер: 0218PK00569<br>Регистрационный номер: 0118PK00927                                          |
|   | Клинико-лабораторная диагностика клещевых инфекций                                                                                                                                                                                                            | Разработчики: Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Государственное учреждение образования «Минский государственный медицинский университет», Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска | Утверждены первым заместителем Министра Здравоохранения Д.Л. Пиневич 27.12.2013 г. Регистрационный № 192-1113 |
|   | Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по предупреждению паразитарных заболеваний"                                                | Утверждены Приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 16 мая 2022 года № КР ДСМ-44.                                                                                                                                                                                               | Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 17 мая 2022 года № 28086                          |
|   | Об утверждении форм учетной и отчетной документации в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения                                                                                                                                              | Утверждены Приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 20 августа 2021 года № КР ДСМ-84.                                                                                                                                                                                           | Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 24 августа 2021 года № 24082                      |

| 1 | 2                                                                                                                        | 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 4                                                                                                                              |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | Клинические рекомендации. Болезнь Лайма                                                                                  | Разработчики: Андропова Н.В. к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ПО ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ; Малинникова Е.Ю. д.м.н., доцент, заведующая кафедрой вирусологии ФГБОУ «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ; Позднякова Л.Л. к.м.н., главный врач ГБУЗ Новосибирской области «Городская инфекционная клиническая больница №1»; Тихонова Е.П. д.м.н., профессор Зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ПО ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ; Филина Е.И. к.м.н. заведующая отделением №5 ГБУЗ НСО «Городская инфекционная клиническая больница №1» | Некоммерческое партнерство «Национальное научное общество инфекционистов» (ННОИ)                                               |
|   | Методические рекомендации по эпидемиологии, клинике, диагностике, лечению и профилактике иксодового клещевого боррелиоза | Составители: Шапиева Ж.Ж., Егембердиева Р.А., Дмитриевский А.М., Умешова Л.А.<br>Рецензенты: Тыныбеков А.С., Доскожаева С.Т.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Утверждены Приказом Председателя-Главного государственного санитарного врача Республики Казахстан от 12 ноября 2010 года № 313 |

| 1 | 2                                                                                                                                                                         | 3                       | 4                                                                                                                                      |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | Инструкция по применению набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l./PHK ВКЭ»                                                                         | АО «Вектор Бест»        | РУ № РЗН 2013/1180 РФ, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Научно-производственная зона, корпус 36                          |
|   | Инструкция по применению набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> »                                                                                       | АО «Вектор Бест»        | РУ № РЗН 2014/1405 РФ, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Научно-производственная зона, корпус 36                          |
|   | Инструкция по применению набора реагентов «АмплиСенс <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL»                                                                                       | ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии | от 05.03.18<br>111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А                                                                   |
|   | Инструкция по применению набора реагентов «АмплиСенс TBEV, <i>B. burgdorferi</i> sl, <i>Aphagocytophilum</i> , <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> -FL»               | ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии | от 22.02.23<br>111123, Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А                                                                   |
|   | Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК боррелии бургдорфери ( <i>Borrelia burgdorferi</i> ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) «Боррелио Ген» | ООО "ДНК Технология"    | 160-6 от 12 ноября 2018<br>117587, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, Варшавское шоссе, дом 125Ж, корпус 5 |
|   | Инструкция по применению набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.»                                                                                 | АО «Вектор Бест»        | РУ № РЗН 2017/6037 РФ, 630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, Научно-производственная зона, корпус 36                          |

| 1 | 2                                                                     | 3                   | 4                                                                                                                                          |
|---|-----------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | Manual for "GeneProof™ <i>Borrelia</i> PCR Kit"                       | GeneProof a.s.      | Version: DOK_140_17_03<br>Valid from: 04.09.2017<br>Videňská 101/119 Dolní<br>Heršpice CZ - 619 00 Brno                                    |
|   | Manual for "AccuPower® <i>Borrelia burgdorferi</i> Real-Time PCR Kit" | BIONEER CORPORATION | BQ-042-101-03, Revision 7<br>(2021-04-12)<br>Bioneer Global Center, 71,<br>Techno 2-ro, Yuseong-gu,<br>Daejeon 34013, Republic of<br>Korea |
|   | Manual for " <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato qPCR Kit"         | NZYtech Lda.        | MD0739_IFU_en_V2402<br>Estrada do Paço do Lumiar,<br>Campus do Lumiar, 1649-<br>038 Lisboa, Portugal                                       |
|   | Manual for " <i>Borrelia</i> qPCR Detection Kit"                      | EURx Ltd.           | E0450<br>80-297 Gdańsk Poland, ul.<br>Przyrodników 3                                                                                       |
|   | Manual for " <i>Borrelia Burgdorferi</i> Real Time PCR Kit"           | BioServices AB      | YJC60113NW<br>Solkraftsvägen 33, 135 70<br>Stockholm                                                                                       |
|   | Manual for "Real Time PCR Detection Kit <i>Borrelia burgdorferi</i> " | Biopremier          | Produção e<br>Desenvolvimento,<br>Unipessoal Rua Henrique de<br>Paiva Couceiro 10 2700-453<br>Amadora Portugal                             |
|   | Manual for "BactoReal® <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato"        | ingenetix GmbH      | IFU Version 2.0 2024-03-31<br>Haidingerasse 1, 1030<br>Wien, Austria                                                                       |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ  
о выполнении патентных исследований

Проведен патентно-информационный поиск на глубину 28 лет. Патентно-информационный поиск проводился по электронным базам данных, информационно-справочным системам: USPTO Patent Full-Text and Image Database (Патентное ведомство США), Deutsches Patent- und Markenamt (Патентное ведомство ФРГ), European Patent Office (Европейское Патентное ведомство), Евразийская патентная информационная система EAPATIS и др.

В результате проведенного поиска в странах Евразийского союза, Евросоюза, Великобритании, Японии, США по классам МКП: C12Q1/68, G01N2333/20, C07K14/20, C12N15/1013, C12Q2561/113, C12Q2600/16, Y02A50/30, выявлены патенты, имеющие общую направленность с тематикой работы, проводимой в рамках данного проекта. В мировой практике имеются патенты по использованию для детекции *Borrelia burgdorferi* s.l. и *Borrelia miyamotoi* методом ПЦР и ПЦР-в-реальном времени следующих генов-мишеней: *16S rRNA*, *OspA*, *OspB*, *flaA*. Пересечения с предлагаемыми нами для детекции участками генов-мишеней не прослеживаются.

Просмотр конъюнктурной и нормативной документации по диагностическим системам на возбудителей болезни Лайма и возвратных лихорадок позволяет сделать заключение о том, что предпринимаемые нами НИР являются не только актуальными и перспективными, но и конкурентоспособными. Большая часть тест-систем базируется на определении только одного из патогенов – либо *Borrelia burgdorferi* s.l., либо *Borrelia miyamotoi*. Диагностическая система “BactoReal® *Borrelia burgdorferi* sensu lato” предлагает определение гена *ospA* *Borrelia burgdorferi*; «АмплиСенс *Borrelia miyamotoi*-FL» – гена *glpQ*; «Боррелио Ген» и «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL» - гена *16S rRNA*. Для тест-наборов фирмы «Вектор Бест» не указываются гены-мишени, но они также выполнены в виде синглов, т.е. либо *B. burgdorferi*, либо *Borrelia miyamotoi*. Кит “GeneProof™ *Borrelia* PCR Kit” предлагает дуоплекс (один ген внутреннего контроля) для определения 15 видов *B. burgdorferi* sl. Также “*Borrelia* qPCR Detection Kit” (EURx Ltd) предлагает дуоплекс с внутренним контролем и, судя по размеру целевого фрагмента (153 н.) это, скорее всего, *16S rRNA*. Наборы португальских компаний «Biopremier» и «NZYtech Lda» также не указывают целевые гены, но оба набора определяют *B. burgdorferi* sl. в сингловых. Таким образом, аналогов запланированному нами исследованию в патентных базах данных и на открытом международном рынке не обнаружено.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Распределение видов лекарственных растений по регионам Казахстана

Таблица Г.1 – Восточно-Казахстанская область

| Род             | Вид                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Аcoraceae       | <i>Acorus calamus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Amaranthaceae   | <i>Salsola collina</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Amaryllidaceae  | <i>Allium microdictyon</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Apiaceae        | <i>Bupleurum multinerve</i> , <i>Carum carvi</i> , <i>Conium maculatum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Asparagaceae    | <i>Convallaria majalis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Asteraceae      | <i>Achillea millefolium</i> , <i>Arctium lappa</i> , <i>Arctium tomentosum</i> , <i>Artemisia absinthium</i> , <i>Artemisia vulgaris</i> , <i>Bidens tripartite</i> , <i>Centaurea cyanus</i> , <i>Cichorium intybus</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Inula helenium</i> , <i>Leuzea carthamoides</i> , <i>Serratula coronate</i> , <i>Solidago virgaurea</i> , <i>Tanacetum vulgare</i> , <i>Taraxacum officinale</i> , <i>Tussilago farfara</i> |
| Berberidaceae   | <i>Gymnospermium altaicum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Betulaceae      | <i>Betula pendula</i> , <i>Betula pubescens</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Brassicaceae    | <i>Capsella bursa-pastoris</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Cannabaceae     | <i>Humulus lupulus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Caprifoliaceae  | <i>Patrinia intermedia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Caryophyllaceae | <i>Saponaria officinalis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Crassulaceae    | <i>Phedimus hybridus</i> , <i>Rhodiola rosea</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Cucurbitaceae   | <i>Bryonia alba</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Cupressaceae    | <i>Juniperus communis</i> , <i>Juniperus sabina</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Droseraceae     | <i>Drosera rotundifolia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Dryopteridaceae | <i>Dryopteris filix-mas</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Ephedraceae     | <i>Ephedra equisetina</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Equisetaceae    | <i>Equisetum arvense</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Ericaceae       | <i>Vaccinium microcarpum</i> , <i>Vaccinium myrtillus</i> , <i>Vaccinium vitis-idaea</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Euphorbiaceae   | <i>Euphorbia soongarica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Fabaceae        | <i>Astragalus glycyphyllos</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza uralensis</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Ononis arvensis</i> , <i>Sphaerophysa salsula</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Fagaceae        | <i>Quercus robur</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Grossulariaceae | <i>Ribes nigrum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Hypericaceae    | <i>Hypericum perforatum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Lamiaceae       | <i>Mentha longifolia</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Salvia dumetorum</i> , <i>Ziziphora clinopodioides</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Liliaceae       | <i>Erythronium sibiricum</i> , <i>Fritillaria meleagris</i> , <i>Fritillaria verticillata</i> , <i>Lilium martagon</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Malvaceae       | <i>Althaea officinalis</i> , <i>Malva neglecta</i> , <i>Malva pusilla</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Продолжение таблицы Г.1

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Melanthiaceae    | <i>Paris quadrifolia, Veratrum lobelianum</i>                                                                                                                                                                                                                 |
| Menyanthaceae    | <i>Menyanthes trifoliata</i>                                                                                                                                                                                                                                  |
| Orchidaceae      | <i>Cypripedium calceolus, Gymnadenia conopsea</i>                                                                                                                                                                                                             |
| Orobanchaceae    | <i>Cymbaria daurica</i>                                                                                                                                                                                                                                       |
| Papaveraceae     | <i>Chelidonium majus</i>                                                                                                                                                                                                                                      |
| Pinaceae         | <i>Abies sibirica, Picea obovata, Pinus sylvestris</i>                                                                                                                                                                                                        |
| Plantaginaceae   | <i>Gratiola officinalis, Linaria vulgaris, Plantago lanceolata</i><br><i>Plantago major</i>                                                                                                                                                                   |
| Plumbaginaceae   | <i>Limonium gmelini</i>                                                                                                                                                                                                                                       |
| Polygonaceae     | <i>Bistorta vivipara, Persicaria amphibia, Polygonum aviculare, Rheum compactum, Rumex confertus, Rumex thyrsiflorus</i>                                                                                                                                      |
| Primulaceae      | <i>Primula veris</i>                                                                                                                                                                                                                                          |
| Ranunculaceae    | <i>Adonis vernalis, Delphinium dictyocarpum, Delphinium elatum</i><br><i>Thalictrum foetidum, Thalictrum minus</i>                                                                                                                                            |
| Rhamnaceae       | <i>Frangula alnus, Rhamnus cathartica</i>                                                                                                                                                                                                                     |
| Rosaceae         | <i>Crataegus sanguinea, Filipendula ulmaria, Filipendula vulgaris</i><br><i>Fragaria vesca, Geum geoides, Geum urbanum, Potentilla argentea, Rosa acicularis, Rosa alberti, Rosa laxa, Rubus idaeus, Sanguisorba officinalis</i><br><i>Sibiraea laevigata</i> |
| Salicaceae       | <i>Populus nigra, Populus tremula, Salix alba</i><br><i>Salix fragilis, Salix pentandra</i>                                                                                                                                                                   |
| Saxifragaceae    | <i>Bergenia crassifolia</i>                                                                                                                                                                                                                                   |
| Scrophulariaceae | <i>Verbascum thapsus</i>                                                                                                                                                                                                                                      |
| Solanaceae       | <i>Hyoscyamus niger, Solanum dulcamara, Solanum nigrum</i>                                                                                                                                                                                                    |
| Thymelaeaceae    | <i>Daphne altaica, Daphne mezereum</i>                                                                                                                                                                                                                        |
| Urticaceae       | <i>Urtica dioica</i>                                                                                                                                                                                                                                          |
| Viburnaceae      | <i>Sambucus sibirica, Viburnum opulus</i>                                                                                                                                                                                                                     |
| Violaceae        | <i>Viola tricolor</i>                                                                                                                                                                                                                                         |

Таблица Г.2 – Жетысуская область

| Род           | Вид                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amaranthaceae | <i>Anabasis aphylla, Salsola collina</i>                                                                                                                                                                                                 |
| Apiaceae      | <i>Carum carvi, Conium maculatum, Daucus carota, Ferula iliensis, Oenanthe aquatica, Peucedanum morisonii</i>                                                                                                                            |
| Asparagaceae  | <i>Convallaria majalis</i>                                                                                                                                                                                                               |
| Asteraceae    | <i>Achillea millefolium, Arctium lappa, Arctium tomentosum, Artemisia absinthium, Artemisia vulgaris, Bidens tripartite, Cichorium intybus, Helichrysum arenarium, Inula helenium, Leuzea carthamoides, Serratula coronata, Solidago</i> |

|  |                                                                                       |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <i>virgaurea</i><br><i>Tanacetum vulgare, Taraxacum officinale, Tussilago farfara</i> |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------|

Продолжение таблицы Г.2

|                 |                                                                                                                                                     |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Berberidaceae   | <i>Berberis integerrima</i>                                                                                                                         |
| Betulaceae      | <i>Betula pendula, Betula pubescens</i>                                                                                                             |
| Brassicaceae    | <i>Brassica juncea, Capsella bursa-pastoris, Erysimum cheiranthoides</i>                                                                            |
| Cannabaceae     | <i>Celtis caucasica, Humulus lupulus</i>                                                                                                            |
| Caprifoliaceae  | <i>Patrinia intermedia</i>                                                                                                                          |
| Caryophyllaceae | <i>Saponaria officinalis</i>                                                                                                                        |
| Crassulaceae    | <i>Rhodiola rosea</i>                                                                                                                               |
| Cucurbitaceae   | <i>Bryonia alba</i>                                                                                                                                 |
| Cupressaceae    | <i>Juniperus pseudosabina, Juniperus sabina</i>                                                                                                     |
| Dryopteridaceae | <i>Dryopteris filix-mas</i>                                                                                                                         |
| Ephedraceae     | <i>Ephedra equisetina, Ephedra intermedia</i>                                                                                                       |
| Equisetaceae    | <i>Equisetum arvense</i>                                                                                                                            |
| Euphorbiaceae   | <i>Euphorbia soongarica</i>                                                                                                                         |
| Fabaceae        | <i>Alhagi kirghisorum, Alhagi pseudalhagi, Glycyrrhiza uralensis, Medicago sativa, Melilotus officinalis, Ononis arvensis, Sphaerophysa salsula</i> |
| Fagaceae        | <i>Quercus robur</i>                                                                                                                                |
| Gentianaceae    | <i>Centaurium pulchellum, Gentianella turkestanorum</i>                                                                                             |
| Grossulariaceae | <i>Ribes nigrum</i>                                                                                                                                 |
| Hypericaceae    | <i>Hypericum perforatum</i>                                                                                                                         |
| Juglandaceae    | <i>Juglans regia</i>                                                                                                                                |
| Lamiaceae       | <i>Marrubium vulgare, Origanum vulgare, Salvia aethiopis, Salvia deserta, Salvia sclarea, Thymus serpyllum, Ziziphora clinopodioides</i>            |
| Liliaceae       | <i>Fritillaria verticillata</i>                                                                                                                     |
| Malvaceae       | <i>Althaea officinalis, Malva neglecta, Malva pusilla</i>                                                                                           |
| Oleaceae        | <i>Fraxinus sogdiana</i>                                                                                                                            |
| Papaveraceae    | <i>Chelidonium majus</i>                                                                                                                            |
| Pinaceae        | <i>Abies sibirica, Picea obovata, Pinus sylvestris</i>                                                                                              |
| Plantaginaceae  | <i>Linaria vulgaris, Plantago lanceolata, Plantago major</i>                                                                                        |
| Plumbaginaceae  | <i>Limonium gmelini</i>                                                                                                                             |
| Poaceae         | <i>Cynodon dactylon</i>                                                                                                                             |
| Polygonaceae    | <i>Bistorta vivipara, Polygonum aviculare, Rheum wittrockii, Rumex thyrsiflorus, Rumex tianschanicus</i>                                            |

|               |                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ranunculaceae | <i>Aconitum leucostomum</i> , <i>Aconitum soongaricum</i> , <i>Adonis vernalis</i><br><i>Delphinium dictyocarpum</i> , <i>Delphinium elatum</i> , <i>Thalictrum foetidum</i><br><i>Thalictrum minus</i> |
| Rhamnaceae    | <i>Frangula alnus</i> , <i>Rhamnus cathartica</i>                                                                                                                                                       |

Продолжение таблицы Г.2

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rosaceae         | <i>Crataegus sanguinea</i> , <i>Filipendula ulmaria</i> , <i>Fragaria vesca</i> , <i>Geum urbanum</i> ,<br><i>Malus domestica</i> , <i>Potentilla argentea</i> , <i>Rosa alberti</i> , <i>Rosa beggeriana</i> , <i>Rosa laxa</i><br><i>Rosa webbiana</i> , <i>Rubus idaeus</i> , <i>Sanguisorba officinalis</i> |
| Salicaceae       | <i>Populus nigra</i> , <i>Populus tremula</i> ,<br><i>Salix alba</i>                                                                                                                                                                                                                                            |
| Scrophulariaceae | <i>Verbascum thapsus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Solanaceae       | <i>Datura stramonium</i> , <i>Hyoscyamus niger</i> ,<br><i>Solanum dulcamara</i> , <i>Solanum nigrum</i>                                                                                                                                                                                                        |
| Tetradiclidaceae | <i>Peganum harmala</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Urticaceae       | <i>Urtica dioica</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Viburnaceae      | <i>Viburnum opulus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Vitaceae         | <i>Vitis vinifera</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Zygophyllaceae   | <i>Tribulus terrestris</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

Таблица Г.3 – Алматинская область

| Род             | Вид                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Apiaceae        | <i>Carum carvi</i> , <i>Conium maculatum</i> , <i>Daucus carota</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Asparagaceae    | <i>Convallaria majalis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Asteraceae      | <i>Achillea millefolium</i> , <i>Arctium lappa</i> , <i>Arctium tomentosum</i> , <i>Artemisia absinthium</i> ,<br><i>Artemisia vulgaris</i> , <i>Bidens tripartite</i> , <i>Centaurea cyanus</i> , <i>Cichorium intybus</i> ,<br><i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Inula helenium</i> , <i>Serratula coronata</i> , <i>Solidago virgaurea</i> ,<br><i>Tanacetum vulgare</i> , <i>Taraxacum officinale</i> , <i>Tussilago farfara</i> |
| Berberidaceae   | <i>Berberis integerrima</i> , <i>Gymnospermium altaicum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Betulaceae      | <i>Betula pendula</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Boraginaceae    | <i>Symphytum officinale</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Brassicaceae    | <i>Capsella bursa-pastoris</i> , <i>Erysimum croceum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Cannabaceae     | <i>Celtis caucasica</i> , <i>Humulus lupulus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Caprifoliaceae  | <i>Patrinia intermedia</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Caryophyllaceae | <i>Saponaria officinalis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Colchicaceae    | <i>Colchicum kesselringii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Crassulaceae    | <i>Phedimus hybridus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Cucurbitaceae   | <i>Bryonia alba</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Cupressaceae    | <i>Juniperus communis</i> , <i>Juniperus pseudosabina</i> , <i>Juniperus sabina</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Dryopteridaceae | <i>Dryopteris filix-mas</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|                 |                                                                                                                                                          |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ephedraceae     | <i>Ephedra equisetina, Ephedra intermedia</i>                                                                                                            |
| Fabaceae        | <i>Alhagi kirghisorum, Alhagi pseudalhagi, Glycyrrhiza glabra, Glycyrrhiza uralensis, Medicago sativa, Sphaerophysa salsula, Thermopsis alterniflora</i> |
| Gentianaceae    | <i>Gentianella turkestanorum</i>                                                                                                                         |
| Grossulariaceae | <i>Ribes nigrum</i>                                                                                                                                      |

Продолжение таблицы Г.3

|                  |                                                                                                                                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hypericaceae     | <i>Hypericum perforatum</i>                                                                                                                                                        |
| Iridaceae        | <i>Iris alberti</i>                                                                                                                                                                |
| Juglandaceae     | <i>Juglans regia</i>                                                                                                                                                               |
| Lamiaceae        | <i>Marrubium vulgare, Origanum vulgare, Salvia aethiopis, Salvia deserta, Salvia sclarea, Ziziphora clinopodioides</i>                                                             |
| Liliaceae        | <i>Fritillaria meleagris, Tulipa greigii</i>                                                                                                                                       |
| Limnephilidae    | <i>Micropterna muehleni</i>                                                                                                                                                        |
| Malvaceae        | <i>Althaea officinalis, Malva neglecta</i>                                                                                                                                         |
| Melanthiaceae    | <i>Veratrum lobelianum</i>                                                                                                                                                         |
| Moraceae         | <i>Morus nigra</i>                                                                                                                                                                 |
| Oleaceae         | <i>Fraxinus sogdiana</i>                                                                                                                                                           |
| Papaveraceae     | <i>Chelidonium majus</i>                                                                                                                                                           |
| Pinaceae         | <i>Pinus sylvestris</i>                                                                                                                                                            |
| Plantaginaceae   | <i>Linaria vulgaris, Plantago lanceolata, Plantago major</i>                                                                                                                       |
| Plumbaginaceae   | <i>Limonium gmelini</i>                                                                                                                                                            |
| Poaceae          | <i>Cynodon dactylon</i>                                                                                                                                                            |
| Polygonaceae     | <i>Bistorta vivipara, Polygonum aviculare, Rheum compactum, Rheum tataricum, Rheum wittrockii, Rumex marschallianus, Rumex tianschanicus</i>                                       |
| Ranunculaceae    | <i>Aconitum leucostomum, Aconitum soongaricum, Adonis chrysocytha, Thalictrum minus</i>                                                                                            |
| Rhamnaceae       | <i>Rhamnus cathartica</i>                                                                                                                                                          |
| Rosaceae         | <i>Filipendula ulmaria, Fragaria vesca, Geum urbanum, Malus domestica, Potentilla argentea, Rosa alberti, Rosa beggeriana, Rosa canina, Rosa laxa, Rosa webbiana, Rubus idaeus</i> |
| Salicaceae       | <i>Populus nigra, Populus tremula</i>                                                                                                                                              |
| Saxifragaceae    | <i>Bergenia crassifolia</i>                                                                                                                                                        |
| Scrophulariaceae | <i>Verbascum thapsus</i>                                                                                                                                                           |
| Solanaceae       | <i>Datura stramonium, Hyoscyamus niger, Solanum dulcamara, Solanum nigrum</i>                                                                                                      |
| Tetradiclidaceae | <i>Peganum harmala</i>                                                                                                                                                             |
| Thymelaeaceae    | <i>Daphne mezereum</i>                                                                                                                                                             |
| Urticaceae       | <i>Urtica dioica</i>                                                                                                                                                               |
| Verbenaceae      | <i>Verbena officinalis</i>                                                                                                                                                         |
| Viburnaceae      | <i>Viburnum opulus</i>                                                                                                                                                             |
| Violaceae        | <i>Viola odorata</i>                                                                                                                                                               |
| Vitaceae         | <i>Vitis vinifera</i>                                                                                                                                                              |

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| Zygophyllaceae | <i>Tribulus terrestris</i> |
|----------------|----------------------------|

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

### Список лекарственных растений, включенных в государственную фармакопею

#### Республики Казахстан

Таблица Д.1 – Лекарственные растения, включенные в государственную фармакопею Республики Казахстан

| Название на латинице                            | Названия и список растений                      |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>Althaeae radix</i>                           | алтея корни                                     |
|                                                 | <i>Althaea officinalis</i> L.                   |
|                                                 | <i>Althaea armeniaca</i> Ten.                   |
| <i>Ajania fruticulosa (Ledeb.) Poljak herba</i> | аяния кустарничковая                            |
|                                                 | <i>Ajania fruticulosa (Ledeb.) Poljak herba</i> |
|                                                 | <i>Ajania fruticulosa (Ledeb.) Poljak</i>       |
| <i>Betulae gemmae</i>                           | березы почки                                    |
|                                                 | <i>Betula pendula</i>                           |
|                                                 | <i>Betula pubescens</i>                         |
| <i>Crataegi fructus</i>                         | боярышника плоды                                |
|                                                 | <i>Crataegus monogyna</i> Jacq. (Lindm.)        |
|                                                 | <i>Crataegus laevigata</i> (Poir.) D.C.         |
|                                                 | <i>Crataegus oxyacantha</i> sensu Pojark.       |
|                                                 | <i>Crataegus nigra</i> Waldst                   |
|                                                 | <i>Crataegus pentagyna</i> Waldst               |
|                                                 | <i>Crataegus sanguinea</i> Pall.                |
|                                                 | <i>Crataegus korolkowii</i> L., Henry           |
|                                                 | <i>Crataegus altaica</i> (Lond.) Lange          |
|                                                 | <i>Crataegus chlorocarpa</i> Lenne et C. Koch   |
|                                                 | <i>Crataegus dahurica</i> Koehne ex Schneid.    |
|                                                 | <i>Crataegus monogyna</i> Jacq.                 |
|                                                 | <i>Crataegus germanica</i> Cin.                 |
|                                                 | <i>Crataegus pentagyna</i> Waldst. et Kit.      |
|                                                 | <i>Crataegus orientobaltica</i> Cin.            |
|                                                 | <i>Crataegus curvisepala</i> Lindm.             |
|                                                 | <i>Crataegus x curoica</i> Cin.                 |
|                                                 | <i>Crataegus x dunensis</i> Cin.                |
| <i>Valerianae radix</i>                         | валерианы корни                                 |
|                                                 | <i>Valeriana officinalis</i>                    |
| <i>Origanum herba</i>                           | душица                                          |
|                                                 | <i>Origanum onites</i>                          |
|                                                 | <i>Origanum vulgare</i>                         |
| <i>Hyperici herba</i>                           | зверобой                                        |

Продолжение таблицы Д.1

|                                              |                                       |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|
|                                              | Hypericum perforatum                  |
|                                              | Hypericum maculatum                   |
| <i>Calendulae flos</i>                       | календулы цветки                      |
|                                              | Calendula officinalis                 |
| <i>Limonium gmelinii rhizoma et radix</i>    | кермека гмелина корневища и корни     |
|                                              | Limonium gmelinii M.                  |
| <i>Tiliae flos</i>                           | липы цветки                           |
|                                              | Tilia cordata Miller                  |
|                                              | Tilia platyphyllos Scop.              |
|                                              | Tilia vulgaris Heyne                  |
|                                              | Tilia americana                       |
|                                              | Tilia tomentosa                       |
| <i>Euphorbia soongaricae Boss. herba</i>     | молочай джунгарский                   |
|                                              | Euphorbia soongarica Boss.            |
| <i>Menthae piperitae folium</i>              | МЯТЫ ЛИСТЬЯ                           |
|                                              | Mentha piperita L.                    |
| <i>Paeoniae anomalaе rhizoma et radix</i>    | пиона уклоняющегося корневища и корни |
|                                              | Paeoniae anomalaе                     |
| <i>Artemisia leucodes Schrenk herba</i>      | полынь беловатая                      |
|                                              | Artemisia leucodes Schrenk,           |
| <i>Artemisia glabella Kar. et Kir. herba</i> | полынь гладкая                        |
|                                              | Artemisia glabella Kar. et Kir.       |
| <i>Absinthii herba</i>                       | полынь горькая                        |
|                                              | Artemisia absinthium L.               |
|                                              | Artemisia leucodes Schrenk herba      |
|                                              | Artemisia glabella Kar. et Kir. Herba |
|                                              | Artemisia absinthium L.               |
| <i>Leonuri cardiacaе herba</i>               | пустырник                             |
|                                              | Leonurus cardiaca L.                  |
|                                              | Leonurus quinquelobatus Gilib.        |
| <i>Matricariae flos</i>                      | ромашки цветки                        |
|                                              | Matricaria recutito L.                |
| <i>Serratula coronata L. herba</i>           | серпуха венценосная                   |
|                                              | Serratula coronata L.                 |
| <i>Liquiritiae radix</i>                     | солодки корни                         |
|                                              | Glycyrrhiza glabra L.                 |
|                                              | Glycyrrhiza inflata Bat.              |
|                                              | Glycyrrhiza uralensis Fish.           |
| <i>Salsola collina Pall. herba</i>           | солянка холмовая                      |

Продолжение таблицы Д.1

|                             |                           |
|-----------------------------|---------------------------|
|                             | Salsola collina Pall.     |
| <i>Thymi herba</i>          | Тимьян                    |
|                             | Thymus vulgaris L.        |
|                             | Thymus zygis L.           |
|                             | Thymus serpyllum L.       |
| <i>Serpylli herba</i>       | Тимьян ползучий           |
|                             | Thymus serpyllum L.s.I.   |
| <i>Millefolii herba</i>     | Тысячелистник             |
|                             | Achillea millefolium L.   |
| <i>Chelidonii herba</i>     | Чистотел                  |
|                             | Chelidonium majus L.      |
| <i>Rosae pseudo-fructus</i> | Шиповника плоды           |
|                             | Rosa canina L.            |
|                             | Rosa corymbifera Borkh    |
|                             | Rosa micrantha Smith      |
|                             | Rosa rugosa Thunb         |
|                             | Rosa majalis Herrm        |
|                             | Rosa beggeriana Schrenk.  |
|                             | Rosa fedtschenkoana Regel |
|                             | Rosa acicularis Lindl.    |
|                             | Rosa davurica Pall.       |

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

### Нуклеотидная последовательность гена обратной транскриптазы после кодоноптоимизации

ATGCCCATTAGTCCTATTGAAACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGG  
CCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAATAAAAGCATTAACAGAA  
ATATGTACAGAAATGGAAAAAGAAGGAAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCC  
ATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGGAAAT  
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAAAGAACTCAAGATTTTTTGGGAGGTTCAATTAG  
GAATACCGCATCCTGCAGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTG  
GGGGATGCATATTTTTTCAGTCCCCTTAGATAAGGATTTTCAGGAAGTACACTGCATTC  
ACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGAATTAGGTACCAGTACAATGTGCT  
TCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGCAGCATGACAAAGATCT  
TAGAGCCTTTTAGAAAAACAAAATCCAGAGATAGTTATCTATCAATACATGGATGATT  
TGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAATTG  
AGAGAACATTTGTATAAAATGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGA  
ACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCC  
TATACAGTTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTGG  
GAAAATTAAATTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGGATTAAAGTAAAGCAATTATGT  
AAACTCCTTAGGGGAGCCAAGGCACTAACAGACGTAGTACCACTAACAGAAGAAGC  
AGAGCTAGAAGTGGCAGAAAACAGGGAAATTCTAAAAGAACCAGTACATGGAGTG  
TATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGGCAAGGCCA  
ATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAATATG  
CAAAAATGAGGAGTGCCACACCAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGTAGTGCAA  
AAAATAGCCACAGAAAGCATAGTGATATGGGGAAAGACTCCTAAGTTTAGACTACC  
CATACAAAAAGAGACATGGGAGACATGGTGGACAGAGTATTGGCAGGCTACCTGGA  
TTCCTGAATGGGAGTTTGTCAATACCCCCCTCTAGTAAAACTATGGTATCAGTTAG  
AAACAGAGCCCATAGTAGGAGCAGAAACCTTCTATGTAGATGGGGCAGCTAATAGA  
GAGACCAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTTACTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTG  
TTCCCTAACTGAGACCACAAATCAGAAGACTGAGTTACAGGCAATTCAGTTAGCTT  
TACAGGATTCAGGATCAGAAGTGAACATAGTAACAGACTCACAGTATGCATTAGGA  
ATCATTCAAGCACAAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAATAATAGA  
GCAATTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGTCATGGGTACCAGCACACAAAGGGA  
TTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTAGTCAGTTCTGGAATCAGAAAAGTACTG  
TGA