



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004101294/13, 31.05.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.05.2002(30) Конвенционный приоритет:  
20.06.2001 (пп.1-33) US 09/885,731

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2005

(45) Опубликовано: 10.08.2007 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO 0146467, 28.06.2001. US 5874555,  
23.02.1999. US 5176996 A, 05.01.1993. US  
6255469, 03.07.2001. Mol Biol (Mosk). 1992  
May-Jun; 26(3): 512-31. SU 1523053 A3,  
15.11.1989.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
20.01.2004(86) Заявка РСТ:  
IB 02/01972 (31.05.2002)(87) Публикация РСТ:  
WO 02/103051 (27.12.2002)Адрес для переписки:  
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО  
"Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву

(72) Автор(ы):

ЭРИКСОН Глен Х. (BS),  
ДЭКСИС Джэсмин И. (CA),  
КЭНДИК Айвена (CA),  
ПИКАР Пьер (CA)

(73) Патентообладатель(и):

ИНДЖИНИЕС ИНК. (BZ)

## (54) СПОСОБ СОЗДАНИЯ КВАДРУПЛЕКСА И СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии и может быть использовано для обнаружения последовательностей нуклеиновых кислот или аналогов нуклеиновых кислот. Предложен способ создания квадруплекса нуклеиновой кислоты из двух дуплексов Уотсона-Крика. Полученный квадруплекс нуклеиновой кислоты стабилизирован связыванием оснований по правилам Уотсона-Крика или по правилам гомологичного связывания оснований. Для обнаружения двухцепочечной нуклеиновой кислоты-мишени или аналога

нуклеиновой кислоты, имеющего последовательность-мишень, получают квадруплекс нуклеиновой кислоты, образованный двухцепочечным зондом и двухцепочечной нуклеиновой кислотой-мишенью или последовательностью-мишенью двухцепочечного аналога нуклеиновой кислоты в присутствии флуорофора и анализируют интенсивность испускаемой им флуоресценции. Применение изобретения позволяет провести эффективный анализ последовательностей нуклеиновых кислот или их аналогов. 3 н. и 30 з.п. ф-лы, 26 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/68* (2006.01)*C12N 15/11* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004101294/13, 31.05.2002**(24) Effective date for property rights: **31.05.2002**(30) Priority:  
**20.06.2001 (cl.1-33) US 09/885,731**(43) Application published: **27.02.2005**(45) Date of publication: **10.08.2007 Bull. 22**(85) Commencement of national phase: **20.01.2004**(86) PCT application:  
**IB 02/01972 (31.05.2002)**(87) PCT publication:  
**WO 02/103051 (27.12.2002)**Mail address:  
**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO  
"Sojuzpatent", pat.pov. A.P.Agureevu**(72) Inventor(s):  
**EhRIKSON Glen Kh. (BS),  
DEhKSIS Dzhehsmin I. (CA),  
KEhNDIK Ajvena (CA),  
PIKAR P'er (CA)**(73) Proprietor(s):  
**INDZhINIES INK. (BZ)****(54) METHOD FOR CONSTRUCTION OF QUADRUPLEX AND METHOD FOR DETECTION OF NUCLEIC ACID**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry, in particular detection of sequences of nucleic acid or analog thereof.

SUBSTANCE: disclosed is method for construction of nucleic acid quadruplex from two Watson-Creak duplex. Obtained nucleic acid quadruplex is stabilized with base bonding according to Watson-Creak rules or rules of base homological bonding. To detect target double-strand nucleic acid or nucleic acid analog having

target sequence nucleic acid quadruplex formed by double-strand probe and target double-strand nucleic acid or target sequence of double-strand nucleic acid analog in presence of fluorophore is obtained and emitted fluorescence intensity is analyzed.

EFFECT: effective analysis of sequences of nucleic acids or analog thereof.

33 cl, 12 ex, 26 dwg

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к области биотехнологии и, в частности, к мультиплексам нуклеиновых кислот и, более конкретно, к способам создания их в виде триплексов и квадруплексов и, кроме того, к применению их в анализах для обнаружения

5 специфических нуклеиновых кислот.

Уровень техники

Способность двух одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот с комплементарными последовательностями оснований связываться специфически друг с другом обеспечила

10 инструментов. Способность одноцепочечных молекул связываться с двухцепочечными мишенями и способность двухцепочечных молекул связываться с двухцепочечными мишенями была менее полно исследована, чем такая «общепринятая гибридизация».

Способность связываться с двухцепочечными мишенями потенциально имеет преимущества над общепринятой гибридизацией. Эти преимущества могут происходить

15 отчасти из того факта, что двухцепочечная мишень не должна быть денатурирована, что делает возможными «мягкие» условия гибридизации и обеспечение мишени, менее склонной к превращению в полностью случайную спираль. Эти преимущества могут происходить также из того факта, что механизм спаривания оснований будет, по меньшей мере, частично иным, чем в общепринятой гибридизации, обеспечивающим возможность

20 более предпочтительной кинетики и уменьшения количества зонда, необходимого в гибридизационной реакционной смеси.

Предыдущие исследования по созданию мультиплексов включали в себя:

1) образование триплексов как часть процесса гомологичной рекомбинации, процесса, опосредуемого бактериальным белком RecA и белками сходной функции в других

25 организмах;

2) создание 3-цепочечных структур во время гибридизации *in situ* (например, патент США US 5707801 Bresser et al.) и

3) 3-цепочечных или 4-цепочечных комплексов, в основе которых лежит связывание по типу Хугстина.

30 Эти предыдущие исследования не используют полностью потенциал образования мультиплексов. RecA-опосредуемый процесс требует присутствия белка. Способы гибридизации *in situ* основываются на принципе, что двухцепочечная внутриклеточная мишень будет локально открывать ее двухцепочечные структуры, обеспечивая одноцепочечную мишень, которая будет гибридизоваться в соответствии с общепринятыми

35 принципами гибридизации. Комплексы, о которых сообщалось, что они основываются на полимерах типа Хугстина, ограничиваются структурами, которые не являются истинными гетерополимерами. Скорее, они требуют, чтобы конкретная цепь была полипурином или полипиримидином, или очень близкой к ним цепью. См., например, Floris et al., "Effect of cations on purine-purine-pyrimidine triple helix formation in mixed-valence salt solutions," 260 Eur. J. Biochem. 801-809 (1999).

40 Как это было в случае с триплексными нуклеиновыми кислотами, обычный здравый смысл в отношении квадруплексных нуклеиновых кислот заключался в том, что такие своеобразные структуры существуют только при относительно чрезвычайных условиях для относительно узкого класса нуклеиновых кислот. В частности, Sen et al. (Nature 334:

45 364-366 (1988) сообщали, что обогащенные гуанином олигонуклеотиды могут самопроизвольно самособираются в четырехцепочечные спирали *in vitro*. Sen et al. (Biochemistry 31: 65-70) сообщали, что эти четырехцепочечные комплексы могут дополнительно ассоциироваться в суперструктуры, состоящие из 8, 12 или 16 олигомеров.

Marsh et al. (Biochemistry 33: 10718-10724 (1994) и Nucleic Acids Research 23: 695-

50 700 (1995) описали, что некоторые обогащенные гуанином олигонуклеотиды могут также собираться в сбалансированном, параллельном выстраивании с образованием длинных "G-проводов" ("G-wires"). Эти структуры более высокого порядка стабилизируются G-квартетами, которые состоят из четырех остатков гуанозина, расположенных в плоскости

и удерживаемых вместе спариваниями оснований по Хугстину. Согласно Sen et al. (Biochemistry 31: 65-70 (1992), по меньшей мере, три смежных остатка гуанина в этом олигомере являются критическими для образования этих структур более высокого порядка.

5 Было сделано предположение, что четырехцепочечные ДНК играют роль в различных биологических процессах, таких как ингибирование интегразы ВИЧ-1 (Mazumder et al., Biochemistry 35: 13762-13771 (1996), образование синапсиса (конъюгации хромосом) во время мейоза (Sen et al., Nature 334: 364-366 (1988) и поддержание теломер (Williamson et al., Cell 59: 871-880 (1989); Baran et al., Nucleic Acids Research 25: 297-303 (1997).

10 Кроме того, было сделано предположение, что регуляция образования обогащенных гуанином квадруплексов может быть ключом к регуляции таких биологических процессов. Например, патент США US 6017709, выданный Hardin et al., предполагает, что теломеразная активность может регулироваться лекарственными средствами, которые ингибируют образование квартетов гуанинов.

15 Патент США US 5888739, выданный Pitner et al., сообщает, что квадруплексы на основе G-квартетов могут быть использованы в анализе для обнаружения нуклеиновых кислот. После гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом структура G-квартета разворачивается или линеаризуется, увеличивая тем самым расстояние между донором и акцептором на различных частях структуры G-квартета, приводя к уменьшению их взаимодействия и детектируемому изменению в сигнале (например, флуоресценции), испускаемом из этой структуры.

20 Патент США US 5912332, выданный Agrawal et al., описывает способ для очистки синтетических олигонуклеотидов, в котором синтетические олигонуклеотиды гибридизуются специфически с желаемым полноразмерным олигонуклеотидом и одновременно образуют мультимерный агрегат, такой как квадруплексная ДНК. Затем этот мультимерный агрегат, содержащий олигонуклеотид, очищают с использованием гель-фильтрационных способов.

Несмотря на предыдущие исследования, полный потенциал квадруплексной нуклеиновой кислоты не был ни полностью оценен, ни полностью использован.

30 С проблемой выполнения экспериментов типа гибридизации с двухцепочечными мишенями связан способ их детектирования. На протяжении десятилетий для обнаружения и количественного определения нуклеиновых кислот использовали флуоресцентные красители. В их наиболее упрощенной форме анализы, основанные на интенсивности флуоресценции, обычно предусматривали контактирование мишени с флуорофор-содержащим зондом, удаление несвязавшихся зондов из связавшегося зонда и детектирование флуоресценции в промытой пробе. Гомогенные анализы улучшают такие основные анализы благодаря тому, что гомогенные анализы не требуют стадии промывания или обеспечения нежидкофазного носителя.

40 Например, патенты США US 5538848, Livak et al., и US 4220450, Maggio, описывают гомогенные анализы на основе флуоресценции нуклеотидных последовательностей с использованием олигонуклеотидных зондов в растворе. Однако эти патенты требуют применения гасящего агента в комбинации с репортерным агентом для различения между сигналами, генерируемыми гибридизованными зондами и негибридизованными зондами. Патент Livak et al. требует также применения ферментов в описанном в этом патенте способе. Гасящие агенты и ферменты увеличивают сложность и стоимость этих способов.

45 Патент США US 5332659, Kidwell, описывает способ обнаружения нуклеотидных последовательностей в растворе с использованием зондов, содержащих, по меньшей мере, две флуорофорные части молекул. Эти флуорофоры должны быть выбраны для электронного взаимодействия друг с другом при нахождении их в достаточной близости для варьирования зависимости от длины волны их спектров. Негибридизованные зонды являются гораздо более гибкими, чем зонды, гибридизованные с последовательностью-мишенью, и, следовательно, эти две флуорофорные части молекулы на каждом зонде должны быть с большей вероятностью близкими друг к другу, когда этот зонд является негибридизованным, чем в том случае, когда этот зонд является гибридизованным. Таким

образом, изменение в испускании длины волны, коррелируемой со свободным зондом, может быть подвергнуто мониторингу как указание количества свободного зонда в данной пробе.

Патент США US 5846729, Wu et al., также описывает гомогенные анализы на основе флуоресценции для обнаружения куклеиновых кислот.

Кроме вышеуказанных разработок, которые детектируют интенсивность флуоресценции, некоторые сообщали о преимуществах флуоресцентно-поляризационных анализов. Однако анализы на основе поляризации имеют существенные недостатки. Степень изменения поляризации как функции связывания может быть непредсказуемой, и интерпретация данных для согласования противоречивых данных с теоретическими ожиданиями может требовать большего напряжения, чем это желательно в аналитическом способе, в частности, когда этот способ должен быть автоматическим. Имеются также затруднения, возникающие из молекулярной массы молекул, подвижность которых оценивается во флуоресцентно-поляризационном анализе.

Данное изобретение, как будет видно, в различных вариантах использует преимущество свойств флуоресцентных молекул для целей обнаружения триплексов и квадруплексов.

Все цитируемые здесь ссылки включены в качестве ссылок в их полном объеме.

Сущность изобретения

Способы создания мультиплексов

В одном общем аспекте данное изобретение описывает способ создания мультиплекса нуклеиновых кислот, причем указанный способ предусматривает стадии:

1) создания смеси, содержащей воду, дуплекс Уотсона-Крика, достаточное число одноцепочечных молекул с последовательностью смешанных оснований для образования мультиплекса, который включает в себя дуплекс Уотсона-Крика, и акселераторный (катализирующий) агент, который увеличивает скорость или количество образования мультиплекса, причем указанный мультиплекс является триплексом или квадруплексом, где указанные одноцепочечная молекула или молекулы выбраны таким образом, что при нахождении в мультиплексе каждая из них является связанной со всеми другими цепями этого мультиплекса прикреплением по правилам спаривания оснований, причем эти правила являются либо правилами спаривания оснований Уотсона-Крика, либо правилами спаривания оснований гомологичного связывания; и

2) инкубирования указанной смеси для позволения образования этого мультиплекса, причем каждая цепь указанного мультиплекса связана со всеми другими цепями этого мультиплекса прикреплением в соответствии с правилами спаривания оснований;

при условии, что в этом мультиплексе дуплекс Уотсона-Крика, добавляемый на стадии (1), является гетерополимерным с содержанием G-C от 10% до 90%.

В одном конкретном аспекте этого способа созданный мультиплекс является триплексом, на стадии (1) достаточным числом одноцепочечных молекул является 1, а на стадии (2) образуется этот триплекс. В конкретном варианте этого способа в триплексе эта одноцепочечная молекула связана с одной цепью дуплекса по правилам спаривания оснований Уотсона-Крика, а со второй цепью этого дуплекса - по правилам спаривания оснований гомологичного связывания. В следующем конкретном варианте этот дуплекс, по существу, сохраняет его двухспиральную структуру, а одноцепочечная молекула находится в бороздке этой двухспиральной структуры. Все такие триплексы также являются аспектами данного изобретения.

В другом конкретном аспекте этого способа созданный мультиплекс является квадруплексом, на стадии (1) дуплекс Уотсона-Крика является первым дуплексом Уотсона-Крика и на стадии (1) достаточным числом одноцепочечных молекул является 2, указанные одноцепочечные молекулы находятся во втором дуплексе Уотсона-Крика, а на стадии (2) квадруплекс образуется из указанных первого и второго дуплексов. Предпочтительно, стадию (1) выполняют с двумя одноцепочечными молекулами уже во втором дуплексе Уотсона-Крика.

Способы обнаружения триплекса

Способ создания триплекса может быть адаптирован таким образом, что он является способом для обнаружения триплекса, добавлением дополнительной стадии (3), на которой детектируют этот триплекс.

Способы обнаружения квадруплекса

5 Способ создания квадруплекса может быть адаптирован таким образом, что он является способом для обнаружения квадруплекса, добавлением дополнительной стадии (3), на которой детектируют этот квадруплекс.

Триплекс

10 В другом общем аспекте данное изобретение описывает триплекс (триплексный комплекс), содержащий одноцепочечный зонд, связанный с двухцепочечной нуклеиновой кислотой-мишенью, где указанный зонд содержит гетерополимерную нуклеиновую кислоту или аналог гетерополимерной нуклеиновой кислоты, и все триплеты оснований указанного триплекса являются членами, выбранными из группы, состоящей из А-Т-А, Т-А-Т, У-А-Т, Т-А-У, А-У-А, У-А-У, G-C-G и C-G-C.

15 Квадруплекс

В другом аспекте данное изобретение описывает мультиплексную структуру, которая является квадруплексом, причем квадруплекс содержит:

первую цепь, содержащую первую последовательность нуклеосоединений;  
 вторую цепь, содержащую вторую последовательность нуклеосоединений, где указанная  
 20 вторая цепь связана с указанной первой цепью образованием связи по Уотсону-Крику;  
 третью цепь, содержащую третью последовательность нуклеосоединений; и  
 четвертую цепь, содержащую четвертую последовательность нуклеосоединений, причем  
 указанная четвертая цепь связана с указанной второй цепью и указанной третьей цепью  
 образованием связей по Уотсону-Крику.

25 Описание чертежей

Далее данное изобретение будет описано вместе со следующими фигурами, в которых одинаковые ссылочные цифры (позиции) обозначают одинаковые элементы и в которых:

фиг. 1, 2А и 2В показывают интенсивность флуоресценции как функцию температуры, содержания GC и степени правильного спаривания пар оснований,  
 30 фиг. 3, 4, 5А, 5В, 5С и 5D показывают интенсивность флуоресценции как функцию длины волны, степени правильного спаривания пар оснований и катиона,  
 фиг. 6А, 6В и 6С показывают интенсивность флуоресценции как функцию протокола обработки лазером и катиона,  
 фиг. 7А, 7В, 7С, 8А, 8В, 9А, 9В, 9С и 10 показывают, в отношении квадруплексов,  
 35 интенсивность флуоресценции как функцию степени правильного спаривания пар оснований и катиона,  
 фиг. 11 показывает интенсивность флуоресценции как функцию степени правильного спаривания пар оснований в растворе, содержащем этанол,  
 фиг. 12А, 12В, 12С и 12D показывают интенсивность флуоресценции как функцию длины  
 40 волны для полного и неполного спаривания пар оснований в комплексах дцДНК:оцДГК, в присутствии катионного интеркалятора ДНК YOYO-1.

Подробное раскрытие изобретения

Определения

45 Однобуквенные коды для оснований, которые образуют часть их соответствующих нуклеотидов, являются: А: аденин; Т: тимин; G: гуанин; U: урацил. Эти буквы используются также для представления их соответствующих нуклеотидов.

G-C-содержание дуплекса равно 100, умноженному на число G-C-пар оснований, деленному на сумму: число G-C-пар оснований плюс число А-Т-пар оснований и выраженному в виде процента (например, 20%).

50 Акселераторным агентом в данном контексте является агент, который «увеличивает скорость или количество указанного образования триплекса или квадруплекса». Скорость может быть получена выполнением всего лишь двух измерений, выполняемых в разных временных точках. Количества означают число образованных триплексов или

квадруплексов.

Термин «акселераторный агент» используется взаимозаменяемо с терминами «промотор» и «промоторный агент», за исключением случаев, в которых промотором называют промотор гена.

5 Термины «нуклеиновая кислота», «триплекс», «квадруплекс» и т.п. относятся к молекулам, которые содержат ДНК, РНК и их аналоги, способные образовывать сходные структуры, такие как дуплексы Уотсона-Крика, и триплексы и квадруплексы, образуемые здесь.

"Нуклеососнование" относится к основаниям А, U, G, C, T и их аналогам, которые могут подчиняться правилам спаривания оснований Уотсона-Крика.

Аналогами А, U, G, C и T являются аналоги, которые могут подчиняться правилам спаривания оснований Уотсона-Крика.

Дуплекс Уотсона-Крика является 2-цепочечной молекулой или молекулярным сегментом, в которых две цепи являются антипараллельными, причем их 5'→3'-  
15 направления являются противоположными. Общая структура этого дуплекса является структурой двойной спирали. Цепи удерживаются вместе водородными связями и гидрофобными взаимодействиями. Имеется комплементарность пар оснований, А спаривается с Т двумя водородными связями (или, в случае РНК, А спаривается с U), а G спаривается с С тремя водородными связями. В результате правилами спаривания  
20 оснований являются: А спаривается с Т, А спаривается с U, а G спаривается с С.

3-цепочечная молекула нуклеиновой кислоты необязательно является триплексом, и необязательным является то, что любой сегмент 3-цепочечной молекулы является триплексом. Возможным является то, что ни в одном районе в пределах любой цепи нет такой ситуации, что эта цепь связана с более, чем одной другой цепью. Простым  
25 примером будет Y-образная молекула, где цепи 1 и 2 образуют стебель, цепи 1 и 3 образуют левое верхнее ответвление, цепь 2 образует одноцепочечное правое верхнее ответвление. Примером триплекса является 3-цепочечная молекула или молекулярный сегмент нуклеиновой кислоты, в которых одна цепь (произвольно названная цепью 1) подчиняется правилам спаривания оснований Уотсона-Крика (А-Т, А-U и G-Т) как с цепью  
30 2, так и с цепью 3. Цепи 1 и 2 образуют структуру, которая является дуплексом Уотсона-Крика или близка к дуплексу Уотсона-Крика. Цепь 3 находится в большой бороздке этого дуплекса. Примером такого триплекса является триплекс, выясненный в статье V.B.Zhurkin et al., J. Mol. Biol, (1994) vol.239, 181-200 (см., в частности, фиг.2 этой ссылки), включенной здесь в качестве ссылки. Как часть стабилизации такого  
35 триплекса цепь 3 связана с двумя другими цепями согласно правилам спаривания оснований следующим образом:

А на цепи 3 спарен как с А на цепи 1, так и с Т на цепи 2;

Г на цепи 3 спарен как с G на цепи 1, так и с С на цепи 2;

С на цепи 3 спарен как с С на цепи 1, так и с G на цепи 2; и

40 Т на цепи 3 спарен как с Т на цепи 1, так и с А на цепи 2.

Эти правила спаривания оснований удовлетворяются независимо от того, какой вариант (С или С+ или С', Т или Т') модели Zhurkin рассматривается.

Термин «правила спаривания оснований» относится к правилам, которые определяют специфичность между одной молекулой нуклеиновой кислоты и другой молекулой  
45 нуклеиновой кислоты, когда эти две молекулы связываются друг с другом специфически. Примерами являются правила спаривания оснований Уотсона-Крика (G-C и А-Т или А-U) и правила спаривания оснований гомологичного связывания (А-А, Т-Т, G-G, С-С, U-U).

«Деконденсация» дуплекса определяется как увеличение общей длины спирального повтора. Например, В-конформация дуплекса имеет общую длину спирального повтора 10  
50 пар оснований; деконденсация 106° приводит к тому, что длина этого повтора составляет 13 пар оснований.

ПНК обозначает полиамидные аналоги ДНК и РНК (см., например, патент США US 5539082, Nielsen et al.).

Конкретные варианты и альтернативные формулировки данного изобретения

Изобретения, описанные в разделе «Сущность изобретения», имеют конкретные варианты и предпочтительные, представляющие интерес варианты. Эти варианты описаны во всей этой заявке. Однако для удобства многие из них суммируются в данном разделе.

5 Подобным образом изобретения, описанные в разделе «Сущность изобретения», могут быть сформулированы альтернативным образом, выражающим некоторую вариацию данного изобретения, но с сохранением существенного совпадения в отношении существа изобретения. Такие альтернативные формулировки данного изобретения также включены в этот раздел.

10 (А) Способы получения мультиплексов

Способы образования триплекса или квадруплекса, описанные в общем виде в разделе «Сущность изобретения», могут необязательно выполняться включением одного или нескольких дополнений в данный способ:

15 в случае мультиплекса дуплекс Уотсона-Крика, добавляемый на стадии (1), является гетерополимерным с содержанием G-C между 25% и 75%;

в случае мультиплекса дуплекс Уотсона-Крика, добавляемый на стадии (1), является гетерополимерным с содержанием G-C между 10% и 90%, и, кроме того, объединенные частоты встречаемости в нем димеров пурин-пиримидин и пиримидин-пурин превышают 25% (димеры идентифицируют, начиная с 5'-конца этой последовательности и с

20 продвижением на одно основание каждый раз в течение времени, пока не достигается 3'-конец; например, последовательность 5'-AAAGGGT имеет один димер пурин-пиримидин и не имеет димеров пиримидин-пурин - их объединенные частоты встречаемости равны 1/6; выполнение стадий (1) и/или (2) с цепями нуклеиновых кислот и/или дуплексами не в

25 выполнении стадии (2) без применения белка (такого, как *recA* или белок сходной функции);

на стадии (1) добавление воды таким образом, что она составляет, на основе объема, по меньшей мере, 50% конечного объема этой смеси (более предпочтительно, по меньшей мере, 80% конечной смеси, наиболее предпочтительно на стадии (1) вода является

30 единственной жидкостью, добавляемой к этой смеси);

на стадии (1) отсутствие добавления какого-либо белка;

выполнение стадии (2) при температуре или при температурах, более высоких, чем температура заморозания этого водного раствора, или не более высоких, чем 85°C (более предпочтительно между 5°C и 30°C, наиболее предпочтительно между 15°C и 25°C);

35 на стадии (1) добавление аниона или, более предпочтительно, катиона в качестве акселераторного агента (одновалентного, двухвалентного или поливалентного; например, катиона металла или катионного пептида);

где указанный катион является, по меньшей мере, одним членом, выбранным из группы, состоящей из катионов щелочных металлов, катионов щелочно-земельных металлов,

40 катионов переходных металлов,  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ , трехвалентного спермидина и четырехвалентного спермина;

где указанный катион является  $\text{Na}^+$ , обеспечиваемым в концентрации 50 мМ - 125 мМ;

45 где указанный катион выбран из группы, состоящей из  $\text{Mn}^{+2}$ , обеспечиваемого в концентрации 10 мМ - 45 мМ, и  $\text{Mg}^{+2}$ , обеспечиваемого в концентрации 10 мМ - 45 мМ, и  $\text{Ni}^{+2}$ , обеспечиваемого в концентрации 20 мМ;

на стадии (1) добавление интеркалятора в качестве акселераторного агента (в частности, флуоресцентного интеркалятора; предпочтительно бис-интеркалятора);

50 на стадии (1) указанный акселераторный агент является интеркалирующимся флуорофором, выбранным из группы, состоящей из YOYO-1, TOTO-1, YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, димеров цианина, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO-PRO-1, мономеров цианина, бромида этидия, гомодимера-1 этидия,

гомодимера-2 этидия, производных этидия, акридина, акридинового оранжевого, производных акридина, гетродимера этидий-акридин, моноазида этидия, иодида пропидия, красителей SYTO, SYBR Зеленого 1, красителей SYBR, Pico Зеленого, красителей SYTOX и 7-аминоактиномицина D;

- 5 на стадии (1) указанный акселераторный агент является неинтеркалирующимся флуорофором (в частности, выбранным из группы, состоящей из биотина, родамина, красителей Alexa, красителей BODIPY, конъюгатов биотина, тиол-реактивных зондов, флуоресцеина и производных (в том числе "заключенных" зондов), Орегонового Зеленого, Родаминового Зеленого, красителей QSY), и указанная интенсивность обратно
- 10 коррелирует с образованием триплекса или квадруплекса;  
 на стадии (1) указанный акселераторный агент прикреплен, по меньшей мере к одной из указанной первой цепи, указанной второй цепи, указанной третьей цепи и указанной четвертой цепи;  
 на стадии (1) добавление акселераторного агента, который является интеркалятором,
- 15 который связывается с малой бороздкой дуплекса Уотсона-Крика (или, по меньшей мере, одного из двух дуплексов Уотсона-Крика);  
 на стадии (1) добавление акселераторного агента (в частности, органической жидкости, растворимой в воде, такой как диметилформамид, этанол и глицерин), который при 25°C является жидкостью;
- 20 на стадии (1) добавление более чем одного акселераторного агента;  
 на стадии (1) добавление акселераторного агента, который является агентом конденсации или деконденсации в отношении дуплекса Уотсона-Крика;  
 на стадии 1 добавление акселераторного агента, который является аналогом А, Т, У, С или G;
- 25 на стадии (1) добавление акселераторного агента, выбранного из группы, состоящей из пектинов и полисахаридов;  
 на стадиях (1) и (2), забуферивание этой смеси с рН приблизительно 5 - приблизительно 9;  
 один цитозин, по меньшей мере, в одном триплексе оснований C-G-C или G-C-G является
- 30 положительно заряженным;  
 один цитозин в каждом триплексе оснований C-G-C или G-C-G является положительно заряженным;  
 на стадии (2) время инкубации равно не более, чем приблизительно 2 часам (более предпочтительно не более, чем одному часу; и в пределах любых временных рамок,
- 35 образовывались предпочтительно, по меньшей мере, 25%, более предпочтительно, по меньшей мере, 50% из возможных мультиплексов);  
 указанный, по меньшей мере, один акселераторный агент является связывающей нуклеиновую кислоту малой бороздки молекулой, которая связывается неинтеркалирующимся образом и связывается с константной ассоциацией, по меньшей
- 40 мере,  $10^3 \text{ M}^{-1}$ ;  
 где этот мультиплекс является частью электрической цепи. (Альтернативно данное изобретение является электрической цепью, содержащей мультиплексную структуру.)  
 Специалисту с обычной квалификацией в данной области будет понятно, что предыдущие специфические условия применимы также к следующему способу получения
- 45 квадруплекса.  
 В альтернативно сформулированной версии способ образования квадруплекса предусматривает:  
 (1) обеспечение гибридационной среды, содержащей первую цепь, вторую цепь, третью цепь и четвертую цепь, воду, буфер и, по меньшей мере, один акселераторный
- 50 агент; и  
 (2) инкубирование указанной гибридационной среды в течение времени инкубации, эффективного для гибридизации указанной второй цепи с указанной четвертой цепью для получения указанной мультиплексной структуры, где указанная мультиплексная структура

содержит:

первую цепь, содержащую первую последовательность нуклеоснований;  
вторую цепь, содержащую вторую последовательность нуклеоснований, где указанная  
вторая цепь связана с указанной первой цепью образованием связи Уотсона-Крика;

- 5 третью цепь, содержащую третью последовательность нуклеоснований; и  
четвертую цепь, содержащую четвертую последовательность нуклеоснований, причем  
указанная четвертая цепь связана с указанной второй цепью и указанной третьей цепью  
образованием связей Уотсона-Крика.

- В конкретных вариантах способов образования квадруплекса ниже следующее  
10 применимо отдельно или в комбинации (в описаниях, которые следуют далее,  
используется терминология способа получения квадруплекса, который указывает 4  
отдельные цепи, но они также применимы к способу, который указывает дуплекс Уотсона-  
Крика в качестве одного или двух исходных материалов):

- по меньшей мере, одна из указанной первой цепи и указанной второй цепи  
15 дополнительно содержит фармацевтический агент, и гибридизация указанной второй цепи  
с указанной четвертой цепью помещает указанный фармацевтический агент на  
эффективное расстояние от мишени на указанной третьей цепи, указанной четвертой цепи  
или другой молекулы, связанной, по меньшей мере, с одной из указанной третьей цепи и  
указанной четвертой цепи;

- 20 указанный фармацевтический агент является членом, выбранным из группы, состоящей  
из нуклеиновых кислот, сконструированных для связывания генных промоторных  
последовательностей клинически важных генов, нуклеиновых кислот, сконструированных  
для связывания клинически важных генов, и нуклеиновых кислот, сконструированных для  
связывания сайтов инициации репликации патогенов;

- 25 указанная третья цепь и указанная четвертая цепь обеспечиваются в указанной  
гибридизационной среде перед указанной первой цепью и указанной второй цепью, и  
указанная первая цепь и указанная вторая цепь обеспечиваются в дегидратированной  
форме перед повторной гидратацией посредством контакта с указанной гибридизационной  
средой;

- 30 по меньшей мере, одна из указанной первой цепи и указанной второй цепи ковалентно  
помечена неинтеркалирующимся флуорофором, и указанная интенсивность обратно  
коррелирует с указанной аффинностью связывания;

- по меньшей мере, один акселераторный агент является интеркалирующимся  
флуорофором, и флуоресцентная интенсивность тест-среды, содержащей указанную  
35 мультиплексную структуру, прямо коррелирует с аффинностью связывания указанной  
второй цепи в отношении указанной четвертой цепи;

гибридизацию указанной второй цепи с указанной четвертой цепью детектируют как  
изменение во флуоресцентном, хемилюминесцентном, электрохемилюминесцентном или  
электрическом сигнале;

- 40 интенсивность указанного сигнала коррелирует с аффинностью связывания между  
указанной второй цепью и указанной четвертой цепью;

гибридизация указанной второй цепи с указанной четвертой цепью инактивирует  
активность, связанную, по меньшей мере, с одной из указанной третьей цепи или  
указанной четвертой цепи.

- 45 (В) Способы обнаружения триплексов

Способы обнаружения триплекса, описанные в общем виде в разделе «Сущность  
изобретения», могут необязательно выполняться включением одного или нескольких из  
следующих дополнений в данный способ:

- проведение этого способа в виде гомогенного анализа, так что во время или до стадии  
50 (3) одноцепочечные молекулы, которые не являются частью триплекса, не помещают в  
сосуд или контейнер, отдельные от сосуда или контейнера, содержащего триплекс;

использование способа детектирования для различения (дискриминации) между точным  
спариванием по правилам спаривания оснований, ошибочным спариванием (или делеций)

одного основания и ошибочным спариванием (или делецией) двух оснований, между дуплексом и одноцепочечной молекулой в этом триплексе (этот способ предпочтительно предусматривает калибровку способа с использованием молекул, содержащих известные ошибочные спаривания оснований);

5 использование степени связывания интеркалятора (например, показанной увеличенной флуоресценцией) в качестве указания на образование триплекса;

длина волны, при которой указанный интеркалирующий флуорофор флуоресцирует, смещается ко второй длине волны после интеркаляции, причем разность между указанной длиной волны и указанной второй длиной волны показывает, является ли комплекс между 10 указанным зондом и указанной мишенью дуплексом или триплексом и является ли указанная мишень ДНК или РНК;

этот зонд является ковалентно меченным неинтеркалирующимся флуорофором и указанная интенсивность обратно коррелирует с указанной аффинностью связывания (в частности, когда указанный неинтеркалирующий флуорофор является членом, 15 выбранным из группы, состоящей из биотина, родамина и флуоресцеина);

использование меченой флуорофором одноцепочечной молекулы в качестве одноцепочечной молекулы;

этот способ является гомогенным анализом, проводимым без обеспечения гасящего сигнал агента на указанной последовательности-мишени (т.е., в дуплексе) или на 20 указанном зонде (т.е., одноцепочечной молекуле) и/или без предварительной денатурации указанной последовательности-мишени, и/или без ПЦР-амплификации указанной последовательности-мишени;

указанный способ является гомогенным анализом, проводимым без обеспечения гасящего сигнал агента на указанной последовательности-мишени или на указанном зонде;

25 зонд имеет частично заряженный или незаряженный скелет молекулы;

зонд содержит ПНК-последовательность и/или является оцПИК, полученной параллельным синтезом;

зонд и указанная последовательность-мишень имеют одинаковую длину;

зонд имеет длину 5-30 нуклеотидов;

30 возбуждающее флуоресценцию излучение испускается из аргонового ионного лазера (лазера на ионизированном аргоне) при длине волны от приблизительно 200 нм до приблизительно 1000 нм;

тест-проба имеет объем приблизительно 20 микролитров, содержащий приблизительно 10 фемтомоль последовательности-мишени и приблизительно 10 фемтомоль зонда;

35 концентрация последовательности-мишени в указанной пробе равна не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  С;

концентрация зонда в этой пробе равна не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  С;

этот способ проводят на биочипе;

40 интеркалирующий флуорофор добавляют к среде в форме, не содержащей указанного зонда и не содержащей указанной последовательности-мишени;

интеркалирующий флуорофор является членом, выбранным из группы, состоящей из УОУО-1, ТОТО-1, бромид атидия, гомодимера-1 этидия, гомодимера-2 этидия и акридина.

В альтернативно сформулированном аспекте данное изобретение является способом детектирования, предусматривающим:

45 обеспечение двухцепочечной нуклеиновой кислоты-мишени или аналога нуклеиновой кислоты, содержащего последовательность-мишень, где указанная последовательность-мишень содержит, по меньшей мере, одно пуриновое основание и, по меньшей мере, одно пиримидиновое основание;

50 обеспечение зонда, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность аналога нуклеиновой кислоты;

обеспечение акселераторного агента;

добавление указанного зонда, указанной последовательности-мишени и указанного акселераторного агента к среде для обеспечения тест-пробы, содержащей триплексный

комплекс, содержащий указанный зонд, связанный с указанной последовательностью-мишенью, где все триплеты оснований указанного комплекса являются членами, выбранными из группы, состоящей из А-Т-А, Т-А-Т, U-A-T, Т-А-U, А-U-А, U-A-U, G-C-G и C-G-C;

5 облучение указанной тест-пробы возбуждающим излучением для индуцирования испускания флуоресцентного излучения этой тест-пробой;

детектирование интенсивности указанного флуоресцентного излучения, где указанная интенсивность коррелирует с аффинностью связывания между указанным зондом и указанной последовательностью-мишенью; и

10 определение из указанной интенсивности степени спаривания между указанным зондом и указанной последовательностью-мишенью.

В другом альтернативно сформулированном родственном аспекте этот способ предусматривает:

15 обеспечение нуклеиновой кислоты-мишени или аналога нуклеиновой кислоты, имеющего последовательность-мишень, где указанная последовательность-мишень содержит, по меньшей мере, одно пуриновое основание и, по меньшей мере, одно пиримидиновое основание;

обеспечение двухцепочечного зонда, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность аналога нуклеиновой кислоты;

20 обеспечение акселераторного агента гибридизации;

добавление указанного зонда, указанной мишени и указанного акселераторного агента гибридизации к среде для обеспечения тест-пробы, содержащей триплекс Уотсона-Крика, содержащий указанный зонд, связанный с указанной последовательностью-мишенью;

25 облучение указанной тест-пробы возбуждающим излучением для индуцирования испускания флуоресцентного излучения этой тест-пробой;

детектирование интенсивности указанного флуоресцентного излучения, где указанная интенсивность коррелирует с аффинностью связывания между указанным зондом и указанной последовательностью-мишенью; и

30 определение из указанной интенсивности степени спаривания между указанным зондом и указанной последовательностью-мишенью,

где указанный способ является гомогенным анализом, проводимым без обеспечения гасящего сигнал агента на указанной последовательности-мишени или на указанном зонде.

#### (С) Способы обнаружения квадруплексов

35 Способы обнаружения квадруплекса, описанные в общем виде в разделе «Сущность изобретения», могут необязательно выполняться включением одного или нескольких из следующих дополнений в данный способ:

40 проведение этого способа в виде гомогенного анализа, так что во время или до стадии (3) молекулы нуклеиновых кислот, которые не являются частью квадруплекса, не помещают в сосуд или контейнер, отдельные от сосуда или контейнера, содержащего триплекс;

этот способ является гомогенным анализом, проводимым без обеспечения гасящего сигнал агента на указанной последовательности-мишени или на указанном зонде (т.е. втором дуплексе Уотсона-Крика) и/или без предварительной денатурации указанной последовательности-мишени, и/или без ПЦР-амплификации указанной

45 последовательности-мишени;

использование способа детектирования для различения (дискриминации) между точным спариванием по правилам спаривания оснований, ошибочным спариванием (или делецией) одного основания и ошибочным спариванием (или делецией) двух оснований, между первым и вторым дуплексами Уотсона-Крика (предпочтительно с калибровкой этого

50 способа с использованием молекул, содержащих известные ошибочные спаривания оснований);

использование степени связывания интеркалятора в качестве указания на образование квадруплекса (в частности, с использованием флуоресцентного интеркалятора и с

использованием увеличенной флуоресценции в качестве индикатора);

интеркалирующийся флуорофор добавляют к среде в форме, не содержащей указанного зонда и не содержащей указанной последовательности-мишени;

интеркалирующийся флуорофор является членом, выбранным из группы, состоящей из  
 5 YOYO-1, TOTO-1, бромида этидия, гомодимера-1 этидия, гомодимера-2 этидия и акридина;  
 длина волны, при которой указанный интеркалирующийся флуорофор флуоресцирует,  
 смещается ко второй длине волны после интеркаляции, причем разность между указанной  
 длиной волны и указанной второй длиной волны показывает, является ли комплекс между  
 10 указанным зондом и указанной мишенью дуплексом или триплексом и является ли

этот зонд является ковалентно меченым неинтеркалирующимся флуорофором и  
 указанная интенсивность обратно коррелирует с указанной аффинностью связывания (в  
 частности, когда указанный неинтеркалирующийся флуорофор является членом,  
 выбранным из группы, состоящей из биотина, родамина и флуоресцеина);

15 использование меченой флуорофором одноцепочечной молекулы для части второго  
 дуплекса Уотсона-Крика;

способ дополнительно предусматривает количественное определение аффинности  
 связывания;

зонд имеет частично заряженный или незаряженный скелет молекулы;

20 зонд содержит ПНК-последовательность и/или является оцПНК, полученной  
 параллельным синтезом;

зонд и указанная последовательность-мишень имеют одинаковую длину;

зонд имеет длину 5-30 нуклеотидов (или пар оснований);

25 возбуждающее флуоресценцию излучение испускается из аргонового ионного лазера  
 при длине волны от приблизительно 200 нм до приблизительно 1000 нм;

тест-проба имеет объем приблизительно 20 микролитров, содержащий приблизительно  
 10 фемтомоль последовательности-мишени и приблизительно 10 фемтомоль зонда;

концентрация последовательности-мишени в указанной пробе равна не более,

чем  $5 \times 10^{-10}$  С;

30 концентрация зонда в этой пробе равна не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  С;

отношение указанной первой цепи и указанной второй цепи к указанной третьей цепи и  
 указанной четвертой цепи равно приблизительно 10:1;

концентрации каждой из указанной первой цепи, указанной второй цепи, указанной  
 35 третьей цепи и указанной четвертой цепи равны не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  М;

способ проводят на биочипе.

В альтернативно сформулированном родственном аспекте этот способ  
 предусматривает:

40 обеспечение нуклеиновой кислоты-мишени или аналога нуклеиновой кислоты,  
 имеющего последовательность-мишень, где указанная последовательность-мишень  
 содержит, по меньшей мере, одно пуриновое основание и, по меньшей мере, одно  
 пиримидиновое основание;

обеспечение двухцепочечного зонда, содержащего последовательность нуклеиновой  
 кислоты или последовательность аналога нуклеиновой кислоты;

45 обеспечение акселераторного агента гибридизации;

добавление указанного зонда, указанной мишени и указанного акселераторного агента  
 гибридизации к среде для обеспечения тест-пробы, содержащей квадруплекс Уотсона-  
 Крика, содержащий указанный зонд, связанный с указанной последовательностью-  
 мишенью;

50 облучение указанной тест-пробы возбуждающим излучением для индуцирования  
 испускания флуоресцентного излучения этой тест-пробой;

детектирование интенсивности указанного флуоресцентного излучения, где указанная  
 интенсивность коррелирует с аффинностью связывания между указанным зондом и  
 указанной последовательностью-мишенью; и

определение из указанной интенсивности степени спаривания между указанным зондом и указанной последовательностью-мишенью,

причем указанный способ является гомогенным анализом, проводимым без обеспечения гасящего сигнала агента на указанной последовательности-мишени или на указанном зонде.

5 (D) Триплексы

Триплекс, описанный в общем виде в разделе «Сущность изобретения», может необязательно иметь один или более из следующих признаков:

каждая цепь является гетерополимерной с содержанием G-C между 25% и 75%;

10 каждая цепь является гетерополимерной с содержанием G-C между 10% и 90% и, кроме того, объединенные частоты встречаемости в ней димеров пурин-пиримидин и димеров пиримидин-пурин превышают 25%;

он находится не в клетке (и не в вирусе);

он является стабильным при pH, большем, чем 7,6 (но меньшем, чем pH 9);

15 он находится в среде при pH, большем, чем 7,6 (и предпочтительно меньшем, чем pH 9); одноцепочечная нуклеиновая кислота или аналог нуклеиновой кислоты имеет длину 5-30

оснований, а двухцепочечная нуклеиновая кислота-мишень имеет длину  $8-3,3 \times 10^9$  пар оснований;

последовательность-мишень является гетерополимерной и содержит 25%-75% пуриновых оснований и 75%-25% пиримидиновых оснований в любом порядке (причем 20 предпочтительно частота встречаемости димеров пурин-пиримидин плюс частота встречаемости димеров пиримидин-пурин превышает 25%);

зонд (т.е. одноцепочечная молекула) ковалентно связан с расщепляющим двухцепочечную нуклеиновую кислоту агентом;

зонд ковалентно связан с химиотерапевтическим агентом;

25 зонд ковалентно связан с меткой (например, мультимолекулярным комплексом передачи сигнала, окислительно-восстановительной парой, хемилюминесцентным агентом, электрохемилюминесцентным агентом или в предпочтительном варианте флуорофором, в частности, таким образом, что интенсивность флуоресценции этого комплекса коррелирует с аффинностью связывания между этим зондом и последовательностью-мишенью);

30 правила спаривания оснований для одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты являются, относительно одной цепи дуплекса, правилами спаривания основания Уотсона-Крика, G-C и либо A-T, либо A-U, и, относительно другой цепи дуплекса, A-A и либо T-T, либо U-U;

35 дуплекс, по существу, сохраняет двойную спиральную структуру Уотсона-Крика, а одноцепочечная молекула находится в бороздке этой двойной спирали;

акселераторный агент образует связь между частью дуплекса и частью одноцепочечной нуклеиновой кислоты;

акселераторный агент ковалентно связан с одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты;

40 обе цепи дуплекса Уотсона-Крика являются ДНК (в частности, когда все цепи этого триплекса являются ДНК);

акселераторный агент связывается с основанием в дуплексе Уотсона-Крика, причем указанное основание является основанием, с которым связывается одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты;

45 акселераторный агент связывается с основанием в дуплексе Уотсона-Крика, причем указанное основание не является основанием в этом триплексе;

акселераторный агент связывается с фосфатным скелетом дуплекса Уотсона-Крика;

50 акселераторный агент связывается с более, чем одним сайтом, на дуплексе Уотсона-Крика, причем каждый сайт находится либо на основании, либо в положении на фосфатном скелете указанного дуплекса;

акселераторный агент связывается с одним сайтом на дуплексе Уотсона-Крика, причем указанный сайт находится либо на основании, либо на фосфатном скелете указанного дуплекса;

акселераторный агент связывается с основанием в дуплексе Уотсона-Крика и с основанием в одноцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты;

акселераторный агент связывается с основанием в одноцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.

5 (Е) Квадруплексы

Квадруплекс, описанный в общем виде в разделе «Сущность изобретения», может необязательно иметь один или более из следующих признаков:

каждая из указанных четырех цепей является гетерополимерной с содержанием G-C между 10% и 90%;

10 вторая и четвертая цепи выстроены в параллельном 3'→5'-направлении и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований;

первая и третья цепи выстроены в параллельном 5'→3'-направлении и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований;

15 вторая и четвертая цепи выстроены в параллельном 3'→5'-направлении и связывание между указанными второй и четвертой цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований, и, кроме того, первая и третья цепи выстроены в параллельном 5'→3'-направлении и связывание между указанными первой и третьей цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований;

20 вторая и четвертая цепи выстроены в параллельном 3'→5'-направлении и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания Уотсона-Крика;

первая и третья цепи выстроены в параллельном 5'→3'-направлении и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания Уотсона-Крика;

25 вторая и четвертая цепи выстроены в параллельном 3'→5'-направлении и связывание между указанными второй и четвертой цепями соответствует правилам спаривания Уотсона-Крика, и, кроме того, первая и третья цепи выстроены в параллельном 5'→3'-направлении и связывание между указанными первой и третьей цепями соответствует правилам спаривания Уотсона-Крика;

30 первая и четвертая цепи выстроены в антипараллельных 5'→3' и 3'→5'-направлениях, соответственно, и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания оснований Уотсона-Крика;

вторая и третья цепи выстроены в антипараллельных 3'→5' и 5'→3'-направлениях, соответственно, и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания оснований Уотсона-Крика;

35 первая и четвертая цепи выстроены в антипараллельных 5'→3' и 3'→5'-направлениях, соответственно, и связывание между указанными первой и четвертой цепями соответствует правилам спаривания оснований Уотсона-Крика, и, кроме того, вторая и третья цепи выстроены в антипараллельных 3'→5' и 5'→3'-направлениях, соответственно, и связывание между указанными второй и третьей цепями соответствует правилам спаривания оснований Уотсона-Крика;

40 первая и четвертая цепи выстроены в антипараллельных 5'→3' и 3'→5'-направлениях, соответственно, и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований;

45 вторая и третья цепи выстроены в анти параллельных 3'→5' и 5'→3'-направлениях, соответственно, и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований;

50 первая и четвертая цепи выстроены в антипараллельных 5'→3' и 3'→5'-направлениях, соответственно, и связывание между указанными первой и четвертой цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований, и, кроме того, вторая и третья цепи выстроены в антипараллельных 3'→5' и 5'→3'-направлениях, соответственно, и связывание между указанными второй и третьей цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований;

каждое взаимодействующее основание указанной первой цепи взаимодействует

специфически как с соседним основанием на указанной третьей цепи, так и с основанием на указанной четвертой цепи, основанием, с которым связано основание указанной третьей цепи;

каждое взаимодействующее основание указанной второй цепи взаимодействует  
5 специфически как с соседним основанием на указанной четвертой цепи, так и с основанием на указанной третьей цепи, основанием, с которым связано основание указанной четвертой цепи;

он является выделенным, очищенным, искусственным или синтетическим квадруплексом;

10 каждая цепь является гетерополимерной с содержанием G-C между 25% и 75%;  
каждая цепь является гетерополимерной с содержанием G-C между 10% и 90% и, кроме того, объединенные частоты встречаемости в ней димеров пурин-пиримидин и димеров пиримидин-пурин превышают 25%;

он находится не в клетке (и не в вирусе);

15 каждая указанная цепь независимо содержит гетерополимерную нуклеиновую кислоту или аналог гетерополимерной нуклеиновой кислоты;

каждая указанная цепь независимо содержит ДНК или РНК;

каждая указанная цепь независимо содержит аналог гетерополимерной нуклеиновой кислоты, содержащий незаряженный или частично заряженный скелет;

20 одна из указанной второй цепи или указанной четвертой цепи содержит ДНК, а другая из указанной второй цепи или указанной четвертой цепи содержит РНК, мРНК, гяРНК, рРНК, тРНК или кДНК;

вторая цепь и указанная четвертая цепь являются параллельно гомологичными друг другу;

25 большая бороздка указанной первой цепи и указанной второй цепи расположена в малой бороздке указанной третьей цепи и указанной четвертой цепи;

вторая цепь и указанная четвертая цепь являются параллельно комплементарными друг другу;

30 большая бороздка указанной первой цепи и указанной второй цепи расположена в малой бороздке указанной третьей цепи и указанной четвертой цепи;

каждое нуклеосаждение связывается с более, чем двумя другими нуклеосаждениями; ни одна цепь не является смежной с другой цепью;

эта мультиплексная структура, по существу, не содержит связывания Хугстина;

эта мультиплексная структура, по существу, не содержит квартетов G-G;

35 эта первая цепь и указанная вторая цепь имеют длину 5-50 пар оснований;

эта третья цепь и указанная четвертая цепь являются геномными ДНК;

эта третья цепь и указанная четвертая цепь включают в себя гаплотип в геномной ДНК;

эта третья цепь и четвертая цепь являются ПЦР-амплифицированными продуктами;

где указанная мультиплексная структура не содержит твердого носителя;

40 эта мультиплексная структура связана с твердым носителем (где твердый носитель либо является электропроводимым, либо не является электропроводимым);

где эта мультиплексная структура содержит дополнительно терапевтический, профилактический или диагностический агент, связанный, по меньшей мере, с одной из указанных первой, второй, третьей и четвертой цепей;

45 где эта первая цепь и указанная вторая цепь, каждая, имеют длину 5-30 оснований, а указанная третья и указанная четвертая цепь, каждая, имеет длину  $8-3,3 \times 10^9$  пар оснований;

50 где эта четвертая последовательность содержит 25%-75% пуриновых оснований и 75%-25% пиримидиновых оснований в любом порядке (причем предпочтительно частота встречаемости димеров пурин-пиримидин плюс частота встречаемости димеров пиримидин-пурин превышает 25%);

первый и второй дуплексы Уотсона-Крика (см. способ получения квадруплекса в разделе «Сущность изобретения»), каждый, имеют содержание G-C между 30% и 70%;

обе цепи первого дуплекса Уотсона-Крика являются ДНК (в частности, когда все цепи этого квадруплекса являются ДНК);

акселераторный агент связывается с основанием в первом дуплексе Уотсона-Крика, причем указанное основание является основанием, с которым связывается основание  
5 второго дуплекса;

акселераторный агент связывается с основанием в первом или втором дуплексах Уотсона-Крика, причем указанное основание не является частью этого квадруплекса;  
акселераторный агент связывается с фосфатным скелетом первого или второго дуплекса Уотсона-Крика;

10 акселераторный агент связывается с более, чем одним сайтом, на первом или втором дуплексе Уотсона-Крика, причем каждый сайт находится либо на основании, либо на фосфатном скелете;

акселераторный агент связывается с одним сайтом на дуплексе Уотсона-Крика, причем указанный сайт находится либо на основании, либо на фосфатном скелете;

15 акселераторный агент связывается с основанием в первом дуплексе Уотсона-Крика и с основанием на втором дуплексе Уотсона-Крика;

акселераторный агент связывается с малой бороздкой первого и/или второго дуплекса Уотсона-Крика;

20 акселераторный агент образует связь между частью первого дуплекса Уотсона-Крика и частью второго дуплекса Уотсона-Крика.

Дополнительные аспекты изобретения

Данное изобретение обеспечивает триплексные комплексы, содержащие одноцепочечный зонд, связанный с двухцепочечной нуклеиновой кислотой-мишенью, где этот зонд содержит гетерополимерную нуклеиновую кислоту или аналог гетерополимерной  
25 нуклеиновой кислоты, и все триплеты оснований этого комплекса являются членами, выбранными из группы, состоящей из А-Т-А, Т-А-Т, У-А-Т, Т-А-У, А-У-А, У-А-У, G-C-G и C-G-C.

В отличие от некоторых триплексов Хугстина, описанных в предшествующей литературе, триплексы данного изобретения являются стабильными при величинах рН, больших, чем  
30 7,6. Кроме того, триплексы данного изобретения не требуют присутствия гомопиримидиновых последовательностей или гомопуриновых последовательностей, как это имеет место в некоторых триплексах предыдущего уровня техники. Например, последовательность-мишень может содержать 25%-75% пуриновых оснований и 75%-25% пиримидиновых оснований в любом порядке.

35 Предпочтительно, одноцепочечная нуклеиновая кислота или аналог нуклеиновой кислоты этого триплекса имеет длину 5-30 оснований, а двухцепочечная нуклеиновая кислота-мишень имеет длину  $8-3,3 \times 10^9$  пар оснований.

Образование триплекса в соответствии с данным изобретением является подходящим для различных применений. Например, зонды, ковалентно связанные с расщепляющим  
40 двухцепочечную нуклеиновую кислоту агентом, могут быть использованы для специфического расщепления последовательностей-мишеней двухцепочечных нуклеиновых кислот. Зонды, ковалентно связанные с химиотерапевтическим агентом, могут быть использованы для специфической обработки последовательностей-мишеней двухцепочечных нуклеиновых кислот.

45 В предпочтительных вариантах данное изобретение обеспечивает быстрый, чувствительный, благоприятный для окружающей среды и безопасный способ для анализа связывания между двухцепочечной мишенью и одноцепочечным зондом, где мишень содержит последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность аналога нуклеиновой кислоты и зонд содержит последовательность нуклеиновой кислоты или  
50 последовательность аналога нуклеиновой кислоты.

В отличие от анализов предыдущего уровня техники данное изобретение не только детектирует присутствие специфического связывания зонд-мишень, но также обеспечивает качественную и количественную информацию относительно характера взаимодействия

между зондом и мишенью. Таким образом, данное изобретение позволяет специалисту-практику различать среди полного правильного спаривания, ошибочного спаривания одной пары оснований, ошибочного спаривания двух пар оснований, ошибочного спаривания трех пар оснований, делеции одной пары оснований, делеции двух пар оснований и делеции

5 трех пар оснований, возникающих между последовательностью оснований в зонде и в цепи двухцепочечной мишени.

Варианты данного изобретения включают в себя калибрование измеряемого сигнала (например, интенсивности флуоресценции) для смеси первый зонд-мишень против сигнала того же типа, проявляемого другими зондами, объединенными с той же самой мишенью,

10 где каждый из этих других зондов отличается от первого зонда, по меньшей мере, одним основанием.

Может быть построена калибровочная кривая, где величина измеряемого сигнала (например, интенсивности флуоресценции) является функцией аффинности связывания между мишенью и зондом. Поскольку аффинность связывания между мишенью и

15 множеством различных зондов меняется в зависимости от числа ошибочно спаренных оснований, природы этих ошибочных спариваний (A-G против A-C против T-G против T-C и т.д.), местоположения ошибочного спаривания (ошибочных спариваний) в триплексе и т.д., анализ данного изобретения может быть использован для секвенирования мишени.

В вариантах измеряемым сигналом может быть интенсивность флуоресценции флуорофора, включенного в тест-пробу. В таких вариантах аффинность связывания между зондом и мишенью может прямо или обратно коррелировать с этой интенсивностью в зависимости от того, сигнализирует ли флуорофор о гибридизации посредством гашения сигнала или усиления сигнала. При выбранных условиях интенсивность флуоресценции, генерируемая интеркалирующимися агентами, может прямо коррелировать с аффинностью

20 связывания зонд-мишень, тогда как интенсивность предпочтительных вариантов, использующих неинтеркалирующийся флуорофор, ковалентно связанный с зондом, может обратно коррелировать с аффинностью связывания зонд-мишень. Интенсивность флуоресценции уменьшается для неинтеркалирующихся флуорофоров по мере увеличения степени правильного спаривания между зондом и мишенью, предпочтительно

30 на протяжении диапазона, включающего в себя 0-2 ошибочных спаривания и/или делеций, более предпочтительно на протяжении диапазона, включающего в себя 0-3 ошибочных спаривания и/или делеций.

Данное изобретение позволяет количественно определять аффинность связывания между зондом и мишенью. Такая информация может быть полезной для различных

35 применений, в том числе для конструирования антисмысловых лекарственных средств с оптимизированными характеристиками связывания.

В отличие от способов предыдущего уровня техники анализ данного изобретения является предпочтительно гомогенным. Этот анализ может проводиться без отделения комплекса зонд-мишень от свободных зонда и мишени перед детектированием величины

40 измеряемого сигнала. Анализ не требует стадии разделения на геле, позволяя значительно увеличить производительность тестирования. Количественные анализы являются простыми и точными. В результате этот анализ связывания сберегает большое количество времени, снижает расходы и может быть легко автоматизирован. Кроме того, он позволяет быстро определять переменные связывания, такие как буфер, pH, концентрацию ионов, температуру, время инкубирования, относительную концентрацию

45 последовательностей зонда и мишени, концентрацию интеркалятора, длину последовательностей-мишеней, длину последовательностей зонда и возможные требования кофакторов.

Анализ может, например, проводиться в растворе в лунке, на непроницаемой

50 поверхности или на биочипе.

Кроме того, анализ данного изобретения предпочтительно проводят без обеспечения гасящего сигнала агента на мишени или на зонде.

Хотя авторы изобретения описали ранее преимущества анализов интенсивности

флуоресценции для гибридизации (см., например, заявку на патент США US 09/224505, поданную 31 декабря 1998 года), анализы данного изобретения специфически детектируют триплексы зонда и двухцепочечной мишени, устраняя таким образом необходимость денатурации мишени. Хотя было известно, что зонды нуклеиновой кислоты (и аналога нуклеиновой кислоты) образуют триплексы с определенными ограниченными классами мишеней (см., например, Floris et al., supra, Dervan et al., supra, Egholm et al., 365 Nature 566 (1993) и Tomac et al., 118, J. Am. Chem. Soc. 5544 (1996), авторы данного изобретения неожиданно смогли специфически анализировать триплексы, образованные между одноцепочечными зондами нуклеиновых кислот (например, одДНК и РНК) и двухцепочечными кислотами-мишенями (например, дцДНК-мишенями), где взаимодействие между этими зондами и мишенями основано на спаривании оснований по Уотсону-Крику (по меньшей мере, в том смысле, что А связывается с Т (или с U, в случае РНК), а G связывается с С), а не на очень ограниченной модели Хугстина гибридизации триплексов, например, Dervan et al. Термин «триплекс Уотсона-Крика», который используется здесь, предназначен для кристаллизации этих различий ограничением характера спаривания оснований между одноцепочечным зондом и двухцепочечной мишенью до А-Т-А, Т-А-Т, U-А-Т, Т-А-U, А-U-А, U-А-U, G-С-G и/или С-G-С (в том числе С<sup>+</sup>-G-С и/или любых других ионизированных разновидностей основания). Эти трехчленные группы далее называются триплетами оснований Уотсона-Крика, а полученные структуры называются триплексами Уотсона-Крика.

Подходящие зонды для применения в анализе данного изобретения включают, например, одДНК, РНК, ПНК и другие аналоги нуклеиновых кислот, имеющие незаряженные или частично заряженные скелеты. Предпочтительными являются последовательности зондов, имеющие любую длину от 8 до 20 оснований, так как именно таким является диапазон, в котором обнаружены самые малые уникальные последовательности ДНК прокариот и эукариот. Особенно предпочтительными являются зонды из 12-18 оснований, так как такой является длина самых малых уникальных последовательностей в геноме человека. В вариантах наиболее предпочтительными являются зонды длиной 5-30 оснований. Однако множество более коротких зондов могут быть использованы для обнаружения нуклеотидной последовательности, имеющей в ней множество не-уникальных последовательностей-мишеней, которые объединяются для уникальной идентификации этой нуклеотидной последовательности. Длина этого зонда может быть выбрана таким образом, чтобы она соответствовала длине мишени.

Авторы изобретения обнаружили неожиданное развитие, заключающееся в том, что они были способны специфически анализировать большое разнообразие триплексов, образованных зависимым от спаривания оснований Уотсона-Крика образом между одноцепочечными зондами нуклеиновых кислот (например, одДНК, РНК, одПНК и другими аналогами ДНК или РНК) и двухцепочечными нуклеиновыми кислотами-мишенями (например, дцДНК). Авторы изобретения обнаружили, что образование и/или стабилизация триплекса усиливается присутствием интеркалирующегося агента в подлежащей тестированию пробе.

Авторы изобретения обнаружили, что образование и/или стабилизация триплекса Уотсона-Крика усиливается присутствием катионов в тестируемой пробе. Подходящие катионы включают в себя, например, одновалентные катионы, такие как Na<sup>+</sup> (предпочтительно в концентрации 50 мМ - 125 мМ), K<sup>+</sup> и другие ионы щелочных металлов; двухвалентные катионы, такие как ионы щелочно-земельных металлов (например, Mg<sup>+2</sup> и Ca<sup>+2</sup>) и двухвалентные катионы переходных металлов (например, Mn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> и Zn<sup>+2</sup>); и катионы, имеющие положительный заряд, по меньшей мере, три, такие как Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>+3</sup>, трехвалентный спермидин и четырехвалентный спермин. Mn<sup>+2</sup> предпочтительно обеспечивают в концентрации 10 мМ - 30 мМ. Mg<sup>+2</sup> предпочтительно обеспечивают в концентрации 15 мМ - 20 мМ. Ni<sup>+2</sup> предпочтительно обеспечивают в концентрации приблизительно 20 мМ. В вариантах Mg<sup>+2</sup> и Mn<sup>+2</sup> обеспечивают в комбинации

в концентрации 10 мМ, каждый, 15 мМ или 20 мМ, каждый (т.е. 10-20 мМ каждый).

Количество катиона, добавляемого к среде, в которой образуется триплекс, зависит от ряда факторов, в том числе от природы катиона, концентрации зонда, концентрации мишени, присутствия дополнительных катионов и содержания оснований зонда и мишени.

5 Предпочтительные концентрации и смеси катионов могут быть определены рутинным образом экспериментально.

Данное изобретение не требует применения радиоактивных зондов, которые являются вредными, утомительными и трудоемкими в применении и должны постоянно регенерироваться. Зонды данного изобретения являются предпочтительно безопасными  
10 для применения и стабильными в течение многих лет. Таким образом, зонды могут быть приготовлены или заказаны в больших количествах и длительно храниться.

В вариантах зонд метят мультимолекулярным комплексом передачи сигнала или окислительно-восстановительной парой или меткой, которая индуцирует  
хемилюминесцентные или электролюминесцентные свойства.

15 Предпочтительно зонд или мишень (предпочтительно зонд) имеют флуоресцентную метку, ковалентно связанную с ними. Эта метка является предпочтительно не-интеркалирующимся флуорофором. В таких вариантах флуорофор предпочтительно связан с зондом на любом конце. Предпочтительные флуоресцентные маркеры включают в себя биотин, родамин и флуоресцеин и другие маркеры, которые флуоресцируют при  
20 облучении возбуждающей энергией.

Длину волны возбуждения выбирают (рутинным экспериментированием и/или в соответствии с общепринятыми знаниями) таким образом, чтобы она соответствовала максимуму возбуждения для используемого флуорофора, и она равна предпочтительно  
25 длину волны возбуждения 200-1000 нм. В предпочтительных вариантах используют аргоновый ионный лазер (лазер на ионизированном аргоне) для облучения флуорофора светом, имеющим длину волны в диапазоне 400-540 нм, а флуоресцентное излучение детектируют в диапазоне 500-750 нм.

Анализ данного изобретения может проводиться в диапазоне большого разнообразия температур, таком как, например, 5-85°C. Некоторые анализы предыдущего уровня техники  
30 требуют повышенных температур, что увеличивает стоимость и препятствует применению такого анализа. С другой стороны, данное изобретение может проводиться при комнатной температуре или более низкой температуре (например, при температуре ниже 25°C).

Достоверность данного изобретения не зависит от содержания гуанина и цитозина в  
35 указанной мишени. Поскольку пары G-C оснований образуют три водородные связи, тогда как пары A-T оснований образуют только две водородные связи, последовательности мишени и зонда с более высокими содержаниями G или C являются более стабильными, обладающими более высокими температурами плавления. Вследствие этого ошибочные спаривания оснований, которые увеличивают содержание GC гибридизованного района  
40 зонда и мишени выше содержания, присутствующего в точно спаренных гибридах, могут компенсировать слабость связывания, ассоциированную с ошибочно спаренным зондом. Было показано, что триплексы, содержащие любое возможное ошибочное спаривание оснований между зондом и мишенью, являются более нестабильными, чем правильно спаренные триплексы, всегда приводящие к более низким интенсивностям флуоресценции,  
45 чем полностью комплементарные гибриды, при применении интеркалирующегося флуорофора.

Анализ данного изобретения является чрезвычайно чувствительным, устраняющим тем самым необходимость проведения ПЦР-амплификации мишени. Например, можно  
50 анализировать тест-пробу, имеющую объем приблизительно 20 микролитров, которая содержит приблизительно 10 фемтомолей мишени и приблизительно 10 фемтомолей зонда. Варианты данного изобретения являются достаточно чувствительными для анализа мишеней при концентрации  $5 \times 10^{-9}$  М, предпочтительно при концентрации не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  М. Варианты данного изобретения являются достаточно чувствительными для

использования зондов при концентрации  $5 \times 10^{-9}$  М, предпочтительно при концентрации не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  М. Нет необходимости говорить о том, что приведенные величины не подразумевают того, что данный способ не может детектировать более высокие концентрации.

5 Среда, в которой могут образовываться триплексы, может быть любой общепринятой средой, о которой известно, что она предохраняет нуклеотиды. См., например, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," vol.2 (1989). Например, эта жидкая среда может содержать нуклеотиды, воду, буферы и стандартные концентрации солей. При  
10 использовании двухвалентных катионов исключительно для усиления образования триплекса в эти реакционные смеси не должны включаться хелаторы, такие как ЭДТА или ЭГТА.

15 Специфическое связывание между комплементарными основаниями происходит при большом разнообразии условий, варьирующихся по температуре, концентрации соли, электростатической силе и составу буфера. Примеры таких условий и способы для их применения известны в данной области.

В отличие от триплексов Хугстина, которые являются нестабильными или не существующими при рН, более высоких, чем приблизительно 7,6, триплексы Уотсона-Крика данного изобретения являются стабильными на протяжении широкого диапазона уровней рН, предпочтительно приблизительно от рН 5 до рН 9.

20 Предпочтительно триплексы должны образовываться при температуре приблизительно от 5°C до 25°C в течение приблизительно одного часа или в течение меньшего времени. Более продолжительные периоды реакции не требуются, но инкубирование в течение периода времени до 24 часов в большинстве случаев не оказывает вредного влияния на триплексы. Быстрое связывание триплексов Уотсона-Крика данного изобретения  
25 контрастирует с гораздо более продолжительными периодами времени для анализов на основе триплексов Хугстина.

Хотя это и не является обязательным, можно облегчить образование триплексов в растворе с использованием некоторых реагентов наряду с катионами. Предпочтительные  
30 примеры этих реагентов включают одноцепочечные связывающие белки, такие как белок Rec A, белок 32 гена T4, одноцепочечный белок E. coli, белки, связывающиеся с большой и малой бороздками нуклеиновых кислот, виологен и интеркалирующие вещества, такие как бромид этидия, актиномицин D, псорален и ангелицин. Такие способствующие образованию триплексов реагенты могут оказаться применимыми в чрезвычайных рабочих  
35 условиях, например, при аномальных уровнях рН или чрезвычайно высоких температурах.

Анализ данного изобретения может быть использован, например, для идентификации доступных районов в уложенных нуклеотидных последовательностях, для определения  
40 числа ошибочно спаренных пар оснований в гибридационном комплексе и для картирования геномов.

Авторы изобретения могут здесь иногда предполагать, что триплексы Уотсона-Крика  
40 происходят из гибридизации зонда с дуплексной мишенью. Хотя флуорофоры, прикрепленные к зонду, производили погашенные флуоресцентные излучения после подвергания действию дуплексных мишеней, содержащих цепь комплементарных оснований Уотсона-Крика, что указывает на свершение некоторого рода события связывания, авторы изобретения не уверены в том, что то, что происходит в триплексе  
45 Уотсона-Крика, наилучшим образом описывается как гибридизация в смысле, традиционно связываемом с образованием дуплексов Уотсона-Крика. Хотя образование триплекса Уотсона-Крика может иногда называться здесь событием гибридизации, это делается только для удобства и не предназначается для ограничения объема данного изобретения в отношении того, как может быть наилучшим образом охарактеризовано образование  
50 триплекса Уотсона-Крика.

В отличие от квадруплексов, обсуждаемых в разделе «Предпосылки изобретения» выше, предпочтительные мультиплексные структуры данного изобретения содержат, по меньшей мере, четыре цепи нуклеиновых кислот, связанные вместе в соответствии с

традиционными правилами связывания Уотсона-Крика.

В данном контексте, термин "связывание Уотсона-Крика" предназначено для определения специфической ассоциации между противоположащими парами цепей нуклеиновой кислоты (и/или аналога нуклеиновой кислоты) через соответствующие, 5 противоположащие основания. Хотя образование квадруплекса Уотсона-Крика может иногда называться здесь событием гибридизации, это делается только для удобства и не предназначается для ограничения объема данного изобретения в отношении того, как может быть наилучшим образом охарактеризовано образование квадруплекса Уотсона-Крика.

10 Мультиплексные структуры данного изобретения предпочтительно являются квадруплексами. Каждая цепь этого мультиплекса независимо содержит нуклеиновую кислоту или аналог нуклеиновой кислоты. Подходящие нуклеиновые кислоты включают в себя, например, ДНК или РНК. Предпочтительные аналоги нуклеиновых кислот содержат незаряженный или частично заряженный скелет (т.е. скелет, имеющий заряд, который не 15 является таким отрицательным, как скелет природной ДНК).

В некоторых вариантах одна из второй и четвертой цепей четырехцепочечного квадруплекса содержит ДНК, а другая из этих второй и четвертой цепей содержит РНК, мРНК, гяРНК, рРНК, тРНК или кДНК.

20 В некоторых вариантах вторая цепь и четвертая цепь являются параллельно гомологичными друг другу. В этих вариантах большая бороздка первой и второй цепей расположена в малой бороздке третьей и четвертой цепей.

В других вариантах вторая и четвертая цепи являются параллельно комплементарными друг другу. В этих вариантах, которые обладают "вмонтированной комплементарностью", большая бороздка первой и второй цепей расположена в малой бороздке третьей и 25 четвертой цепей.

В некоторых вариантах каждое нуклеос основание связывается с не более чем двумя другими нуклеос основаниями. В некоторых из этих вариантов основания второй цепи специфически связываются (по правилам Уотсона-Крика) с соответствующими основаниями первой цепи и с соответствующими основаниями четвертой цепи, а 30 основания четвертой цепи специфически связываются (по правилам Уотсона-Крика) с соответствующими основаниями третьей цепи и с соответствующими основаниями второй цепи, причем основания первой и третьей цепей связываются, каждая, не более чем с одним другим основанием. Таким образом, наряду с традиционными парами оснований Уотсона-Крика такие варианты включают в себя следующие триплеты оснований Уотсона- 35 Крика: А-Т-А, Т-А-Т, U-А-Т, Т-А-U, А-U-А, U-А-U, G-C-G и/или C-G-C (в том числе C<sup>+</sup>-G-C и/или любые другие ионизированные разновидности оснований).

В некоторых вариантах считается, что противоположащие основания первой и третьей цепей также связываются друг с другом, наряду с: (а) связыванием между 40 противоположащими основаниями первой и второй цепей; (b) связыванием между противоположащими основаниями третьей и четвертой цепей; и (с) связыванием между противоположащими основаниями второй и четвертой цепей.

В некоторых вариантах мультиплексной структуры данного изобретения ни одна цепь не является смежной с другой цепью. То есть, имеются, по меньшей мере, четыре отдельные 45 цепи. Хотя уложенные конформации и т.п. (например, шпильчатые повороты и т.д.) находятся в объеме данного изобретения, уложенные части одной цепи не должны считаться более одного раза относительно минимума из четырех отдельных цепей.

Мультиплексные структуры данного изобретения предпочтительно не основываются на связывании Хугстина или G-G-квартетах для поддержания мультиплексной структуры, хотя 50 могут присутствовать незначительные количества связей Хугстина и/или G-G-квартетов. То есть, мультиплексные структуры данного изобретения предпочтительно не содержат связывания Хугстина и, по существу, не содержат G-G-квартетов.

В некоторых вариантах первая и вторая цепи данного мультиплекса имеют длину 5-50 оснований (более предпочтительно длину 5-30 оснований), а третья и четвертая цепи

имеют длину  $8-3,3 \times 10^9$  пар оснований. Например, первая и вторая цепи могут составлять двухцепочечный зонд, а третья и четвертая цепи могут составлять двухцепочечную мишень, такую как геномная ДНК, которая может содержать гаплотип.

5 В вариантах третья цепь и четвертая цепь являются ПЦР-амплифицированными продуктами.

Мультиплексы данного изобретения могут присутствовать в растворе, на твердом носителе, *in vitro* или *in vivo*. Твердый носитель может быть электрически проводимым (например, электродом) или непроводимым.

10 Образование квадруплекса в соответствии с данным изобретением пригодно для различных применений. Например, двухцепочечные зонды, ковалентно связанные с расщепляющим двухцепочечную нуклеиновую кислоту агентом, могут быть использованы для специфического расщепления последовательностей-мишеней двухцепочечных кислот. Двухцепочечные зонды, ковалентно связанные с химиотерапевтическим агентом, могут  
15 быть использованы для специфической обработки последовательностей-мишеней двухцепочечных нуклеиновых кислот. Таким образом, данное изобретение включает в себя мультиплексные структуры, дополнительно содержащие терапевтический, профилактический или диагностический агент, связанный, по меньшей мере, с одной из первой, второй, третьей и четвертой цепей.

Кроме того, мультиплексы данного изобретения пригодны для применения в  
20 наноинженерии, например, для обеспечения электрической цепи на молекулярном (т.е. в нано-масштабе) уровне. Дополнительные подробности в отношении наноинженерии с нуклеиновыми кислотами могут быть найдены в патенте США US 5948897, Sen et al., и в цитируемых в нем ссылках.

Мультиплексные структуры данного изобретения могут быть обеспечены способом,  
25 предусматривающим: обеспечение гибридной среды, содержащей первую цепь, вторую цепь, третью цепь, четвертую цепь, воду, буфер и промотор (акселератор); и инкубирование этой гибридной среды в течение времени инкубирования, эффективного для гибридизации второй цепи с четвертой цепью.

Гибридная среда может включать в себя любую общепринятую среду, известную  
30 в качестве среды, подходящей для сохранения нуклеотидов. См., например, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," vol.2 (1989). Например, эта жидкая среда может содержать нуклеотиды, воду, буферы и стандартные концентрации солей. При использовании двухвалентных катионов исключительно для усиления образования квадруплекса в эти реакционные смеси не должны включаться хелаторы, такие как ЭДТА  
35 или ЭГТА.

Специфическое связывание между комплементарными основаниями происходит при большом разнообразии условий, варьирующихся по температуре, концентрации соли, электростатической силе и составу буфера. Примеры таких условий и способы для их применения известны в данной области.

40 В отличие от многих мультиплексов Хугстина, которые являются нестабильными или не существующими при уровнях pH, более высоких, чем приблизительно 7,6, мультиплексы Уотсона-Крика данного изобретения являются стабильными на протяжении широкого диапазона уровней pH, предпочтительно от приблизительно pH 5 до приблизительно pH 9.

Кроме того, мультиплексы данного изобретения не требуют присутствия  
45 гомопиримидиновых или гомопуриновых последовательностей, как это имеет место в некоторых квадруплексах предыдущего уровня техники. Например, последовательность-мишень может содержать 25%-75% пуриновых оснований и 75%-25% пиримидиновых оснований в любом порядке.

Предпочтительно мультиплексы должны образовываться при температуре  
50 приблизительно 5°C - приблизительно 25°C в течение приблизительно одного часа или в течение меньшего времени. Время инкубирования составляет предпочтительно менее пяти минут, даже при комнатной температуре. Более продолжительные периоды реакции не требуются, но инкубирование в течение периода времени до 24 часов в большинстве

случаев не оказывают вредного влияния на квадруплексы. Быстрое связывание квадруплексов Уотсона-Крика данного изобретения контрастирует с гораздо более продолжительными периодами времени для анализов на основе квадруплексов Хугстина.

Промотор (акселератор) в гибридизационной среде является предпочтительно интеркалирующимся агентом или катионом. Интеркалирующийся агент может быть, например, флуорофором, таким как член, выбранный из группы, состоящей из YOYO-1, TOTO-1, бромид этидия, гомодимер-1 этидия, гомодимер-2 этидия и акридин.

Подходящие катионы включают в себя, например, одновалентные катионы, такие как  $\text{Na}^+$  (предпочтительно в концентрации 50 мМ - 125 мМ),  $\text{K}^+$  и другие ионы щелочных металлов; двухвалентные катионы, такие как ионы щелочно-земельных металлов (например,  $\text{Mg}^{+2}$  и  $\text{Ca}^{+2}$ ) и двухвалентные катионы переходных металлов (например,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  и  $\text{Zr}^{+2}$ ); и катионы, имеющие положительный заряд, по меньшей мере, три, такие как  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ , трехвалентный спермидин и четырехвалентный спермин.  $\text{Mn}^{+2}$  предпочтительно обеспечивают в концентрации 10 мМ - 45 мМ.  $\text{Mg}^{+2}$  предпочтительно обеспечивают в концентрации 10 мМ - 45 мМ.  $\text{Ni}^{+2}$  предпочтительно обеспечивают в концентрации приблизительно 20 мМ. В вариантах  $\text{Mg}^{+2}$  и  $\text{Mn}^{+2}$  обеспечивают в комбинации в концентрации 10 мМ, каждый, 15 мМ или 20 мМ, каждый, 25 мМ, каждый, 30 мМ, каждый, 35 мМ, каждый, или 40 мМ, каждый (т.е. 10-40 мМ, каждый).

Количество катиона, добавляемого к среде, в которой образуется мультиплекс, зависит от ряда факторов, в том числе от природы катиона, концентрации зонда, концентрации мишени, присутствия дополнительных катионов и содержания оснований зонда и мишени. Предпочтительные концентрации и смеси катионов могут быть определены рутинным образом экспериментально.

Хотя это и не является обязательным, другие промоторы (акселераторы) включают в себя одноцепочечные связывающие белки, такие как белок Rec A, белок 32 гена T4, одноцепочечный белок E. coli, белки, связывающиеся с большой и малой бороздками нуклеиновых кислот, виологен и интеркалирующиеся вещества, такие как актиномицин D, псорален и ангелицин. Такие способствующие образованию мультиплексов реагенты могут оказаться применимыми в чрезвычайных рабочих условиях, например, при аномальных уровнях pH или чрезвычайно высоких температурах.

Данное изобретение обеспечивает также способ, в котором гибридизация второй цепи с четвертой цепью инактивирует активность, связанную, по меньшей мере, с одной из третьей и четвертой цепей. Таким образом, по меньшей мере, одна из первой и второй цепей дополнительно содержит фармацевтический агент, причем гибридизация второй цепи с четвертой цепью помещает этот фармацевтический агент на эффективное расстояние от мишени на третьей цепи, четвертой цепи или на другой молекуле, связанной, по меньшей мере, с одной из третьей и четвертой цепей. Этот фармацевтический агент является предпочтительно членом, выбранным из группы, состоящей из нуклеиновых кислот, сконструированных для связывания промоторных последовательностей клинически важных генов, нуклеиновых кислот, сконструированных для связывания клинически важных генов, или нуклеиновых кислот, сконструированных для связывания сайта инициации репликации патогенов.

В предпочтительных вариантах данное изобретение обеспечивает быстрый, чувствительный, благоприятный для окружающей среды и безопасный способ для анализа связывания между одноцепочечной или двухцепочечной мишенью и двухцепочечным зондом, где мишень содержит последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность аналога нуклеиновой кислоты и зонд содержит последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность аналога нуклеиновой кислоты.

Анализ данного изобретения может быть использован, например, для идентификации доступных районов в уложенных нуклеотидных последовательностях, для определения числа ошибочно спаренных пар оснований в гибридизационном комплексе и для картирования геномов.

Данное изобретение не только детектирует присутствие специфического связывания зонд-мишень, но также обеспечивает качественную и количественную информацию относительно характера взаимодействия между зондом и мишенью. Таким образом, данное изобретение позволяет специалисту-практику различать среди полного правильного

5 спаривания, ошибочного спаривания одной пары оснований, ошибочного спаривания двух пар оснований, ошибочного спаривания трех пар оснований, делеции одной пары оснований, делеции двух пар оснований и делеции трех пар оснований, появляющихся между последовательностью оснований в зонде и в цепи дзухцепочечной мишени.

Варианты данного изобретения включают в себя калибрование измеряемого сигнала

10 (например, интенсивности флуоресценции, хемилюминесценции, электрохемилюминесценции или электрических свойств) для смеси первый зонд-мишень против сигнала того же типа, проявляемого другими зондами, объединенными с той же самой мишенью, где каждый из этих других зондов отличается от первого зонда, по меньшей мере, одним основанием.

15 Может быть построена калибровочная кривая, где величина измеряемого сигнала (например, интенсивности флуоресценции) является функцией аффинности связывания между мишенью и зондом. Поскольку аффинность связывания между мишенью и множеством различных зондов меняется в зависимости от числа ошибочно спаренных оснований, природы этих ошибочных спариваний (A-G против A-C против T-G против T-C и

20 т.д.), местоположения ошибочного спаривания (ошибочных спариваний) в квадруплексе и т.д., анализ данного изобретения может быть использован для секвенирования мишени.

В вариантах измеряемым сигналом может быть интенсивность флуоресценции флуорофора, включенного в тест-пробу. В таких вариантах аффинность связывания между зондом и мишенью может прямо или обратно коррелировать с этой интенсивностью в

25 зависимости от того, сигнализирует ли флуорофор о гибридизации посредством гашения сигнала или усиления сигнала. При выбранных условиях интенсивность флуоресценции, генерируемая интеркалирующимися агентами, может прямо коррелировать с аффинностью связывания зонд-мишень, тогда как интенсивность эмиссии предпочтительных вариантов, использующих неинтеркалирующийся флуорофор, ковалентно связанный с зондом, может

30 обратно коррелировать с аффинностью связывания зонд-мишень. Интенсивность флуоресценции уменьшается для неинтеркалирующихся флуорофоров по мере увеличения степени правильного спаривания между зондом и мишенью, предпочтительно на протяжении диапазона, включающего в себя 0-2 ошибочных спаривания и/или делеций, более предпочтительно на протяжении диапазона, включающего в себя 0-3 ошибочных

35 спаривания и/или делеций.

Данное изобретение позволяет количественно определять аффинность связывания между зондом и мишенью. Такая информация может быть полезной для различных применений, в том числе для конструирования антисмысловых лекарственных средств с оптимизированными характеристиками связывания.

40 Анализ данного изобретения является предпочтительно гомогенным. Этот анализ может проводиться без отделения комплекса зонд-мишень от свободных зонда и мишени перед детектированием величины измеряемого сигнала. Анализ не требует стадии разделения на геле, позволяя значительно увеличить производительность тестирования. Количественные анализы являются простыми и точными. В результате этот анализ связывания сберегает

45 большое количество времени, снижает расходы и может быть легко автоматизирован. Кроме того, он позволяет быстро определять переменные связывания, такие как буфер, pH, концентрацию ионов, температуру, время инкубирования, относительную концентрацию последовательностей зонда и мишени, концентрацию интеркалятора, длину последовательностей-мишеней, длину последовательностей зонда и возможные

50 требования кофактора (т.е. промотора).

Анализ может, например, проводиться в растворе в лунке или микроканале, на непроницаемой поверхности или на биочипе. В некоторых вариантах третью и четвертую цепи обеспечивают в гибридационной среде перед первой и второй цепями, а первую и

вторую цепи обеспечивают в дегидратированной форме перед повторной гидратацией посредством контакта с гибридационной средой.

Кроме того, анализ данного изобретения предпочтительно проводят без обеспечения гасящего сигнала агента на мишени или на зонде.

5 Хотя авторы изобретения описали ранее преимущества анализов интенсивности флуоресценции для гибридизации (см., например, заявку на патент США US 09/224505, поданную 31 декабря 1998 года), некоторые варианты анализа данного изобретения специфически детектируют квадруплексы зонда и двухцепочечной мишени, устраняя таким образом необходимость денатурации мишени. Авторы данного изобретения неожиданно  
10 смогли специфически анализировать квадруплексы, образованные между двухцепочечными зондами и двухцепочечными мишенями, причем взаимодействие между этими зондами и мишенями основано на спаривании оснований по Уотсону-Крику (по меньшей мере, в том смысле, что А связывается с Т (или с U, в случае РНК), а G связывается с С), а не на очень ограниченной модели Хугстина гибридизации  
15 квадруплексов, например, Pitneret al., supra.

Подходящие зонды для применения в анализе данного изобретения включают в себя, например, дцДНК, дцРНК, гибриды ДНК:РНК, дцПНК, гибриды ПНК:ДНК и другие двухцепочечные аналоги нуклеиновых кислот, имеющие незаряженные или частично  
20 заряженные скелеты. Предпочтительными являются последовательности зондов, имеющие любую длину от 8 до 20 оснований, так как этот диапазон является диапазоном, в котором обнаружены самые малые уникальные ДНК-последовательности прокариот и эукариот. Особенно предпочтительными являются зонды из 12-18 оснований, так как эта длина является длиной самых малых уникальных последовательностей в геноме человека. В вариантах наиболее предпочтительными являются зонды из 5-30 оснований. Однако  
25 множество более коротких зондов могут быть использованы для обнаружения нуклеотидной последовательности, имеющей в ней множество неуникальных последовательностей-мишеней, которые комбинируют для уникальной идентификации нуклеотидной последовательности. Длина этого зонда может быть выбрана таким образом, чтобы она соответствовала длине мишени.

30 Данное изобретение не требует применения радиоактивных зондов, которые являются вредными, утомительными и трудоемкими в применении и должны постоянно регенерироваться. Зонды данного изобретения являются предпочтительно безопасными для применения и стабильными в течение многих лет. Таким образом, зонды могут быть приготовлены или заказаны в больших количествах и продолжительно храниться.

35 В вариантах зонд метят мультимолекулярным комплексом передачи сигнала или окислительно-восстановительной парой, или меткой, которая индуцирует хемилюминесцентные или электролюминесцентные свойства.

Когда флуоресцентный интеркалятор не присутствует в гибридационной среде, предпочтительно, чтобы зонд или мишень (предпочтительно зонд) имели флуоресцентную  
40 метку, ковалентно связанную с ними. Эта метка является предпочтительно неинтеркалирующим флуорофором. В таких вариантах флуорофор предпочтительно связан с зондом на любом конце. Предпочтительные флуоресцентные маркеры включают в себя биотин, родамин и флуоресцеин и другие маркеры, которые флуоресцируют при облучении возбуждающей энергией.

45 Длину волны возбуждения выбирают (рутинным экспериментированием и/или в соответствии с общепринятыми знаниями) таким образом, чтобы она соответствовала максимуму возбуждения для используемого флуорофора, и она равна предпочтительно 200-1000 нм. Флуорофоры предпочтительно выбирают таким образом, чтобы они имели длину волны возбуждения 200-1000 нм. В предпочтительных вариантах используют  
50 аргонный ионный лазер (лазер на ионизированном аргоне) для облучения флуорофора светом, имеющим длину волны в диапазоне 400-540 нм, а флуоресцентное излучение детектируют в диапазоне 500-750 нм.

Анализ данного изобретения может проводиться в диапазоне большого разнообразия

температур, таком как, например, 5-85°C. Некоторые анализы предыдущего уровня техники требуют повышенных температур, что увеличивает стоимость и препятствует применению этого анализа. С другой стороны, данное изобретение может проводиться при комнатной температуре или более низкой температуре (например, при температуре ниже 25°C).

5 Достоверность данного изобретения не зависит от содержания гуанина и цитозина в указанной мишени. Поскольку пары G-C оснований образуют три водородные связи, тогда как пары A-T оснований образуют только две водородные связи, последовательности мишени и зонда с более высокими содержаниями G или C являются более стабильными, обладающими более высокими температурами плавления. В результате ошибочные спаривания оснований, которые увеличивают содержание G-C гибридов зонда и района мишени выше содержания, присутствующего в правильно спаренных гибридах, могут компенсировать слабость связывания, ассоциированную с ошибочно спаренным зондом.

15 Анализ данного изобретения является чрезвычайно чувствительным, устраняющим тем самым необходимость проведения ПЦР-амплификации мишени. Например, можно анализировать тест-пробу, имеющую объем приблизительно 20 микролитров, которая содержит приблизительно 10 фемтомоль мишени и приблизительно 10 фемтомоль зонда. Варианты данного изобретения являются достаточно чувствительными для анализа мишеней при концентрации  $5 \times 10^{-9}$  M, предпочтительно при концентрации не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  M. Варианты данного изобретения являются достаточно чувствительными для использования зондов при концентрации  $5 \times 10^{-9}$  M, предпочтительно при концентрации не более, чем  $5 \times 10^{-10}$  M. Нет необходимости говорить о том, что приведенные величины не подразумевают того, что данный способ не может детектировать более высокие концентрации.

25 Отношение зонда (например, первой и второй цепей) к мишени (например, третьей и четвертой цепей) равно 30:1-1:1, предпочтительно приблизительно 10:1.

30 Примеры покажут, что YOYO-1, известный находящийся в малой бороздке интеркалятор дуплексной ДНК, может облегчать триплексную ассоциацию или связывание ДНК-олиго с дуплексной мишенью и сигнализировать об этой ассоциации и этом связывании, которое является показателем степени комплементарности, определяемой на основе узнавания пар оснований Уотсона-Крика между основаниями на этом олиго и основаниями комплементарной последовательности в дуплексной мишени.

35 Наблюдаемое связывание триплекса не может быть версией гомопиримидинового триплексного мотива, хорошо охарактеризованного в литературе, вследствие требования этими комплексами высококислотных условий. Подобным образом, если типичный 15-мерный олигонуклеотид дикого типа с 33% содержанием GC авторы изобретения оценивали в качестве партнера связывания с "обогащенной пуринами цепью" в дуплексной мишени, как это требуется для гомопуринового триплексного мотива, то олигонуклеотид авторов изобретения имел ошибочные связывания с 9 основаниями либо в олиго-последовательности, либо в предположительном сайте связывания на обогащенной пуринами цепи дуплекса-мишени.

45 Интеркалятор YOYO-1 был сообщен Johansen and Jacobsen (1988) в качестве находящегося в малой бороздке дуплексной ДНК на основании спектроскопических ЯМР-анализов. Сообщалось также, что YOYO-1 действовал, локально деконденсируя В-конформацию этой дуплексной ДНК на 106°, приводя к общему спиральному повтору 13 пар оснований, а не 10 пар оснований, обычно обнаруживаемых в В-конформации спирального повтора.

50 Излучение YOYO-1 в качестве флуорофора значительно усиливалось добавлением комплементарного олигонуклеотида к среде, несущей дуплексную мишень. Это усиленное излучение, связанное с взаимодействием олигонуклеотида и дуплекса, может быть приписано либо YOYO-1, присутствующему в малой бороздке дуплекса и излучающему свет более энергично после контактирования олигонуклеотида с этим дуплексом, либо

нахождению YOYO-1 второго удобного места для его локализации в бороздке, создаваемой олигонуклеотидом и комплементарной цепью в этом дуплексе при контактировании друг с другом их соответствующих оснований. Возможным является также и то, что происходят оба эти события. Дополнительные исследования, такие как рентгеновская кристаллография и ЯМР-спектроскопия, смогут установить возможные локализации и взаимодействия YOYO-1 с природным триплексом.

Johansen and Jacobsen (1988) сделали вывод, что деконденсация этого дуплекса ДНК на  $10^6^\circ$  вызывается бис-интеркаляцией хромофора YOYO-1, тогда как полипропиленаминовая линкерная цепь остается в малой бороздке этого дуплекса. Это может быть частью механизма, при помощи которого мишень деконденсируется на  $10^6^\circ$  с релаксацией, которая будет быстро распространяться из сайта взаимодействия YOYO-1 в обоих направлениях. Может быть также возможным, что +4-катионная природа YOYO-1, локализованного в малой бороздке между скелетом этого дуплекса, приводит к релаксации отталкивания между фосфатными анионными зарядами в непосредственной близости от сайта связывания YOYO-1, заставляя цепи скелета смещаться более близко друг к другу поблизости от YOYO-1. Если второй YOYO-1 должен сам находиться вблизи YOYO-1, присутствующего в малой бороздке, то этот YOYO-1 будет также действовать, уменьшая анионное отталкивание между скелетом олигонуклеотида и комплементарным районом последовательности этого скелета.

Авторы наблюдали также, что реагенты, которые конденсируют дуплексную ДНК, способны облегчать образование триплекса. Наряду; хорошо известной способностью одновалентных, двухвалентных и поливалентных катионов конденсировать дуплексную ДНК, результаты авторов данного изобретения предполагают, что катионы образуют мостики, которые обеспечивают возможность связывания между основаниями в олигонуклеотиде и основаниями в комплементарной цепи этого дуплекса. Авторы данного изобретения показали это образованием сначала триплексов, облегченных катионами, и затем разрушением мостиковых структур. Результатом продолжающейся обработки лазером среды, в которой присутствовали эти катионы и триплекс, было быстрое исчезновение всех триплексных структур.

Опыт исследований авторов данного изобретения с триплексами, образованию которых способствует YOYO-1, показал, что они легко образуются при комнатной температуре и сохраняются в течение многих часов после их образования. Со временем ошибочно спаренные олигонуклеотиды сохраняют один и тот же более низкий уровень излучения флуорофора, показывая один и тот же уровень образования триплекса. С другой стороны, катионы, по-видимому, приводят к транзиторным условиям, которые являются благоприятными для образования триплекса или квадруплекса. Катионы включали интеркаляторы, такие как YOYO-1, катионы центров металлов, таких как  $MgCl_2$ , или катионные пептиды, такие как спермидин, все из которых действуют на конформацию посредством взаимодействия с анионными зарядами, приводя к модификации конформации этой дуплексной ДНК-мишени. Результаты варьировались в зависимости от вида катиона, концентрации или присутствия нескольких видов катионов при варьирующихся концентрациях.

Авторы данного изобретения показали, что подходящие концентрации органических растворителей позволяют модифицировать дуплексную ДНК-мишень, что позволяет образовывать триплексы.

Транзиторная (временная) природа большей части образования триплексов и квадруплексов согласуется с требованием организма того, что многие процессы, включающие в себя оценку информации последовательности из дуплексной ДНК, должны быть легко обрабатываемыми, т.е. легко активироваться и терминироваться. Тем не менее, такие образования являются достаточно стабильными, чтобы на их основе могли быть созданы диагностические и другие анализы.

Таким образом, авторы данного изобретения обнаружили, что именно конденсация или деконденсация дуплексной ДНК, каким бы образом она ни происходила, делает возможным

узнавание между олигонуклеотидом и комплементарной последовательностью достаточным для получения контактирования, по меньшей мере, одного основания на этом олигонуклеотиде с основанием в комплементарной цепи дуплексной мишени. Возможно, существует ряд отклонений от положения, которыми обычно пользуются соседние пары оснований в последовательности, когда размер спирального повтора модифицируется конденсацией или деконденсацией. Это нарушение выстроенных в виде стопки (стекинга) пар оснований в модифицированной спирали, наиболее вероятно, обеспечивает возможность достаточного изменения в орбитах электронов от присутствующего состояния внутри стопки оснований немодифицированной двойной спирали, чтобы позволить начаться связыванию третьей цепи с комплементарной цепью.

Модификация дуплекса либо конденсацией, либо деконденсацией может происходить довольно однородным образом, при котором все анионные заряды в этой дцДНК и вблизи нее испытывают воздействие обычно в одно и то же время или модификация может быть локализованной. В последнем случае будет происходить ряд сильно варьирующихся модификаций в парах оснований ДНК и скелетах, все более и более удаленных от локуса модификации. В условиях обоих случаев могут быть созданы условия, позволяющие связывающему событию между основанием на олигонуклеотиде и основанием в комплементарной цепи этого дуплекса генерировать спаривание с образованием триплекса. Должно быть понятно, каким образом после начала такого связывания две фланкирующие последовательности оснований этого олигонуклеотида могут вступить в положение для связывания с основаниями во фланкирующих последовательностях комплементарной цепи этого дуплекса.

Хотя эксперименты авторов изобретения показывают высокую стабильность в триплексах, образование которых облегчается YOYO-1, многие другие реагенты оказывают влияние на конформацию дуплексной ДНК, которое приводит к тому, что природные триплексы образуются временно (транзиторно). Эти тройные спиральные структуры продолжают переходить в конформации, которые являются менее благоприятными для сохранения триплекса, приводя к потере триплексной структуры.

Любой агент, способный модифицировать конформацию дцДНК-мишени, должен быть подвергнут мониторингу в отношении его действий на протяжении времени для установления концентраций и периодов инкубации, пригодных в выбранных условиях температуры, pH и т.д. Данная заявка описывает способы оценки таких реагентов, которые могут быть использованы или модифицированы специалистами с квалификацией в данной области таким образом, чтобы использовать на практике то, что здесь описано.

Данное изобретение будет иллюстрироваться более подробно со ссылкой на следующие примеры, но должно быть понятно, что данное изобретение не ограничивается этими примерами.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Данное изобретение будет иллюстрироваться более подробно со ссылкой на следующие примеры, но должно быть понятно, что данное изобретение не ограничивается этими примерами.

Пример 1

Пример 1 демонстрирует, что анализ данного изобретения может различать между точно комплементарными комплексами дцДНК:оцДНК и комплексами дцДНК:оцДНК, содержащими ошибочные спаривания или делеции 1 пары оснований, 2 пар оснований и 3 пар оснований в присутствии катионного интеркалятора ДНК, YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Спектроскопические ЯМР-анализы механизма взаимодействия между YOYO-1 и дцДНК показали, что интеркаляция YOYO-1 приводит к локализованной деконденсации спирали дцДНК на  $106^\circ$ , создавая общий спиральный повтор из 13 пар оснований в отличие от нормального спирального повтора из 10 пар оснований в неконденсированной B-конформации дцДНК [J. Biomolec. Struct. and Dynamics 16, 205-222 (1998)].

Комплементарные смысловые и антисмысловые 50-мерные последовательности-

мишени оцДНК, происходящие из экзона 10 гена муковисцидоза человека [Nature 380, 207 (1996)], синтезировали на ДНК-синтезаторе (Expedite 8909, PerSeptive Biosystem) и очищали при помощи ВЖХ. Эквимольные количества комплементарных олигонуклеотидов нагревали при 95°C в течение 10 минут и давали им отжигаться постепенно по мере

5 снижения температуры до 21°C на протяжении 1,5 часов. дцДНК-олигонуклеотиды растворяли в ддН<sub>2</sub>О при концентрации 1 пмоль/мкл.

Последовательность для смысловой цепи ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1) была: 5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT CTT TGG TGT TTC СТА TGA TGA ATA ТА-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1)

10 была:

5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGC СА-3'.

SEQ ID NO:2 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1), за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой) в положении аминокислоты 507, в котором CAT

15 последовательности смысловой цепи дикого типа был заменен на CGT.

Последовательность для смысловой цепи SEQ ID NO:2 была:

5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CGT CTT TGG TGT TTC СТА TGA TGA ATA ТА-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи (SEQ ID NO:2) была:

5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA CGA TAT TTT CTT TAA TGG TGC СА-3'.

20

SEQ ID NO:3 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1), за исключением мутации последовательных двух пар оснований (подчеркнутых) в положениях аминокислот 506 и 507, в которых CAT последовательности смысловой цепи дикого типа был заменен на ACT.

Последовательность для смысловой цепи SEQ ID NO:3 была:

25

5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACT CTT TGG TGT TTC СТА TGA TGA ATA ТА-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи SEQ ID NO:3 была:

5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGA GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGC СА-3'.

30

SEQ ID NO:4 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1), за исключением мутации последовательных трех пар оснований (подчеркнутых) в положениях аминокислот 506 и 507, в которых CAT последовательности смысловой цепи дикого типа был заменен на ACG.

Последовательность для смысловой цепи SEQ ID NO:4 была:

5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT ACG CTT TGG TGT TTC СТА TGA TGA ATA ТА-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи SEQ ID NO:4 была:

35

5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAA AGC GTA TAT TTT CTT TAA TGG TGC СА-3'.

SEQ IDNO:5 была 47-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1), за исключением делеции последовательных трех пар оснований (показанных тремя точками) в положениях аминокислот 507 и 508, в которых CTT последовательности и смысловой цепи дикого типа

40 был делетирован.

Последовательность для смысловой цепи SEQ ID NO:5 была:

5'-TGG CAC CAT TAA AGA AAA TAT CAT... TGG TGT TTC СТА TGA TGA ATA ТА-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи SEQ ID NO:5 была:

5'-TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC СА... А TGA TAT TTT CTT TAA TGG TGC СА-3'.

45

Зонд №1 был 15-мерным оцДНК-зондом, сконструированным таким образом, что он является полностью комплементарным 15-нуклеотидному сегменту смысловой цепи 50-мерной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1), охватывающим положения аминокислот 505-510 [(Nature 380, 207 (1996))]. Хиральность этого зонда была противоположной или антипараллельной хиральности смысловой цепи в мишени. Зонд №1 синтезировали на

50 ДНК-синтезаторе, очищали при помощи ВЖХ и растворяли в ддН<sub>2</sub>О при концентрации 1 пмоль/мкл.

Последовательность для зонда №1 была:

5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'.

Гибридизационная реакционная смесь (120 мкл) содержала следующее: 6 пмоль дцДНК-мишени, 6 пмоль оцДНК-зонда, 0,5×TBE и 500 нМ интеркалятора ДНК YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение 5 минут, помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали периодически в отношении флуоресцентного излучения по мере увеличения температуры со временем в нагреваемой камере. Одновременные измерения температуры этих проб достигались при помощи регулируемого программным обеспечением датчика температуры, помещенного непосредственно в каждую пробу. Максимальные интенсивности флуоресценции строили в виде графика как функции температуры для каждой анализируемой пробы.

Фигура 1 показывает, что наивысшая интенсивность флуоресценции достигалась при взаимодействии 50-мерной неденатурированной дцДНК-последовательности-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1) с 15-мерным оцДНК-зондом №1 при температуре от 30°C до 85°C. При температурах ниже 65°C,  $T_m$  50-мерной дцДНК дикого типа образовывались комплексы дцДНК:оцДНК, усиленные илтеркалятором ДНК YOYO-1. Когда температура увеличивалась выше 65°C, комплексы дцДНК:оцДНК превращались в комплексы оцДНК:оцДНК. Ясно, что YOYO-1 был способен интеркалироваться и флуоресцировать эффективно в обоих типах комплексов.

В противоположность этому неполностью комплементарные комбинации зонда и мишени, генерирующие ошибочное основание 1 пары оснований (SEQ ID NO: 2+ зонд № 1), ошибочное спаривание последовательных 2 пар оснований (SEQ ID NO: 3+ зонд №1), ошибочное спаривание последовательных 3 пар оснований (SEQ ID NO: 4+ зонд №1) и делецию 3 пар оснований (SEQ ID NO: 5+ зонд №1) приводили к интенсивности флуоресценции, которая была на 57%, 94%, 97% и на 98% более низкой при 30°C и на 47%, 79%, 92% и 91% более низкой при 65°C, соответственно, чем наблюдаемые с точно спаренными последовательностями (фиг.1). Контрольные пробы, содержащие 50-мерные дцДНК-мишени плюс 500 нМ YOYO-1, обнаруживали уровни флуоресценции, которые были равными или более низкими, чем уровень флуоресценции, наблюдаемый с комплексами с 3 ошибочно спаренными основаниями при 30°C (данные не показаны). Уровень флуоресценции, испускаемой пробой оцДНК-зонд №1 плюс 500 нМ YOYO-1, был идентичен уровню флуоресценции, испускаемой одним YOYO-1 (данные не показаны). Когда температура повышалась выше 65°C, степень дискриминации между точным спариванием и ошибочными спариваниями пар оснований уменьшалась, что указывало на постепенный распад структуры дцДНК:оцДНК. При 85°C интенсивность флуоресценции, достигаемая ошибочным спариванием 1 пары оснований, ошибочным спариванием 2 пар оснований, ошибочным спариванием 3 пар оснований и делецией 3 пар оснований, была на 40%, 63%, 92% и 83% более низкой, чем получаемая с точным спариванием (фиг.1). При любой конкретной температуре характерный уровень флуоресценции, испускаемой каждым комплексом, наблюдали на протяжении времени, и он был стабильным между 5 минутами и 24 часами.

Присутствие агента деконденсации ДНК, YOYO-1 позволяло использовать оц-ДНК-зонд для различения между точно комплементарными комплексами дцДНК:оцДНК и комплексами, содержащими ошибочные спаривания 1 пары оснований, 2 пар оснований или 3 пар оснований или делеций без необходимости предварительной денатурации дцДНК-мишеней.

#### Пример 2

Для гарантии того, что анализ интенсивности флуоресценции с использованием агента деконденсации ДНК, оцДНК-зондов и неденатурированных дцДНК-мишеней сможет применяться к зонду и ДНК-мишеням, обладающим разительно отличающимися содержаниями GC (и потенциально различными температурами отжига), синтезировали, очищали и отжигали, как описано выше, новые 15-мерные оцДНК-зонды и 50-мерные дцДНК-последовательности-мишени. Как оцДНК-зонды, так и дцДНК-мишени растворяли в

ддН<sub>2</sub>О при концентрации 1 пмоль/мкл.

SEQ ID NO:6 была 50-мерной последовательностью-мишенью дцДНК-модифицированной из SEQ ID NO:1, где процентное содержание GC было изменено с 30% до 52%.

5 Последовательность для смысловой цепи ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:6) была: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.  
Последовательность для антисмысловой цепи ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:6) была:

5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

10 SEQ ID NO:7 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной SEQ ID NO:6, за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой), при которой CTC последовательности смысловой цепи был заменен на CTT.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:7 была:

5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTT TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

15 Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ ID NO:7 была:

5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CA AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

SEQ ID NO:8 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной SEQ ID NO:6, за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой), при которой CAT последовательности смысловой цепи был заменен на CGT.

20 Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:8 была:

5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CGT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ IDNO:8 была:

5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA CGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

25 SEQ ID NO:9 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК,

идентичной SEQ ID NO:6, за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой), при которой CAT последовательности смысловой цепи был заменен на CTT.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:9 была:

5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CTT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ ID NO:9 была:

30 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA AGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

SEQ ID NO:10 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК,

идентичной SEQ ID NO:6, за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой), при которой CTC последовательности смысловой цепи был заменен на CCC.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:10 была:

35 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CCC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ ID NO:10 была:

5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG GGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

SEQ ID NO:11 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК,

идентичной SEQ ID NO:6, за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой), при которой CTC последовательности смысловой цепи был заменен на CGC.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:11 была:

5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CGC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ ID NO:11 была:

5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG CGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

45 SEQ ID NO:12 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК,

идентичной SEQ ID NO:6, за исключением мутации последовательных двух пар оснований (подчеркнутых), при которых CAT последовательности смысловой цепи был заменен на ACT.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:12 была:

50 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT ACT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ ID NO:12 была:

5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA GTA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

SEQ ID NO:13 была 50-мерной последовательностью-мишенью дцДНК,

модифицированной из SEQ ID NO:1, где процентное содержание GC было изменено с 30% до 72%.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:13 была:

5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CGT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCG TG-  
3'.

Последовательность для антисмысловой цепи ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:13) была:

5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA CGA CCG TGC CTG GGA GGG TGC TC-  
3'.

SEQ ID NO:14 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной SEQ ID NO:13, за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой), при которой CGT последовательности смысловой цепи был заменен на CAT.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:14 была:

Последовательность для смысловой цепи ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:14)

была:

5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT CAT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCG TG-  
3'.

Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ ID NO:14 была:

5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA TGA CCG TGC CTG GGA GGG TGC TC-  
3'.

SEQ IDNO:15 была 50-мерной мутантной последовательностью-мишенью дцДНК, идентичной SEQ ID NO:13, за исключением мутации одной пары оснований (подчеркнутой), при которой CGT последовательности смысловой цепи был заменен на AAT.

Последовательность для смысловой цепи мутантной SEQ ID NO:15 была:

5'-GAG CAC CCT CCC AGG CAC GGT ATT CCC TGG TGC GAC CTC CGA CGA GCG TG-  
3'.

Последовательность для антисмысловой цепи мутантной SEQ IDNO:15 была:

5'-CAC GCT CGT CGG AGG TCG CAC CAG GGA ATA CCG TGC CTG GGA GGG TGC TC-  
3'.

Зонд №2 был 15-мерным оцДНК-зондом, сконструированным таким образом, что он является полностью комплементарным 15-нуклеотидному сегменту смысловой цепи 50-мерной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:6). Хиральность этого зонда была противоположной или антипараллельной хиральности смысловой цепи в этой мишени.

Последовательность для зонда №2 была:

5'-CAC CAG AGA TGA CAG-3'.

Зонд №3 был 15-мерным оцДНК-зондом, сконструированным таким образом, что он является полностью комплементарным 15-нуклеотидному сегменту смысловой цепи 50-мерной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:13). Хиральность этого зонда была противоположной или антипараллельной хиральности смысловой цепи в этой мишени.

Последовательность для зонда №3 была:

5'-CAC CAG GGA CGA CCG-3'.

Условия гибридизационного анализа были идентичны условиям, описанным в примере 1.

При взаимодействии оцДНК-зонда №2 (с содержанием GC 53%) с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) и мутантными дцДНК-мишенями (SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:12) комплексы дцДНК:оцДНК образовывались при низких температурах при неденатурирующих условиях (фиг.2A). В то время, как точно спаренные ДНК-комплексы давали наивысшие интенсивности флуоресценции, неполностью комплементарные комплексы с ошибочным спариванием 1 пары оснований (SEQ ID NO:8+зонд №2) и ошибочными спариваниями последовательных 2 пар оснований (SEQ ID NO:12+ зонд №2) давали интенсивность флуоресценции, которая была на 63% и 95% более низкой, соответственно, чем флуоресценция, наблюдаемая с точно спаренными последовательностями, при 30°C (фиг.2A). Когда температура увеличивалась, происходил

постепенный распад комплекса дцДНК:оцДНК, приводя к уменьшенной интенсивности флуоресценции и меньшему различению между точным спариванием и ошибочными спариваниями пар оснований. При 85°C наблюдали очень небольшое различие во флуоресценции между точно спаренными последовательностями и последовательностями, содержащими ошибочно спаренные пары оснований (фиг.2А).

Подобным образом в присутствии YOYO-1 образовывались комплексы дцДНК:оцДНК при взаимодействии оцДНК-зонда №3 (имеющего содержание GC 73%) с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:13) и мутантными дцДНК-мишенями (SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO:15). Интенсивность флуоресценции для комплекса ДНК с ошибочным спариванием 1 пары оснований (SEQ ID NO:14+ зонд №3) и комплекса ДНК с ошибочным спариванием последовательных 2 пар оснований (SEQ ID NO:15+ зонд №3) была на 48% и 64% более низкой, соответственно, чем интенсивность флуоресценции, полученной с точно спаренными последовательностями, при 30°C (фиг.2В). Флуоресценция всех проб уменьшалась, когда температура увеличивалась с 30°C до 85°C, что свидетельствовало об уменьшении связывания YOYO-1 и распаде комплекса дцДНК:оцДНК.

Независимо от процентного содержания GC оцДНК-зондов и дцДНК-мишеней YOYO-1 был способен облегчать образование комплекса дцДНК:оцДНК при неденатурирующих условиях, облегчая точное различение между точно комплементарными последовательностями и последовательностями, содержащими мутации 1 или двух пар оснований.

#### Пример 3

Следующие примеры демонстрируют специфичность анализа, использующего различные агенты конденсации ДНК для стимуляции и стабилизации образования комплекса с неденатурированными дцДНК-мишенями и оцДНК-F-зондами.

Зонд №4 был 15-мерным антипараллельным оцДНК-зондом, идентичным зонду №1, за исключением того, что он имел присоединенную флуоресцеиновую часть молекулы в 5'-положении. Зонд №4 синтезировали на ДНК-синтезаторе, очищали при помощи ВЖХ и растворяли в ддН<sub>2</sub>О при концентрации 1 пмоль/мкл.

Последовательность для зонда №3 была:

5'-Flu-CAC CAA AGA TGA TAT-3'.

Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,4 пмоль дцДНК-мишени, 4 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого оцДНК-зонда №4, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5 и 10 мМ - 125 мМ NaCl. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение 1 часа без предварительной денатурации дцДНК-мишеней. Пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали в отношении флуоресцентного излучения. Максимальная интенсивность флуоресценции имела место при длине волны 525 нм, длине волны излучения для флуоресцеина. Интенсивность флуоресцентного излучения строили в виде графика как функции длины волны для каждой анализируемой пробы.

В отсутствие NaCl или в присутствии 10 мМ или 25 мМ NaCl не обнаруживали связывания между дцДНК-мишенями и антипараллельным оцДНК-F-зондом (данные не показаны).

После 1-часовой инкубации в присутствии 50 мМ NaCl комплексы дцДНК.-оц-ДНК-F, состоящие из точно комплементарных последовательностей (SEQ ID NO:1+ зонд №4), легко образовывались, приводя к 49% уменьшению интенсивности флуоресцентного излучения в сравнении с интенсивностью флуоресценции, излучаемой контрольным зондом №4 (меченой оцДНК-F) (фиг.3). В противоположность этому неполностью комплементарные комплексы дцДНК:оцДНК-F, содержащие ошибочное спаривание 1 пары основания G-T (SEQ ID NO:2+ зонд №4), давали 11% уменьшения интенсивности флуоресцентного излучения в сравнении с интенсивностью флуоресценции, проявляемой контрольной пробой зонда №4.

Присутствие 75 мМ, 100 мМ и 125 мМ NaCl в реакционной смеси также приводило к гашению флуоресцентного излучения, согласующемуся со значительными количествами

образования комплекса между точно спаренной мишенью SEQ ID NO:1 и антипараллельным зондом №4, и значительно меньшему гашению в присутствии мишени SEQ ID NO:2 с ошибочно спаренной 1 парой оснований G-T и зонда №4, с продуцированием интенсивности флуоресценции, сходной с флуоресценциями, наблюдаемыми в присутствии 50 мМ NaCl (данные не показаны).

Применение одновалентных катионов, которые являются известными агентами конденсации ДНК, способствовало образованию комплекса ДНК между неденатурированными дцДНК-мишенями и флуоресцентно меченными антипараллельными оцДНК-зондами, что позволяло различать между точно комплементарными ДНК-последовательностями и последовательностями, содержащими ошибочное спаривание единственной 1 пары оснований. Эта реакция происходила при комнатной температуре в пределах 1 часа инкубации при отношении зонда к мишени 10:1. дцДНК-мишени и оцДНК-зонд, используемые в этом примере, имели содержание GC 33% и не содержали сегментов гомопуринов или гомопиримидинов ДНК. Несмотря на присутствие 6 пиримидиновых оснований, вставленных в оцДНК-зонде из 15 нуклеотидов, комплексы дцДНК:оц-ДНК образовывались легко последовательность-специфическим образом.

#### Пример 4

Для гарантии того, что анализ интенсивности флуоресценции, который использует 5'-флуоресцеин-меченые оцДНК-зонды и неденатурированные дцДНК-мишени в присутствии агентов конденсации ДНК, таких как катионы, мог бы использоваться для зонда и ДНК-мишеней, имеющих разительно отличающееся процентное содержание GC (и потенциально отличающиеся предпочтения отжига), 15-мерные оцДНК-F-зонды и 50-мерные последовательности дцДНК-мишеней (с варьирующимся процентным содержанием GC) синтезировали, очищали и отжигали, как описано выше. Как оцДНК-F-зонды, так и дцДНК-мишени растворяли в ддН<sub>2</sub>O при концентрации 1 пмоль/мкл.

Зонд №5 был 15-мерным антипараллельным оцДНК-зондом, идентичным зонду №2, за исключением того, что он имел присоединенную флуоресцеиновую часть молекулы на 5'-конце.

Последовательность для зонда №5 была:

5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'.

Зонд №6 был 15-мерным антипараллельным оцДНК-зондом, идентичным зонду №3, за исключением того, что он имел присоединенную флуоресцеиновую часть молекулы на 5'-конце.

Последовательность для зонда №6 была:

5'-Flu-CAC CAG GGA CGA CCG-3'.

Анализы, выполняемые в примере 3, проводили с использованием способствующих образованию комплексов одновалентных катионов в реакционных смесях. Специфичность этого анализа исследовали дополнительно с использованием двухвалентных катионов (вместо одновалентных катионов) для усиления образования комплексов с дцДНК-мишенями и оцДНК-F-зондами, имеющими различное процентное содержание GC.

Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,4 пмоль дцДНК-мишени, 4 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого оцДНК-зонда, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 5 мМ - 30 мМ MnCl<sub>2</sub> или 5 мМ - 30 мМ MgCl<sub>2</sub> или 5 мМ - 30 мМ NiCl<sub>2</sub>. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение 1 часа без предварительной денатурации дцДНК-мишеней. Пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали в отношении флуоресцентного излучения. Максимальная интенсивность флуоресценции имела место при длине волны 525 нм, длине волны излучения для флуоресцеина. Интенсивность флуоресцентного излучения строили в виде графика как функции длины волны для каждой анализируемой пробы.

При инкубировании оцДНК-F-зонда №5 (с содержанием GC 53%) с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) и мутантными дцДНК-мишенями (SEQ ID NO:7 - SEQ ID NO:12) в присутствии MnCl<sub>2</sub> комплексы дцДНК:оцДНК-F образовывались при комнатной

температуре при неденатурирующих условиях. В то время как точно спаренные ДНК-комплексы давали максимальное уменьшение интенсивности флуоресценции (43%-ное уменьшение после 1 часа инкубации), менее стабильные комплексы дцДНК:оцДНК-F, содержащие ошибочное спаривание 1 пары оснований T-G (SEQ ID NO:7+ зонд №5), давали интенсивность флуоресценции, которая была на 20% более низкой, чем интенсивность флуоресценции, наблюдаемая только с зондом №5, после 1 часа инкубации (фиг.4). Комплексы дцДНК:оцДНК-F, которые приводили к ошибочному спариванию 1 пары оснований G-T (SEQ ID NO:8+ зонд №5), ошибочному спариванию 1 пары оснований T-T (SEQ ID NO:9+ зонд №5), ошибочному спариванию 1 пары оснований C-A (SEQ ID NO:10+ зонд №5) и ошибочному спариванию последовательных 2 пар оснований A-G и C-T (SEQ ID NO:12+ зонд №5), - все были менее стабильными, чем точно спаренный комплекс дцДНК:оцДНК-F (SEQ ID NO:6+ зонд №5), дающими интенсивность флуоресценции между интенсивностью флуоресценции, наблюдаемой для одного зонда №5, и интенсивностью флуоресценции, наблюдаемой для точно спаренного ДНК-комплекса (данные не показаны). За исключением комплекса дцДНК:оцДНК-F с ошибочно спаренной 1 парой оснований T-T (приводящего лишь к 5% уменьшению интенсивности флуоресценции после 1 часа), все другие ошибочно спаренные ДНК-комплексы генерировали очень сходную интенсивность флуоресценции. Только комплекс дцДНК:оцДНК-F, который содержал ошибочное спаривание 1 пары оснований G-A (SEQ ID NO:11+ зонд №5), давал интенсивность флуоресценции более низкую, чем интенсивность флуоресценции точно спаренного комплекса дцДНК:оцДНК-F (данные не показаны).

Включение 20 мМ  $MgCl_2$  или 20 мМ  $MnCl_2$ , или 20 мМ  $NiCl_2$  также способствовало образованию комплекса дцДНК:оцДНК-F при взаимодействии оцДНК-F-зонда №6 (имеющего содержание GC 73%) с соответствующей 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:13) и мутантной дцДНК-мишени (SEQ ID NO:14) в течение 1 часа (данные не показаны). Как и ожидалось, точно спаренные комплексы дцДНК:оцДНК-F давали максимальное уменьшение интенсивности флуоресценции, тогда как менее стабильные комплексы дцДНК:оцДНК-F с ошибочно спаренной 1 парой оснований A-C (SEQ ID NO:14+ зонд №6) давали промежуточные уровни флуоресценции (данные не показаны).

Точно спаренные комплексы дцДНК:оцДНК-F (имеющие содержание GC 33%) (SEQ ID NO:1+ зонд №4) образовывались легко в пределах 1 часа в присутствии 10 мМ  $MnCl_2$ , приводя к 57%-ному уменьшению интенсивности флуоресценции в сравнении с интенсивностью флуоресценции, испускаемой одним зондом №4 (данные не показаны). Эти условия реакции были крайне неблагоприятными для комплексов дцДНК:оцДНК-F, которые содержали ошибочное спаривание 1 пары оснований G-T (SEQ ID NO:2+ зонд №4), приводящее к увеличенной флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, наблюдаемой с одним зондом №4 (данные не показаны).

Независимо от процентного содержания GC дцДНК-мишеней и оцДНК-зондов добавление двухвалентных катионов, таких как  $Mn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  и  $Ni^{+2}$ , способствовало образованию комплекса дцДНК:оцДНК при неденатурирующих условиях, позволяя точное различение между точно комплементарными последовательностями и последовательностями, содержащими мутации 1 пары оснований.

#### Пример 5

Анализ образования комплексов дцДНК:оцДНК в примерах 3 и 4 выполняли в присутствии одного типа одновалентного или двухвалентного катиона. Следующие примеры демонстрируют достоверность анализа данного изобретения для различения между точными спариваниями и ошибочными спариваниями в комплексах дцДНК:оцДНК при использовании комбинаций двухвалентных катионов в качестве агентов, способствующих образованию комплексов.

Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,4 пмоль дцДНК-мишени, 4 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого оцДНК-зонда, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 5 мМ - 20 мМ каждого из  $MgCl_2$  и  $MnCl_2$ . Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение 1 часа без предварительной денатурации дцДНК-мишеней.

Пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали в отношении флуоресцентного излучения. Интенсивность флуоресценции строили в виде графика как функции длины волны для каждой анализируемой пробы.

5 При инкубировании антипараллельного оцДНК-F-зонда №6 (с содержанием GC 73%) в течение 1 часа с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:13) в присутствии 20 mM MgCl<sub>2</sub> и 20 mM MnCl<sub>2</sub> эффективно образовывались точно комплементарные комплексы дцДНК:оцДНК-F, дающие 46% уменьшение флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, испускаемой одним зондом №6 (фиг.5A). Эти условия реакции были крайне  
10 неблагоприятными для комплексов дцДНК:оцДНК-F, которые содержали ошибочное спаривание 1 пары оснований А-С (SEQ ID NO:14+ зонд №6), приводящими к 3% уменьшению флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, наблюдаемой с одним зондом №6 (фиг.5A). Очень сходные результаты получали при инкубировании тех же самых проб в течение 1 часа в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub> или 15 mM MgCl<sub>2</sub> и 15 mM  
15 MnCl<sub>2</sub> (данные не показаны). Добавление 5 mM MgCl<sub>2</sub> и 5 mM MnCl<sub>2</sub> было недостаточным для обеспечения образования комплекса между антипараллельным оцДНК-F-зондом №6 и всеми исследованными дцДНК-мишенями после 1 часа инкубирования (данные не показаны).

При инкубировании антипараллельного оцДНК-F-зонда №4 (с содержанием GC 33%) с  
20 дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:1) или мутантными дцДНК-мишенями (SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO:3) в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub> наблюдали минимальное образование ДНК-комплекса (данные не показаны). Однако инкубирование в присутствии 15 mM MgCl<sub>2</sub> и 15 mM MnCl<sub>2</sub> в течение 1 часа облегчало образование точно спаренного комплекса дцДНК:оцДНК-F (SEQ ID NO:1+ зонд №4), как показано 49% уменьшением  
25 наблюдаемой интенсивности флуоресценции в сравнении с интенсивностью флуоресценции, полученной с одним зондом №4 (фиг.5B). Комплексы дцДНК:оцДНК-F, которые приводили к ошибочному спариванию 1 пары оснований G-T (SEQ ID NO:2+ зонд №4) или делеции 3 пар оснований (SEQ ID NO:3+ зонд №4) или, были очень нестабильными в присутствии 15 mM MgCl<sub>2</sub> и 15 mM MnCl<sub>2</sub>, давая 2% уменьшение  
30 флуоресценции и 5% увеличение флуоресценции, соответственно, в сравнении с флуоресценцией, испускаемой одним зондом №4 (фиг.5 B). Обработка 20 mM MgCl<sub>2</sub> и 20 mM MnCl<sub>2</sub> в течение 1 часа приводила к 68%, 48% и 6% уменьшения флуоресценции для точно спаренных комплексов дцДНК:оцДНК-F и для комплексов дцДНК:оцДНК-F, содержащих ошибочное спаривание 1 пары оснований G-T или делецию 3 пар оснований,  
35 соответственно, в сравнении с флуоресценцией, наблюдаемой с одним зондом №4 (данные не показаны).

Как показано на фиг.5C, в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub> комплексы дцДНК-оцДНК-F, имеющие содержание GC 53% и содержащие точно комплементарные последовательности (SEQ ID NO:6+ зонд №5) или ошибочное спаривание 1 пары  
40 оснований T-G (SEQ ID NO:7+ зонд №5), генерировали интенсивность флуоресценции после 1 часа, которая была на 68% и 20% более низкой, соответственно, чем интенсивность флуоресценции, испускаемой одним антипараллельным зондом №5.

При инкубировании антипараллельного оцДНК-F-зонда №5 (с содержанием GC 53%) в течение 1 часа с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) в присутствии 15  
45 mM MgCl<sub>2</sub> и 15 mM MnCl<sub>2</sub> очень эффективно образовывались точно комплементарные комплексы дцДНК:оцДНК-F, дающие 74% уменьшения флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, испускаемой одним зондом №5 (фиг.5D). В противоположность этому комплексы дцДНК:оцДНК-F, которые содержали ошибочное спаривание 1 пары оснований T-G (SEQ ID NO:7+ зонд №5), были гораздо менее стабильными в присутствии 15 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 и 15 mM MnCl<sub>2</sub>, давая 15%-ное уменьшение флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, испускаемой одним зондом №5, после 1 часа инкубирования (фиг.5D). Подобным образом комплексы дцДНК:оцДНК-F, которые приводили к ошибочному спариванию 1 пары оснований G-T (SEQ ID NO:8+ зонд №5), ошибочному спариванию 1

пары оснований C-A (SEQ ID NO:10+ зонд №5), ошибочному спариванию 1 пары оснований G-A (SEQ ID NO:11+ зонд 5) и ошибочному спариванию последовательных 2 пар оснований A-G и C-T (SEQ ID NO:12+ зонд №5), - все были менее стабильными, чем точно спаренный ДНК-комплекс (данные не показаны). При взаимодействии зонда №5 (имеющего содержание GC 53%) с дцДНК-мишенью SEQ ID NO:3 (имеющей содержание GC 33%) наблюдали 3% увеличения флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, полученной с одним зондом №5 (фиг.5D), что свидетельствует об отсутствии образования ДНК-комплекса. Этот результат был ожидаемым с учетом того, что эта комбинация зонда и мишени могла приводить к ошибочному спариванию 5 пар оснований.

В целом, примеры 3, 4 и 5 показывают, что добавление агентов конденсации, таких как одновалентные катионы или двухвалентные катионы (по отдельности или в комбинации), способствовало образованию ДНК-комплексов между дцДНК-мишенями и флуоресцентно-меченными оцДНК-зондами, имеющими разительно отличающееся процентное содержание GC, что обеспечивает точное и достоверное различие (дискриминацию) между точно комплементарными последовательностями и последовательностями, содержащими различные мутации 1 пары оснований.

#### Пример 6

Комплексы дцДНК:оцДНК, образование которых облегчается YOYO-1, легко образуются при комнатной температуре в пределах 5 минут анкубирования и генерируют флуоресцентные излучения на одном и том же уровне интенсивности в течение часов. Комплексы, содержащие ошибочные спаривания пар оснований, также испускают сигналы флуоресценции, которые сохраняются, показывая один и тот же уровень образования комплексов на протяжении времени. Для испытания скорости образования, стабильности и скорости диссоциации комплексов дцДНК:оцДНК, образованных в присутствии конденсирующих агентов, таких как катионы, выполняли эксперименты с исследованием временного хода этого процесса.

Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,4 пмоль неденатурированной дцДНК-мишени, 4 пмоль 5'-флуоресцеин-меченного оцДНК-зонда, 10 mM Трис-HCl, pH 7,5 и 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub>. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение различных периодов времени в диапазоне от 1 минуты до 2 часов. После инкубирования пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали флуоресцентное излучение. Дополнительные измерения флуоресценции выполняли для тех же самых проб после последующего множественного лазерного облучения в указанных временных точках (фиг.6). Интенсивность флуоресценции строили в виде графика как функции времени для каждой анализируемой пробы.

Флуоресценция, испускаемая контрольными пробами, содержащими 4 пмоль зонда №5 плюс 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub> в отсутствие дцДНК-мишени, разительно уменьшалась в 3 раза в пределах всего лишь 5 минут инкубирования (данные не показаны) и затем стойко снижалась при гораздо более медленной скорости в пределах следующих нескольких часов (фиг.6A). Этот эффект авторы изобретения называют «катионным гашением». Это ингибирование флуоресценции, связанное с увеличенными периодами инкубирования зондов оцДНК-F со специфическими катионами, происходило рутинным образом в присутствии двухвалентных катионов, но не в присутствии одновалентных катионов (данные не показаны). Это наблюдение делает очевидным важность инкубирования контрольной пробы в эксперименте при точно таких же условиях, при которых взаимодействуют тест-пробы эксперимента. Множественные облучения лазером каждой контрольной пробы оцДНК-F после варьирующихся периодов инкубирования ингибировало дальнейшее гашение флуорофора, приводя к постоянному уровню флуоресценции после этого (фиг.6A). Этот результат был совершенно непонятным.

При инкубировании антипараллельного оцДНК-F-зонда №5 с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub> образование комплекса дцДНК:оцДНК-F было очевидным после 15 минут инкубирования и приводило к

уменьшению флуоресценции, которое было на 6% более высоким, чем прогрессивное катионное гашение контрольного зонда №5 (фиг.6B). Образование комплекса в сильной степени обнаруживали после 30 и 60 минут инкубирования SEQ ID NO:6 с зондом №5 в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub> с генерированием 76% и 61% уменьшения

5 флуоресценции, соответственно, в сравнении с флуоресценцией, достигаемой одним катионно гасящимся зондом 5 (фиг.6B). После 90 и 120 минут инкубирования в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub> не было сигналов образования комплекса (фиг.6B). Уровень флуоресцентного излучения, наблюдаемый при 90 и 120 минутах, приписывали полностью эффекту катионного гашения (сравните фиг.6A и 6B).

10 В противоположность этому комплексы дцДНК:оцДНК-F, которые содержали ошибочное спаривание 1 пары оснований T-G (SEQ ID NO:7+ зонд №5), образовывались при более медленной скорости и были гораздо менее стабильными после образования в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub>. Комплекс с ошибочным спариванием 1 пары оснований T-G наблюдали сначала после 30 минут инкубирования, и он, по-видимому, элиминировался

15 после 60 минут инкубирования (фиг.6C). Опять этот зонд был антипараллельным комплементарной цепи в данном дуплексе (фиг.6C).

Множественное лазерное облучение полностью комплементарных комплексов дцДНК-оцДНК-F (SEQ ID NO:6+ зонд №5), образованных после 30 минут или 60 минут инкубирования в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 10 mM MnCl<sub>2</sub>, приводило к флуоресцентным

20 излучениям, согласующимся с деструкцией этих комплексов при скорости, характерной для комплексов ДНК, содержащих антипараллельный оцДНК-зонд (фиг.6B). При выполнении следующего измерения при 45 минутах после лазерного облучения точно комплементарного комплекса при 30 минутах уровень интенсивности флуоресценции был 1869, что свидетельствует о быстроте, с которой разрушается этот комплекс (данные не

25 показаны). Уровень флуоресцентного излучения после множественных лазерных облучений возвращался к величинам катионного гашения, наблюдаемым с использованием одного не находящегося в комплексе зонда №6 в качестве контроля (срав. фиг.6A и 6B). Единственным исключением были точно спаренные комплексы, образованные после 15 минут инкубирования и периодически облучаемые после этого (фиг.6B). В этом случае

30 флуоресцентное излучение не согласовалось с деструкцией этих комплексов (фиг.6B), даже хотя дальнейшее катионное гашение зонда №5, при множественном облучении после 15 минут инкубирования, полностью ингибировалось (фиг.6A). Комплексы дцДНК:оцДНК-F, содержащие ошибочное спаривание 1 пары оснований T-G (SEQ ID NO:7+ зонд №5), были также явно разрушенными множественным лазерным облучением (фиг.6C).

35 Проводили эксперимент для определения причины действия множественного лазерного облучения на эти комплексы. Было обнаружено, что при добавлении свежих катионов к реакционной смеси, которая была облучена при помощи лазера два раза, ингибирование катионного гашения флуоресценции, испускаемой оцДНК-F-зондом, не происходит после

40 дополнительного инкубирования, что в сильной степени предполагает, что оцДНК-зонд-F инактивировался множественным лазерным облучением посредством пока еще неизвестного механизма (данные не показаны). Подобным образом при добавлении свежих оцДНК-F-зондов к реакционной смеси, которая была облучена при помощи лазера два раза, после нормализации в отношении увеличенного флуоресцентного излучения свежего зонда не наблюдали последующего прогрессирующего катионного гашения после

45 дополнительного инкубирования этой реакционной смеси, что в сильной степени предполагает, что облученные лазером катионы были каким-то образом выведены из строя (данные не показаны).

#### Пример 7

50 Примеры 1-6 продемонстрировали образование комплекса дцДНК:оцДНК последовательность-специфическим образом между дцДНК-мишенями и оцДНК-зондами при усилении образования комплексов либо агентами деконденсации ДНК, такими как YOYO-1, либо агентами конденсации ДНК, такими как одновалентные или двухвалентные катионы. Следующие примеры исследуют скорость образования, стабильность и скорость

диссоциации комплексов дцДНК:дцДНК, образуемых в присутствии различных катионов. Эти примеры покажут, каким образом катион, концентрация каждого катиона и комбинация различных катионов при различных концентрациях влияют на скорость образования, стабильность и скорость диссоциации образованных комплексов дцДНК:дцДНК.

5 Комплементарные смысловые и антисмысловые 15-мерные последовательности оцДНК-зондов синтезировали на ДНК-синтезаторе и очищали при помощи ВЖХ. Эквимольные количества комплементарных олигонуклеотидов нагревали при 95°C в течение 10 минут и давали им отжигаться постепенно по мере снижения температуры до 21°C на протяжении 1,5 часов. дцДНК-олигонуклеотиды растворяли в ддН<sub>2</sub>O при концентрации 1 пмоль/мкл.

10 Зонд №7 был дцДНК-зондом 15 п.н. с присоединенной флуоресцеиновой частью в каждом 5'-положении, сконструированным таким образом, что он является полностью гомологичным сегменту 15 п.н. 50-мерной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ED NO:6). Антисмысловая цепь зонда №7 была идентична зонду №5.

Последовательность для смысловой цепи зонда №7 была:

15 5'-Flu-CTG TCA TCT CTG GTG-3'.

Последовательность для антисмысловой цепи зонда №7 была:

5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'.

Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,4 пмоль неденатурированной дцДНК-мишени, 4 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого дцДНК-зонда, 10 20 mM Трис-HCl, pH 7,5, 70 mM - 90 mM KCl и 0 mM - 20 mM NaCl. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение различных периодов времени в диапазоне от 1 минуты до 2 часов. После инкубирования пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали в отношении флуоресцентного излучения. Интенсивность флуоресценции строили в виде графика как функции времени для каждой анализируемой пробы.

25 Флуоресценция, испускаемая контрольными пробами, содержащими 4 пмоль зонда №7 плюс 90 mM KCl в отсутствие дцДНК-мишени, оставалась относительно постоянной на протяжении 120 минут инкубирования, что указывает на то, что в присутствии одновалентного KCl не происходило катионное гашение дцДНК-F-зонда (фиг.7А). При инкубировании дцДНК-F-зонда №7 с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) и мутантной дцДНК-мишенью (SEQ ID NO:7) в присутствии 90 mM KCl комплексы дцДНК: дцДНК-F образовывались при комнатной температуре в неденатурирующих условиях в пределах всего лишь 15 минут инкубирования и сохранялись в течение, по меньшей мере, 120 минут (фиг.7А). Максимальное различие между точно спаренными и имеющими 35 ошибочно спаренную 1 пару основания комплексами дцДНК:дцДНК-F наблюдали после 30 и 45 минут инкубирования в присутствии 90 mM KCl, причем эти комплексы генерировали интенсивности флуоресценции, которые были на 27% и на 3% более низкими, соответственно, после 30 минут и на 34% и 15% более низкими, соответственно, после 45 минут, чем интенсивность флуоресценции, испускаемая одним зондом №7 (фиг.7А).

40 В присутствии 70 mM KCl и 20 mM NaCl комплексы дцДНК:дцДНК-F, содержащие точно спаренные последовательности (SEQ ID NO:6+ зонд №7) или ошибочное спаривание 1 пары оснований (SEQ ID NO:7+ зонд №7), продуцировали интенсивности флуоресценции, которые были на 47% и на 19% более низкими, соответственно, после 30 минут и на 35% и 14% более низкими, соответственно, после 45 минут, чем интенсивность флуоресценции, испускаемая одним зондом №7 (фиг.7В). Небольшое количество катионного гашения контрольной пробы дцДНК-F-зонда №7 наблюдали на протяжении 120 минут инкубирования в присутствии 70 mM KCl и 20 mM NaCl (фиг.7В). Это минимальное катионное гашение было обусловлено включением NaCl, который в случае его отдельного присутствия вызывает сходное прогрессирующее гашение флуоресценции Зонда №7 50 (данные не показаны).

Присутствие 80 mM KCl и 10 mM NaCl преимущественно способствовало образованию точно спаренного комплекса дцДНК:дцДНК-F между дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) и дцДНК-F-зондом №7, приводя к уменьшению флуоресцентного излучения 18%,

46% и 34% после 30 минут, 45 минут и 60 минут инкубирования, соответственно, в сравнении с флуоресценцией, испускаемой из контрольной пробы зонда №7 в тех же временных точках (фиг.7С). В противоположность этому образование комплексов дцДНК: дцДНК-F с ошибочно спаренной 1 парой оснований (SEQ ID NO:7+ зонд №7) было очень неэффективным на протяжении всего 120-минутного инкубирования в присутствии 80 мМ KCl и 10 мМ NaCl, как показано низким 1%-5% уменьшением флуоресценции, наблюдаемым с этими ошибочно спаренными комплексами, в сравнении с флуоресценцией, обнаруживаемой Зондом №7 (фиг.7С).

Таким образом, включение одновалентных катионов, таких как KCl и NaCl, при концентрациях, близких к физиологическим, способствовало образованию ДНК-комплексов между неденатурированными дцДНК-мишенями и флуоресцентно-мечеными дцДНК-зондами. Образование комплекса происходило на основе узнавания гомологичных пар оснований с измеряемым и значимо большим количеством образования комплекса между полностью спаренными гомологичными цепями дуплекса. Эта реакция происходила при комнатной температуре в пределах относительно коротких периодов инкубирования 15 минут - 60 минут при отношении зонда к мишени 10:1. дцДНК-мишени и дцДНК-зонд, используемые в этом примере, были гомологичными, имели содержание GC 53% и не содержали гомопуриновых или гомопиримидиновых сегментов на любой цепи ДНК. Анализ данного изобретения был способен идентифицировать точно спаренные последовательности дцДНК и последовательности, содержащие пару ошибочно спаренных оснований, с использованием дцДНК-зондов.

#### Пример 8

Анализы, выполненные в примере 7, облегчались добавлением одновалентных катионов в реакционных смесях. Этот пример будет демонстрировать скорость образования, стабильность и скорость диссоциации комплексов дцДНК:дцДНК, образуемых в присутствии двухвалентных катионов. Условия реакции были идентичны условиям, описанным в примере 7, за исключением того, что KCl и NaCl заменяли 30 мМ - 40 мМ каждым из MgCl<sub>2</sub> и MnCl<sub>2</sub>.

Контрольная проба дцДНК-F-зонда №7 обнаруживала прогрессирующее уменьшение флуоресценции с увеличением времени инкубирования в присутствии 20 мМ MgCl<sub>2</sub> и 30 мМ MnCl<sub>2</sub> (фиг.8А) или 40 мМ MgCl<sub>2</sub> и 40 мМ MnCl<sub>2</sub> (фиг.8В). Это катионное гашение было сходным с катионным гашением, наблюдаемым с оцДНК-F-зондом №5 в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 10 мМ MnCl<sub>2</sub> (фиг.6А).

При инкубировании дцДНК-F-зонда №7 с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) в присутствии 30 мМ MgCl<sub>2</sub> и 30 мМ MnCl<sub>2</sub> образование комплекса дцДНК:дцДНК-F было очевидным после 60 минут инкубирования, приводящим к уменьшению флуоресценции, которое было на 13% более высоким, чем прогрессирующее катионное гашение контрольного зонда №7 (фиг.8А). Образование комплекса было высоким после 75 минут инкубирования SEQ ID NO:6 с зондом №7 в присутствии 30 мМ MgCl<sub>2</sub> и 30 мМ MnCl<sub>2</sub>, генерирующим 81% уменьшение флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, получаемой одним катионно гасящимся зондом №7 (фиг.8А). Комплексы дцДНК:дцДНК, которые содержали ошибочное спаривание 1 пары оснований (SEQ ID NO:7+ зонд №7), также образовывались после 60 минут и 75 минут инкубирования в присутствии 30 мМ MgCl<sub>2</sub> и 30 мМ MnCl<sub>2</sub>, генерируя 16% и 30% уменьшения флуоресценции, соответственно, в сравнении с флуоресценцией, получаемой с использованием одного катионно гасящегося зонда №7 (фиг.8А). После 90 и 120 минут инкубирования в присутствии 30 мМ MgCl<sub>2</sub> и 30 мМ MnCl<sub>2</sub> не наблюдали сигналов образования комплекса (фиг.8А). После 90 минут уровень наблюдаемой флуоресценции был полностью отнесен на счет эффекта катионного гашения (фиг.8А).

В присутствии 40 мМ MgCl<sub>2</sub> и 40 мМ MnCl<sub>2</sub> комплексы дцДНК:дцДНК-F, содержащие точно спаренные последовательности (SEQ ID NO:6+ зонд №7) или ошибочное спаривание 1 пары оснований (SEQ ID NO:7+ зонд №7), давали интенсивность флуоресценции, которая была на 17% более низкой и на 4% более высокой, соответственно, после 60 минут, на

36% и 22% более низкой, соответственно, после 75 минут и на 57% более низкой и на 0,2% более высокой, соответственно, после 90 минут, чем флуоресценция, испускаемая одним катионно гасящимся зондом №7 (фиг.8В). После 120 минут инкубирования в присутствии 40 мМ  $MgCl_2$  и 40 мМ  $MnCl_2$  не наблюдали сигналов образования комплекса (фиг.8В).

Добавление двухвалентных катионов, таких как  $MgCl_2$  и  $MnCl_2$ , облегчало образование ДНК-комплекса между неденатурированными дцДНК-мишенями и флуоресцентно-мечеными дцДНК-зондами для обеспечения возможности точного различения между точно спаренными гомологичными последовательностями и последовательностями, содержащими мутации 1 пары оснований. Приблизительно двойная концентрация как  $MgCl_2$ , так и  $MnCl_2$  требовалась для образования комплексов дцДНК:дцДНК в сравнении с концентрацией, требуемой для образования комплексов дцДНК:оцДНК. Скорость образования комплексов дцДНК:дцДНК была более медленной в присутствии двухвалентных катионов, чем в присутствии одновалентных катионов. После образования индуцированные двухвалентными катионами комплексы дцДНК:дцДНК являются, по-видимому, стабильными на протяжении более короткого периода времени.

#### Пример 9

Затем испытывали скорость образования, стабильность и скорость диссоциации комплексов дцДНК:дцДНК, образованных в присутствии одновалентных и двухвалентных катионов. Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,4 пмоль неденатурированной дцДНК-мишени, 4 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого дцДНК-зонда, 10 мМ Трис-НСI, рН 7,5, 60 мМ - 80 мМ КСI, 10 мМ - 20 мМ NaCl, 30 мМ  $MgCl_2$  и 30 мМ  $MnCl_2$ . Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение различных периодов времени в диапазоне от 1 минуты до 150 минут. После инкубирования пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали в отношении флуоресцентного излучения. Интенсивность флуоресценции строили в виде графика как функции времени для каждой анализируемой пробы.

Присутствие различных концентраций КСI и NaCl вместе с 30 мМ  $MgCl_2$  и 30 мМ  $MnCl_2$  приводило к катионному гашению флуоресценции контрольного дцДНК-F-зонда №7 (фиг.9), которое было очень похоже на катионное гашение, наблюдаемое в присутствии только двухвалентных катионов (фиг.8). По-видимому, включение одновалентных катионов не влияет на катионное гашение дцДНК-зонда двухвалентными катионами.

При инкубировании дцДНК-F-зонда №7 с 50-мерной дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) и мутантной дцДНК-мишенью (SEQ ID NO:7) в присутствии 60 мМ КСI, 20 мМ NaCl, 30 мМ  $MgCl_2$  и 30 мМ  $MnCl_2$  комплексы дцДНК:дцДНК-F образовывались при комнатной температуре в неденатурирующих условиях в пределах всего лишь 15 минут инкубирования и сохранялись в течение, по меньшей мере, 120 минут (фиг.9А).

Максимальное различие между точно спаренными и имеющими ошибочно спаренную 1 пару оснований комплексами дцДНК:дцДНК-F наблюдали после 30, 45 и 150 минут инкубирования в присутствии 90 мМ КСI, причем эти комплексы генерировали интенсивность флуоресценции, которая была на 43% и на 16% более низкой, соответственно, после 30 минут, на 38% и 16% более низкой, соответственно, после 45 минут и на 65% и 1% более низкой, соответственно, после 150 минут, чем интенсивность флуоресценции, испускаемая одним катионно гасящимся Зондом №7 (фиг.9А).

В присутствии 70 мМ КСI, 20 мМ NaCl, 30 мМ  $MgCl_2$  и 30 мМ  $MnCl_2$  комплексы дцДНК:дцДНК-F, содержащие точно спаренные последовательности (SEQ ID NO:6+ зонд №7) или ошибочное спаривание 1 пары оснований (SEQ ID NO:7+ зонд №7), продуцировали интенсивность флуоресценции, которая была на 17% и 11% более низкой, соответственно, после 60 минут, на 48% и 11% более низкой, соответственно, после 75 минут и на 22% и 3% более низкой, соответственно, после 90 минут и на 34% и 2% более низкой, соответственно, после 120 минут, чем интенсивность флуоресценции, испускаемая одним катионно гасящимся зондом №7 (фиг.9В).

Присутствие 80 мМ KCl, 10 мМ NaCl, 30 мМ MgCl<sub>2</sub> и 30 мМ MnCl<sub>2</sub> способствовало преимущественно образованию точно спаренного комплекса дцДНК-дцДНК между дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID NO:6) и дцДНК-F-зондом №7 после 30 минут - 120 минут инкубирования. Точно спаренные комплексы дцДНК:дцДНК-F генерировали уменьшение флуоресцентного излучения 27%, 43%, 29% и 52% после 60 минут, 75 минут, 90 минут и 120 минут инкубирования, соответственно, в сравнении с флуоресценцией, испускаемой пробой катионно гасящегося зонда №7, в тех же самых временных точках (фиг.9С). В противоположность этому образование комплексов дцДНК:дцДНК-F, которые содержали ошибочное спаривание 1 пары оснований (SEQ ID NO:7+ зонд №7), было очень неэффективным после 45 минут - 90 минут инкубирования в присутствии 80 мМ KCl, 10 мМ NaCl, 30 мМ MgCl<sub>2</sub> и 30 мМ MnCl<sub>2</sub>, как показано низким 2%-3% уменьшением флуоресценции, наблюдаемой с этими ошибочно спаренными комплексами, в сравнении с флуоресценцией, обнаруживаемой с катионно гасящимся зондом №7 (фиг.9С). Минимальное образование комплекса дцДНК:дцДНК-F с ошибочным спариванием 1 пары оснований происходило после 120 минут инкубирования, приводя к 14% уменьшению флуоресценции в сравнении с флуоресценцией, испускаемой катионно гасящимся зондом №7.

Присутствие как одновалентных, так и двухвалентных катионов способствовало образованию комплекса дцДНК:дцДНК при более быстрой скорости, чем присутствие только двухвалентных катионов. После образования комплексы, стимулированные обоими типами катионов, сохранялись в течение более продолжительного времени, чем комплексы, стимулированные либо одновалентными, либо двухвалентными катионами по отдельности. Максимальное различие между точно спаренными и имеющими ошибочное спаренную 1 пару оснований комплексами дцДНК:дцДНК-F наблюдали в течение более продолжительного интервала времени в присутствии как одновалентных, так и двухвалентных катионов. Таким образом, физиологические концентрации KCl, NaCl и MgCl<sub>2</sub> преимущественно облегчали образование комплекса между полностью спаренными гомологичными дуплексными цепями на основе узнавания гомологичных пар оснований.

#### Пример 10

Примеры 3-6 продемонстрировали образование комплексов дцДНК-оцДНК последовательность специфическим образом между дцДНК-мишенями и оцДНК-зондами, облегчаемое агентами конденсации ДНК, такими как одновалентные или двухвалентные катионы. Следующий пример показывает испытание скорости образования, стабильности и скорости диссоциации комплексов дцДНК-оцДНК, образованных в присутствии поливалентного катиона, спермидина (имеющего заряд +3), который также способен конденсировать ДНК.

Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,2 пмоль неденатурированной дцДНК-мишени, 2 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого оцДНК-зонда, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 1 мМ спермидин. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение различных периодов времени в диапазоне от 1 минуты до 2 часов. После инкубирования пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали в отношении флуоресцентного излучения. Интенсивность флуоресценции строили в виде графика как функции времени для каждой анализируемой пробы.

Контрольный оцДНК-F-зонд №5 обнаруживал прогрессирующее уменьшение флуоресценции с увеличением времени инкубирования в присутствии 1 мМ спермидина (фиг.10). Это катионное гашение не было таким сильно выраженным, как гашение, наблюдаемое при инкубировании того же самого зонда в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 10 мМ MnCl<sub>2</sub>, особенно в пределах первых 5 минут инкубирования (фиг.6А).

Образование точно комплементарного комплекса дцДНК:оцДНК-F между дцДНК-мишенью (SEQ ID NO:6) и оцДНК-F-зондом №5 наблюдали после всего лишь 15 и 30 минут инкубирования в присутствии 1 мМ спермидина, причем этот комплекс генерировал 11% и 20% уменьшения флуоресценции, соответственно, в сравнении с флуоресценцией,

получаемой с использованием одного катионно гасящегося зонда №5 (фиг.10). После 45 минут инкубирования в присутствии 1 мМ спермидина сигналы показывали минимальное образование комплекса.

5 Включение 1 мМ спермидина было крайне неблагоприятным для образования комплекса дцДНК:оцДНК-F, который содержал ошибочное спаривание 1 пары оснований (SEQ ID NO: 7+ зонд №5), как показано увеличенной флуоресценцией на 11% и 7% в сравнении с флуоресценцией, наблюдаемой с использованием катионно гасящегося зонда №5 после 15 минут и 30 минут инкубирования, соответственно (фиг.10). Минимальное образование комплекса, включающего в себя не полностью комплементарные последовательности, 10 обнаруживали только после 75 минут инкубирования в присутствии 1 мМ спермидина, и оно исчезало при 120 минутах.

Добавление конденсирующего ДНК агента, спермидина, облегчало быстрое образование комплекса дцДНК:оцДНК между точно спаренными последовательностями, что позволяло различать точно комплементарные последовательности и последовательности, 15 содержащие мутацию 1 пары оснований.

#### Пример 11

Многочисленные различные агенты, наряду с катионами, способны конденсировать дцДНК. Пример 11 демонстрирует скорость образования, стабильность и скорость диссоциации комплексов дцДНК:оцДНК, образуемых в присутствии этанола, агента другого 20 типа конденсации ДНК.

Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 0,2 пмоль неденатурированной дцДНК-мишени, 2 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого оцДНК-зонда, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 10% этанол. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение различных периодов времени в диапазоне от 1 минуты до 90 25 минут. После инкубирования пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали флуоресцентное излучение. Интенсивность флуоресценции строили в виде графика как функции времени для каждой анализируемой пробы.

В отличие от двухвалентных или поливалентных катионов добавление 10% этанола не 30 приводило к гашению флуоресценции, испускаемой контрольным оцДНК-F-зондом №5, а фактически вызывало небольшое увеличение флуоресценции этого зонду на протяжении времени (фиг.11).

Присутствие 10% этанола преимущественно способствовало образованию точно комплементарного комплекса дцДНК-оцДНК-F между дцДНК-мишенью дикого типа (SEQ ID 35 NO:6) и оцДНК-F-зондом №5 после 15 минут - 60 минут инкубирования (фиг.11). В противоположность этому образование комплекса дцДНК:оцДНК-F с ошибочным спариванием 1 пары оснований T-G (SEQ ID NO:7+ зонд №5) было очень неэффективным во время этого периода инкубирования в присутствии 10% этанола. Интенсивность флуоресценции, продуцируемой точно спаренными комплексами и комплексами с 40 ошибочным спариванием 1 пары оснований, была на 11% и 2% более низкой, соответственно, после 15 минут, на 12% и 1% более низкой, соответственно, после 30 минут, на 25% и 2% более низкой, соответственно, после 45 минут и на 13% и 7% более низкой, соответственно, после 60 минут, чем флуоресценция, испускаемая контрольным зондом №5 (фиг.11). Не наблюдали значимого образования комплекса дцДНК:оцДНК-F 45 после 75 минут инкубирования в присутствии 10% этанола.

Добавление низких концентраций этанола облегчало образование ДНК-комплексов между неденатурированными дцДНК-мишенями и флуоресцентно-мечеными дцДНК-зондами, что позволяет различать точно комплементарные последовательности и последовательности, содержащие мутацию одной пары оснований.

#### 50 Пример 12

Пример 12 демонстрирует, что анализ данного изобретения может различать точно комплементарные комплексы дцДНК:оцДНК и комплексы дцДНК:оцДНК, содержащие любой тип возможного ошибочного спаривания 1 пары оснований, в присутствии катионного

интеркалятора ДНК YOYO-1.

Комплементарные смысловые и антисмысловые 15-мерные оцДНК-зонды синтезировали на ДНК-синтезаторе, очищали при помощи ВЖХ и растворяли в ддН<sub>2</sub>О при концентрации 1 пмоль/мкл. Зонд №1 был 15-мерным оцДНК-зондом, сконструированным таким образом, что он является полностью комплементарным 15-нуклеотидному сегменту смысловой цепи 50-мерной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1), охватывающему положения аминокислот 505-510 [Nature 380, 207 (1996)]. Хиральность этого зонда была противоположной или антипараллельной хиральности смысловой цепи в этой мишени. Мутантные зонды (зонд №8 - зонд №16) были идентичны последовательности зонда №1, за исключением мутации 1 основания (подчеркнутой).

Последовательность для зонда №1 была:

5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №8 была:

5'-CAC CAA AGA AGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №9 была:

5'-CAC GAA AGA TGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №10 была:

5'-CAC CAA ACA TGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №11 была:

5'-CAC CAT AGA TGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №12 была:

5'-CAC CAG AGA TGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №13 была:

5'-CAC CAC AGA TGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №14 была:

5'-CAC CAA AGA CGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №15 была:

5'-CAC CAA AAA TGA TAT-3'.

Последовательность для зонда №16 была:

5'-CAC AAA AGA TGA TAT-3'.

Зонд №17 был 15-мерным оцДНК-зондом, сконструированным таким образом, что он является полностью комплементарным 15-нуклеотидному сегменту антисмысловой цепи 50-мерной ДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1), охватывающему положения аминокислот 505-510 [Nature 380, 207 (1996)]. Хиральность этого зонда была противоположной или антипараллельной хиральности антисмысловой цепи в этой мишени. Мутантные зонды (зонд №18 - зонд №26) были идентичны последовательности зонда №17, за исключением мутации 1 основания (подчеркнутой).

Последовательность для зонда №17 была:

5'-ATA TCA TCT TTG GTG-3'.

Последовательность для зонда №18 была:

5'-ATA TCT TCT TTG GTG-3'.

Последовательность для зонда №19 была:

5'-ATA TCA TCT TTC GTG-3'.

Последовательность для зонда №20 была:

5'-ATA TCA TGT TTG GTG-3'.

Последовательность для зонда №21 была:

5'-ATA TCA TCT ATG GTG-3'.

Последовательность для зонда №22 была:

5'-ATA TCA TCT TTG CTG-3'.

Последовательность для зонда №23 была:

5'-ATA TCA TCT GTG GTG-3'.

Последовательность для зонда №24 была:

5'-ATA TCG TCT TTG GTG-3'.

Последовательность для зонда №25 была:

5'-ATA TCA TTT TTG GTG-3'.

Последовательность для зонда №17 была:

5'-ATA TCA TCT TTT GTG-3'.

5 Гибридизационная реакционная смесь (40 мкл) содержала следующее: 2 пмоль дцДНК-мишени, 2 пмоль 5'-флуоресцеин-меченого оцДНК-зонда, 0,5×TBE и 500 нМ интеркалятор ДНК YOYO-1. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре (21°C) в течение 5 минут без предварительной денатурации дцДНК-мишеней. Пробы помещали в кварцевую кювету, облучали лучом аргонового ионного лазера, имеющим длину волны 488 нм, и наблюдали в отношении флуоресцентного излучения. Интенсивность флуоресценции строили в виде графика как функции длины волны для каждой анализируемой пробы.

10 50-мерная неденатурированная дцДНК-мишень дикого типа взаимодействовала с 15-мерным антисмысловым оцДНК-зондом №1 и различными 15-мерными антисмысловыми оцДНК-зондами с 1 мутированным основанием (зонд №8 - зонд №16), которые могли бы генерировать любой тип возможного ошибочного спаривания 1 пары оснований. Как и ожидалось, наивысшие интенсивности флуоресцентного излучения генерировались комплексами дцДНК:оцДНК, состоящими из точно комплементарных последовательностей (SEQ ED NO:1+ зонд №1) (фигуры 12А и 12В). Комплексы дцДНК:оцДНК, которые приводили к ошибочному спариванию 1 пары оснований А-А (SEQ ID NO:1+ зонд №8), 15 ошибочному спариванию одной пары оснований G-G (SEQ ID NO:1+ зонд №9), ошибочному спариванию 1 пары оснований С-С (SEQ ID NO:1+ зонд №10), ошибочному спариванию 1 пары оснований Т-Т (SEQ ID NO:1+ зонд №11), ошибочному спариванию 1 пары оснований Т-G (SEQ ID NO:1+ зонд №12), ошибочному спариванию 1 пары оснований Т-С (SEQ ID NO: 1+ зонд №13), ошибочному спариванию 1 пары оснований А-С (SEQ IDNO:1+ зонд №14), 20 ошибочному спариванию 1 пары оснований С-А (SEQ ID NO:1+ зонд №15) и ошибочному спариванию 1 пары оснований G-А (SEQ ID NO:1+ зонд №16), производили интенсивность флуоресцентного излучения, которая была на 63%, 66%, 50%, 47%, 49%, 79%, 57%, 51% и 71% более низкой, соответственно, чем интенсивность флуоресценции, испускаемой точно спаренными комплексами дцДНК:оцДНК (фигуры 12А и 12В).

30 Анализ тройной цепи оценивали также реакцией 50-мерной неденатурированной дцДНК-мишени дикого типа (SEQ ID NO:1) с 15-мерным смысловым оцДНК-зондом №17 дикого типа и различными 15-мерными смысловыми оцДНК-зондами с 1 мутированным основанием (зонд №18 - зонд №26), которые могли бы генерировать любой тип возможного ошибочного спаривания 1 пары оснований. Точно комплементарные трехцепочечные 35 комплексы дцДНК:оцДНК (SEQ ID NO:1+ зонд №17), содержащие зонд смысловой цепи (фигуры 12С и 12D), образовывались со сходной эффективностью в сравнении с точно комплементарными трехцепочечными комплексами (SEQ ID NO:1+ зонд №1), содержащими зонд антисмысловой цепи (фигуры 12А и 12В). Комплексы дцДНК:оцДНК, которые приводили к ошибочному спариванию 1 пары оснований Т-Т (SEQ ID NO:1+ зонд №18), 40 ошибочному спариванию 1 пары оснований С-С (SEQ ID NO:1+ зонд №19), ошибочному спариванию 1 пары оснований G-G (SEQ ID NO:1+ зонд №20), ошибочному спариванию 1 пары оснований А-А (SEQ ID NO:1+ зонд №21), ошибочному спариванию 1 пары оснований С-А (SEQ ID NO:1+ зонд №22), ошибочному спариванию 1 пары оснований G-А (SEQ ID NO: 1+ зонд №23), ошибочному спариванию 1 пары оснований G-Т (SEQ ID NO:1+ зонд №24), 45 ошибочному спариванию 1 пары оснований Т-G (SEQ ID NO:1+ зонд №25) и ошибочному спариванию 1 пары оснований Т-С (SEQ ID NO:1+ зонд №26), производили интенсивность флуоресцентного излучения, которая была на 63%, 67%, 76%, 59%, 54%, 57%, 59%, 56% и 82% более низкой, соответственно, чем интенсивность флуоресценции, испускаемой точно спаренными комплексами дцДНК:оцДНК (фигуры 12С и 12D).

50 Вариабельность в интенсивности флуоресцентного излучения, наблюдаемая между различными ошибочными спариваниями 1 пары оснований, зависела в большей степени от ошибочного спаривания конкретной пары оснований, чем от процентного содержания GC мутантных трехцепочечных последовательностей (фиг.12). Результаты фиг.12 подтвердили

достоверность анализа тройной цепи для идентификации всех возможных ошибочных спариваний 1 пары оснований с большой точностью при взаимодействии антисмысловых или смысловых оцДНК-зондов с неденатурированными дцДНК-мишенями в присутствии агента деконденсации ДНК УОУО-1.

5 Хотя данное изобретение было описано подробно со ссылкой на его характерные примеры, для специалиста с квалификацией в данной области будет очевидным, что в нем могут быть произведены различные изменения и модификации без отклонения от его сущности и объема.

10 **Формула изобретения**

1. Способ создания квадруплекса нуклеиновой кислоты, включающий стадии:

1) создания смеси, включающей воду и буфер, первый дуплекс Уотсона-Крика, второй дуплекс Уотсона-Крика и акселераторный агент гибридизации, который увеличивает скорость или количество образования квадруплекса, причем

15 (а) первый дуплекс Уотсона-Крика включает первую цепь, содержащую последовательность нуклеотидов, и вторую цепь, содержащую вторую последовательность нуклеотидов, в котором указанная вторая цепь связана с указанной первой цепью связью Уотсона-Крика; и

(b) второй дуплекс Уотсона-Крика включает третью цепь, содержащую  
20 последовательность нуклеотидов, и четвертую цепь, содержащую вторую последовательность нуклеотидов, в котором указанная четвертая цепь связана с указанной третьей цепью связью Уотсона-Крика, и

2) инкубирования указанной смеси для образования квадруплекса нуклеиновой кислоты, в котором

25 (а) по крайней мере, одна цепь первого дуплекса Уотсона-Крика связана, по крайней мере, с одной цепью второго дуплекса Уотсона-Крика по правилам спаривания оснований Уотсона-Крика или по правилам спаривания оснований гомологичного связывания;

(b) по крайней мере, одна цепь второго дуплекса Уотсона-Крика имеет точное спаривание оснований, ошибочное связывание или делецию одного основания, или  
30 ошибочное связывание или делецию двух оснований, по крайней мере, с одной цепью первого дуплекса Уотсона-Крика; и

(с) по крайней мере, одна цепь первого дуплекса Уотсона-Крика является гетерополимерной с содержанием G-C от 10 до 90%.

2. Способ по п.1, где первый дуплекс Уотсона-Крика, по существу, сохраняет свою  
35 двуспиральную структуру, и, по крайней мере, одна цепь второго дуплекса Уотсона-Крика находится в бороздке этой двуспиральной структуры.

3. Способ по п.2, где, по крайней мере, одна цепь первого дуплекса Уотсона-Крика связана с третьей цепью второго дуплекса Уотсона-Крика по правилам спаривания оснований Уотсона-Крика и с четвертой цепью второго дуплекса Уотсона-Крика по  
40 правилам спаривания оснований за счет гомологичного связывания.

4. Способ по п.1, где объединенные частоты встречаемости димеров пурин-пиримидин и димеров пиримидин-пурин, по крайней мере, в одной цепи первого дуплекса Уотсона-Крика превышают 25%.

5. Способ по п.1, где стадии (1) и (2) выполняют с дуплексами не в клетке.

45 6. Способ по п.1, где стадию (2) выполняют без помощи белка.

7. Способ по п.1, где на стадии (1) воду добавляют таким образом, что она составляет в расчете на объем, по меньшей мере, 50% конечного объема этой смеси.

8. Способ по п.1, где на стадии (1) воду добавляют таким образом, что она составляет в расчете на объем, по меньшей мере, 80% конечного объема этой смеси.

50 9. Способ по п.1, где на стадии (1) воду добавляют таким образом, что она составляет в расчете на объем всю жидкость, добавленную к этой смеси.

10. Способ по п.1, где стадию (2) выполняют при температуре или при температурах, превышающих температуру замерзания этой смеси и не превышающих 85°C.

11. Способ по п.10, где стадию (2) выполняют при температуре или при температурах от 5 до 30°C.

12. Способ по п.11, где стадию (2) выполняют при температуре или при температурах от 15 до 25°C.

5 13. Способ по п.1, где на стадии (1) в качестве акселераторного агента добавляют катион.

14. Способ по п.13, где указанный катион является  $\text{Na}^+$ , обеспечиваемым в концентрации 50 - 125 мМ.

10 15. Способ по п.14, где указанный катион выбран из группы, состоящей из  $\text{Mn}^{+2}$ , обеспечиваемого в концентрации 10 - 45 мМ,  $\text{Mg}^{+2}$ , обеспечиваемого в концентрации 10 - 45 мМ и  $\text{Ni}^{+2}$ , обеспечиваемого в концентрации 20 мМ.

16. Способ по п.1, где в стадии (1) в качестве акселераторного агента добавляют интеркалятор.

15 17. Способ по п.16, где интеркалятор является флуоресцентным интеркалятором.

18. Способ по п.17, где флуоресцентный интеркалятор выбран из группы, состоящей из YOYO-1, TOTO-1, YOYO-3, TOTO-3, POPO-1, BOBO-1, POPO-3, BOBO-3, LOLO-1, JOJO-1, димеров цианина, YO-PRO-1, TO-PRO-1, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5, PO-PRO-1, BO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-3, LO-PRO-1, JO-PRO-1, мономеров цианина, бромида этидия, гомодимера-1 этидия, гомодимера-2 этидия, производных этидия, акридина, акридинового

20 оранжевого, производных акридина, гетеродимера этидий-акридин, моноазида этидия, иодида пропидия, красителей SYTO, SYBR Зеленого 1, красителей SYBR, Pico Зеленого 1, красителей SYTOX и 7-аминоактиномицина D.

19. Способ по п.1, где указанный акселераторный агент является

25 неинтеркалирующим флуорофором.

20. Способ по п.19, где указанный неинтеркалирующийся флуорофор выбран из группы, состоящей из биотина, родамина, красителей Alexa, красителей BODIPY, конъюгатов биотина, тиол-реактивных зондов, флуоресцеина и производных, в том числе, но не ограничивающихся ими, "заключенных" зондов, орегонского зеленого, родаминового

30 зеленого, красителей QSY.

21. Способ по п.1, где на стадии (1) указанный акселераторный агент является интеркалятором, который связывается с малой и/или большой бороздкой дуплекса Уотсона-Крика.

22. Способ по п.1, где на стадии (1) указанный акселераторный агент при 25°C является

35 жидкостью.

23. Способ по п.22, где на стадии (1) указанный акселераторный агент является органической жидкостью, растворимой в воде.

24. Способ по п.1, где на стадии (1) добавляют акселераторный агент, который является агентом конденсации в отношении дуплекса Уотсона-Крика.

40 25. Способ по п.1, где на стадии (1) добавляют акселераторный агент, который является агентом деконденсации в отношении дуплекса Уотсона-Крика.

26. Квадруплекс нуклеиновой кислоты, содержащий:

первую цепь, содержащую первую последовательность нуклеотидов;

вторую цепь, содержащую вторую последовательность нуклеотидов, где

45 указанная вторая цепь связана с указанной первой цепью образованием связи Уотсона-Крика;

третью цепь, содержащую третью последовательность нуклеотидов; и четвертую цепь, содержащую четвертую последовательность нуклеотидов,

50 причем указанная четвертая цепь связана с указанной третьей цепью с образованием связи Уотсона-Крика, характеризующийся тем, что каждая из указанных четырех цепей является гетерополимерной с содержанием G-C от 10 до 90%, и где

(а) вторая и четвертая цепи выстроены в параллельном 3'→5'-направлении, и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам гомологичного связывания



указанными первой и четвертой цепями соответствует правилам спаривания оснований Уотсона-Крика, и, кроме того, вторая и третья цепи выстроены в антипараллельных 3'→5' и 5'→3'-направлениях соответственно, и связывание между указанными второй и третьей цепями соответствует правилам спаривания оснований Уотсона-Крика.

5 30. Квадруплекс по п.26, где либо в (d) первая и четвертая цепи выстроены в антипараллельных 5'→3' и 3'→5'-направлениях соответственно, и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований; либо в (e) вторая и третья цепи выстроены в антипараллельных 3'→5' и 5'→3'-направлениях  
10 соответственно, и связывание между этими 2 цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований; либо в (f) первая и четвертая цепи выстроены в антипараллельных 5'→3' и 3'→5'-направлениях соответственно, и связывание между указанными первой и четвертой цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований, и, кроме того, вторая и третья цепи выстроены в антипараллельных 3'→5' и 5'→3'-направлениях соответственно, и связывание между указанными второй и третьей  
15 цепями соответствует правилам спаривания гомологичных оснований.

31. Квадруплекс по п.26, где каждое основание первой последовательности нуклеотидов взаимодействует специфически как с соседним основанием третьей последовательности нуклеотидов, так и с основанием четвертой последовательности нуклеотидов, с которым  
20 связано соседнее основание третьей последовательности нуклеотидов.

32. Квадруплекс по п.26, где каждое основание второй последовательности нуклеотидов взаимодействует специфически как с соседним основанием четвертой последовательности нуклеотидов, так и с основанием третьей последовательности нуклеотидов, с которым  
25 связано соседнее основание четвертой последовательности нуклеотидов.

33. Способ обнаружения нуклеиновой кислоты-мишени или аналога нуклеиновой кислоты-мишени, предусматривающий:

обеспечение двухцепочечной нуклеиновой кислоты-мишени или аналога нуклеиновой кислоты, имеющего последовательность-мишень, где указанная последовательность-мишень содержит, по меньшей мере, одно пуриновое основание и, по меньшей мере, одно  
30 пиримидиновое основание;

обеспечение двухцепочечного зонда, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты или последовательность аналога нуклеиновой кислоты;

обеспечение (a) акселераторного агента гибридизации и флуорофора, или (b) флуорофора, который является акселераторным агентом гибридизации;

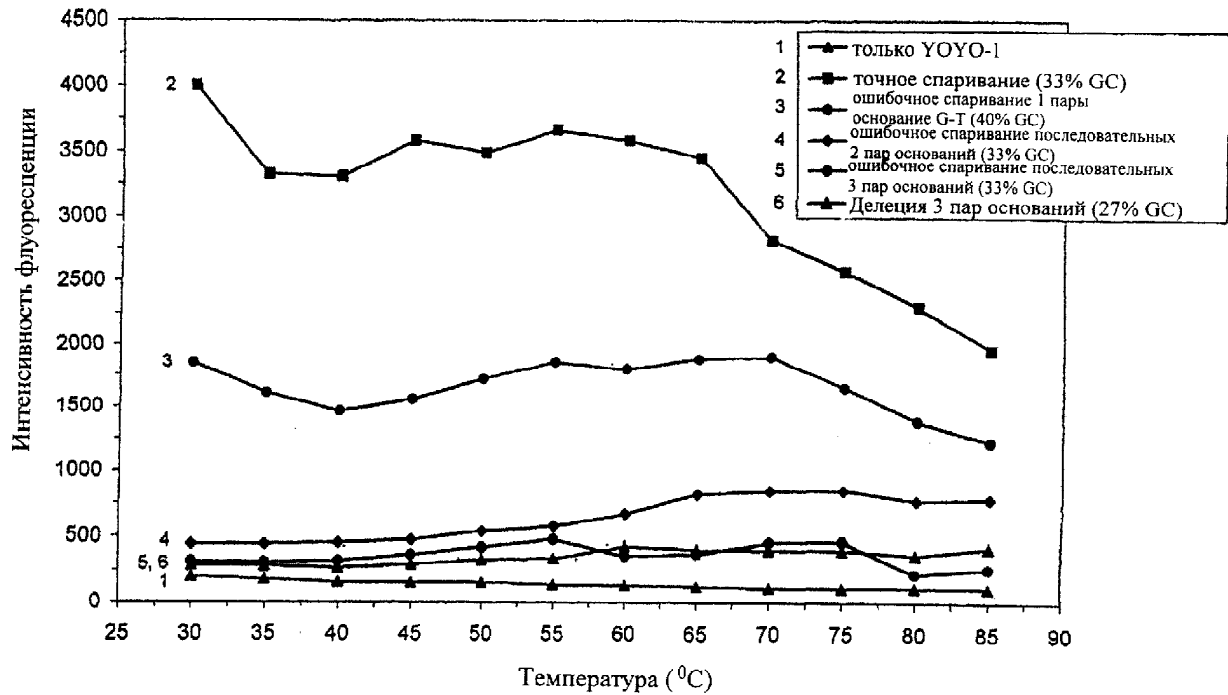
35 добавление указанного зонда, указанной нуклеиновой кислоты-мишени или аналога нуклеиновой кислоты, указанного акселераторного агента гибридизации и флуорофора (a) или флуорофора (b) к среде для обеспечения тест-пробы, содержащей квадруплекс нуклеиновой кислоты, в котором связывание соответствует правилам спаривания оснований Уотсона-Крика, содержащий указанный зонд, связанный с указанной  
40 последовательностью-мишенью, где указанная среда включает воду и буфер;

облучение указанной тест-пробы возбуждающим излучением для индуцирования испускания флуоресцентного излучения этой тест-пробой;

детектирование интенсивности указанного флуоресцентного излучения, где указанная интенсивность коррелирует с аффинностью связывания между указанным зондом и  
45 указанной последовательностью-мишенью; и

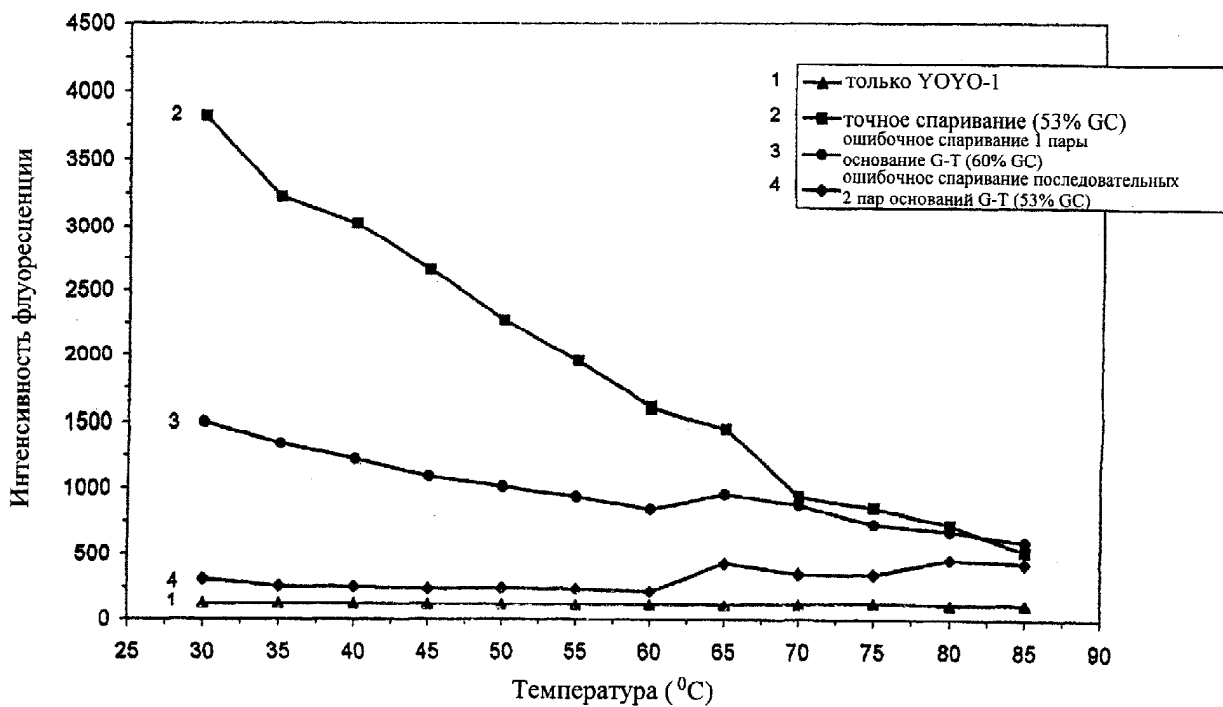
сравнение указанной интенсивности с известной интенсивностью известной пробы, позволяющее определить по указанной интенсивности степень спаривания между указанным зондом и указанной последовательностью-мишенью, чтобы таким образом обнаружить указанную нуклеиновую кислоту-мишень или аналог нуклеиновой кислоты,

50 причем указанный способ является гомогенным анализом, проводимым без обеспечения гасящего сигнал агента на указанной последовательности-мишени или на указанном зонде.



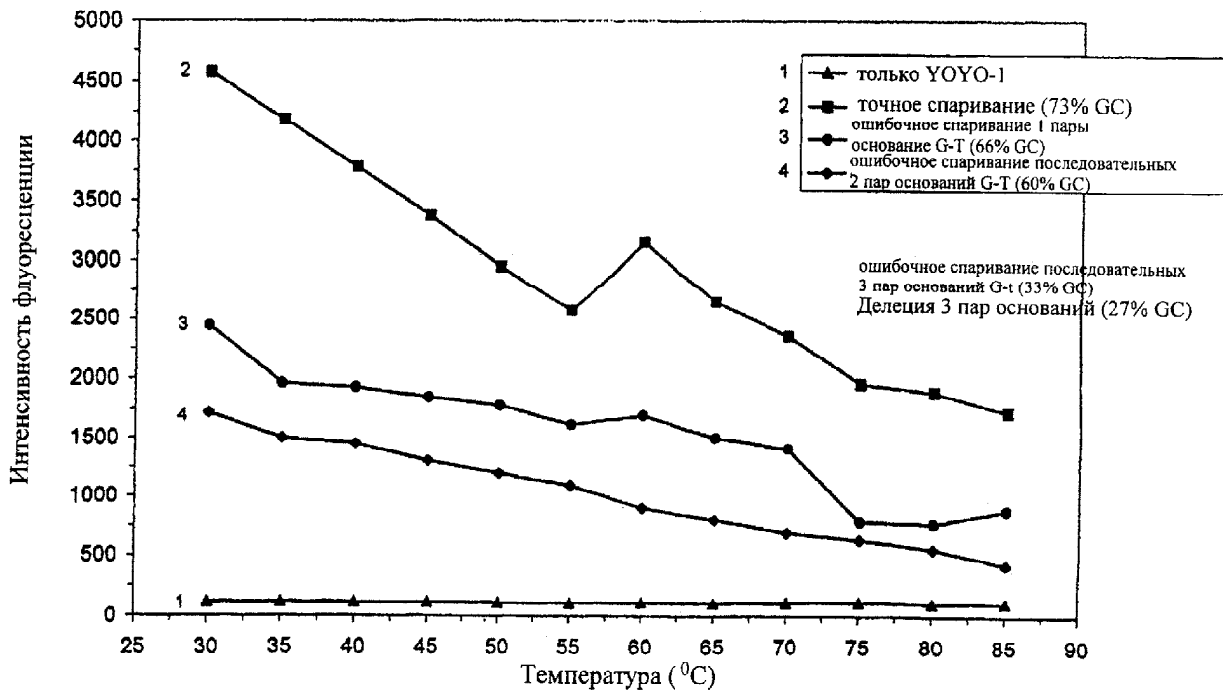
Связывание 15-мерной антипараллельной оцДНК с 50-мерной дцДНК с YOYO-1 без предварительной денатурации дцДНК

Фиг. 1



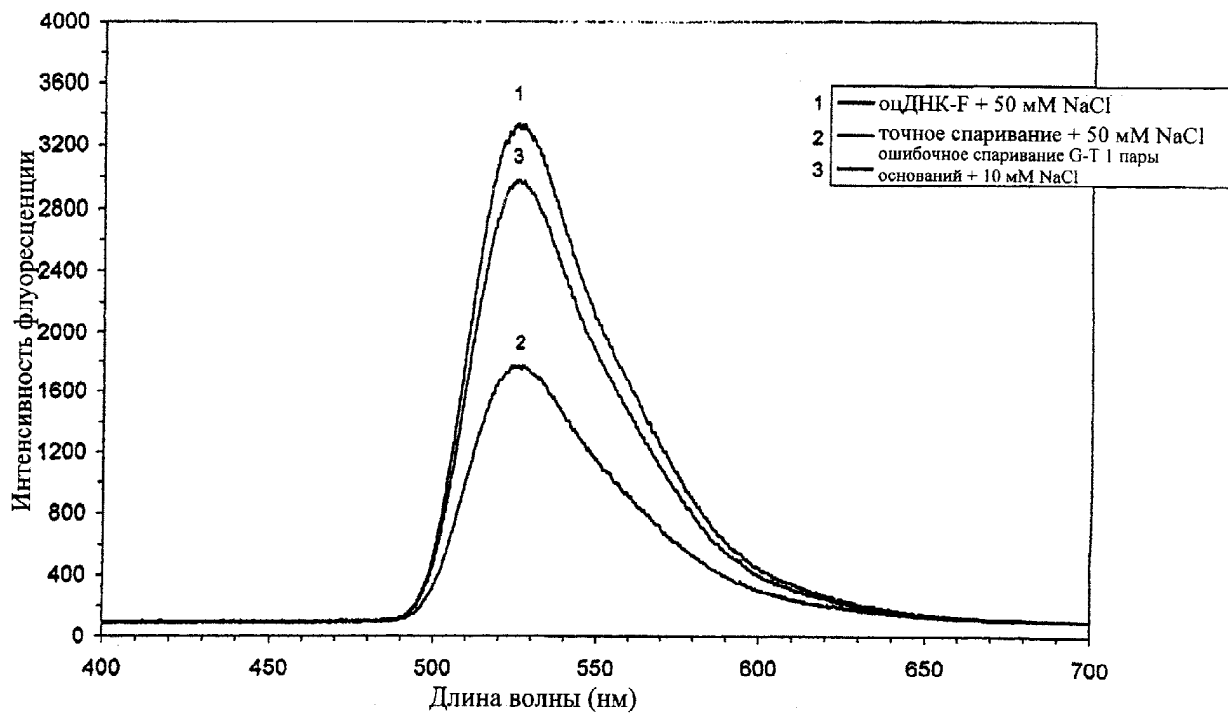
Связывание 15-мерной антипараллельной оцДНК с 50-мерной дцДНК с YOYO-1 без предварительной денатурации дцДНК

Фиг. 2А



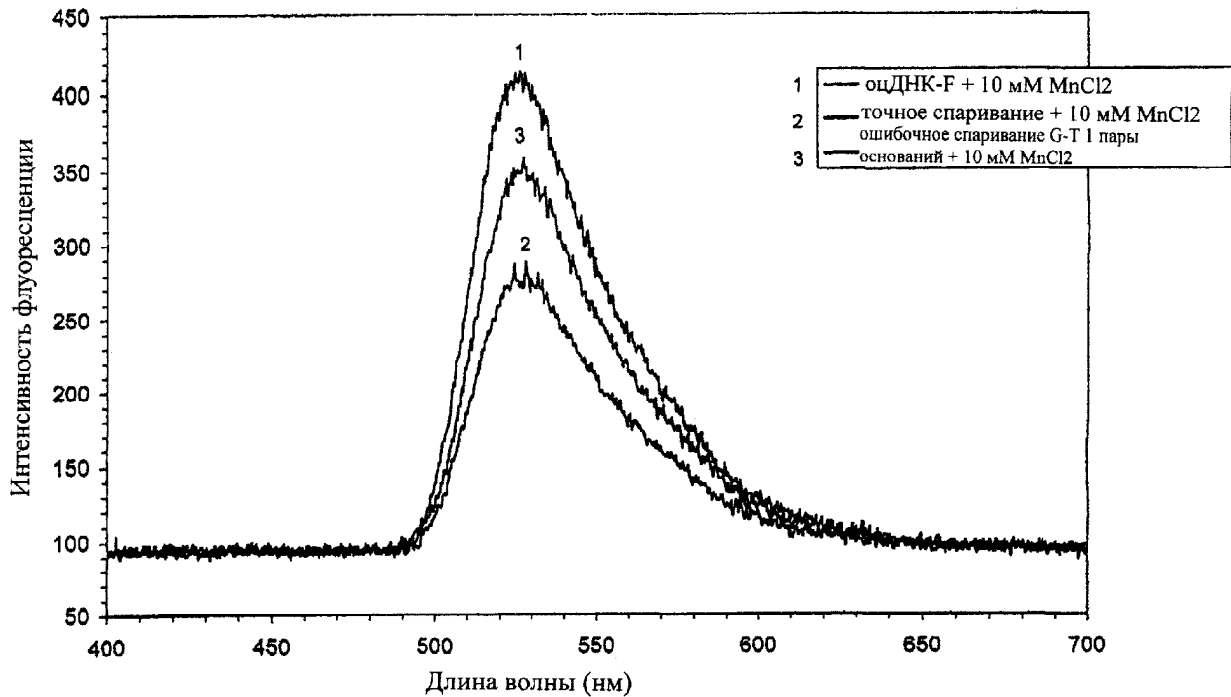
Связывание 15-мерной антипараллельной оцДНК с 50-мерной дцДНК с YOYO-1 без предварительной денатурации дцДНК

Фиг. 2В



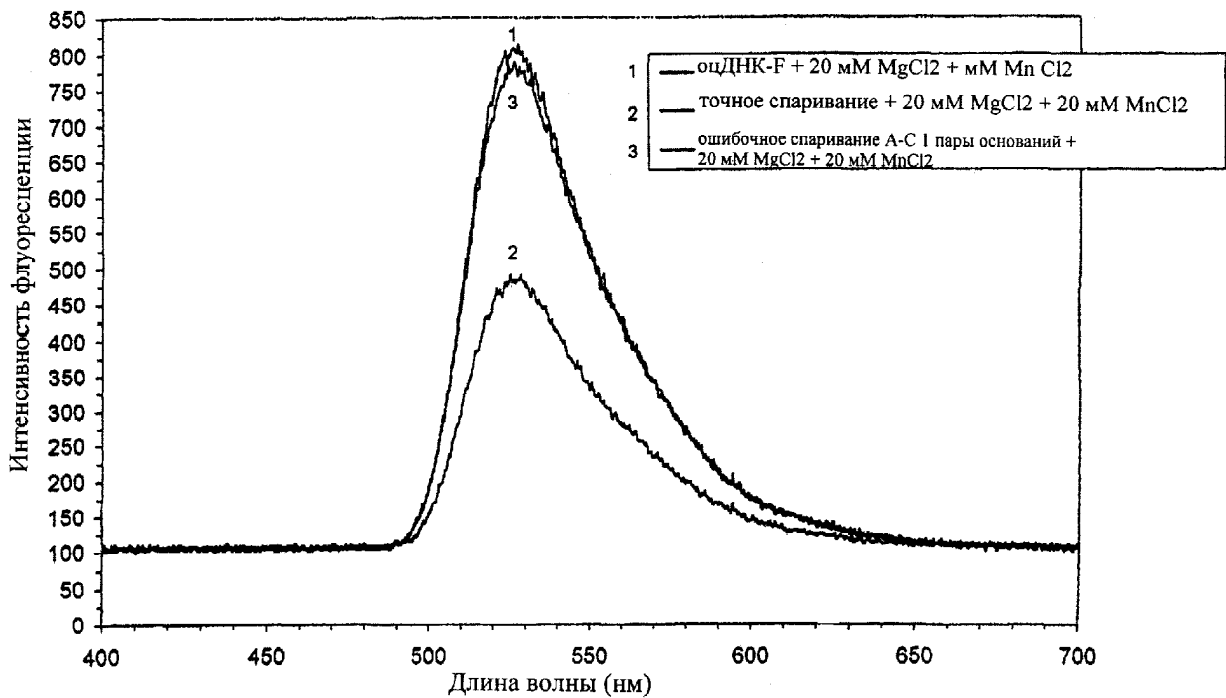
Связывание 15-мерного антипараллельного оцДНК-F- зонда (4пмоль) (33% GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии 50 mM NaCl (после 1 часа)

Фиг. 3



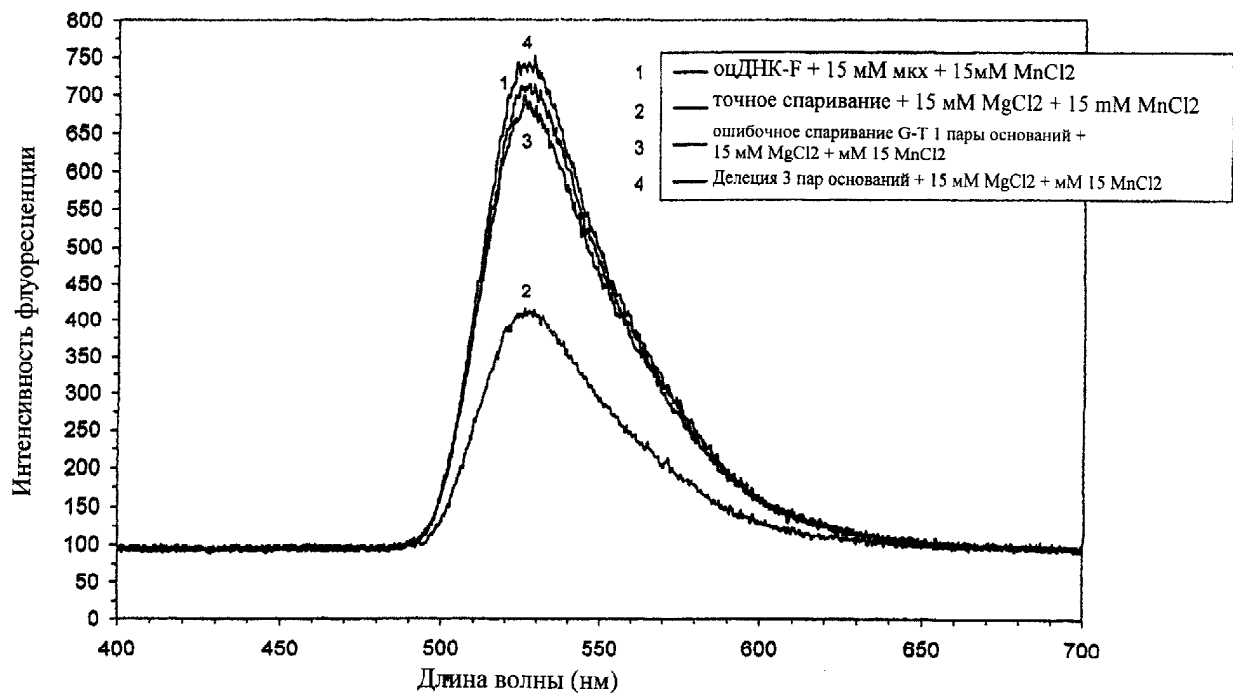
Связывание 15-мерного антипараллельного оцДНК-F-зонда (4пмоль) (53% GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии двухвалентных катионов (после 1 часа)

Фиг. 4



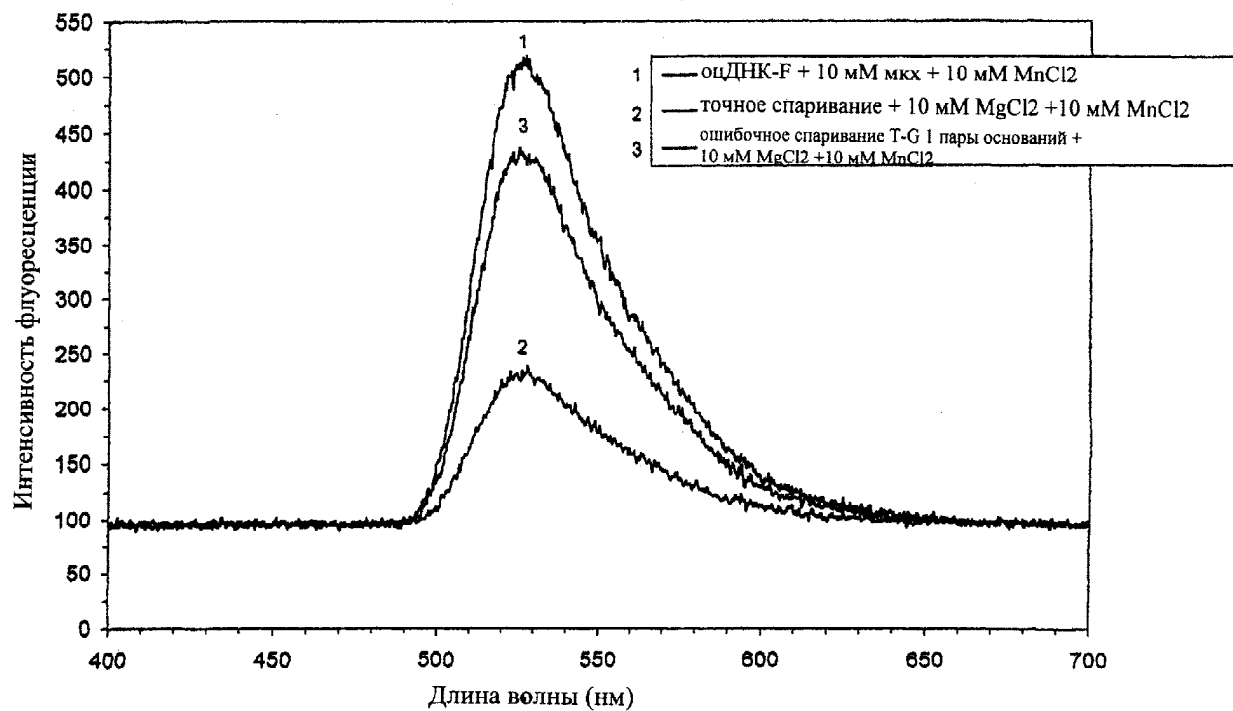
Связывание 15-мерного антипараллельного оцДНК-F-зонда (4пмоль) (73% GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии двухвалентных катионов (после 1 часа)

Фиг. 5А



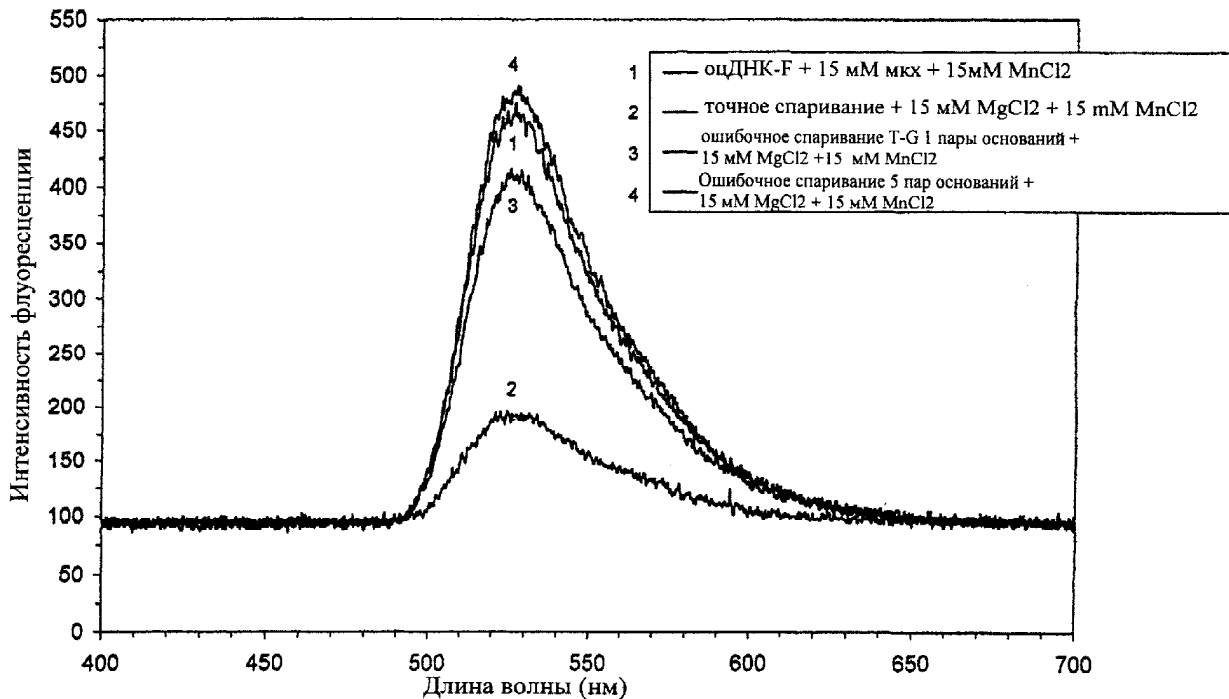
Связывание 15-мерного антипараллельного оцДНК-F- зонда (4 μмоль) (33% GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 μмоль) в присутствии двухвалентных катионов (после 1 часа)

Фиг. 5В



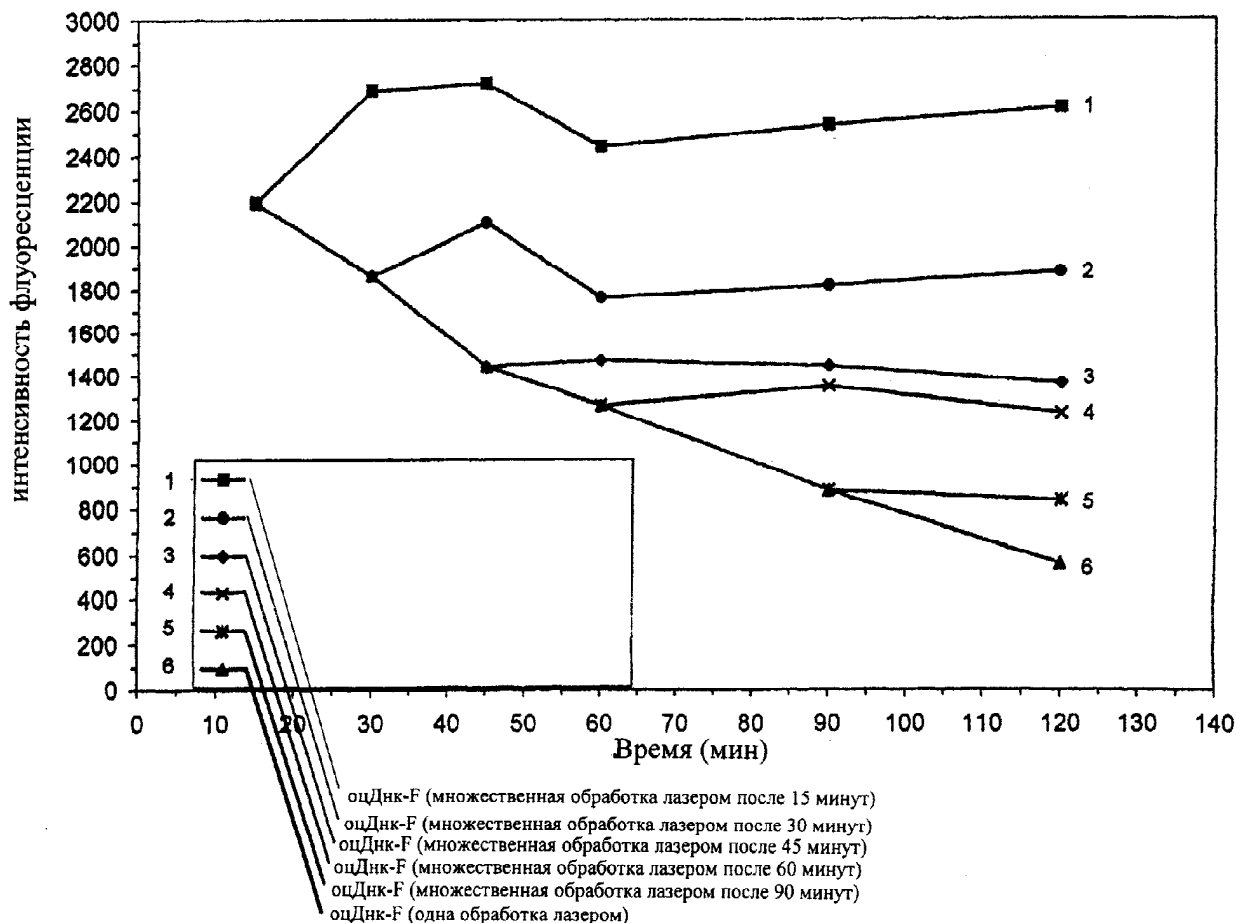
Связывание 15-мерного антипараллельного оцДНК-F- зонда (4 μмоль) (53% GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 μмоль) в присутствии двухвалентных катионов (после 1 часа)

Фиг. 5С



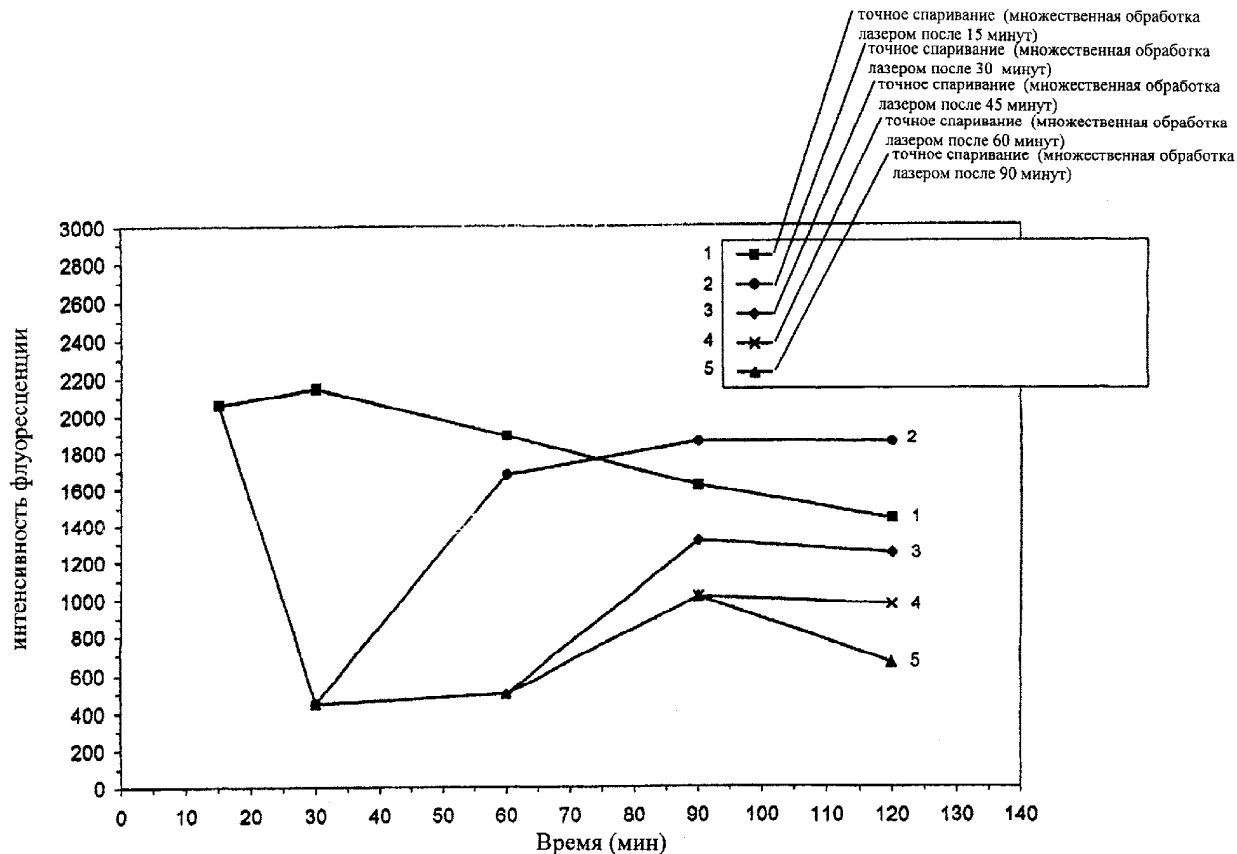
Связывание 15-мерного антипараллельного оцДНК-F- зонда (4пмоль) (53% GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии двухвалентных катионов (после 1 часа)

Фиг. 5D



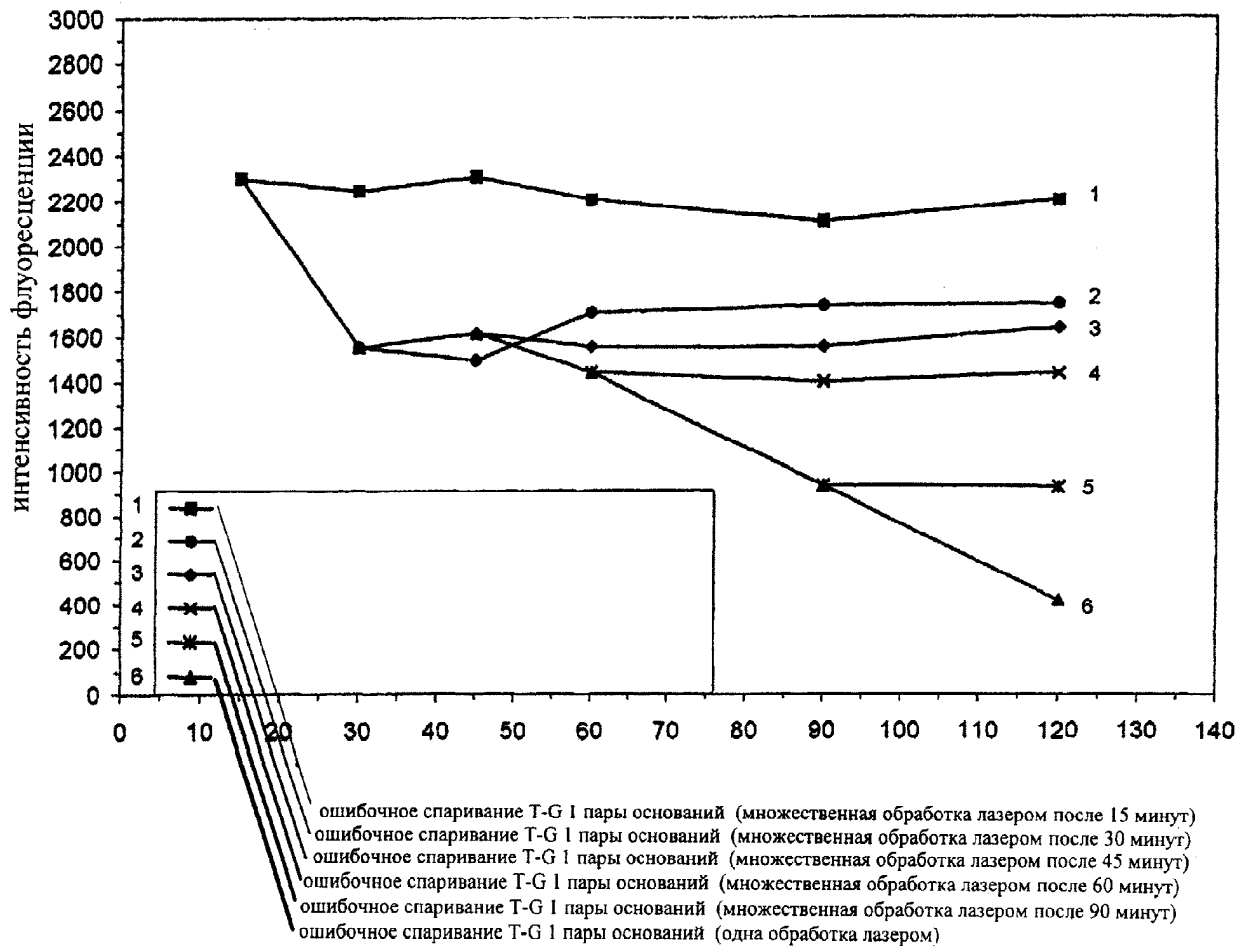
Действие множественной лазерной обработки на катионное гашение 15-мерной антипараллельной оцДНК-F (4 пмоль) 10 мМ MgCl2 + 10 мМ MnCl2

Фиг. 6А



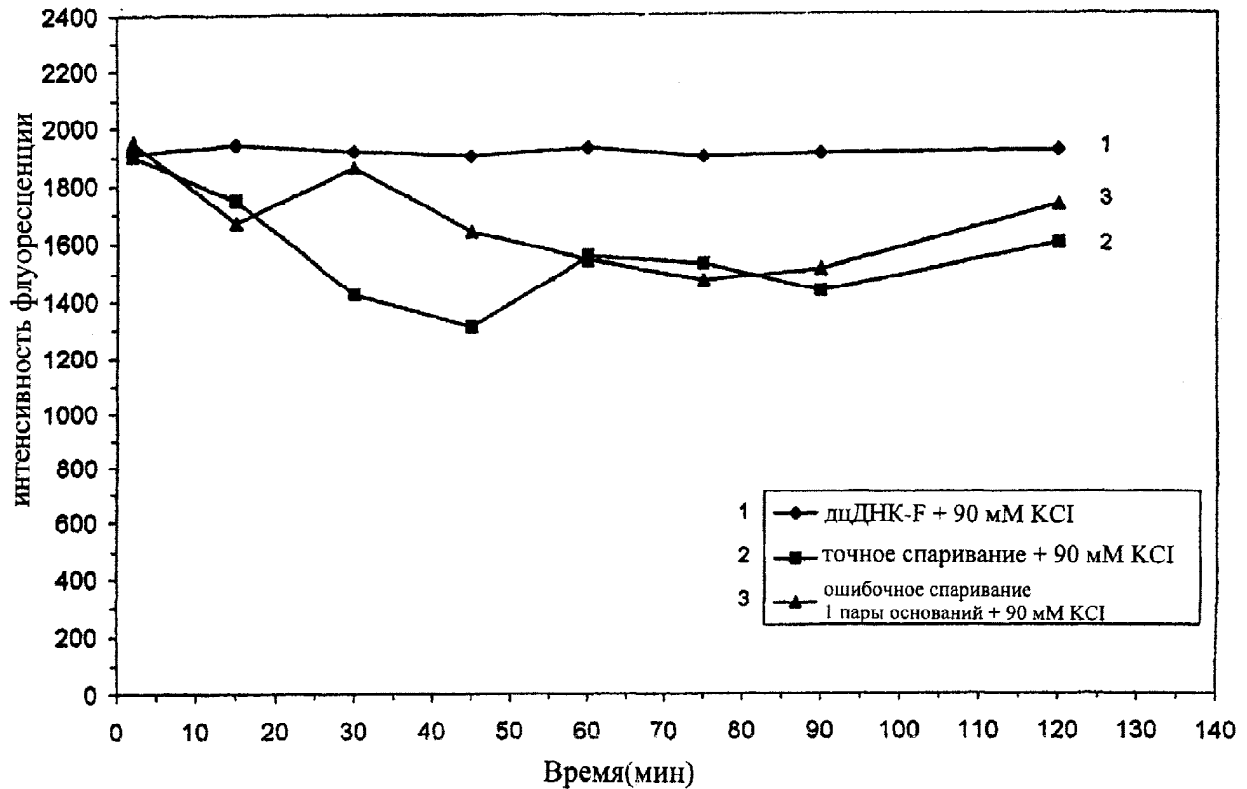
Действие множественной лазерной обработки на образование комплекса между точно спаренной антипараллельной 15-мерной оцДНК-F (4 пмоль) + 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии 10 mM MgCl<sub>2</sub> + 10 MnCl<sub>2</sub>

Фиг. 6В



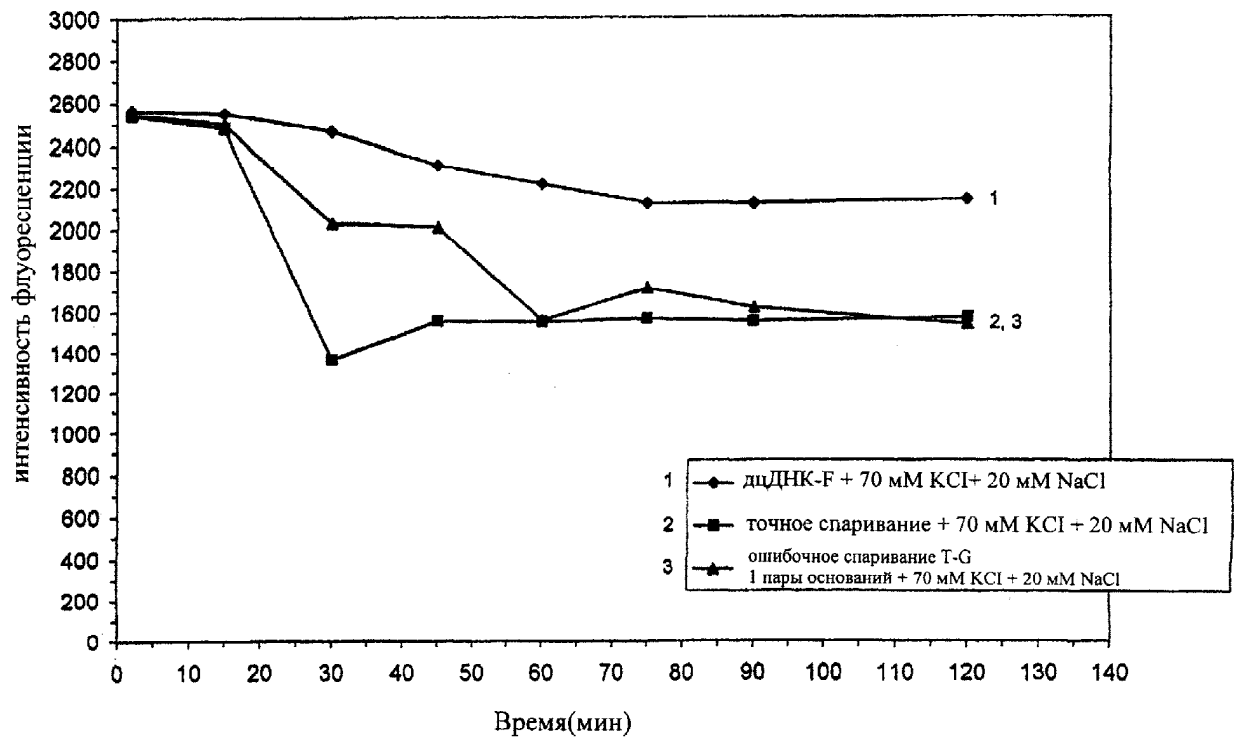
Действие множественной лазерной обработки на образование комплекса между точно спаренной антипараллельной 15-мерной оцДНК-F (4 пмоль) + 50 мерной дц ДНК (0.4 пмоль), приводящее к ошибочному спариванию 1 пары оснований T-G, в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub> + 10 мМ MnCl<sub>2</sub>

Фиг. 6С



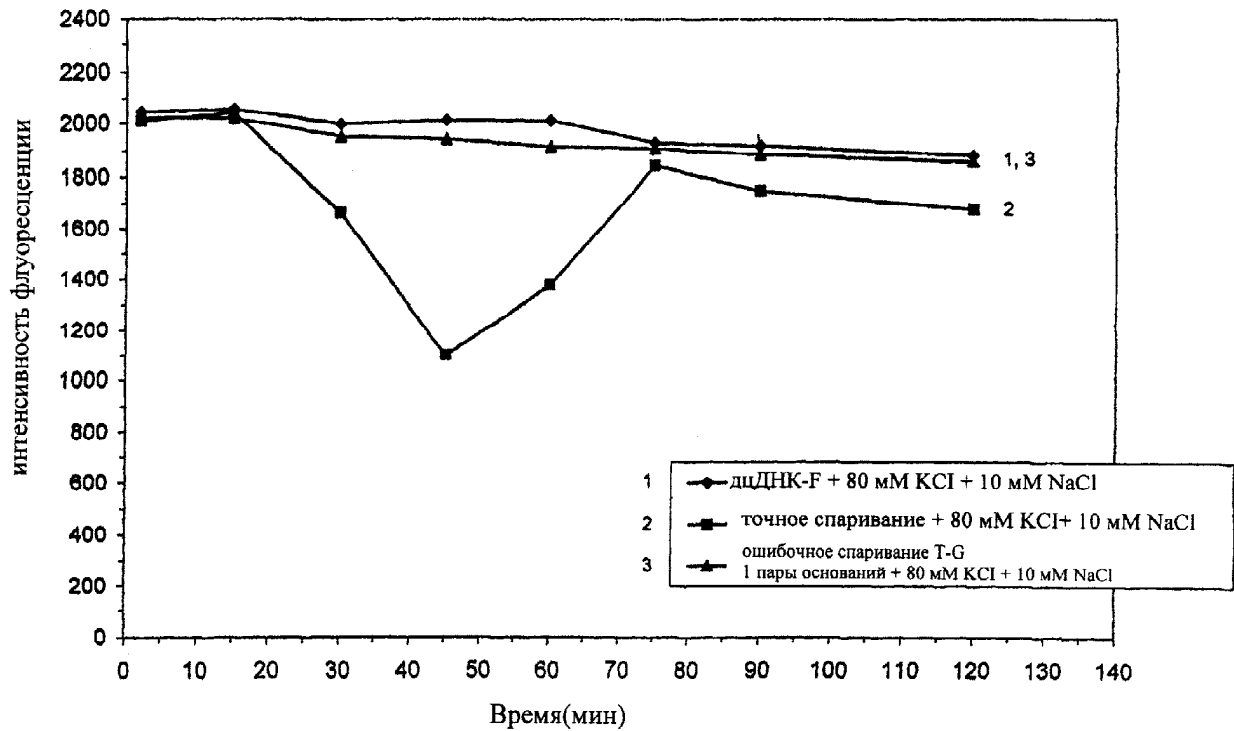
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии 90 mM KCl на протяжении времени

Фиг. 7А



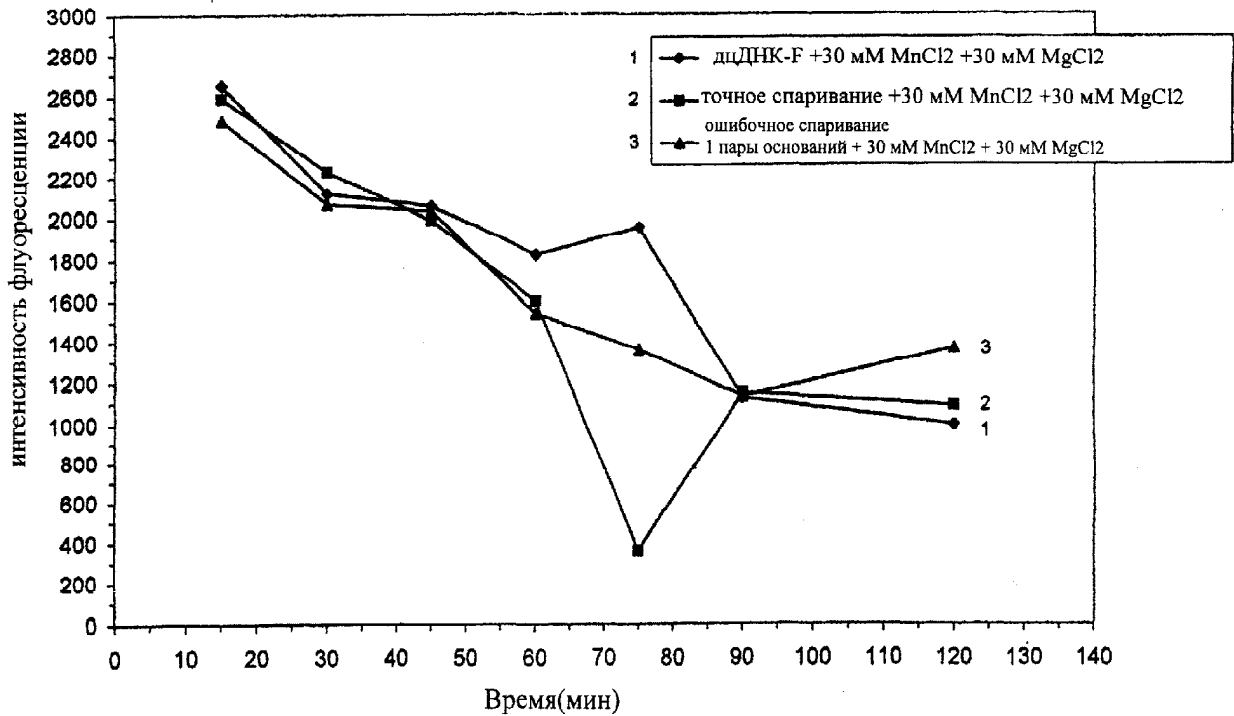
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии 70 mM KCl + 20 mM NaCl на протяжении времени

Фиг. 7В



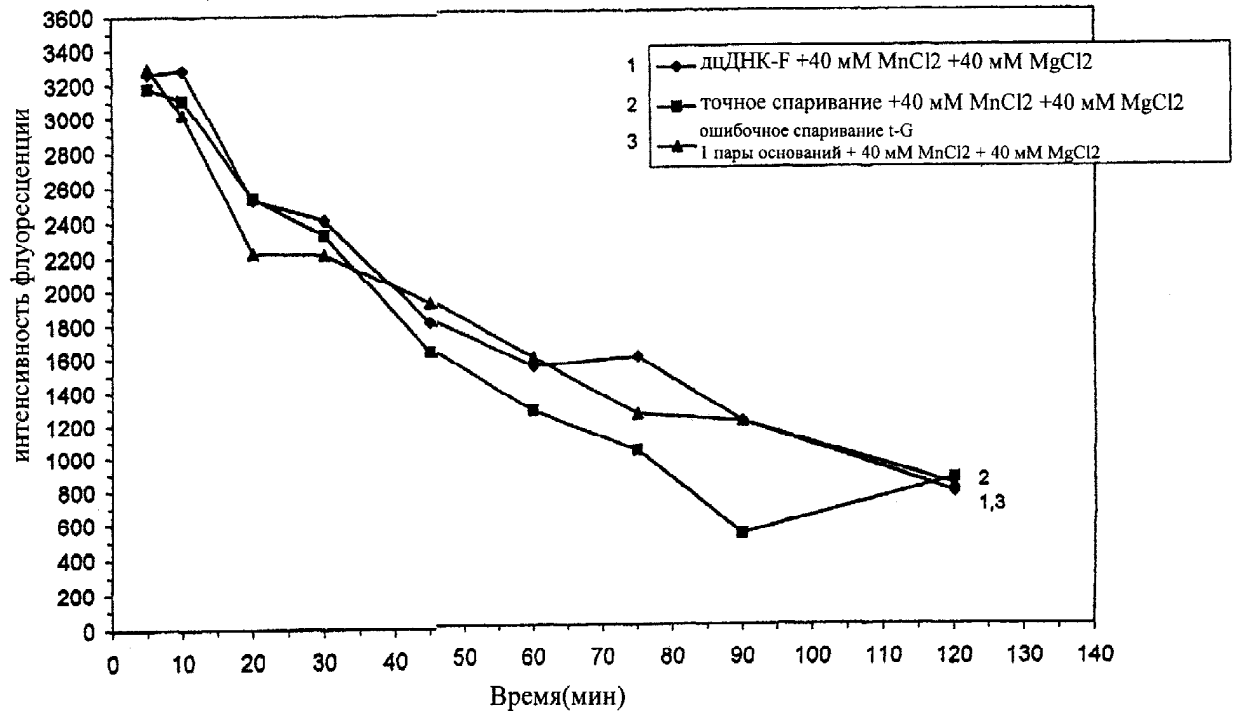
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии 80 mM KCl + 10 mM NaCl на протяжении времени

Фиг. 7С



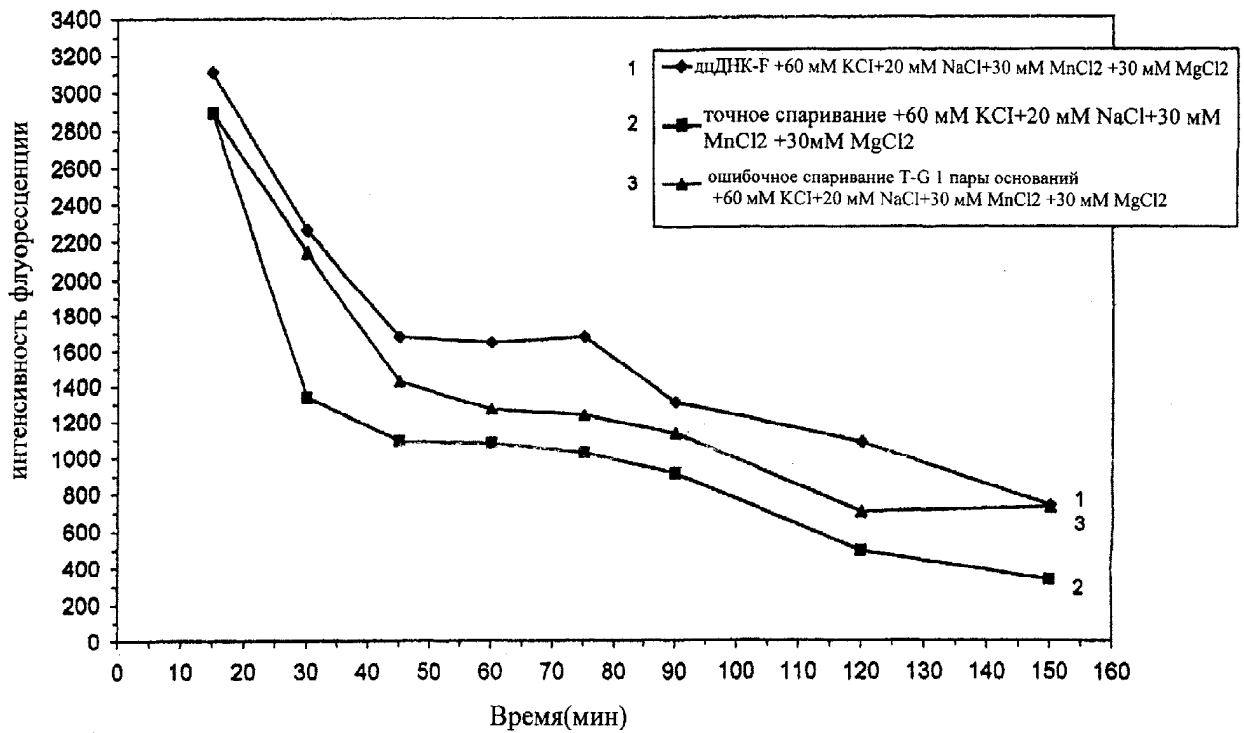
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии 30 mM MnCl2 + 30 mM MgCl2 на протяжении времени

Фиг. 8А



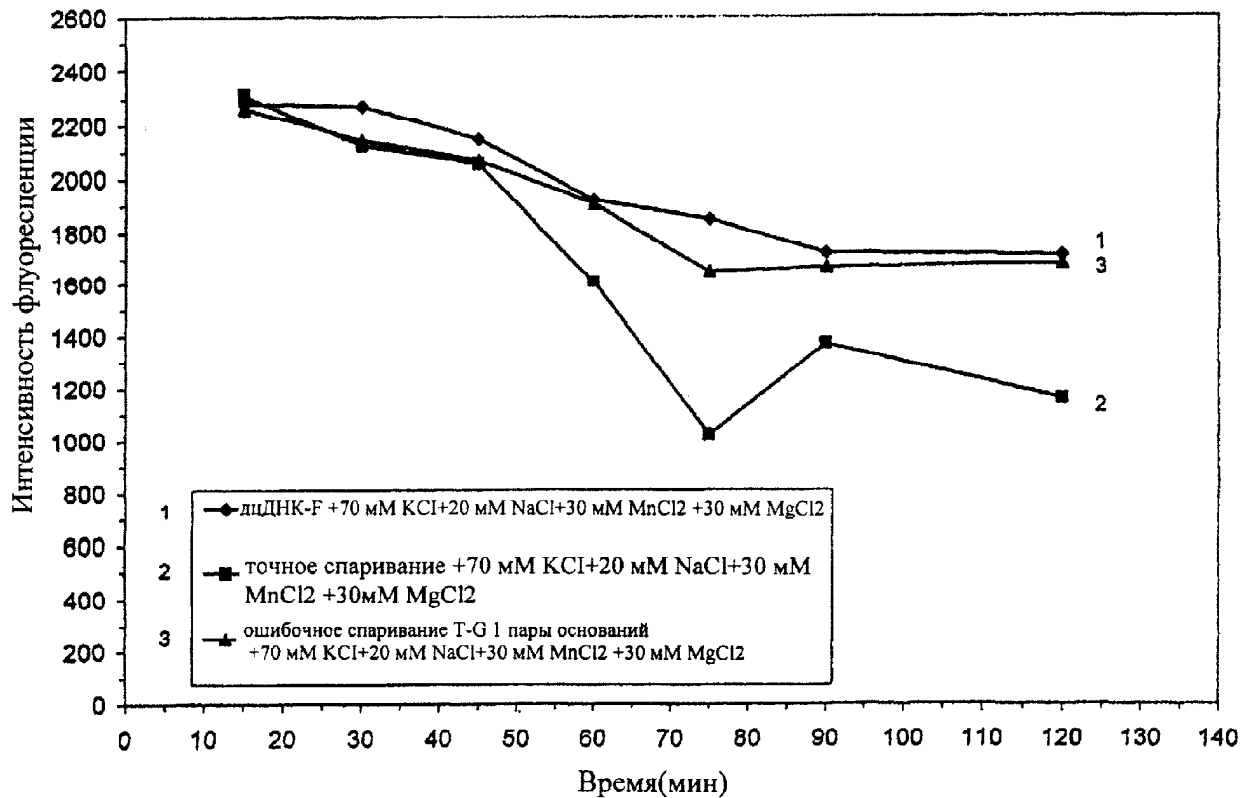
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии 40 mM MnCl<sub>2</sub> + 40 mM MgCl<sub>2</sub> на протяжении времени

Фиг. 8В



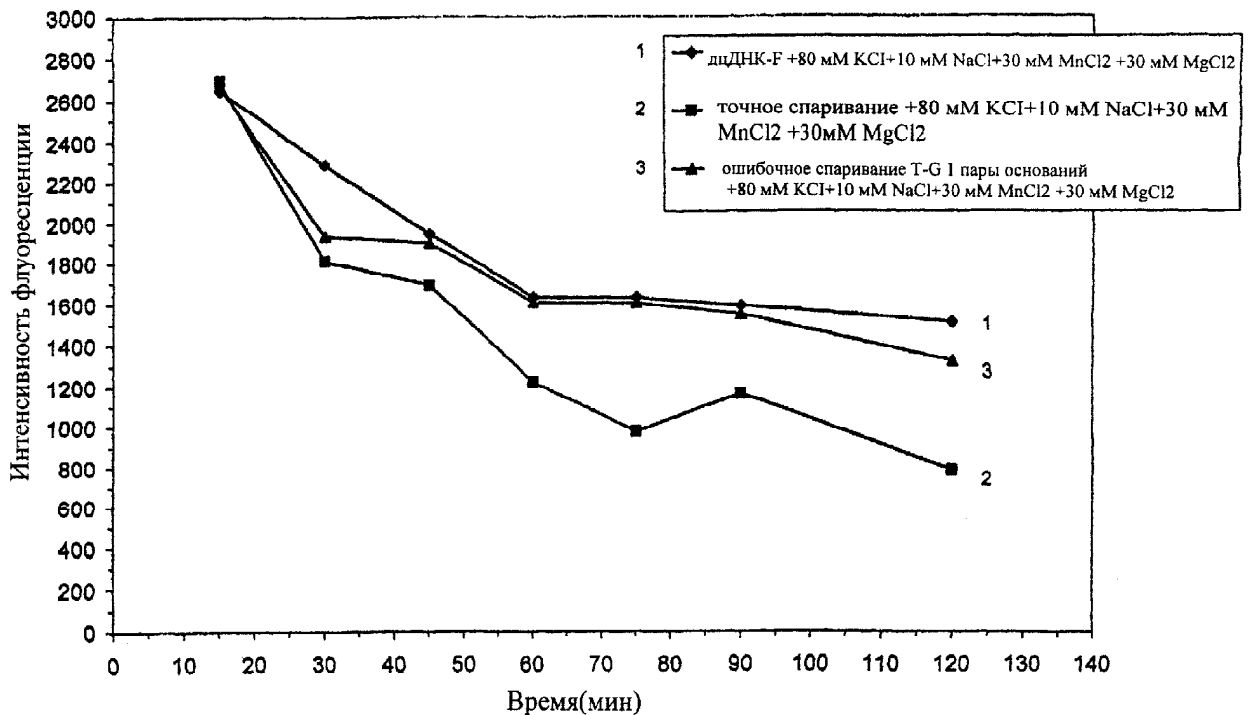
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии одновалентных и двухвалентных катионов на протяжении времени

Фиг. 9А



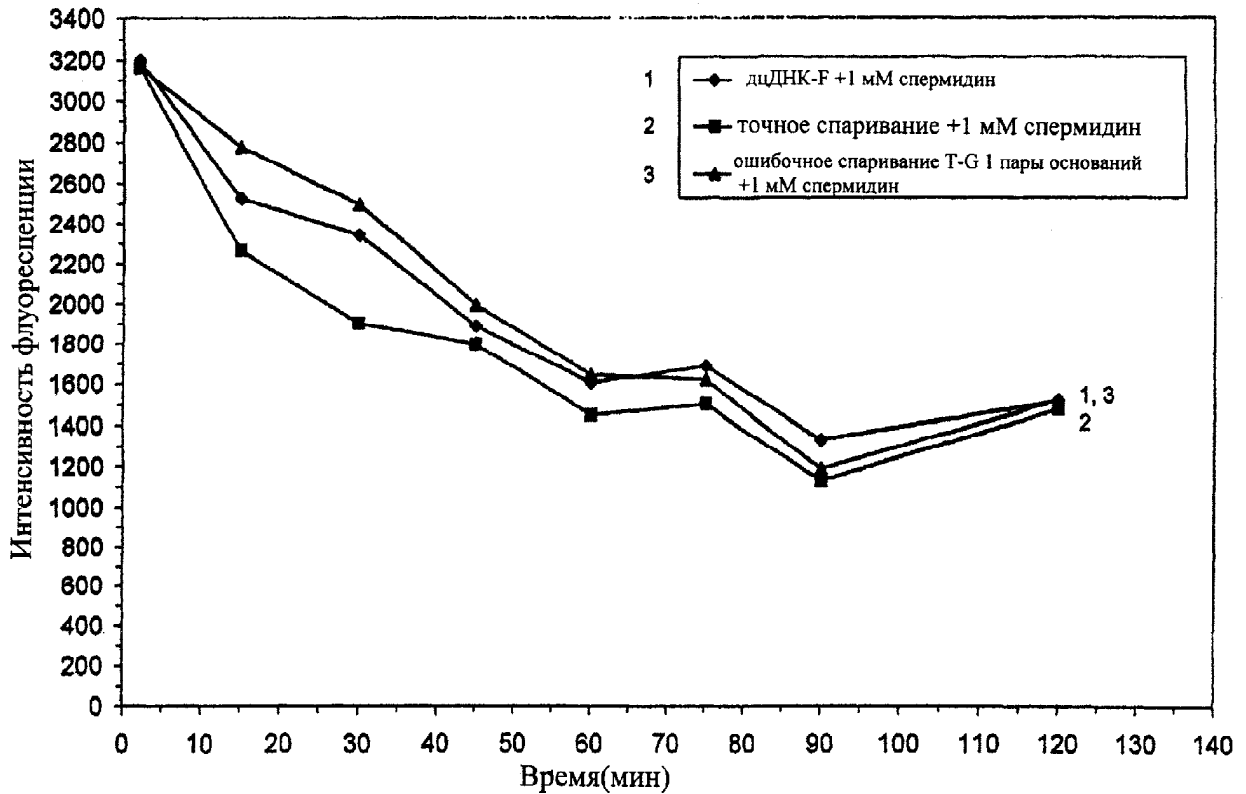
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии одновалентных и двухвалентных катионов на протяжении времени

Фиг. 9В



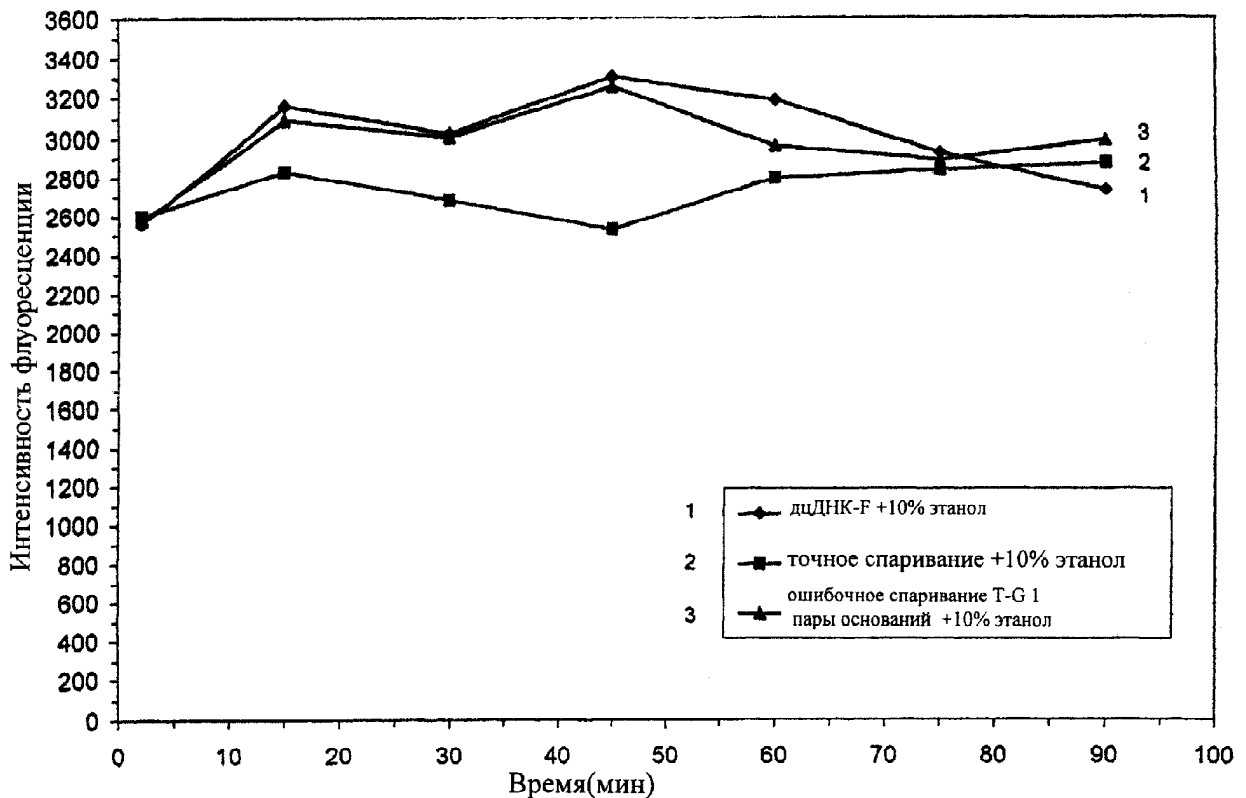
Связывание 15-мерной оцДНК- F (4 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,4 пмоль) в присутствии одновалентных и двухвалентных катионов на протяжении времени

Фиг. 9С



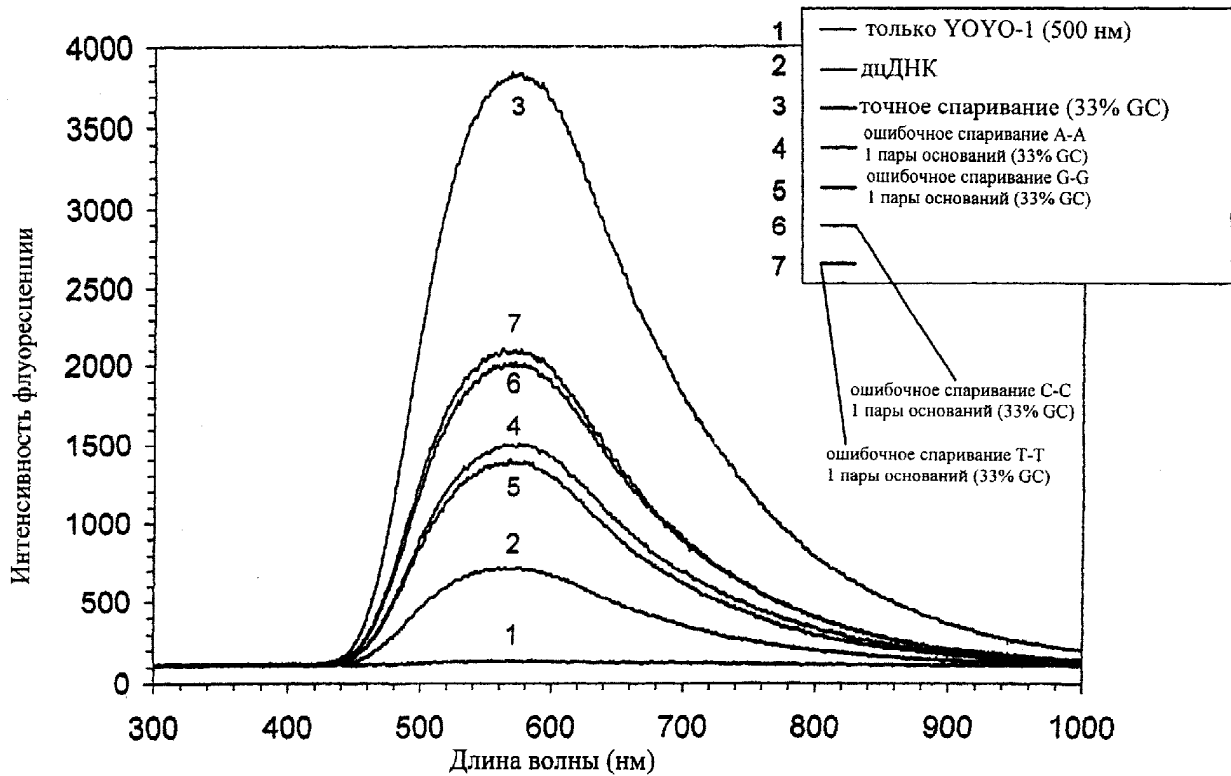
Связывание 15-мерной оцДНК- F (2 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,2 пмоль) в присутствии 1 mM спермидина на протяжении времени

Фиг. 10



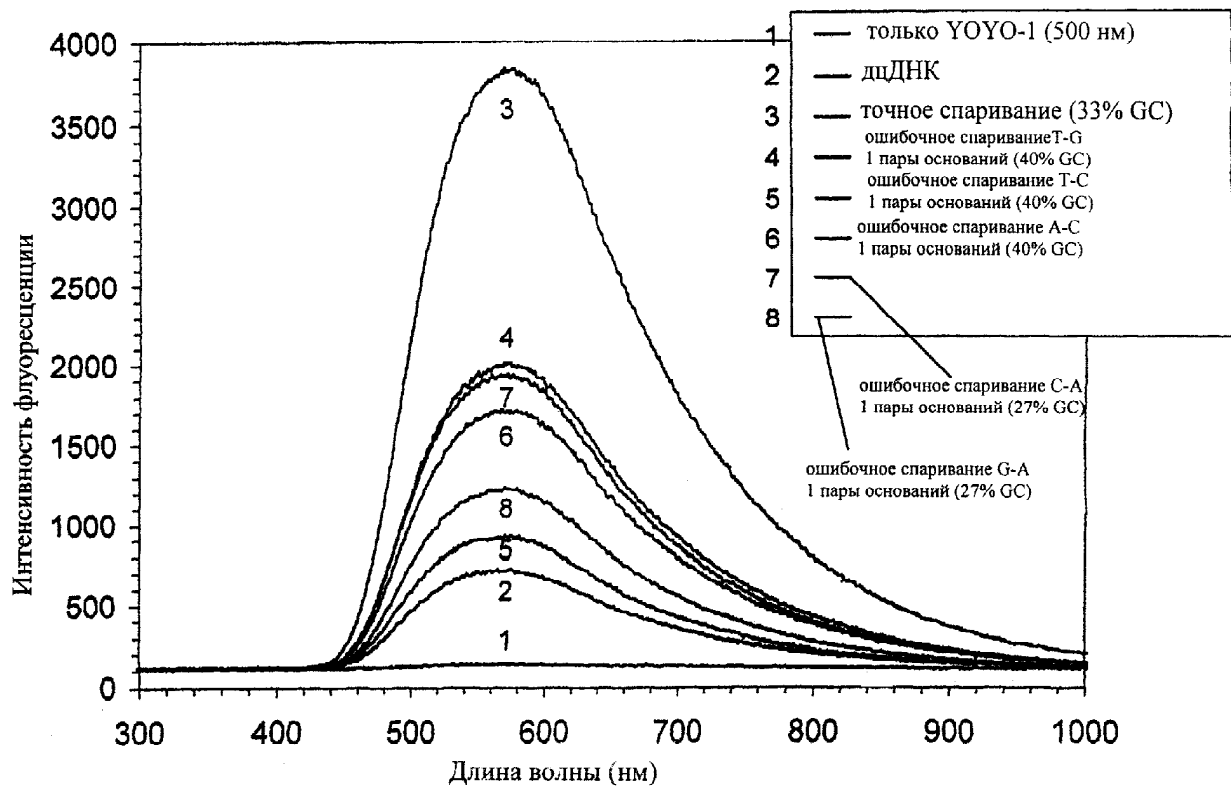
Связывание 15-мерной оцДНК- F (2 пмоль) (53 % GC) и 50-мерной дцДНК (0,2 пмоль) в присутствии 10% этанола на протяжении времени

Фиг. 11



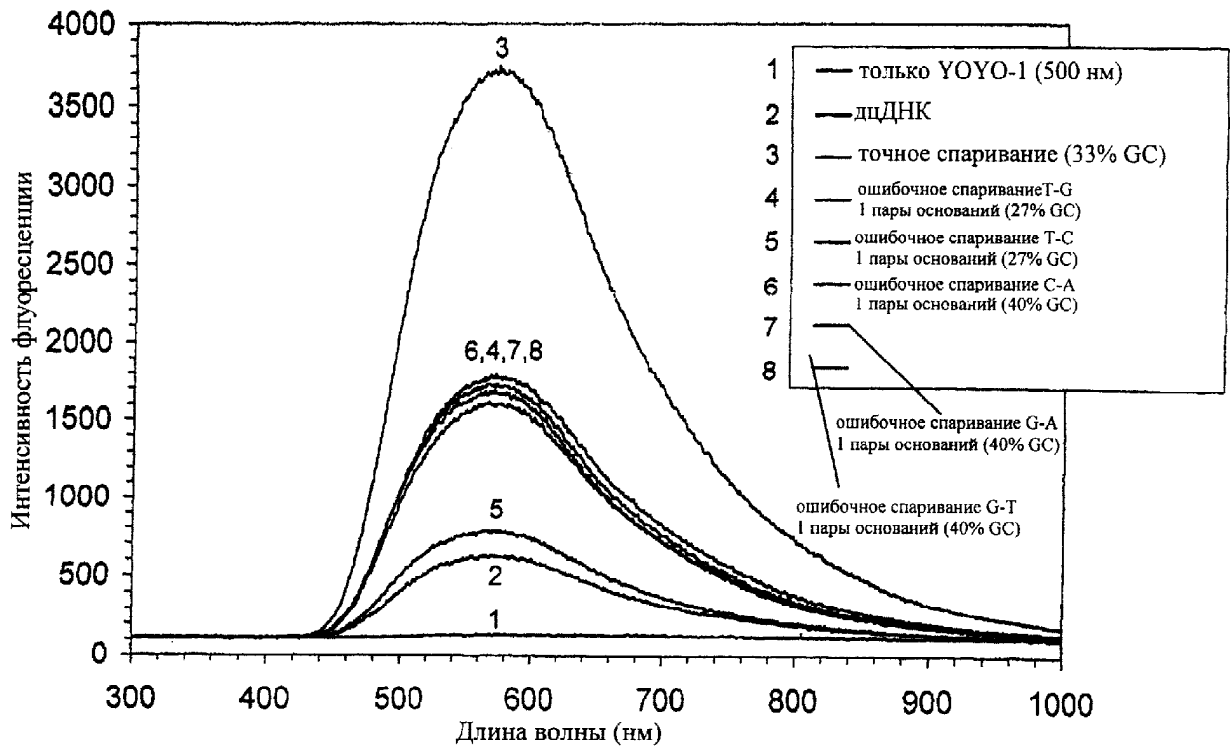
Связывание 15-мерной антисмысловой оцДНК с 50-мерной дцДНК с YOYO-1

Фиг. 12А



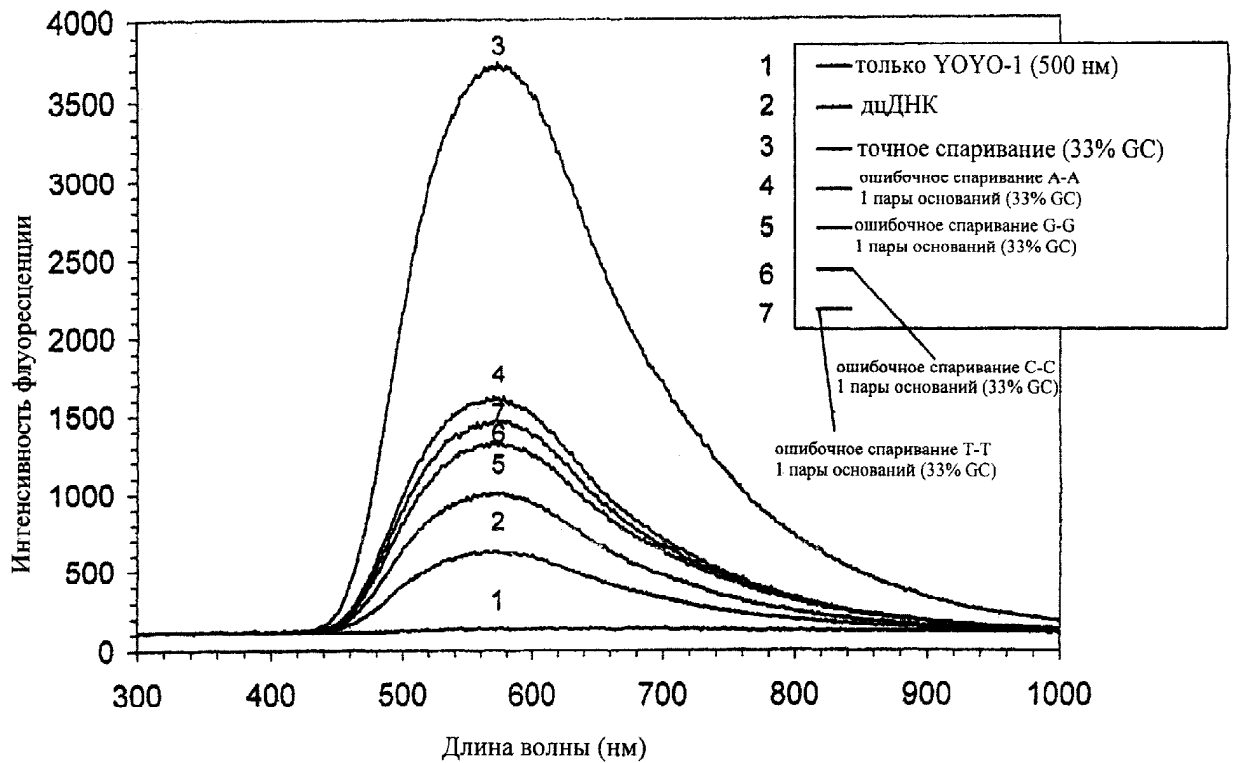
Связывание 15-мерной антисмысловой оцДНК с 50-мерной дцДНК с YOYO-1

Фиг. 12В



Связывание 15-мерной смысловой оцДНК с 50-мерной дцДНК с YOYO-1

Фиг. 12D



Связывание 15-мерной смысловой оцДНК с 50-мерной дцДНК с YOYO-1

Фиг. 12С