



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2006.01); C12Q 1/14 (2006.01); C12Q 1/66 (2006.01); C12N 7/00 (2006.01); C12N 15/74 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015143713, 13.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
13.03.2014

Дата регистрации:  
11.07.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
13.03.2013 US 61/779,177;  
29.10.2013 US 61/897,040;  
12.02.2014 US 61/939,126

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2017 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 11.07.2018 Бюл. № 20

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 13.10.2015

(86) Заявка РСТ:  
US 2014/026536 (13.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/160418 (02.10.2014)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,  
"Гоулингз Интернэшнл Инк.", Лыу Татьяна  
Нгоковна

(72) Автор(ы):

РЭЙ Диего Ариэл (US),  
ДЕФОРЕСТ Николь (US),  
КОКС Хизер (US),  
ШУКЛА Сони (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕВИВ БИОСАЙНСИС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO2008131230 A1, 30.10.2008.  
WO96021007 A2, 11.07.1996. CARLES UBEDA  
et al., Specificity of staphylococcal phage and  
SaPI DNA packaging as revealed by integrase  
and terminase mutations, Mol Microbiol. 2009  
April, Vol.72, No.1, pp. 98-108. GEETA RAM  
et al., Staphylococcal pathogenicity island  
interference with helper phage reproduction is  
a (см. прод.)

## (54) НЕРЕПЛИКАТИВНЫЕ ТРАНСДУКТОРНЫЕ ЧАСТИЦЫ И ОСНОВАННЫЕ НА ТРАНСДУКТОРНЫХ ЧАСТИЦАХ РЕПОРТЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии и вирусологии и касается способов и системы для упаковки репортерных молекул нуклеиновых кислот в нерепликативные трансдукторные частицы для использования в качестве репортерных молекул. Упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в

нерепликативную содержит лизогенизированный геном бактериофага, не содержащий первый ген бактериофага, кодирующий первую последовательность сайта инициации упаковки, причем удаление указанного первого гена бактериофага предотвращает упаковку молекулы нуклеиновой кислоты бактериофага в указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и

плазмиду с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей репортерный ген, содержащую второй ген бактериофага, причем указанный второй ген бактериофага кодирует вторую последовательность сайта инициации упаковки и облегчает упаковку копии указанной плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанный второй ген бактериофага способен экспрессировать белок, который кодируется указанным вторым геном, причем

указанная копия указанной плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты образует репликон, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанный бактериофаг выбран из бактериофага P1 Enterobacteriaceae, бактериофага ф80α или бактериофага ф11 S. aureus. Изобретение позволяет получить нерепликативные трансдукторные частицы, которые не страдают от вредного воздействия литических функций вируса. 8 н. и 128 з.п. ф-лы, 35 ил., 13 табл., 10 пр.

(56) (продолжение):

**paradigm of molecular parasitism, PNAS, October 2, 2012, vol. 109, no. 40, 16300-16305. RU 2209088 C2, 27.07.2003.**

RU 2 6 6 1 1 0 1 C 2

RU 2 6 6 1 1 0 1 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 35/76* (2015.01)  
*C12Q 1/04* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

*C12N 1/20* (2006.01); *C12Q 1/14* (2006.01); *C12Q 1/66* (2006.01); *C12N 7/00* (2006.01); *C12N 15/74* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015143713**, 13.03.2014

(24) Effective date for property rights:  
13.03.2014

Registration date:  
11.07.2018

Priority:

(30) Convention priority:  
13.03.2013 US 61/779,177;  
29.10.2013 US 61/897,040;  
12.02.2014 US 61/939,126

(43) Application published: 20.04.2017 Bull. № 11

(45) Date of publication: 11.07.2018 Bull. № 20

(85) Commencement of national phase: 13.10.2015

(86) PCT application:  
US 2014/026536 (13.03.2014)

(87) PCT publication:  
WO 2014/160418 (02.10.2014)

Mail address:  
119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,  
"Goulingz Interneshnl Ink.", Lyu Tatyana Ngokovna

(72) Inventor(s):

**REY Diego Ariel (US),  
DEFOREST Nikol (US),  
COX Heather (US),  
SHUKLA Soni (US)**

(73) Proprietor(s):

**GENEWEARE BIOSCIENCES, INC. (US)**

## (54) NON-REPLICATIVE TRANSDUCTION PARTICLES AND TRANSDUCTION PARTICLE BASED REPORTER SYSTEMS

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry and virology and relates to methods and systems for packaging reporter nucleic acid molecules in non-replicative transduction particles for use as reporter molecules. Bacterial cell packaging system for packaging the reporter nucleic acid molecule into non-replicative contains a lysogenised bacteriophage genome that does not contain the first bacteriophage gene encoding the first sequence of the packaging initiation

site, wherein the removal of said first bacteriophage gene prevents the packaging of the bacteriophage nucleic acid molecule into said non-replicative transduction particle; and a plasmid with a reporter nucleic acid molecule containing a reporter gene containing a second bacteriophage gene, wherein said second bacteriophage gene encodes a second sequence of the packaging initiation site and facilitates packaging of a copy of said plasmid with a reporter nucleic acid molecule into said non-replicative transduction particle,

wherein said second bacteriophage gene is capable of expressing a protein that is encoded by said second gene, wherein said copy of said plasmid with a reporter nucleic acid molecule forms a replicon that can be packaged into said non-replicative transduction particle, said bacteriophage being selected from the

bacteriophage P1 Enterobacteriaceae, bacteriophage  $\phi 80\alpha$  or bacteriophage  $\phi 11$  S. aureus.

EFFECT: invention makes it possible to obtain non-replicative transduction particles that do not suffer from harmful effects of the lytic functions of the virus.

136 cl, 35 dwg, 13 tbl, 10 ex

R U 2 6 6 1 1 0 1 C 2

R U 2 6 6 1 1 0 1 C 2



### Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США №61/779177, поданной 13 марта 2013 г., предварительной заявкой на патент США №61/897040, поданной 29 октября 2013 г., и предварительной заявкой на патент США №61/939126, поданной 12 февраля 2014 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ.

Указанная копия ASCII, созданная 10 апреля 2014 г., названа 25938PCT\_CRF\_SequenceListing.txt, и ее размер составляет 65305 байт.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для упаковки и доставки нерепликативных трансдукторных репортерных молекул в клетки для обнаружения генов-мишеней в клетках.

### Уровень техники

Трансдукторная частица относится к вирусу, способному доставлять невирусную нуклеиновую кислоту в клетку. Основанные на вирусах репортерные системы были использованы для обнаружения наличия клеток и основаны на лизогенной фазе вируса, делающей возможной экспрессию репортерной молекулы из клетки. Эти основанные на вирусах репортерные системы используют компетентные по репликации трансдукторные частицы, которые экспрессируют репортерные молекулы и заставляют клетку-мишень излучать обнаруживаемый сигнал.

Однако было показано, что литический цикл вируса вреден для основанных на вирусах репортерных анализов. Carrière, C. et al., Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35(12): p. 3232-3239.

Carrière с соавт. изучал люциферазные репортерные фаги *M. tuberculosis*/бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ), у которых свои литические циклы супрессируются при 30°C, но активны при 37°C. С использованием этой системы, Carrière с соавт.

продemonстрировали обнаружение БЦЖ с использованием фаговых репортеров с супрессированным литическим циклом.

Существуют недостатки, однако, связанные с супрессированием, но не исключением функции репликации бактериофага в основанных на бактериофагах репортерных анализах. Во-первых, контрольные функции репликации бактериофага накладывают ограничивающие анализ условия. Например, литический цикл репортерного фага phAE40, используемый Carrière с соавт., подавляли, когда фаг использовали для инфицирования клеток при непермиссивной температуре 30°C. Это температурное требование накладывало ограничивающие условия на репортерный анализ таким образом, что оптимальная температура для бактерий-мишеней составляла 37°C. Эти ограничивающие условия препятствуют оптимальной производительности анализа.

Кроме того, функции репликации вируса трудно контролировать. Репликация вируса должна быть супрессирована при использовании трансдукторных частиц в качестве репортерной системы. Например, литическую активность репортерного фага phAE40, о котором сообщал Carrière с соавт., была снижена, но не была устранена, что приводило к падению люциферазного сигнала в анализе. Carrière с соавт. выделяли возможные причины полученного падения в репортерном сигнале, такие как интактные

экспрессируемые фагами гены и температурные ограничения анализа, все вытекающие из того факта, что литический цикл репортерного фага не был ликвидирован.

Можно ожидать, что репортерные анализы, основываясь на естественном лизогенном цикле фагов, будут проявлять литическую активность спорадически. Кроме того, анализы, которые основаны на лизогенном цикле фага, могут быть склонны к суперинфекционному иммунитету от клеток-мишеней, уже лизогенизированных аналогичным фагом, а также природные системы рестрикции хозяина, которые направлены воздействуют на проникающую вирусную нуклеиновую кислоту, тем самым ограничивая круг хозяев этих репортерных фагов.

В других примерах системы производства трансдукторных частиц разрабатывают для упаковки экзогенных молекул нуклеиновых кислот, но трансдукторная частица часто содержит комбинацию экзогенных молекул нуклеиновых кислот и нативных потомственных вирусных молекул нуклеиновых кислот. Нативный вирус может проявлять литическую активность, что представляет собой препятствие для проведения анализа, и литическая активность вируса должна быть устранена для того, чтобы очистить трансдукторные частицы. Тем не менее, это очищение, как правило, невозможно. В патенте США №2009/0155768 А, озаглавленном Reporter Plasmid Packaging System for Detection of Bacteria, Scholl с соавт. описывает развитие такой системы трансдукторных частиц. Продукт системы представляет собой сочетание репортерной трансдукторной частицы и нативного бактериофага (фиг. 8 в качестве ссылки). Хотя авторы указывают на то, что трансдукторная частица и нативный бактериофаг могут быть разделены с помощью ультрацентрифугирования, такое разделение возможно только в системе, где трансдукторная частица и нативный вирус характеризуются различными плотностями, которые позволили бы разделение с помощью ультрацентрифугирования. В то время как эта характеристика проявляется в основанной на бактериофаге Т7 системе упаковки, описанной в ссылке, для нее не характерно то, что, как правило, применимо для других вирусных систем. Общее для вирусного упаковочного устройства представляет собой проявление упаковки "полной головки", которая приведет к тому, что нативный вирус и трансдукторная частица проявят неотличимые плотности и не смогут быть разделены с помощью ультрацентрифугирования. Вирусные упаковочные системы также основаны на минимальном количестве упаковки как требовании для правильной структурной сборки вируса, что приводит к нативному вирусу и трансдукторной частице с неразличимыми плотностями.

Таким образом, существует потребность в нерепликативных трансдукторных частицах, которые не страдают от вредного воздействия литических функций вируса и с возможностью быть ограниченными иммунитетом суперинфекции и механизмами ограничения хозяев, которые нацелено воздействуют на вирусные молекулы нуклеиновых кислот и вирусные функции, все из которых могут ограничить производительность репортерного анализа путем увеличения пределов обнаружения и приводя в результате к ложноотрицательным результатам.

Даже там, где трансдукторные частицы были сконструированы, способы использования трансдукторных частиц для обнаружения и сообщения о наличии молекул-мишеней нуклеиновых кислот в клетках характеризуются ограничениями. Некоторые способы требуют разрушения клетки и трудоемких техник для выделения и обнаружения транскриптов в лизате. Способы обнаружения включают в себя использование меченых зондов, таких как антитела, аптамеры, или зондов-нуклеиновых кислот. Меченые зонды, направленные на ген-мишень, могут приводить к

неспецифическому связыванию с непредусмотренными мишенями или производить сигналы, которые характеризуются высоким соотношением сигнал-шум. Таким образом, существует потребность в специфических, эффективных и точных способах обнаружения и сообщения об эндогенных молекулах нуклеиновых кислот в клетках.

Соответственно, необходимы способы и системы для производства нерепликативных трансдукторных частиц, которые делают возможной упаковку и экспрессию репортерных молекул в клетках, при этом устраняя компетентный по репликации потомственный вирус. Также необходимы эффективные и точные способы обнаружения молекул в клетках с использованием экспрессированных репортерных молекул.

Сущность изобретения

В настоящем документе раскрыта упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная бактериальная клетка содержит лизогенизированный геном бактериофага, не содержащий ген бактериофага, кодирующий последовательность сайта инициации упаковки, причем удаление указанного гена бактериофага препятствует упаковке молекулы нуклеиновой кислоты бактериофага в указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит второй ген бактериофага, причем указанный второй ген бактериофага кодирует последовательность сайта инициации упаковки и облегчает упаковку копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанный второй ген бактериофага способен экспрессировать белок, который кодируется указанным геном, причем указанная копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты образует репликон, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. Согласно другому варианту осуществления промотор выбирают для содействия реактивности репортерной молекулы, экспрессированной из указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанную бактериальную клетку. Согласно одному варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит точку начала репликации. Согласно еще одному варианту осуществления репликон содержит конкатемер, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

Согласно одному варианту осуществления первый и второй указанные гены бактериофага каждый содержат ген *pacA* бактериофага P1 *Enterobacteriaceae* и содержат указанную последовательность сайта инициации упаковки. Согласно одному варианту осуществления второй ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 9. Согласно другому варианту осуществления репликон представляет собой литический репликон бактериофага P1 *Enterobacteriaceae*. Согласно некоторым вариантам осуществления репликон содержит контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловой промотор P53, ген *terL* и делецию внутри рамки считывания гена *kilA*. Согласно одному варианту осуществления репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

Согласно еще одному варианту осуществления первый и второй гены бактериофага каждый содержат ген малой терминазы (*terS*), содержащий указанную последовательность сайта инициации упаковки. Согласно одному варианту осуществления ген *terS* представляет собой ген *terS* бактериофага  $\phi 11$  или  $\phi 80\alpha$  *S. aureus*.

Согласно другому варианту осуществления репликон происходит от точки начала

репликации плазмиды pT181 *S. aureus*. Согласно еще одному варианту осуществления репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит рас-сайт. Согласно другим вариантам осуществления рас-сайт указанного второго гена бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 7. Согласно одному аспекту последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит *cos*-сайт. Согласно другому аспекту последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит конкатемерное сцепление.

Согласно другому аспекту плаزمида содержит указанную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно одному аспекту второй ген бактериофага функционально связан с промотором. Согласно другому варианту осуществления промотор представляет собой индуцируемый промотор или конститутивный промотор. Согласно одному варианту осуществления бактериофаг включает бактериофаг P1 *Enterobacteriaceae*. Согласно еще одному варианту осуществления бактериофаг включает бактериофаг  $\phi 80\alpha$  или бактериофаг  $\phi 11$  *S. aureus*. Согласно одному аспекту бактериальная клетка включает клетку *E. coli*. Согласно другому аспекту бактериальная клетка включает клетку *S. aureus*. Согласно еще одному варианту осуществления бактериальная клетка включает грамотрицательную клетку. Согласно другим вариантам осуществления бактериальная клетка включает грамположительную клетку.

Согласно другому аспекту репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит репортерный ген. Согласно одному аспекту репортерный ген кодирует обнаруживаемый и/или селектируемый маркер. Согласно некоторым аспектам репортерный ген выбирают из группы, состоящей из ферментов, опосредующих люминесцентные реакции (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *gus*, *nluc*), ферментов, опосредующих колориметрические реакции (*LacZ*, *HRP*), флуоресцентных белков (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*, *CFP*, *BFP*, *mCherry*, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), аффинных пептидов (*His-Tag*, *3X-FLAG*) и селективных маркеров (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*). Согласно другому аспекту репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер. Согласно еще одному аспекту репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты.

Согласно одному варианту осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту. Согласно другому варианту осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит *cis*-репрессорную последовательность. Согласно еще одному варианту осуществления копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, причем последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту и причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит *cis*-репрессорную последовательность.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу включает обеспечение условий указанной описанной в настоящем документе бактериальной клетке, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой кислоты; и выделение указанной нерепликативной

трансдукторной частицы, содержащей указанную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту осуществления нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага. Согласно другому варианту осуществления индукция указанной литической фазы запускает удаление указанной молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из указанного генома указанной бактериальной клетки.

Согласно другому варианту осуществления композиция содержит указанную нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую копию указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, полученной с помощью описанного в настоящем документе способа.

Настоящее изобретение включает упаковочную систему бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная бактериальная клетка содержит лизогенизированный геном бактериофага, содержащий первую последовательность сайта инициации упаковки бактериофага, причем указанная первая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит мутацию, которая предотвращает упаковку молекулы нуклеиновой кислоты бактериофага в указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит вторую последовательность сайта инициации упаковки бактериофага, причем указанная вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага не содержит указанную мутацию и облегчает упаковку копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанная копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты образует репликон для упаковки в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

Согласно одному варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. Согласно другому варианту осуществления промотор выбирают для содействия реактивности репортерной молекулы, экспрессированной из указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанной бактериальной клетке. Согласно еще одному варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит точку начала репликации. Согласно одному варианту осуществления репликон содержит конкатемер, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу. Согласно другому аспекту первая и вторая последовательности сайта инициации упаковки бактериофага каждая содержит последовательность сайта инициации упаковки из гена малой терминазы. Согласно одному аспекту первая и указанная вторая последовательности сайта инициации упаковки бактериофага каждая содержит последовательность рас-сайта из гена *racA* бактериофага P1 *Enterobacteriaceae*. Согласно другому аспекту первая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит SEQ ID NO: 2. Согласно еще одному аспекту вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит SEQ ID NO: 1. Согласно одному варианту осуществления репликон включает литический репликон бактериофага P1 *Enterobacteriaceae*. Согласно другому варианту осуществления репликон содержит контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловой промотор P53, ген *repL* и делецию внутри рамки считывания гена *kilA*. Согласно одному варианту осуществления репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым аспектам первая и вторая последовательности сайта инициации упаковки бактериофага каждая содержит последовательность рас-сайта из гена малой терминазы (*terS*) бактериофага  $\phi$ 11 или  $\phi$ 80 $\alpha$  *S. aureus*. Согласно одному аспекту репликон

происходит от точки начала репликации плазмиды pT181 *S. aureus*. Согласно еще одному аспекту репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 5. Согласно одному аспекту первая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления

5 вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 1. Согласно другим вариантам осуществления последовательность сайта инициации упаковки содержит рас-сайт. Согласно другому варианту осуществления последовательность сайта инициации упаковки содержит cos-сайт. Согласно еще другому варианту осуществления последовательность сайта

10 инициации упаковки содержит конкатемерное сцепление. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация в указанной первой последовательности сайта инициации упаковки бактериофага содержит молчащую мутацию. Согласно другому варианту осуществления мутация в указанной первой последовательности сайта инициации упаковки бактериофага предотвращает расщепление указанной

15 последовательности инициации упаковки. Согласно другому варианту осуществления плазида содержит указанные репортерные молекулы нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту осуществления бактериофаг включает бактериофаг P1 *Enterobacteriaceae*.

Согласно другому варианту осуществления бактериофаг включает бактериофаг ф11

20 или бактериофаг ф80α *S. aureus*. Согласно одному аспекту бактериальная клетка включает клетку *E. coli*. Согласно другому аспекту бактериальная клетка включает клетку *S. aureus*. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериальная клетка включает грамотрицательную клетку. Согласно другому аспекту бактериальная клетка включает грамположительную клетку. Согласно другому аспекту репортерная молекула

25 нуклеиновой кислоты содержит репортерный ген. Согласно еще одному аспекту репортерный ген кодирует обнаруживаемый маркер и/или селективируемый маркер.

Согласно другим аспектам репортерный ген выбирают из группы, состоящей из: генов, кодирующих ферменты, опосредующие люминесцентные реакции (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *guc*, *pluc*), генов, кодирующих ферменты, опосредующие колориметрические

30 реакции (*LacZ*, *HRP*), генов, кодирующих флуоресцентные белки (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*, *CFP*, *BFP*, *mCherry*, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), молекул нуклеиновых кислот, кодирующих аффинные пептиды (*His-Tag*, *3X-FLAG*), и генов, кодирующих селективные маркеры (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*). Согласно другому аспекту репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер. Согласно другим

35 аспектам репликон упаковывается в указанную нерепликативную трансдукторную частицу с помощью упаковочного устройства бактериофагов. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты.

40 Согласно другому варианту осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

Согласно одному аспекту последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность. Согласно другому аспекту копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит последовательность

45 транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, причем последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту и причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты

содержит цис-репрессорную последовательность.

Согласно определенным аспектам способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу включает: обеспечение условий указанной описанной в настоящем документе бактериальной

5 клетке, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой кислоты; и выделение указанной нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей указанную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты.

10 Согласно другим аспектам нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага. Согласно одному аспекту индукция указанной литической фазы запускает удаление указанной молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из указанного генома указанной бактериальной клетки.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрена композиция,

15 содержащая указанную нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую копию указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, полученной с помощью описанного в настоящем документе способа.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрена упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой

20 кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная бактериальная клетка содержит: лизогенизированный геном бактериофага, содержащий первый ген бактериофага, содержащий делецию последовательности сайта инициации упаковки указанного первого гена бактериофага, которая предотвращает упаковку молекулы нуклеиновой кислоты бактериофага в указанную нерепликативную трансдукторную

25 частицу; и репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит второй ген бактериофага, содержащий вторую последовательность сайта инициации упаковки, облегчающую упаковку копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанный второй ген бактериофага кодирует белок, причем указанная копия указанной репортерной

30 молекулы нуклеиновой кислоты образует репликон для упаковки в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

Согласно другому аспекту репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. Согласно одному аспекту промотор выбирают для содействия реактивности репортерной молекулы, экспрессированной из указанной

35 репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанной бактериальной клетке.

Согласно определенным аспектам репортерная нуклеиновая кислота содержит точку начала репликации. Согласно другому аспекту репликон содержит конкатемер, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

Согласно одному аспекту первый и указанный второй гены бактериофага каждый

40 содержит ген *расА* бактериофага P1 Enterobacteriaceae и содержит указанную последовательность сайта инициации упаковки. Согласно другому аспекту первый ген бактериофага содержит SEQ ID NO: 6. Согласно определенным аспектам второй ген бактериофага содержит SEQ ID NO: 7. Согласно одному аспекту репликон включает литический репликон бактериофага P1 Enterobacteriaceae. Согласно еще другому аспекту

45 репликон содержит контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловой промотор P53, ген *герL* и делецию внутри рамки считывания гена *kilA*. Согласно другому аспекту репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 3. Согласно другим аспектам первый и указанный второй гены бактериофага каждый содержит ген малой

терминазы (terS), содержащий указанную последовательность сайта инициации упаковки. Согласно одному аспекту ген terS представляет собой тон terS бактериофага  $\phi 11$  или бактериофага  $\phi 80\alpha$  *S. aureus*. Согласно другому аспекту первый ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 8. Согласно еще одному аспекту второй ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 9. Согласно одному аспекту репликон происходит от точки начала репликации плазмиды pT181 *S. aureus*. Согласно одному варианту осуществления репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 5. Согласно другому варианту осуществления последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит рас-сайт. Согласно еще одному варианту осуществления последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит cos-сайт.

Согласно определенным вариантам осуществления последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит конкатемерное сцепление. Согласно одному варианту осуществления плазмиды содержит указанную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно другому варианту осуществления второй ген бактериофага функционально связан с промотором. Согласно еще другому варианту осуществления промотор представляет, собой индуцируемый промотор или конститутивный промотор. Согласно определенным вариантам осуществления бактериофаг включает бактериофаг P1 Enterobacteriaceae. Согласно одному варианту осуществления бактериофаг включает бактериофаг  $\phi 80\alpha$  или бактериофаг  $\phi 11$  *S. aureus*. Согласно другим вариантам осуществления бактериальная клетка включает клетку *E. coli*. Согласно другому варианту осуществления бактериальная клетка включает клетку *S. aureus*. Согласно одному варианту осуществления бактериальная клетка включает грамотрицательную клетку. Согласно другому варианту осуществления бактериальная клетка включает грамположительную клетку.

Согласно другому аспекту репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит репортерный ген. Согласно одному аспекту репортерный ген кодирует обнаруживаемый и/или селектируемый маркер. Согласно другому аспекту репортерный ген выбирают из группы, состоящей из генов, кодирующих ферменты, опосредующие люминесцентные реакции (luxA, luxB, luxAB, luc, gus, nluc), генов, кодирующих ферменты, опосредующие колориметрические реакции (LacZ, HRP), генов, кодирующих флуоресцентные белки (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), молекул нуклеиновых кислот, кодирующих аффинные пептиды (His-Tag, 3X-FLAG), и генов, кодирующих селективные маркеры (ampC, tet(M), CAT, erm). Согласно одному варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер. Согласно другому варианту осуществления репликон упаковывается в указанную нерепликативную трансдукторную частицу с помощью упаковочного устройства бактериофагов. Согласно еще другому варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту. Согласно другому варианту осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность. Согласно определенным вариантам осуществления копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной копии



указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, причем последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту и причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

- 5 В настоящем изобретении предусмотрен способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, включающий: обеспечение условий указанной бактериальной клетке по любому из пп. 86-125, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой
- 10 кислоты; и выделение указанной нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей указанную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту осуществления нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага. Согласно другому варианту осуществления индукция указанной литической фазы вызывает удаление указанной молекулы нуклеиновой кислоты
- 15 геномного острова из указанного генома указанной бактериальной клетки.

Согласно некоторым аспектам в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая указанную нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую копию указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, полученной с помощью описанного в настоящем документе способа.

- 20 Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрена упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная бактериальная клетка содержит: лизогенизированный геном бактериофага, не содержащий упаковочный ген и содержащий гены, которые кодируют белки, которые образуют
- 25 указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и молекулу нуклеиновой кислоты геномного острова, содержащую репортерную молекулу нуклеиновой кислоты и упаковочный ген. Согласно одному аспекту, упаковочный ген содержит ген малой терминазы (terS). Ген terS включает ген terS бактериофага ф80α или ген terS бактериофага ф11 *S. aureus*.

- 30 Согласно одному аспекту ген terS содержит последовательность SEQ ID NO: 9. Согласно другому аспекту молекула нуклеиновой кислоты геномного острова включает молекулу нуклеиновой кислоты SaPIbov2 геномного острова. Согласно еще одному аспекту молекулу нуклеиновой кислоты геномного острова выбирают из группы, состоящей из молекул нуклеиновой кислоты геномного острова SAPI, SaPI1, SaPI2,
- 35 SaPIbov1 и SaPIbov2. Согласно другому варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. Согласно еще одному варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит точку начала репликации. Согласно некоторым вариантам осуществления бактериофаг включает бактериофаг ф80α или бактериофаг ф11 *S. aureus*. Согласно другим вариантам
- 40 осуществления бактериальная клетка включает клетку *S. aureus*. Согласно одному варианту осуществления молекула нуклеиновой кислоты геномного острова содержит ген интегразы и причем указанный ген интегразы кодирует белок-интегразу для вырезания и интегрирования молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из и в бактериальный геном указанной бактериальной клетки. Согласно другому варианту
- 45 осуществления ген интегразы содержит последовательность SEQ ID NO: 10. Согласно еще одному варианту осуществления молекулу нуклеиновой кислоты геномного острова интегрируют в бактериальный геном указанной бактериальной клетки.

Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты геномного острова

может быть реплицирована и образовывать молекулярный репликон, который поддается упаковке с помощью упаковочного устройства бактериофагов в указанной бактериальной клетке. Согласно другому аспекту молекула нуклеиновой кислоты образует конкатемер. Согласно еще одному аспекту реплицированная молекула нуклеиновой кислоты геномного острова способна быть упакована в указанную нерепликативную трансдукторную частицу. Согласно некоторым аспектам упаковочный ген содержит последовательность сайта рас. Согласно другому аспекту упаковочный ген содержит последовательность сайта cos. Согласно еще одному варианту осуществления упаковочный ген содержит конкатемерное сцепление.

Согласно другим вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит репортерный ген. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерный ген кодирует обнаруживаемый и/или селективируемый маркер. Согласно другому варианту осуществления репортерный ген выбирают из группы, состоящей из ферментов, опосредующих люминесцентные реакции (luxA, luxB, luxAB, luc, gus, nluc), ферментов, опосредующих колориметрические реакции (LacZ, HRP), флуоресцентных белков (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), аффинных пептидов (His-Tag, 3X-FLAG) и селективных маркеров (amp<sup>r</sup>, tet(M), CAT, erm). Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер. Согласно другим вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты геномного острова не содержит ген интегразы. Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении включает в себя бактериальный ген, содержащий ген интегразы, функционально связанный с промотором, и причем указанный ген интегразы кодирует белок-интегразу для вырезания и интеграции указанной молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из и в бактериальный геном указанной бактериальной клетки. Согласно одному варианту осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, комплементарную второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты. Согласно другим вариантам осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту. Согласно еще другим вариантам осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность. Согласно другому варианту осуществления копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, комплементарную второй последовательности в указанной копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты. Согласно другим вариантам осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту. Согласно другим вариантам осуществления последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

В настоящем изобретении предусмотрен способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, включающий: обеспечение условий указанной бактериальной клетке по любому из пп. 130-160, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой кислоты; и выделение указанной нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей указанную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага. Согласно одному варианту осуществления

индукция указанной литической фазы вызывает удаление указанной молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из указанного генома указанной бактериальной клетки.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая указанную нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую копию указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, полученной с помощью описанного в настоящем документе способа.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ обнаружения наличия или отсутствия бактериальной клетки в образце, включающий: введение в образец нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей репортерный ген, кодирующий репортерную молекулу, и не содержащей геном бактериофага при таких условиях, что нерепликативная трансдукторная частица может преобразовывать указанную бактериальную клетку и причем указанный репортерный ген может быть экспрессирован в указанной бактериальной клетке; обеспечение условий для активации указанной репортерной молекулы и обнаружение наличия или отсутствия репортерного сигнала, передаваемого от указанной экспрессированной репортерной молекулы, причем наличие указанного репортерного сигнала правильно указывает на наличие указанной бактериальной клетки.

Согласно одному варианту осуществления способ обеспечивает по меньшей мере 80% специфичность обнаружения по отношению к стандарту, по меньшей мере 90% специфичность обнаружения по отношению к стандарту или по меньшей мере 95% специфичность обнаружения по отношению к стандарту. Согласно другому варианту осуществления способ обеспечивает по меньшей мере 80% чувствительность обнаружения по отношению к стандарту, по меньшей мере 85% чувствительность обнаружения по отношению к стандарту или по меньшей мере 90% чувствительность обнаружения по отношению к стандарту, или по меньшей мере 95% чувствительность обнаружения по отношению к стандарту. Согласно еще одному варианту осуществления способ обеспечивает по меньшей мере 95% специфичность обнаружения и по меньшей мере 90% чувствительность обнаружения по отношению к стандарту. Согласно другому варианту осуществления стандарт представляет собой общепринятый стандарт. Согласно еще одному варианту осуществления бактериальная клетка включает резистентную к метициллину клетку *Staphylococcus aureus* (MRSA). Согласно другим вариантам осуществления бактериальная клетка содержит чувствительную к метициллину клетку *Staphylococcus aureus* (MSSA).

Согласно другому варианту осуществления репортерный ген кодирует обнаруживаемый и/или селективируемый маркер. Согласно одному варианту осуществления репортерный ген выбирают из группы, состоящей из генов, кодирующих ферменты, опосредующие люминесцентные реакции (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *rus*, *nluc*), генов, кодирующих ферменты, опосредующие колориметрические реакции (*LacZ*, *HRP*), генов, кодирующих флуоресцентные белки (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*, *CFP*, *BFP*, *mCherry*, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), молекул нуклеиновых кислот, кодирующих аффинные пептиды (*His-Tag*, *3X-FLAG*), и генов, кодирующих селективные маркеры (*amp<sup>R</sup>*, *tet<sup>R</sup>*(M), *CAT*, *erm*). Согласно одному варианту осуществления репортерный ген функционально связан с конститутивным промотором.

Согласно другому аспекту репортерный сигнал может быть обнаружен от образца при пределе обнаружения (LoD), составляющем менее 1000 колониеобразующих единиц (КОЕ). Согласно другим аспектам репортерный сигнал может быть обнаружен от образца при пределе обнаружения (LoD), составляющем менее 100 колониеобразующих

единиц (КОЕ). Согласно одному аспекту репортерный сигнал может быть обнаружен от образца при пределе обнаружения (LoD), составляющем менее 10 колониеобразующих единиц (КОЕ). Согласно другим аспектам репортерный сигнал может быть обнаружен от образца при LoD, составляющем менее пяти КОЕ. Согласно другому аспекту репортерный сигнал может быть обнаружен от образца при LoD, составляющем три или менее КОЕ.

Согласно одному варианту осуществления способ включает обеспечение антибиотиком указанного образца в заранее определенной концентрации и обнаружение наличия или отсутствия указанного репортерного сигнала для определения того, устойчива или чувствительна ли указанная бактериальная клетка к указанному антибиотику. Согласно другому варианту осуществления способ включает обеспечение различными предварительно определенными концентрациями антибиотика указанного образца и определение количества указанного репортерного сигнала для определения минимальной ингибирующей концентрации указанной бактериальной клетки для указанного антибиотика.

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая конструкт нуклеиновой кислоты, который кодирует репортерный транскрипт нуклеиновой кислоты, способный образовывать по меньшей мере две конформации, включающие первую конформацию, которая предотвращает экспрессию репортера, содержащего внутримолекулярную двухцепочечную область, содержащую первую подпоследовательность и вторую подпоследовательность, и вторую конформацию, которая не содержит указанную внутримолекулярную двухцепочечную область и обеспечивает экспрессию репортерного гена, причем преобразование между указанными первой и второй конформациями опосредуется конкурентным связыванием клеточного транскрипта с указанной первой и/или указанной второй подпоследовательностью.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрена нерепликативная трансдукторная частица, содержащая указанный конструкт нуклеиновой кислоты. Согласно еще одному аспекту конкурентное связывание указанного клеточного транскрипта с указанной первой и/или указанной второй подпоследовательностью приводит к указанной второй конформации указанного репортерного конструкта нуклеиновой кислоты. Согласно одному аспекту первая подпоследовательность или вторая подпоследовательность содержит цис-репрессорную последовательность. Согласно другому аспекту цис-репрессорная последовательность содержит последовательность, которая комплементарна или по существу комплементарна части указанного клеточного транскрипта. Согласно другим аспектам первая подпоследовательность или указанная вторая подпоследовательность содержит последовательность репортерного гена. Согласно еще одному аспекту последовательность репортерного гена содержит сайт связывания рибосом. Согласно другим аспектам последовательность репортерного гена кодирует обнаруживаемую молекулу. Согласно другому аспекту обнаруживаемый маркер содержит флуоресцентную молекулу или фермент, способный опосредовать люминесцентную или колориметрическую реакцию. Согласно одному варианту осуществления последовательность репортерного гена кодирует селективируемый маркер. Согласно другому варианту осуществления селективируемый маркер содержит ген устойчивости к антибиотику.

Согласно другим вариантам осуществления первая подпоследовательность и указанная вторая подпоследовательность находятся в цис-положении друг к другу на

указанном конструкте нуклеиновой кислоты с образованием указанной внутримолекулярной двухцепочечной области. Согласно некоторым вариантам осуществления первая подпоследовательность и указанная вторая подпоследовательность комплементарны или по существу комплементарны друг другу и образуют указанную внутримолекулярную двухцепочечную область. Согласно одному варианту осуществления первая подпоследовательность или указанная вторая подпоследовательность указанной первой конформации содержит транскрипционную энхансерную последовательность, и причем указанная транскрипционная энхансерная последовательность находится выше против хода транскрипции от кодирующей области указанной последовательности репортерного гена. Согласно другому варианту осуществления первая конформация указанного репортерного luxB транскрипта нуклеиновой кислоты способна связываться с расщепляющим ферментом. Согласно другим вариантам осуществления первая конформация указанного репортерного транскрипта нуклеиновой кислоты представляет собой мишень для дегградации с помощью клеточного фермента. Согласно другим аспектам первая конформация содержит несвязывающую внутримолекулярную область. Согласно другому аспекту несвязывающая внутримолекулярная область расположена со стороны 3' указанной первой подпоследовательности и со стороны 5' указанной второй подпоследовательности. Согласно другим аспектам несвязывающая внутримолекулярная область содержит последовательность YUNR, в которой Y представляет собой пиримидин, U представляет собой урацил, N представляет собой любой нуклеотид и R представляет собой пурин.

Согласно одному варианту осуществления первая подпоследовательность или вторая подпоследовательность содержит модифицированную последовательность указанного клеточного транскрипта. Согласно другому варианту осуществления модифицированная последовательность содержит нуклеотидную замену. Согласно еще одному варианту осуществления модифицированная последовательность содержит вставку, делецию или инверсию последовательности указанного клеточного транскрипта.

Способ включает композицию, содержащую конструкт нуклеиновой кислоты, который кодирует репортерный транскрипт нуклеиновой кислоты, содержащий последовательность репортерного гена, и способен образовывать по меньшей мере две конформации указанного репортерного транскрипта нуклеиновой кислоты, первую нестабильную конформацию, которая предотвращает трансляцию указанной последовательности репортерного гена в указанном репортерном транскрипте нуклеиновой кислоты, и вторую устойчивую конформацию в результате связывания указанной первой нестабильной конформации с клеточным транскриптом, указанная вторая стабильная вторичная конформация делает возможной трансляцию указанной последовательности репортерного гена указанного репортерного транскрипта нуклеиновой кислоты.

Согласно одному варианту осуществления композиция содержит нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую указанный конструкт нуклеиновой кислоты. Согласно другому варианту осуществления клеточный транскрипт связывается на последовательности 3'UTR указанного репортерного транскрипта нуклеиновой кислоты. Согласно одному варианту осуществления вторая стабильная вторичная конформация образуется путем расщепления части последовательности указанной первой нестабильной вторичной конформации. Согласно другому варианту осуществления последовательность репортерного гена кодирует обнаруживаемую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления обнаруживаемый маркер содержит

флуоресцентную молекулу или фермент, способный опосредовать люминесцентную или колориметрическую реакцию. Согласно другим вариантам осуществления последовательность репортерного гена кодирует селективный маркер. Согласно другому варианту осуществления селективный маркер содержит ген устойчивости к антибиотику.

5 В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая конструктор нуклеиновой кислоты, который кодирует репортерный транскрипт нуклеиновой кислоты, содержащий последовательность репортерного гена и способен образовывать по меньшей мере две конформации указанного репортерного транскрипта нуклеиновой кислоты, содержащего первую конформацию, которая предотвращает дальнейшую  
10 транскрипцию указанного конструктора нуклеиновой кислоты, и вторую конформацию, образованную путем связывания указанной первой конформации с клеточным транскриптом, причем указанная вторая конформация обеспечивает транскрипцию указанного конструктора нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую указанный конструктор нуклеиновой кислоты. Согласно другому варианту осуществления репортерный транскрипт нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

Согласно одному варианту осуществления репортерный транскрипт нуклеиновой кислоты содержит последовательность репортерного гена. Согласно другому варианту  
20 осуществления первая конформация образуется из связывания указанной цис-репрессорной последовательности с указанной последовательностью репортерного гена. Согласно некоторым вариантам осуществления первая конформация представляет собой субстрат для расщепления фермента. Согласно одному варианту осуществления первая конформация указанного репортерного транскрипта нуклеиновой кислоты  
25 содержит последовательность, которая образует структуру терминации транскрипции. Согласно другим вариантам осуществления связывание указанного клеточного транскрипта с указанной последовательностью, которая образует структуру терминации транскрипции, приводит к прекращению расщепления части указанного репортерного транскрипта нуклеиновой кислоты и образованию указанной второй конформации.

30 В настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий регуляторную последовательность, функционально связанную с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанный описанный в настоящем документе репортерный транскрипт нуклеиновой кислоты.

В настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения транскрипта-мишени  
35 в клетке, включающий: введение в указанную клетку указанного описанного в настоящем документе репортерного конструктора нуклеиновой кислоты; и обнаружение наличия или отсутствия выходного сигнала от указанной клетки, причем указанное наличие указанного выходного сигнала указывает на наличие транскрипта-мишени в указанной клетке. Способ включает обнаружение наличия бактериальной клетки на  
40 основании обнаружения указанного наличия указанного транскрипта-мишени.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ обнаружения наличия бактериальной клетки в образце, включающий введение в указанный образец  
указанного описанного в настоящем документе репортерного конструктора нуклеиновой кислоты; и обнаружение наличия или отсутствия выходного сигнала от указанного  
45 образца, причем указанное наличие указанного выходного сигнала указывает на наличие бактериальной клетки в указанном образце.

В настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий компартмент для удерживания образца, содержащего клетку и указанный описанный в настоящем

документе репортерный конструкт нуклеиновой кислоты, и инструкции для обнаружения наличия или отсутствия выходного сигнала от указанного образца, причем наличие выходного сигнала указывает на наличие транскрипта-мишени в указанной клетке

В настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую репортерный конструкт нуклеиновой кислоты, содержащий первый промотор, функционально связанный с репортерным геном, причем указанный первый промотор способен к индукции с помощью эндогенного белка-индуктора в бактериальной клетке.

В настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения наличия бактериальной клетки в образце, включающий контактирование указанного образца с нерепликативной трансдукторной частицей, содержащей репортерный конструкт нуклеиновой кислоты, содержащий первый промотор, функционально связанный с репортерным геном, причем указанный первый промотор способен к индукции с помощью эндогенного белка-индуктора в бактериальной клетке; и обнаружение наличия или отсутствия выходного сигнала от указанного репортерного гена, причем указанное наличие выходного сигнала свидетельствует о наличии указанной бактериальной клетки в указанном образце.

Согласно одному варианту осуществления первый промотор представляет собой такой же, как индуцируемый промотор, функционально связанный с молекулой-мишенью нуклеиновой кислоты в указанной бактериальной клетке.

В настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую репортерный конструкт нуклеиновой кислоты, содержащий репортерный ген, который кодирует репортерную молекулу, нерепликативную трансдукторную частицу, способную проникать в бактериальную клетку, и огражденный субстрат, который представляет собой экзогенный по отношению к указанной бактериальной клетке, который после удаления ограждения способен реагировать с указанной репортерной молекулой в указанной клетке.

В настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения наличия бактериальной клетки в образце, включающий контактирование указанного образца с ограниченным субстратом и нерепликативной трансдукторной частицей, содержащей репортерный конструкт нуклеиновой кислоты, содержащий репортерный ген, который кодирует репортерную молекулу, огражденный субстрат, экзогенный по отношению к указанной бактериальной клетке, который без ограждения способен реагировать с указанной репортерной молекулой в указанной клетке; и обнаружение наличия или отсутствия выходного сигнала от указанной репортерной молекулы, причем указанное наличие выходного сигнала свидетельствует о наличии указанной бактериальной клетки в указанном образце.

Согласно одному варианту осуществления фермент-мишень в указанной клетке связывается с указанным огражденным субстратом для получения не огражденного субстрата. Согласно некоторым вариантам осуществления не огражденный субстрат взаимодействует с указанной репортерной молекулой для получения выходного сигнала.

В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая нерепликативную трансдукторную частицу, содержащую репортерный конструкт нуклеиновой кислоты, кодирующий переключаемую молекулу, способную связываться с молекулой-мишенью в бактериальной клетке для образования комплекса; и субстрат, способный проникать в указанную клетку и связываться с указанным комплексом для получения обнаруживаемого сигнала от указанной клетки.

В настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения наличия бактериальной

клетки в образце, включающий контактирование указанного образца с субстратом и нерепликативной трансдукторной частицей, содержащей репортерный конструкт нуклеиновой кислоты, кодирующий переключаемую молекулу, способную связываться с молекулой-мишенью в указанной клетке для образования комплекса, субстрат, способный связываться с указанным комплексом для образования связанного с субстратом комплекса и обнаружение наличия или отсутствия выходного сигнала от указанного связанного с субстратом комплекса, причем указанное наличие указанного выходного сигнала свидетельствует о наличии указанной бактериальной клетки в указанном образце. Согласно одному варианту осуществления связывание указанной переключаемой молекулы с указанной молекулой-мишенью производит конформационное изменение в указанной переключаемой молекуле. Согласно другому варианту осуществления конформационное изменение в указанной переключаемой молекуле позволяет указанному субстрату связываться с указанным комплексом.

Краткое описание чертежей

Эти и другие особенности, аспекты и преимущества настоящего изобретения станут более понятными с учетом последующего описания и прилагаемых графических материалов, где:

На фиг. 1 показан пример конструкции и функции основанной на молчащей мутации/комплементации упаковочной системы плазмиды P1 в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 2 показана схема вектора pGWP10001 в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 3 показан пример конструкции и функции упаковочной системы плазмиды с делецией рас-сайта/комплементацией в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 4 показана схема вектора pGW80A0001 в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 5 показан процесс упаковки геномного острова (GI) бактериофагом в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 6 показан пример конструкции и функции основанной на GI упаковочной системы в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 7 показана конструкция и функция основанной на GI упаковочной системы, в которой отсутствует ген интегразы, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8 показана конструкция и функции основанной на SaPI<sub>bov2</sub> упаковочной системы, в которой отсутствует ген интегразы, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 9 показана система для использования NRTP для обнаружения индукторов к промоторам гена-мишени в пределах жизнеспособных клеток в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 10 показана репортерная система, которая включает в себя репортерную молекулу нуклеиновой кислоты (например, плазмиду), которую конструируют для обнаружения VanR, индуктора промотора гена устойчивости к ванкомицину (vanA) в *Enterococcus faecium* (или *E. faecalis*) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. Репортерная плаزمида несет репортерный ген, который функционально связан с промотором гена vanA.

На фиг. 11 показана репортерная система, которая включает в себя репортерную молекулу нуклеиновой кислоты, сконструированную для обнаружения TcdD, индуктора



промоторов генов токсинов А и В (tcdA и tcdB, соответственно) *C. difficile*, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты включает в себя репортерный ген, который функционально связан с промотором гена tcdA.

5 На фиг. 12 показана репортерная система, которая включает в себя репортерную молекулу нуклеиновой кислоты, сконструированную для обнаружения SarS, индуктора промотора гена белка (spa) в *S. aureus*, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты включает в себя бактериальные гены люциферазы luxA и luxB, функционально связанные с промотором  
10 гена spa ( $P_{spa}$ ).

На фиг. 13 показана репортерная система, которая содержит систему для обнаружения внутриклеточных ферментов в живых клетках, которая использует молекулы  
15 огражденного субстрата, которые могут лишаться ограждения с помощью внутриклеточного фермента-мишени, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 14 показана конструкция и функция системы обнаружения с ферментом  $\beta$ -лактамазой в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 15 показана репортерная система обнаружения внутриклеточных молекул в жизнеспособных клетках, которая использует переключаемые молекулы, способные  
20 производить обнаруживаемый сигнал при их связывании с молекулой-мишенью, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 16 показана конструкция и функция основанной на бактериофаге/переключаемом аптамере (SA) внутриклеточной системы репортерной молекулы в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

25 На фиг. 17 показан пример системы, которая использует цис-репрессорный механизм, который может направленно воздействовать на 5' UTR (нетранслируемую область) репортерной последовательности на репортерном транскрипте в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 18 показан пример системы для обнаружения наличия транскрипта-мишени  
30 в клетке, которая основана на цис-репрессорном механизме, направлено воздействующем на сайт связывания рибосом (RBS) репортерной последовательности в репортерном транскрипте в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 19 показана иллюстративная система для обнаружения наличия транскрипта-мишени в клетке, которая основана на цис-репрессорном механизме, направлено  
35 воздействующем на кодирующую область ("AUG") репортерной последовательности в репортерном транскрипте, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 20 показана иллюстративная система для обнаружения наличия транскрипта-мишени в клетке, которая основана на репрессорном механизме с использованием  
40 нестабильного репортерного транскрипта в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 21 показаны результаты анализа трансдукции, в котором 36 чувствительных к тетрациклину MRSA подвергали воздействию трансдукторных частиц, несущих  
45 pGW80A0001, и затем наносили на планшеты со средами, содержащими 5 мкг/мл тетрациклина, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 22 показана люминесценция, измеренная от 80 клинических штаммов MRSA и 28 клинических штаммов чувствительных к метициллину *S. aureus* (MSSA),

трансдуцированных с трансдукторной частицей, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 23 показаны результаты роста *S. aureus* при 4, 8, 16, 32, 64 и 128 мкг/мл цефокситина.

5 На фиг. 24 показаны значения RLU, полученные с помощью анализа NRTP в присутствии 4, 8, 16, 32, 64 и 128 мкг/мл цефокситина. Ось x на фиг. 24 установлена на граничном значении RLU MSSA.

На фиг. 25 показана вторичная структура транскрипта *mesA* (SEQ ID NO: 16), созданного на основе самой низкоэнергетической конформации, рассчитанной с помощью MFold и визуализированной с помощью VARNA.

На фиг. 26 показана терминальная петля 23 (T23) транскрипта *mesA* (нуклеотиды 1464-1519 в SEQ ID NO: 16), которая содержит консенсусную последовательность YUNR.

На фиг. 27 показана цис-репрессорная последовательность, добавленная к 5'-концу генов *luxAB* и разработанная для образования структуры "петля-на-стебле", которая блокирует последовательность RBS ("AAGGAA") гена *luxAB* (нуклеотиды 1-61 в SEQ ID NO: 19).

На фиг. 28 показана схема образования пар оснований между транскриптом-мишенью (нуклеотиды 1464-1519 в SEQ ID NO: 16) и цис-репрессорной последовательностью репортерного транскрипта (нуклеотиды 1-61 в SEQ ID NO: 19).

20 На фиг. 29 показан пример последовательности гена-мишени *mesA* (SEQ ID NO: 15) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 30 показана иллюстративная последовательность транскрипта *mesA*, которая может быть использована для разработки репортерного транскрипта (SEQ ID NO: 16), в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

25 Фиг. 31 представляет собой пример последовательности ДНК локусов гена *luxAB* (SEQ ID NO: 17), которая может быть использована для разработки репортерного транскрипта, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 32 представляет собой пример последовательности транскрипта *luxAB*, которая может быть использована для разработки репортерного транскрипта (SEQ ID NO: 18), в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 33 представляет собой пример цис-репрессорной последовательности транскрипта *luxAB*, которая может быть использована в репортерном транскрипте (SEQ ID NO: 19), в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 34 показан пример клетки, содержащей вектор, который кодирует репортерный транскрипт, где нет эндогенного транскрипта *mesA* в клетке, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 35 показан вектор, введенный в клетку, где вектор кодирует репортерный транскрипт, который включает в себя цис-репрессорную последовательность и репортерную последовательность (гены *luxA* и *luxB*). Когда транскрипт *mesA*, присутствующий в клетке, связывается с цис-репрессорной последовательностью, ингибирующая петля шпильки открывается и подвергается воздействию RBS для гена *luxA*. Может происходить трансляция репортерных последовательностей (*luxA* и *luxB*), в результате чего происходит образование фермента *luxAB*. Фермент *LuxAB* производит обнаруживаемый люминесцентный сигнал. Таким образом, репортерный вектор транскрипта сообщает о наличии эндогенных транскриптов *mesA* внутри клетки.

Подробное описание изобретения

I. Определения

Используемые в формуле изобретения и в описании термины определяются, как

указано ниже, если не указано иное.

Используемая в настоящем документе "репортерная молекула нуклеиновой кислоты" относится к нуклеотидной последовательности, содержащей молекулу ДНК или РНК. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты может быть природного происхождения или представлять собой искусственную или синтетическую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой экзогенную по отношению к клетке-хозяину и может быть введена в клетку-хозяина, как часть экзогенной молекулы нуклеиновой кислоты, такой как плаزمид или вектор. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты может быть комплементарна гену-мишени в клетке. Согласно другим вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит репортерный ген, кодирующий репортерную молекулу (например, репортерный фермент, белок). Согласно некоторым вариантам осуществления репортерную молекулу нуклеиновой кислоты называют "репортерным конструктом" или "репортерным конструктом нуклеиновой кислоты".

"Репортерная молекула" или "репортер" относится к молекуле (например, нуклеиновой кислоте или белку), которая придает организму обнаруживаемый или селективируемый фенотип. Обнаруживаемый фенотип может быть колориметрическим, флуоресцентным или люминесцентным, например. Репортерные молекулы могут быть экспрессированы с репортерными генами, кодирующими ферменты, опосредующие люминесцентные реакции (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), генами, кодирующими ферменты, опосредующие колориметрические реакции (LacZ, HRP), генами, кодирующими флуоресцентные белки (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), молекулами нуклеиновых кислот, кодирующими аффинные пептиды (His-Tag, 3X-FLAG), и генами, кодирующими селективные маркеры (amp<sup>r</sup>, tet(M), CAT, erm). Репортерная молекула может быть использована в качестве маркера для успешного захвата молекулы нуклеиновой кислоты или экзогенной последовательности (плазмиды) в клетку. Репортерная молекула может также использоваться для указания на наличие описанных в настоящем документе гена-мишени, молекулы-мишени нуклеиновой кислоты, внутриклеточной молекулы-мишени или клетки. Кроме того, репортерная молекула может представлять собой нуклеиновую кислоту, такую как аптамер или рибозим.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором. Согласно другим аспектам настоящего изобретения промотор может быть выбран или разработан для содействия реактивности и перекрестной реактивности репортерной системы, основанной на активности промотора в конкретных клетках (например, конкретного вида), а не в других. Согласно некоторым аспектам репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит точку начала репликации. Согласно другим аспектам выбор точки начала репликации может аналогично способствовать реактивности и перекрестной реактивности репортерной системы, когда репликация репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в клетке-мишени способствует или требуется для производства репортерного сигнала на основании активности точки начала репликации в конкретных клетках (например, конкретного вида), а не в других. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула нуклеиновой кислоты образует репликон, способный к упаковке в виде конкатемерной ДНК в потомственный вирус во время репликации вируса.

Используемый в настоящем документе "транскрипт-мишень" относится к части

нуклеотидной последовательности ДНК или молекулы мРНК, которая в природе образуется клеткой-мишенью, включая в себя образованные при транскрипции ген-мишень и мРНК, которая представляет собой продукт процессинга РНК первичного продукта транскрипции. Транскрипт-мишень может также упоминаться как клеточный транскрипт или встречающийся в природе транскрипт.

Используемый в настоящем документе термин "транскрипт" относится к длине нуклеотидной последовательности (ДНК или РНК), транскрибируемой из последовательности-матрицы или гена ДНК или РНК. Транскрипт может представлять собой последовательность кДНК, транскрибируемую с РНК-матрицы, или последовательность мРНК, транскрибируемую с ДНК-матрицы. Транскрипт может представлять собой кодирующий или не кодирующий белок. Транскрипт может также быть транскрибирован со сконструированного конструкта нуклеиновой кислоты.

Транскрипт, полученный из репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, может упоминаться как "репортерный транскрипт". Репортерный транскрипт может включать в себя репортерную последовательность и цис-репрессорную последовательность. Репортерный транскрипт может содержать последовательности, которые образуют области комплементарности, таким образом, что транскрипт включает в себя две области, которые образуют дуплекс (например, межмолекулярную дуплексную область). Одна область может упоминаться как "цис-репрессорная последовательность" и характеризоваться комплементарностью к части или всему транскрипту-мишени и/или репортерной последовательности. Вторая область транскрипта называется "репортерная последовательность" и может характеризоваться комплементарностью к цис-репрессорной последовательности. Комплементарность может представлять собой полную комплементарность или существенную комплементарность. Присутствие и/или связывание цис-репрессорной последовательности с репортерной последовательностью может образовывать конформацию в репортерном транскрипте, которая может блокировать дополнительную экспрессию репортерной молекулы. Репортерный транскрипт может образовывать вторичные структуры, такие как шпильчатая структура, так что области в репортерном транскрипте, которые комплементарны друг другу, могут гибридизоваться друг с другом.

"Введение в клетку", когда речь идет о молекуле нуклеиновой кислоты или экзогенной последовательности (например, плазмиде, векторе, конструкте), означает облегчение захвата и поглощения в клетку, как понятно специалистам в настоящей области техники. Поглощение или захват конструктов или транскриптов нуклеиновых кислот может происходить посредством пассивной диффузии или с помощью активных клеточных процессов, или с помощью вспомогательных средств или устройств, включая в себя посредством использования бактериофага, вируса и трансдукторных частиц. Значение этого термина не ограничивается клетками *in vitro*; молекула нуклеиновой кислоты может быть также "введена в клетку", где клетка представляет собой часть живого организма. В таком случае, введение в клетку будет включать в себя доставку в организм. Например, для доставки *in vivo* молекулы нуклеиновых кислот, конструкты или векторы согласно настоящему изобретению могут быть инъецированы в участок ткани или введены системно. Введение *in vitro* в клетку включает в себя известные в настоящей области техники способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем документе или известны в настоящей области техники.

"Трансдукторная частица" относится к вирусу, способному обеспечить доставку невирусной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку. Вирус может представлять собой

бактериофаг, аденовирус и т.д.

"Нерепликативная трансдукторная частица" относится к вирусу, способному обеспечить доставку невирусной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку, но не упаковывает свой собственный реплицированный вирусный геном в трансдукторную частицу. Вирус может представлять собой бактериофаг, аденовирус и т.д.

"Плазмида" представляет собой небольшую молекулу ДНК, которая физически отделена от и может реплицироваться независимо от хромосомной ДНК внутри клетки. Наиболее часто встречается в виде небольших круглых, двухцепочечных молекул ДНК в бактериях, плазмиды иногда присутствуют в археях и эукариотических организмах. Плазмиды рассматриваются как репликоны, способные к автономной репликации в подходящем хозяине.

"Вектор" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве проводника для искусственного переноса чужеродного генетического материала в другую клетку, где он может быть реплицирован и/или экспрессирован.

"Вирус" представляет собой небольшой инфекционный патоген, который реплицирует только внутри живых клеток других организмов. Вирусные частицы (известные как вирионы) включают в себя две или три части: I) генетический материал, созданный из молекул либо ДНК, либо РНК, которые несут генетическую информацию; II) белковую оболочку, которая защищает эти гены; и в некоторых случаях, III) конверт липидов, который окружает белковую оболочку.

"MRSA" относится к резистентному к метициллину *Staphylococcus aureus*.

"MSSA" относится к чувствительному к метициллину *Staphylococcus aureus*.

Термин "улучшающий" относится к любому терапевтически полезному результату в лечении патологического состояния, например, патологического состояния, включая в себя профилактику, уменьшение тяжести или прогрессирования, ремиссию или излечение.

Термин "in situ" относится к процессам, которые происходят в живой клетке, растущей отдельно от живого организма, например, растущей в тканевой культуре.

Термин "in vivo" относится к процессам, которые происходят в живом организме.

Используемый в настоящем документе термин "млекопитающее" включает в себя как людей, так и отличных от людей млекопитающих, и включает в себя без ограничения людей, нечеловекообразных приматов, собак, кошачьих, мышевидных, крупный рогатый скот, лошадей и свиней.

"G", "C", "A" и "U" каждый, как правило, означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин и урацил в качестве основания, соответственно. "T" и "dT" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к дезоксирибонуклеотиду, в котором нуклеотидное основание представляет собой тимин, например, дезоксириботимин. Тем не менее, следует понимать, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид", или "дезоксирибонуклеотид" может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как подробно изложено ниже, или суррогатно замещенному фрагменту. Специалисту в настоящей области техники хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой замещенный фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве своего основания, может образовывать комплементарную пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях согласно изобретению

нуклеотидом, содержащим, например, инозин. Последовательности, содержащие такие замещенные фрагменты, представляют собой варианты осуществления настоящего изобретения.

Используемый в настоящем документе термин "комплементарный", когда  
5 используется для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизировать и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную  
10 последовательность, как будет понятно специалисту в настоящей области техники. Комплементарные последовательности также описаны как связывающиеся друг с другом и характеризующиеся аффинностями связывания.

Например, первая нуклеотидная последовательность может быть описана как комплементарная ко второй нуклеотидной последовательности, когда две  
15 последовательности гибридизуют (например, путем отжига) в жестких условиях гибридизации. Условия гибридизации включают в себя температуру, ионную силу, pH и концентрацию органического растворителя для стадий отжига и/или промывки. Термин жесткие условия гибридизации относится к условиям, при которых первая нуклеотидная последовательность будет гибридизоваться предпочтительно с ее  
20 последовательностью-мишенью, например, со второй нуклеотидной последовательностью, и в меньшей степени или вообще не будет с другими последовательностями. Жесткие условия гибридизации зависят от последовательности и отличаются при различных параметрах окружающей среды. Как правило, жесткие условия гибридизации выбирают так, чтобы они были приблизительно на 5°C ниже  
25 точки плавления ( $T_m$ ) для нуклеотидной последовательности при определенной ионной силе и значении pH.  $T_m$  представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% первых нуклеотидных последовательностей гибридизуются с точно соответствующей последовательностью-мишенью. Обширное пособие по гибридизации нуклеиновых кислот находится, например, в Tijssen (1993) Laboratory  
30 Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, chap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, N.Y. ("Tijssen"). Могут применяться другие условия, такие как соответствующие физиологическим условия как те, с которыми можно столкнуться внутри организма. Специалист в настоящей области техники будет способен определить набор условий  
35 наиболее подходящих для исследования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Это включает в себя спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или  
40 полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине первой и второй нуклеотидной последовательности. Такие последовательности могут быть отнесены к "полностью комплементарным" по отношению друг к другу в настоящем документе. Однако там, где первая последовательность упоминается как "по существу комплементарная" по отношению ко второй последовательности в  
45 настоящем документе, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одно или несколько, но, как правило, не более 4, 3 или 2 ошибочно спаренных оснований при гибридизации, сохраняя способность к гибридизации в условиях, наиболее актуальных для их окончательного применения. Однако там, где два олигонуклеотида предназначены для образования

при гибридизации одного или нескольких одноцепочечных липких концов, такие липкие концы не должны рассматриваться как несоответствия в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину, а другой олигонуклеотид из 23 нуклеотидов в длину, причем более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может быть отнесена к "полностью комплементарной" для описанных в настоящем документе целей.

Используемые в настоящем документе "комплементарные" последовательности могут также включать в себя или быть образованы полностью из не-уотсон-криковских пар оснований и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в мере вышеуказанных требований в отношении их способности к выполнению гибридизации. Такие не-уотсон-криковские пары оснований включают в себя без ограничений G:U колебание или хугстиновское спаривание оснований.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный" в настоящем документе могут быть использованы по отношению к соответствию оснований между двумя цепями в дцРНК или между антисмысловой цепью дцРНК и последовательностью-мишенью, между комплементарными цепями одноцепочечной последовательности РНК или одноцепочечной последовательности ДНК, как будет понятно из контекста их использования.

Используемая в настоящем документе "дуплексная структура" содержит две антипараллельные и по существу комплементарные последовательности нуклеиновых кислот. Комплементарные последовательности в конструкторе нуклеиновой кислоты, между двумя транскриптами, между двумя областями внутри транскрипта или между транскриптом и последовательностью-мишенью могут образовывать "дуплексную структуру". Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити представляют собой рибонуклеотиды, но как описано подробно в настоящем документе, каждая или обе нити могут также включать в себя по меньшей мере один нерибонуклеотид, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Две нити, образующие дуплексную структуру, могут представлять собой различные части одной большой молекулы РНК или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Там, где две нити представляют собой часть одной крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой нити, образующей дуплексную структуру, соединительная цепь РНК упоминается как "петля шпильки". Там, где две нити ковалентно связаны другими способами, отличными от непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой нити, образующей дуплексную структуру, соединительная конструкция называется "линкер". Нити РНК могут содержать такое же или разное количество нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой цепи дуплекса минус любые выступы, которые присутствуют в дуплексе. Как правило, дуплексная структура составляет от 15 до 30 или от 25 до 30, или от 18 до 25, или от 19 до 24, или от 19 до 21, или 19, 20 или 21 пару оснований в длину. Согласно одному варианту осуществления дуплекс составляет 19 пар оснований в длину. Согласно другому варианту осуществления дуплекс составляет 21 пару оснований в длину. Когда две разные миРНК используются в комбинации, длины дуплекса могут быть одинаковыми или могут отличаться.

Используемый в настоящем документе термин "область комплементарности"

относится к области на антисмысловой нити, которая по существу комплементарна последовательности, например, последовательности-мишени, как определено в настоящем документе. Где область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, ошибочные спаривания наиболее допустимы в терминальных областях и, если присутствуют, как правило, находятся в терминальной области или областях, например, в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5' и/или 3' конца.

Термин процент "идентичности" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые содержат точно установленный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые представляют собой одинаковые при сравнении и выровнены на максимальное соответствие, что измерено с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, BLASTP и BLASTN или других алгоритмов, доступных специалистам в настоящей области техники) или путем визуального осмотра. В зависимости от применения, процент "идентичности" может существовать в пределах сравниваемой области последовательности, например, в пределах функционального домена или, альтернативно, существует по всей длине этих двух сравниваемых последовательностей.

При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравниваются исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, указывают координаты подпоследовательностей, если необходимо, и указывают параметры программы алгоритма последовательности. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет процент идентичности последовательностей для исследуемой последовательности(ей) по отношению к эталонной последовательности на основании указанных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), с помощью поиска способа сходства Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) или путем визуального осмотра (смотрите в основном Ausubel et al., ниже).

Один из примеров алгоритма, который пригоден для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательностей, представляет собой алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST публично доступно через Национальный центр биотехнологической информации ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

Термин "достаточное количество" означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например, количество, достаточное для получения обнаруживаемого сигнала от клетки.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает такое количество, которое эффективно для улучшения симптомов заболевания. Терапевтически эффективное количество может представлять собой "профилактически эффективное количество", поскольку профилактику можно считать лечением.

Следует отметить, что используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если из



контекста явно не следует иное.

## II. Лизогенный и литический цикл вирусов

Вирусы подвергаются лизогенным и литическим циклам в клетке-хозяине. Если лизогенный цикл принят, фаговая хромосома может быть интегрирована в бактериальную хромосому или она может установить себя в качестве стабильной плазмиды в хозяине, где она может оставаться в состоянии покоя в течение длительных периодов времени. Если индуцируется лизоген, фаговый геном вырезается из бактериальной хромосомы и инициирует литический цикл, который завершается лизисом клетки и высвобождением фаговых частиц. Литический цикл приводит к производству новых фаговых частиц, которые высвобождаются с помощью лизиса хозяина.

Определенный умеренный фаг может проявлять литическую активность и склонность к этому может варьировать с разными бактериями-хозяевами. Чтобы проиллюстрировать этот феномен, литическую активность двух умеренных фагов *S. aureus* на десяти MRSA клинических штаммах изучали с помощью анализа бляшкообразования (таблица 1). Фаг  $\phi 11$  проявлял литическую активность в 10 из 10 клинических MRSA штаммов и фаг  $\phi 80\alpha$  проявлял литическую активность в шести из 10 клинических MRSA штаммов. Таким образом, можно ожидать, что репортерные анализы, основывающиеся на естественном лизогенном цикле фагов, будут проявлять литическую активность спорадически.

**Таблица 1: Литическая активность (обозначается буквой "х") умеренных фагов  $\phi 11$  и  $\phi 80\alpha$  *S. aureus* в десяти клинических MRSA штаммов**

Штамм MRSA	$\phi 11$	$\phi 80\alpha$
1	х	
2	х	
3	х	х
4	х	х
5	х	х
6	х	
7	х	х
8	х	
9	х	х
10	х	х

Кроме того, основанные на вирусах репортерные анализы, такие как основанные на фагах репортеры, могут нести последствия от ограниченной реактивности (т.е. аналитической инклюзивности) из-за ограничений в диапазоне хозяев фага, вызванных основанными на хозяине и полученными от профага механизмами резистентности фагов. Эти механизмы резистентности направленно воздействуют на нуклеиновую кислоту нативного фага, что может приводить к деградации или иному ингибированию ДНК фага и функций. Такие механизмы резистентности включают в себя системы рестрикции, которые расщепляют ДНК фага, и системы CRISPR, которые ингибируют полученные из фагов транскрипты.

Как литическая активность, так и фаговая резистентность может быть ингибирована

для анализов, основанных на репортерных фагах. Литическая активность может ингибировать сигнал путем уничтожения или иным образом ингибируя клетку в его способности производить обнаруживаемый сигнал и, таким образом, влияя на ограничения обнаружения путем уменьшения количества обнаруживаемого сигнала или предотвращения образования обнаруживаемого сигнала. Механизмы фаговой резистентности могут ограничивать круг хозяев фага и ограничивать инклюзивность основанного на фаге репортера, сходным образом влияя на ограничения обнаружения путем уменьшения количества обнаруживаемого сигнала или предотвращения образования обнаруживаемого сигнала. Как литическая активность, так и фаговая резистентность, вызванная введением ДНК фага в репортерном фаге, может приводить к ложноотрицательным результатам в анализах, которые включают эти фаговые репортеры.

### III. Способы получения нерепликативных трансдукторных частиц (NRTP)

A. Основанные на разрушении/комплементации способы получения нерепликативных трансдукторных частиц

#### 1) Основанная на молчащей мутации/комплементации упаковочная система

Настоящее изобретение включает способы получения NRTP с использованием основанных на молчащей мутации/комплементации способов.

Эта упаковочная система нерепликативных трансдукторных частиц основана на введении молчащей мутации в компонент генома вируса, который узнается устройством упаковки вирусов как элемент, из которого начинается геномная упаковка во время вирусного производства. Примеры такого элемента включают в себя последовательность рас-сайта бактериофагов рас-типа и последовательность cos-сайта бактериофагов cos-типа.

Поскольку эти сайты инициации упаковки часто обнаруживаются в областях кодирования генов, которые необходимы для производства вируса, молчащую мутацию вводят таким образом, что рас-сайт больше не распознается в качестве сайта инициации упаковки устройством вирусной упаковки. В то же время, мутация не нарушает ген, в котором закодирован сайт. Путем нарушения последовательности сайта упаковки мутантный вирус способен подвергаться литическому циклу, но не способен упаковывать свою геномную ДНК в свою упаковочную единицу.

Экзогенная репортерная молекула нуклеиновой кислоты, такая как плазмидная ДНК, может быть введена в клетку-хозяина, которая была лизогенизирована с вирусным геномом с мутантной последовательностью сайта инициации упаковки. Экзогенная репортерная молекула нуклеиновой кислоты может включать в себя нативную последовательность сайта инициации упаковки. Экзогенная репортерная молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в клетку и реплицироваться в клетке. Когда мутированный вирус подвергается литическому циклу, экспрессированное устройство вирусной упаковки упаковывает экзогенную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты с нативной последовательностью сайта инициации упаковки в вирусную упаковочную единицу. Вирусный геном не упаковывается в упаковочную единицу, так как его последовательность сайта инициации упаковки мутирована. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация в последовательности сайта инициации упаковки содержит молчащую мутацию, которая предотвращает расщепление последовательности инициации упаковки, но не нарушает экспрессию генного продукта, который охватывает последовательность сайта инициации упаковки. Это производит нерепликативные трансдукторные частицы, например, вирусные структурные компоненты, несущие реплицированную экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты.

Пример такой системы основан на бактериофаге P1, фаге рас-типа. Согласно одному варианту осуществления плазмиды, включающая в себя нативный рас-сайт P1, трансформируется в клетку. Клетка лизогенизирует с геном профага P1. Геном профага P1 включает в себя молчащую мутацию в последовательности рас-сайта, кодируемой геном расА P1. Когда литический цикл профага индуцируется, система приводит к производству основанных на P1 трандукторных частиц, несущих плазмидную ДНК. Пример молчащей мутации, которая подходит для этой системы, описан в опубликованном патенте США №2005/0118719, поданном 7 ноября 2002 г., который полностью включен посредством ссылки. Пример также обеспечивается SEQ ID NO: 2, представленной ниже (рас-сайт P1 с молчащими мутациями, строчные буквы обозначают мутированные основания).

На фиг. 1 показан пример конструкции и функции основанной на молчащей мутации/комплементации упаковочной системы 100 плазмиды P1 в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В этой системе, клетка E. coli 101 лизогенизирует с профагом P1 102, который включает в себя молчащую мутацию в своей последовательности сайта инициации упаковки (например, рас-сайт). Клетку трансформируют плазмидой, содержащей нативный рас-сайт 103, и плаزمиды реплицируются в клетке для образования конкатемеров плазмиды 104. Плазмиды могут также включать в себя репортерный ген, который кодирует репортерную молекулу.

Когда индуцируется литический цикл профага P1, профаг P1 вырезается из бактериального генома и экспрессирует структурные компоненты P1, такие как белки капсида 105. Структурные компоненты P1 только упаковывают ДНК, которая содержит нативный рас-сайт (например, ДНК плазмиды), таким образом производя нерепликативные трандукторные частицы, несущие ДНК плазмиды 106 (например, репортерный ген).

Пример вектора для использования в основанной на молчащей мутации/комплементации упаковочной системе плазмиды P1 показан на фиг. 2. Подробнее о том, как сконструировать штаммы и векторы основанной на молчащей мутации/комплементации упаковочной системы плазмиды P1 описаны подробно в примере 1 ниже.

## 2) Основанная на делеции/комплементации упаковочная система

В настоящем изобретении предусмотрены способы получения NRTP с использованием основанного на делеции/комплементации способа.

Эта упаковочная система нерепликативных трандукторных частиц основана на удалении компонента генома вируса, который распознается вирусным упаковочным устройством, как элемент, от которого начинается геномная упаковка во время вирусного производства. Примеры такого элемента включают в себя последовательность рас-сайта бактериофагов рас-типа и последовательность cos-сайта бактериофагов cos-типа. Эти сайты инициации упаковки часто находятся в областях кодирования генов, которые необходимы для производства вируса. Согласно некоторым вариантам осуществления удаляется только сайт инициации упаковки, что позволяет мутированному вирусу подвергаться литическому циклу, но не позволяет вирусу упаковать его геномную ДНК. Например, SEQ ID NO: 6 представляет собой пример гена расА P1 с удаленной последовательностью рас-сайта (строчные символы указывают на удаленную последовательность рас-сайта). Согласно другим вариантам осуществления удаляется весь ген, содержащий сайт инициации упаковки. Например, в SEQ ID NO: 8 показано удаление гена terS (строчные символы показывают удаленную последовательность).

В одном примере геном клетки лизогенизирует с вирусным геномом, где был удален сайт инициации упаковки. Комплементарную плазмиду вводят в клетку, и плазмидная ДНК включает в себя ген с последовательностью сайта инициации упаковки, который

дополняет удаленную последовательность сайта инициации упаковки в вирусном геноме. Когда мутированный вирус подвергается литическому циклу, вирусные упаковывающие белки упаковывают репликон плазмидной ДНК в упаковочную единицу из-за его сайта инициации упаковки, и производятся нерепликативные трансдукторные частицы, переносящие реплицированную плазмидную ДНК.

Согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно, чтобы делеция/комплементация разрабатывались таким образом, чтобы не было гомологии между мутантной вирусной ДНК и комплементарной экзогенной ДНК. Потому что отсутствие гомологии между мутантной вирусной ДНК и комплементарной экзогенной ДНК исключает возможность гомологичной рекомбинации между двумя молекулами ДНК, которая может приводить к повторному введению последовательности упаковки в геном вируса. Для достижения отсутствия гомологии, одна стратегия состоит в удалении полного гена, содержащего последовательность сайта инициации упаковки из генома вируса, а затем дополнении этого гена экзогенной молекулой ДНК, которая содержит не более, чем точную последовательность ДНК, которая была удалена из вируса. В этой стратегии комплементарная молекула ДНК предназначена для экспрессии гена, который был удален из вируса.

Предусмотрен другой пример такой системы с использованием бактериофага ф80α, фага рас-типа. Геном фага лизогенизируют в бактериальную клетку-хозяина, и геном фага включает в себя ген малой терминазы, где рас-сайт профага рас-типа ф80α был удален. Плазмиду, включающую в себя комплементарный ген малой терминазы с нативным рас-сайтом, трансформируют в клетку. Когда индуцируется литический цикл лизогенизированного профага, упаковочная система бактериофага упаковывает плазмидную ДНК в структурные компоненты потомства бактериофага скорее, чем нативную ДНК бактериофага. Таким образом, упаковочная система производит нерепликативные трансдукторные частицы, несущие ДНК плазмиды.

На фиг. 3 показан пример конструкции и функции упаковочной системы 300 плазмиды с делецией/комплементацией рас-сайта, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. Бактериальную клетку 301 лизогенизируют с фагом рас-типа 302, у которого удален ген малой терминазы (terS). Клетку трансформируют с плазмидой репликации по типу катящегося кольца 303, которая включает в себя ген малой терминазы, который дополняет делецию гена terS в фаге. Ген малой терминазы содержит последовательность сайта инициации упаковки, например, рас-сайта. Плаزمида 303 может также включать в себя репортерный ген, который кодирует репортерную молекулу.

Белковый комплекс, содержащий белки малой терминазы и большой терминазы, способен распознавать и расщеплять двухцепочечную молекулу ДНК в или вблизи рас-сайта, и это позволяет плазмидной молекуле ДНК быть упакованной в фаговый капсид. Когда профаг в клетке индуцируется, литический цикл фага производит фаговые структурные белки 304 и фаговый белок большой терминазы 305. Комплементарная плазмида реплицируется, и экспрессируется белок малой терминазы 306.

Реплицированная плазмидная ДНК 307, содержащая ген terS (и репортерный ген), упаковывается в фаговые капсиды, приводя в результате к нерепликативным трансдукторным частицам, несущим только плазмидную ДНК 308. На фиг. 4 показан пример полученного в результате вектора, используемого в упаковочной системе

плазмиды с делецией/комплементацией рас-сайта. Более подробная информация о компонентах и конструкции упаковочной системы плазмиды с делецией/комплементацией рас-сайта представлена в примере 2 ниже.

#### В. Основанная на острове патогенности упаковочная система

5 Острова патогенности (РТИ) представляют собой подмножество горизонтально перенесенных генетических элементов, известных как геномные острова. Существует определенное семейство высокомобельных РТИ в *Staphylococcus aureus*, которые индуцируются для вырезания и копирования определенных резидентных профагов. Эти РТИ упаковываются в мелкоголовчатые фагоподобные частицы и переносятся с частотой, соизмеримой с бляшкообразующим титром фага. Этот процесс относится к циклу вырезания репликации-упаковки (ERP) SaPI, и перенос с высокой частотой SaPI относится к SaPI-специфическому переносу (SPST), чтобы отличить его от классической обобщенной трансдукции (CGT). SaPI характеризуются высоко консервативной генетической организацией, которая аналогична таковой бактериофагов и четко отличает их от всех других горизонтально приобретенных геномных островов. Кодируемые SaPI1 и кодируемые SaPI<sub>bov</sub>2 интегразы требуются как для удаления, так и для интеграции соответствующих элементов, и предполагается, что то же самое верно и для других SaPI. Фаг 80α может индуцировать несколько различных SaPI, включающих в себя SaPI1, SaPI2 и SaPI<sub>bov</sub>1, в то время как φ11 может индуцировать SaPI<sub>bov</sub>1, но ни один из двух других SaPI.

На фиг. 5 изображен естественный процесс упаковки геномного острова (GI) 500 с помощью бактериофага. В природе бактериальная клетка 501, лизогенизированная с подходящим профагом 503 и переносящая GI 504, может производить фаговые частицы, несущие конкатемеры GI 512. В этом процессе, когда фаг индуцируется в его литический цикл, геном фага вырезается (не показан) из бактериального генома 502, который затем экспрессирует белки бактериофага, включающие в себя составляющие капсида 505 и белок большой терминазы (TerL) 506. Индукция профага запускает вырезание GI через экспрессию белка-интегразы GI (int) 507. Аналогичным вырезанному геному фага образом (не показано), GI приобретает круглую форму 508, экспрессирует собственный белок малой терминазы (TerS) 509 и начинает реплицировать, образуя конкатемеры GI 510. Ген TerL фага и ген TerS GI может затем объединять, связывать и расщеплять конкатемер GI через последовательность рас-сайта в геноме GI, и конкатемер GI затем может быть упакован в фаговые капсиды 511, приводя в результате к фаговым частицам, несущим конкатемеры GI 512.

В природных системах, как показано на фиг. 5, полученный в результате лизат, полученный из производства фага, включает в себя как нативные фаговые частицы, а также GI-содержащие фаговые частицы. Нативные фаговые частицы представляют собой результат упаковки нативного генома фага в связи с распознаванием рас-сайта в конкатемерах фагового генома.

#### 1) Конструкция и функция упаковочной системы геномного острова (GI)

Способы согласно настоящему изобретению для получения NRTP включают основанную на GI упаковочную систему.

По сравнению с плазмидной упаковочной системой, природная упаковочная система GI получает преимущества от факта того, что ДНК, которая упаковывается, получают из геномной области в бактериальном геноме и, таким образом, не требуется поддержание плазмиды бактериальным хозяином.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение включает в себя упаковочную систему бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы

нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, причем бактериальная клетка содержит лизогенизированный геном бактериофага без упаковочного гена и геномный остров, криптический фаг или другую молекулу нуклеиновой кислоты, требующую бактериофаг (например, хелперный фаг) для мобилизации молекулы нуклеиновой кислоты и содержащую репортерную молекулу нуклеиновой кислоты и упаковочный ген. Основанные на геномных островах системы могут быть основаны на островах патогенности *S. aureus* (SaPI), криптическом фаге P4 и хелперном фаге P2 *E. coli*, и криптическом фаге P7 и хелперном фаге P1 *Enterococci*, например.

GI-упаковочные системы могут быть использованы таким образом, что экзогенные последовательности нуклеиновых кислот упаковываются бактериофагом. Это может быть достигнуто путем включения таких экзогенных последовательностей нуклеиновых кислот в GI.

В целях устранения нативного фага из этого процесса, ген малой терминазы профага может быть удален. Последовательность гена малой терминазы содержит последовательность рас-сайта нативного фага, и это удаление характеризуется эффектом предотвращения упаковки нативной фаговой ДНК. Согласно другим вариантам осуществления может быть удален только рас-сайт гена малой терминазы. GI, который будет упакован, включает в себя собственный рас-сайт и ген малой терминазы, который экспрессирует подходящий белок малой терминазы, и только ДНК GI будет поддаваться упаковке в этой системе.

На фиг. 6 показан пример конструкции и функции основанной на GI упаковочной системы 600, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В этой системе бактериальная клетка 601 характеризуется лизогенизированным геномом с подходящим профагом 603, который характеризуется делецией своего гена малой терминазы, и клеточный геном 602 несет GI 604. Когда фаг вовлекается в свой литический цикл, геном фага вырезается (не показано) из бактериального генома 602. Фаговый геном экспрессирует белки бактериофага, включающие в себя составляющие капсида 605 и белок большой терминазы (TerL) 606. Индукция профага также запускает вырезание GI через экспрессию белка-интегразы GI (int) 607. Аналогичным вырезанному фаговому геному образом (не показано), GI принимает округлую форму 608 и экспрессирует свой белок малой терминазы (TerS) 609 и реплицируется, образуя конкатемер GI 610. Ген TerL фага и ген TerS GI могут затем объединяться, связываться и расщеплять конкатемер GI через последовательность рас-сайта в ДНК GI. Конкатемер GI может быть упакован в фаговые капсиды 611, приводя в результате к фаговым частицам, несущим конкатамеры GI 612. В этой системе фаговая ДНК не будет упакована в фаговые частицы, поскольку в ней отсутствует ген *terS*, который содержит последовательность рас-сайта фага, и таким образом, не может быть распознана экспрессированными белками TerS GI и TerL фага.

Когда фаговые частицы, содержащие упакованную ДНК GI, вводят в клетку-реципиент, фаг будет связываться с поверхностью клетки-реципиента, а затем вводить упакованный конкатемер ДНК GI в клетку. После проникновения внутрь клетки GI может снова экспрессировать свой белок-интегразу, и GI может интегрироваться в его конкретный сайт в геноме клетки-реципиента. Если экзогенные последовательности ДНК включены в GI перед упаковкой, упаковочная система позволяет, таким образом, доставку экзогенных последовательностей ДНК в клетку-реципиент и интеграцию этих экзогенных последовательностей ДНК в геном клетки-реципиента.

2) Основанная на GI упаковочная система без интегразы

Согласно другому варианту осуществления описанную выше упаковочную систему конструируют таким образом, что упакованная ДНК GI не может интегрировать в геном клетки-реципиента. Это может быть достигнуто с помощью делеции гена интегразы в GI и дополнения делеции путем способствования экспрессии гена интегразы в транс-положении от GI. Таким образом, белок-интегразы доступен для вырезания GI в упаковываемой клетке-хозяине, и ДНК GI, которая была упакована в бактериофаг, не содержит ген интегразы и не может экспрессировать белок-интегразу, таким образом предотвращая интеграцию доставленного GI.

На фиг. 7 изображена конструкция и функция основанной на GI системы упаковки, которая не содержит ген *int* 700, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В этой системе, бактериальная клетка 701 лизогенизирует с подходящим профагом, у которого удален его ген малой терминазы 703. Геном клетки 702 несет GI, который характеризуется удаленным геном интегразы (*int*) 704, а также несет удаленный ген *int*, функционально связанный с подходящим промотором 705. Ген *int*, таким образом, может экспрессировать интегразный белок (*Int*) в транспозиции от GI 706. Когда фаг вовлекается в его литический цикл, генома фага вырезается (не показано) из бактериального генома 702, который затем экспрессирует белки бактериофага, включающие в себя составляющие капсида 707 и белок большой терминазы (*TerL*) 708. Индукция профага также запускает вырезание GI через экспрессию белка-интегразы 707. Схожим вырезанному геному фага образом (не показано), вырезанный GI принимает округлую форму 709, экспрессирует свой собственный белок малой терминазы (*TerS*) 710 и начинает реплицировать, образуя конкатемер GI 711. Ген *TerL* фага и ген *TerS* GI могут затем объединяться, связаться и расщеплять конкатемер GI через последовательности рас-сайта в ДНК GI и конкатемер GI затем может быть упакован в фаговые капсиды 712, приводя в результате к фаговым частицам, несущим конкатемеры GI 713. В этой системе ДНК фага не будет упаковываться, так как она не содержит ген *terS*, который содержит фаговую последовательность рас-сайта, и таким образом, не может быть распознана экспрессированными белками *TerS* GI и *TerL* фага.

Когда фаговые частицы, содержащие упакованную ДНК GI, не содержащую ген *int* вводят клетку-реципиент, фаг будет связываться с поверхностью клетки-реципиента, а затем вводить упакованный конкатемер ДНК GI в клетку. После попадания внутрь клетки GI не может экспрессировать свой белок-интегразу из-за отсутствия гена интегразы и GI не может интегрировать в конкретный сайт в геноме клетки-реципиента. Если экзогенные последовательности ДНК включены в GI перед упаковкой, упаковочная система позволяет, таким образом, доставку экзогенных последовательностей ДНК в клетку-реципиент и доставленные последовательности ДНК не интегрируют в геном клетки-реципиента в конкретном сайте интеграции GI.

3) Конструкция и функции основанной на SaPI<sub>bov2</sub> упаковочной системы без интегразы

Согласно некоторым вариантам осуществления способ получения NRTP включает использование SaPI<sub>bov2</sub> GI и бактериофага  $\phi$ 11 в основанной на GI упаковочной системе. Согласно альтернативным вариантам осуществления могут использоваться другие SAPI GI и другие подходящие бактериофаги, включающие в себя SaPI1, SaPI2, SaPI<sub>bov1</sub> и SaPI<sub>bov2</sub> SAPI вместе с бактериофагом 80 $\alpha$ , и SaPI<sub>bov1</sub> и SaPI<sub>bov2</sub> SAPI вместе с бактериофагом  $\phi$ 11. На основании приведенного ниже описания, специалисту в настоящей области техники известно, как разработать основанную на GI упаковочную систему без гена *int*, как описано в разделе II A.

На фиг. 8 изображена конструкция и функция основанной на SaPI<sub>bov2</sub> упаковочной

системы 800, которая не содержит ген *int*, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В этой системе клетка *S. aureus* 801 лизогенизирует с  $\phi 11$ , который характеризуется удаленным геном малой терминазы 803. Геном клетки 802 несет SaPIbov2, который характеризуется удаленным геном интегразы (*int*) 804 и также несет удаленный ген *int*, функционально связанный с конститутивно экспрессированным промотором гена *PclpB* 805. Ген *int* может экспрессировать белок-интегразу (*Int*) в транс-положении от SaPIbov2 806. Когда фаг вовлекается в свой литический цикл, геном фага вырезается (не показано) из бактериального генома 802, который затем экспрессирует белки бактериофага, включающие в себя составляющие капсида 807 и белок большой терминазы (*TerL*) 808. Индукция профага также запускает вырезание SaPIbov2 с помощью экспрессии белка-интегразы 806. Схожим вырезанному геному фага образом (не показано), вырезанный SaPIbov2 принимает округлую форму 809, экспрессирует свой собственный белок малой терминазы (*TerS*) 810 и начинает реплицировать, образуя конкатемер SaPIbov2 811. Ген *TerL* фага и ген *TerS GI* могут затем объединяться, связываться и расщеплять конкатемер SaPIbov2 через последовательность рас-сайта в ДНК SaPIbov2, и конкатемер SaPIbov2 может быть упакован в фаговые капсиды 812, образуя в результате фаговые частицы, несущие конкатемеры SaPIbov2 813. В этой системе ДНК фага не будет упаковываться, так как она не содержит ген *terS*, который содержит фаговую последовательность рас-сайта и таким образом, не может быть распознана экспрессированными белками *TerS* SaPIbov2 и *TerL* фага.

#### IV. Репортеры

Согласно некоторым вариантам осуществления NRTP и конструкции согласно настоящему изобретению содержат репортерную молекулу нуклеиновой кислоты, включающую в себя репортерный ген. Репортерный ген может кодировать репортерную молекулу и репортерная молекула может представлять собой обнаруживаемый или селективный маркер. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерный ген кодирует репортерную молекулу, которая производит обнаруживаемый сигнал при экспрессии в клетке.

Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула может представлять собой флуоресцентную репортерную молекулу, такую как, без ограничения, зеленый флуоресцентный белок (GFP) усиленный GFP, желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), синий флуоресцентный белок (BFP), красный флуоресцентный белок (RFP) или mCherry, а также флуоресцентные белки ближней инфракрасной области.

Согласно другим вариантам осуществления репортерная молекула может представлять собой фермент, опосредующий люминесцентные реакции (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *gus*, *pluc* и т.д.). Репортерные молекулы могут включать в себя бактериальную люциферазу, эукариотическую люциферазу, фермент, подходящий для колориметрического обнаружения (*LacZ*, *HRP*), белок, подходящий для иммунологического обнаружения, например, аффинные пептиды (*His*-метка, 3X-FLAG), нуклеиновую кислоту, которая функционирует в качестве аптамера или которая проявляет ферментативную активность (рибозим), или селективный маркер, например, гена резистентности к антибиотику (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*). Другие известные в настоящей области техники репортерные молекулы могут быть использованы для получения сигналов для обнаружения нуклеиновой кислоты-мишени или клетки-мишени.

Согласно другим аспектам репортерная молекула содержит молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым аспектам репортерная молекула представляет собой



аптамер со специфической активностью связывания или проявляет ферментативную активность (например, аптазим, ДНКзим, рибозим).

Репортеры и репортерные анализы описаны далее в разделе V в настоящем документе.

#### V. NRTP и репортерные анализы

##### 5 А. Индукторный репортерный анализ

Настоящее изобретение включает способы использования NRTP в качестве репортерных молекул для использования с эндогенными или природными индукторами этих промоторов гена-мишени в пределах жизнеспособных клеток. NRTP согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы с использованием способов, описанных в разделе III и ниже в примерах 1-6.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает применение NRTP в качестве репортера, причем NRTP содержит репортерный ген, который функционально связан с индуцируемым промотором, который контролирует экспрессию гена-мишени в пределах клетки-мишени. Когда NRTP, которая включает в себя репортерный ген, вводят в клетку-мишень, экспрессия репортерного гена возможна посредством индукции промотора гена-мишени в репортерной молекуле нуклеиновой кислоты.

На фиг. 9 изображен геномный локус клетки-мишени 900 с двумя генами, геном, кодирующим индуктор 902, и геном-мишенью 903. Также изображена репортерная молекула нуклеиновой кислоты 904, которая включает в себя репортерный ген. 905, который функционально связан с промотором 906 гена-мишени клетки-мишени. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты 904 может быть введена в клетку посредством NRTP. В нативной клетке, когда ген-индуктор 902 экспрессируется и производит индукторный белок 907, индукторный белок 907 способен индуцировать промотор гена-мишени 906, который функционально связан с геном-мишенью, что приводит к экспрессии гена-мишени и производству продукта гена-мишени 908.

Когда репортерная молекула нуклеиновой кислоты 904 присутствует в организме-мишени, индуктор 907 может также индуцировать промотор гена-мишени 906, присутствующий в репортерной молекуле нуклеиновой кислоты 904, тем самым вызывая экспрессию репортерного гена 905, приводя в результате к производству репортерной молекулы 909, способной производить обнаруживаемый сигнал.

Таким образом, производство обнаруживаемого сигнала от репортерной молекулы 909 указывает на наличие клетки, основываясь на наличии индукторного белка 907 в клетке-мишени.

##### 1) Репортерная система VanR

Согласно одному варианту осуществления репортерная система включает в себя NRTP, содержащую репортерную молекулу нуклеиновой кислоты (например, плазмиду). Репортерная молекула нуклеиновой кислоты может быть сконструирована для обнаружения VanR, индуктора промотора гена резистентности к ванкомицину (vanA) в *Enterococcus faecium* (или *E. faecalis*). Репортерная плазида несет репортерный ген, который функционально связан с промотором гена vanA.

На фиг. 10 показана конструкция и функция репортерной системы VanR. На фиг. 10 изображена область транспозона Tn1546 1001, который может присутствовать в *E. faecium*. Транспозон Tn1546 может включать в себя ген-индуктор vanR 1002 и ген-мишень vanA 1003. Также на фигуре изображена репортерная молекула нуклеиновой кислоты 1004, которая может быть упакована в NRTP и введена в клетку. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты 1004 включает в себя репортерный ген 1005, который функционально связан с промотором P<sub>H</sub> 1006, который контролирует экспрессию оперона vanHAX, который включает в себя ген vanA. В нативной клетке, когда ген vanR

1002 экспрессируется и производит белок VanR 1007, VanR способен индуцировать P<sub>H</sub> 1006 в транспозоне Tn1546, тем самым вызывая экспрессию гена vanA и, таким образом, производя белок vanA 1008. Когда репортерная молекула нуклеиновой кислоты 1003 (вектор) присутствует в организме-мишени, VanR также способен индуцировать P<sub>H</sub>

1006 в репортерной молекуле нуклеиновой кислоты 1003, тем самым вызывая экспрессию репортерной молекулы 1009. Таким образом, производство репортерной молекулы представляет собой показатель наличия VanR в клетке-мишени.

Примеры промоторов, подходящих для разработки анализа VRE, включают в себя: промотор гена vanA и промотор гена vanB. Arthur, M., et al., The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. J. Bacteriol., 1997. 179(1): p. 97-106.

## 2) Репортерная система TcdD

Согласно другому варианту осуществления этой системы, репортерную молекулу нуклеиновой кислоты вводят в клетку с использованием NRTP. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты может быть сконструирована для обнаружения TcdD, индуктора промоторов генов токсинов A и B (tcdA и tcdB, соответственно) *C. difficile*. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты включает в себя репортерный ген, который функционально связан с промотором гена tcdA.

На фиг. 11 представлена конструкция и функция репортерной системы TcdD, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. На фиг. 11 изображена область транспозона PaLoc 1101, которая может присутствовать в *C. difficile*. Транспозон PaLoc может содержать ген tcdD 1102 и ген-мишень tcdA 1103. Также на фигуре изображена репортерная молекула нуклеиновой кислоты 1104 (например, вектор), которую вводят в клетку с использованием NRTP. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты 1104 включает в себя репортерный ген 1105, который функционально связан с промотором гена tcdA (P<sub>tcdA</sub>) 1106.

В нативной клетке, когда ген tcdA экспрессируется и продуцирует белок TcdD 1107, TcdD способен индуцировать P<sub>tcdA</sub> 1106 в транспозоне PaLoc 1101, тем самым вызывая экспрессию гена tcdA 1103 и, таким образом, производя белок токсина A 1108.

Когда репортерная молекула нуклеиновой кислоты 1104 присутствует в организме-мишени, TcdD также способен индуцировать P<sub>tcdA</sub> 1106 в репортерном векторе, тем самым вызывая экспрессию репортерной молекулы 1109. Таким образом, производство репортерной молекулы 1109 свидетельствует о наличии TcdD в клетке-мишени.

Примеры промоторов, подходящих для разработки анализа *C. difficile*, включают в себя: промотор гена tcdA и промотор гена tcdB. Karlsson, S., et al., Expression of *Clostridium difficile* Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. Infect. Immun., 2003. 71(4): p. 1784-1793.

Клетки-мишени и индукторы: Клетки-мишени могут включать в себя эукариотические и прокариотические клетки-мишени и связанные индукторы.

Системы доставки вектора: Доставка вектора, содержащего рекомбинантную ДНК, может быть выполнена с помощью небологических или биологических систем. Включая в себя без ограничения липосомы, вирусоподобные частицы, полученные из фага или вирусов трансдукторные частицы и конъюгацию.

## 3) Основанная на бактериофаге репортерная система SarS

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения репортерную молекулу нуклеиновой кислоты конструируют для обнаружения SarS, индуктора промотора гена белка A (spa) в *S. aureus*. Репортерная молекула нуклеиновой кислоты

может быть введена в клетку в NRTP и включает в себя бактериальные люциферазные гены luxA и luxB, функционально связанные с промотором гена spa ( $P_{spa}$ ). Репортерная молекула нуклеиновой кислоты доставляется к *S. aureus* посредством NRTP, например. Если SarS присутствует в клетке, он будет индуцировать экспрессию генов luxAB, таким образом, производя фермент-люциферазу, который способен производить люминесцентный сигнал.

На фиг. 12 представлена конструкция и функция репортерной системы SarS, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения. На фиг. 12 изображена область генома *S. aureus* 1201, которая содержит ген sarS 1202 и ген spa 1203. Также на фигуре показана репортерная молекула нуклеиновой кислоты (например, вектор) 1204, поставляемая с NRTP в клетку, и которая включает в себя репортерные гены luxAB 1205, функционально связанные с промотором  $P_{spa}$  1206, который контролирует экспрессию гена spa 1203.

В нативной клетке, когда экспрессируется ген sarS 1202, производя белок SarS 1207, белок способен индуцировать  $P_{spa}$  1206 в транспозоне генома *S. aureus*, тем самым вызывая экспрессию гена spa 1203 и производя белок A 1208.

Когда репортерная молекула нуклеиновой кислоты 1204 присутствует в организме-мишени, SarS 1207 также способен индуцировать  $P_{spa}$  1206 в репортерной молекуле нуклеиновой кислоты 1204, тем самым вызывая экспрессию luxAB, приводя в результате к производству фермента-люциферазы 1209, который может производить люминесцентный сигнал. Таким образом, производство люциферазы свидетельствует о присутствии SarS в клетке-мишени.

#### В. Ферментный репортерный анализ

В настоящем изобретении предусмотрена система обнаружения внутриклеточных ферментов в живых клетках, которая использует огражденные молекулы субстрата, которые могут лишаться ограждения с помощью внутриклеточного фермента-мишени, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 13 изображена конструкция и функции системы обнаружения внутриклеточных ферментов. Экспрессирующий репортерную молекулу вектор 1301 доставляется в клетку-мишень 1302 с NRTP (не показано). Экспрессирующий репортерную молекулу вектор 1301 способен проникать в клетку-мишень 1302 через NRTP и доставлять ген репортерной молекулы 1303 в клетку-мишень 1302, и репортерная молекула 1304 затем может быть экспрессирована из гена репортерной молекулы 1303. Огражденный субстрат 1305 также добавляется в клетку-мишень 1302, и он способен проникать в клетку-мишень 1302. Если внутриклеточный фермент-мишень 1307 присутствует в клетке-мишени 1306, фермент 1307 способен удалять ограждающий компонент из иммобилизованного субстрата 1305, таким образом, производя лишенный ограждения субстрат 1308. Лишенный ограждения субстрат 1308 может реагировать с репортерной молекулой 1304 внутри клетки 1302, и продукт этой реакции приводит к обнаруживаемому сигналу 1309.

Клетки-мишени и ферменты-мишени: Клетки-мишени могут включать в себя эукариотические и прокариотические клетки-мишени и связанные с ними ферменты, включающие в себя, например,  $\beta$ -лактамазу в *S. aureus*.

Системы доставки вектора: Доставка вектора, содержащего рекомбинантную ДНК, может быть выполнена с помощью небιологических или биологических систем. Включая в себя без ограничения липосомы, вирусоподобные частицы, полученные из фагов или вирусов трансдукторные частицы и конъюгацию.

Репортерные молекулы и огражденные субстраты: Могут быть использованы различные репортерные молекулы и огражденные субстраты, описанные в Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007, Zymera, Inc.

#### 1) Основанный на бактериофаге $\beta$ -лактамазный репортер

5 Согласно одному варианту осуществления экспрессирующий репортерную молекулу вектор может быть внесен с помощью NRTP, таким образом, что вектор может быть доставлен в бактериальную клетку. Репортерная молекула для экспрессии может представлять собой люциферазу Renilla, а огражденный субстрат может представлять собой люциферин Renilla, который огражден таким образом, что фермент  $\beta$ -лактамаза, 10 который представляет собой эндогенный по отношению к клетке-мишени, может расщеплять ограждающее соединение из огражденного люциферина и выпускать лишенный ограждения люциферин.

На фиг. 14 изображена конструкция и функция системы обнаружения фермента  $\beta$ -лактамазы, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. 15 Экспрессирующий люциферазу Renilla вектор, внесенный с помощью основанной на бактериофаге NRTP 1401, добавляется к клетке-мишени *S. aureus* 1402. Экспрессирующий люциферазу Renilla вектор способен проникать в клетку-мишень 1402 с помощью NRTP, содержащей вектор. NRTP доставляет ген люциферазы Renilla 1403 в клетку-мишень 1402, и люцифераза Renilla 1404 может быть экспрессирована из ее гена. Огражденный 20 люциферин Renilla 1405 также добавляется в клетку-мишень 1402 и он способен проникать в клетку-мишень 1402. Если внутриклеточная  $\beta$ -лактамаза 1407 присутствует в клетке-мишени 1402, фермент способен удалять ограждающий компонент огражденного люциферина 1406, таким образом, производя лишенный ограждения люциферин 1408. Лишенный ограждения люциферин 1408 может затем реагировать с 25 люциферазой Renilla 1404 внутри клетки 1402, и продукт этой реакции приводит в результате к люминесценции 1409.

Таким образом, когда клетка-мишень, которая содержит  $\beta$ -лактамазу, подвергается воздействию NRTP и огражденного люциферина, клетка будет проявлять люминесцентный сигнал, который свидетельствует о наличии  $\beta$ -лактамазы, 30 присутствующей в клетке.

#### С. Внутриклеточный молекулярный репортер

В настоящем изобретении предусмотрена система для обнаружения внутриклеточных молекул в жизнеспособных клетках, которая использует переключаемые молекулы, способные производить обнаруживаемый сигнал после их связывания с молекулой- 35 мишенью.

На фиг. 15 изображена конструкция и функция основанной на переключаемой молекуле (SM) внутриклеточной системы обнаружения молекулы. Экспрессирующий SM вектор 1501 доставляется в клетку-мишень 1502 в NRTP. Экспрессирующий SM вектор 1501 способен проникать в клетку-мишень 1502 и доставлять ген SM 1503 в 40 клетку-мишень 1502. Белок SM 1504 затем может быть экспрессирован из гена SM 1503. Белок SM 1504 затем может связываться с молекулой-мишенью 1505 внутри клетки и, таким образом, образовывать комплекс SM-молекула-мишень 1506. Связывание SM 1504 с молекулой-мишенью 1505 в результате приводит к конформационному изменению в SM 1504, что делает связанную SM поддающейся к связыванию субстрата. Субстрат 45 1508 добавляется в клетку 1507, и он способен проникать в клетку 1502. Связанная SM внутри клетки 1502 способна также связываться с субстратом, образуя комплекс SM-молекула-мишень-субстрат 1509. Наконец, связывание субстрата 1508 связанной с молекулой-мишенью SM характеризуется эффектом производства обнаруживаемого

сигнала 1510. Таким образом, производимый системой обнаруживаемый сигнал свидетельствует о наличии молекулы-мишени внутри клетки.

Клетки-мишени и молекулы-мишени: Могут быть использованы различные эукариотические и прокариотические клетки-мишени, и основанные на переключаемом аптамере SM могут быть разработаны для направленного воздействия на различные основанные на нуклеиновых кислотах и аминокислотах внутриклеточные молекулярные мишени, как описано в Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University.

Системы доставки вектора: Доставка вектора, содержащего рекомбинантную ДНК, может быть выполнена с помощью небιологических или биологических систем. Включая в себя без ограничения липосомы, вирусоподобные частицы, полученные из фагов или вирусов трансдукторные частицы и конъюгацию.

1) Основанная на нерепликативной трансдукторной частице/переключаемом аптамере внутриклеточная молекулярная репортерная система

В одном примере этого способа экспрессирующий переключаемую молекулу вектор может переноситься с помощью такой основанной на бактериофаге трансдукторной частицы, что вектор может быть доставлен в бактериальную клетку. Переключаемая молекула для экспрессии может представлять собой переключаемый аптамер, который предназначен для того, чтобы подвергаться конформационному изменению при его связывании с внутриклеточной молекулой-мишенью. Конформационное изменение позволяет аптамеру затем связываться с флуорофором, который проявляет повышенную флуоресценцию при связывании с аптамером.

На фиг. 16 изображена конструкция и функция основанной на бактериофаге/переключаемом аптамере (SA) внутриклеточной молекулярной репортерной системы.

Экспрессирующий SA вектор, переносимый с помощью NRTP 1601, добавляется к клетке-мишени 1602. NRTP 1601 способен доставлять экспрессирующий SA вектор и экспрессирующий SA ген 1603 в клетку-мишень 1602. Белок SA 1604 затем может экспрессироваться из гена SA 1603. Белок SA 1604 может затем связываться с молекулой-мишенью 1605 внутри клетки и, таким образом, образовывать комплекс SA-молекула-мишень 1606. Связывание SA 1604 с молекулой-мишенью 1605 в результате приводит к конформационному изменению в SA, что делает связанный SA поддающимся к связыванию флуорофора 1608. Флуорофор 1607 добавляется к клетке и может проникнуть в клетку 1608. Связанный SA внутри клетки может также связываться с флуорофором, образуя комплекс SA-молекула-мишень-флуорофор 1609. Наконец, связывание флуорофора связанным с молекулой-мишенью SA характеризуется эффектом повышения флуоресценции флуорофора 1610. Таким образом, создаваемый системой обнаруживаемый флуоресцентный сигнал свидетельствует о присутствии молекулы-мишени внутри клетки.

#### D. Репортерный анализ транскриптов

В настоящем изобретении предусмотрен репортерный анализ, включающий основанный на антисмысловой РНК способ обнаружения транскриптов-мишеней в пределах жизнеспособных клеток, вызывая экспрессию репортерной молекулы, если транскрипт-мишень присутствует в клетке.

Некоторые внутриклеточные способы в настоящей области техники ингибирования экспрессии генов используют малую интерферирующую РНК, такую как двухцепочечная РНК (дцРНК), для направленного воздействия на транскрибированные гены в клетках. ДцРНК содержит антисмысловые и смысловые нити, которые доставляются в или экспрессируются в клетках, и нити дцРНК действуют посредством транс-действующего

механизма ингибирования, где одна нить (как правило, антисмысловая нить) связывается с последовательностью гена-мишени (РНК-транскриптом) и предотвращает экспрессию последовательности гена-мишени. Было показано, что двухцепочечные молекулы РНК блокируют (нокаутируют) экспрессию гена в высоко консервативном регулирующем механизме, известном как РНК-интерференция (RNAi). В публикации WO 99/32619 (Fire et al.) раскрыто использование дцРНК, составляющей по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину, для ингибирования экспрессии генов в *C. elegans*. Также было показано, что дцРНК деградирует РНК-мишень в других организмах, включающих в себя растения (смотрите, например, WO 99/53050, Waterhouse et al.; and WO 99/61631, Heifetz et al.), дрозофил (смотрите, например, Yang, D., et al, Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200) и млекопитающих (смотрите WO 00/44895, Limmer; and DE 10100586.5, Kreutzer et al.). Тем не менее, связывание нити дцРНК с геном-мишенью может быть неспецифическим. Если бы подобный механизм был бы применен к системе обнаружения, это неспецифическое связывание могло привести к высокому количеству ложных срабатываний, которые делают его непригодным для развития клинически применимых систем обнаружения.

Было показано, что предыдущие транс-действующие механизмы ингибирования не пригодны для развития клинически применимых систем обнаружения. Например, некоторые способы приводят к высоким уровням неспецифических сигналов и до 90% ложных срабатываний, при достижении 90% чувствительности анализа. Смотрите патент США №8329889. Были разработаны некоторые способы посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, которые используют цис-репрессорный маркерный транскрипт, такой как зеленый флуоресцентный белковый маркер, где сайт связывания рибосомы маркера заблокирован цис-репрессорной последовательностью, наряду с транс-активирующим РНК-транскриптом. Когда транс-активирующий РНК-транскрипт связывается с цис-репрессорным маркерным транскриптом, структура шпильки цис-репрессорного маркерного транскрипта изменяется, и выше против хода транскрипции сайт связывания рибосомы маркерного гена подвергается воздействию, делая возможной транскрипцию и экспрессию маркерного гена. Однако эти способы не были ранее использованы для обнаружения эндогенных транскриптов, и не были успешными за пределами основного механизма переключения для управления экспрессией генов в клетках.

#### 1) Взаимодействие и механизмы молекул нуклеиновых кислот

Способы согласно настоящему изобретению пользуются преимуществом механизмов регулирования уровня транскрипта, включая в себя механизм антисмысловой РНК (асРНК) в клетках, чтобы доставить молекулы нуклеиновых кислот в клетки.

Антисмысловой механизм включает в себя все формы специфического к последовательности распознавания мРНК, приводя к уменьшенной, устраненной, увеличенной, активированной или иным образом измененной экспрессии транскрипта-мишени. Смотрите Good, L., Translation Repression By Antisense Sequences. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003. 60(5): p. 854-861 и Lioliou, E., RNA-mediated regulation in bacteria: from natural to artificial systems, New Biotechnology. 2010. 27(3): p. 222-235.

Природные асРНК найдены во всех трех царствах жизни, и они влияют на разрушение, угнетение и активацию матричной РНК (мРНК), а также процессинг и транскрипцию РНК. Смотрите регулирование Sabine, B., Antisense-RNA regulation and RNA Interference. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2001. 1575(1-3): p. 15-25. Этот механизм используется в ингибировании синтеза белков в терапевтических целях.

Антисмысловая РНК представляет собой одноцепочечную РНК, которая комплементарна нити матричной РНК (мРНК), транскрибированной внутри клетки. асРНК может быть введена в клетку для ингибирования трансляции комплементарной мРНК по спариванию оснований с ним и для физического препятствования механизму трансляции. Отжиг антисмысловой РНК с комплементарной последовательностью-мишенью мРНК и трансляция последовательности-мишени мРНК нарушается вследствие стерических затруднений либо доступа рибосомы, либо считывания рибосомы.

Механизм антисмысловой РНК отличается от РНК-интерференции (RNAi), связанного процесса, в котором фрагменты двухцепочечной РНК (дцРНК, также называемые малые интерферирующие РНК (миРНК)) запускают каталитически опосредованное молчание генов, наиболее часто путем направленного воздействия на индуцированный РНК комплекс сайленсинга (RISC) для связывания и разрушения мРНК. Отжиг нити молекулы дцРНК с мРНК или ДНК может приводить к быстрой деградации дуплексной РНК, гибриднему дуплексу РНК/ДНК или дуплексной РНК, напоминающей предшественник тРНК с помощью рибонуклеазы в клетке, или путем расщепления РНК-мишени самим антисмысловым соединением.

Путь РНК-интерференции встречается у многих эукариот и инициируется ферментом Dicer, который расщепляет длинные молекулы двухцепочечных РНК (дцРНК) на короткие двухцепочечные фрагменты ~ 20 нуклеотидов, называемые миРНК. Каждая миРНК разматывается на две одноцепочечные РНК (оцРНК), называемые пассажирская нить и нить-гид. Пассажирская нить деградирует, и нить-гид включается в индуцированный РНК комплекс сайленсинга (RISC). В посттранскрипционном сайленсинге генов, основания нити-гида образуют пары с комплементарной последовательностью в молекуле матричной РНК, и расщепление индуцируется белком, называемым Argonaute, каталитическим компонентом комплекса RISC.

В отношении взаимодействий нуклеиновых кислот механизмов согласно настоящему изобретению, взаимодействия между репортерным транскриптом и транскриптом-мишенью может относиться к образованию пар оснований между петлями, присутствующими в обоих транскриптах (например, "целующиеся комплексы") или между петлей и одноцепочечной (оц) областью. В некоторых случаях, образование целующихся комплексов достаточно для опосредования желаемого эффекта взаимодействия, а в других случаях распространение первичных контактов будет приводить к взаимодействию, приводящему в результате к желаемому эффекту.

2) Механизмы для цис-репрессии и транс-активации трансляции репортерного конструкта посредством регулирования на уровне транскриптов

В последующем описании показаны транскрипторные репортерные системы, основанные на различных механизмах репрессии/активации, которые могут использоваться в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. На каждой из фигур 17-20 вектор включает в себя конструкт, содержащий репортерную последовательность, и области на репортерном конструкте показаны на каждой из фигур, включая в себя области, на которые могут направлено воздействовать для репрессии цис-репрессированной последовательностью. Приведенное ниже описание содержит неограничивающие примеры различных механизмов ингибирования транскрипции, включающие в себя ослабление транскрипции, ослабление трансляции и дестабилизацию транскрипта, а также различные механизмы активации, включающие в себя конформационные изменения и расщепление.

На фиг. 17 показан пример системы 1700, которая использует цис-репрессорный механизм, который может направленно воздействовать на 5' UTR (нетранслируемую

область) 1701 репортерной последовательности 1702 на репортерном транскрипте 1703. Также показаны области внутри репортерной последовательности 1702 (5'UTR (1701), RBS, кодирующая область 3'UTR). Цис-репрессорная последовательность 1705 находится выше против хода транскрипции от репортерной последовательности и до 5' UTR 1701 репортерной последовательности. РНК-полимераза 1704 транскрибирует последовательность репортерного конструкта 1703 из вектора 1706.

В некоторый момент во время транскрипции процесс транскрипции останавливается путем образования структуры стебель-петля терминации транскрипции (ТТ) 1707 в репортерном транскрипте 1703, из-за взаимодействия в транскрибированной цис-репрессорной последовательности 1705. Структура терминации транскрипции 1707 останавливает 1708 РНК-полимеразу 1704 от транскрибирования вектора 1706 Согласно некоторым вариантам осуществления белок терминации транскрипции (например, NusA в *E. coli*) связывается с РНК-полимеразой и/или структурой терминации транскрипции 1707 для прекращения транскрипции репортерного конструкта.

Когда транскрипт-мишень 1709 присутствует в клетке, транскрипт-мишень 1709 связывается с репортерным транскриптом 1703. Согласно некоторым вариантам осуществления связывание между транскриптом-мишенью и репортерным транскриптом происходит путем спаривания оснований нуклеотидов в каждой последовательности. Взаимодействие между транскриптом-мишенью 1709 и репортерным транскриптом 103 вызывает расщепление 1710 структуры стебель-петля терминации транскрипции (ТТ) 1707. Расщепление репортерного транскрипта 1703 может происходить с помощью клеточного фермента, такого как РНКазы III, например. В этом случае вторичную структуру транскрипта-мишени анализируют на наличие консенсусной последовательности РНКазы III среди областей оцРНК вторичной структуры, например 5'-nnWAWGNNNUUN-3' (SEQ ID NO: 20) или 5'-NAGNNNNCWUWnn-3' (SEQ ID NO: 21), где "N" и "n" представляют собой любой нуклеотид и "W" представляет собой А или U, и "N" указывает на относительно строгие требования к уотсон-криковскому спариванию оснований, а "n" указывает на минимальный требование к спариванию оснований. Когда такая консенсусная последовательность находится на транскрипте-мишени, петля структуры терминации транскрипции 1707 может быть предназначена для того, чтобы быть комплементарной указанной консенсусной последовательности РНКазы III, так что когда оцРНК в каждой молекулы РНК гибридизуется, образуется сайт расщепления РНКазы III, делая возможным расщепление структуры терминации транскрипции 1707. В транскрипте *tesA*, петля T23, начиная с нуклеотида 1404, содержит последовательность CAGAUAACAUUUU (SEQ ID NO: 22), которая подходит для такого подхода.

Согласно некоторым вариантам осуществления конструируют сайт расщепления в репортерном конструкте таким образом, что репортерный транскрипт расщепляется после транскрипции. Расщепление в приведенном примере может происходить в непосредственной близости к месту петли в структуре терминации транскрипции. Транскрипция повторно иницируется 1711 РНК-полимеразой 104. Расщепление структуры стебель-петля терминации транскрипции (ТТ) 1707 позволяет остатку репортерной последовательности 1702 транскрибироваться и затем транслироваться. Это приводит к получению обнаруживаемого или селективного маркера из транслированной репортерной молекулы.

В прокариотах структура терминации транскрипции 1707 включает в себя Rho-независимый механизм со структурой стебель-петля, которая составляет 7-20 пар оснований в длину, богатую парами оснований цитозин-гуанин и за ней следует цепь



остатков урацила. NusA связывается со структурой стебель-петля терминации транскрипции 1707, заставляющей РНК-полимеразу останавливаться во время транскрипции поли-урациловой последовательности. Слабые аденин-урациловые связи снижают энергию дестабилизации дуплекса РНК-ДНК, что позволяет разматываться и диссоциировать от РНК-полимеразы. У эукариот структура терминации транскрипции 1707 распознается белковыми факторами и включает в себя расщепление нового транскрипта с последующим полиаденилированием.

На фиг. 18 показан пример системы 1800 для обнаружения наличия транскрипта-мишени в клетке, которая основана на цис-репрессорном механизме, нацеленно воздействующем на сайт связывания рибосом (RBS) 1801 репортерной последовательности 1702 в репортерном транскрипте 1703. RBS 1801 представляет собой последовательность мРНК, которая связана с рибосомой 1802 при инициировании трансляции белка. Цис-репрессорная последовательность 1705 предназначена для связывания с RBS 1801 (например, цис-репрессорная последовательность 1705 комплементарна последовательности RBS 1801). RBS 1801 связывается с цис-репрессорной последовательностью 1705 и становится поглощенной (недоступной для рибосом 1802), предотвращая репортерную трансляцию 1703. Когда транскрипт-мишень 109 из клетки связывается с репортерным транскриптом 1703, транскрипт-мишень 1709 характеризуется более высокой аффинностью связывания для последовательности RBS 1801, и конформационное изменение происходит в репортерном транскрипте 1703 таким образом, что высвобождает связывание между цис-репрессорной последовательностью 1705 и последовательностью RBS 1801. Это позволяет рибосоме 1802 связываться с RBS 1801, тем самым делая возможной трансляцию репортерного транскрипта 1703.

На фиг. 19 показана иллюстративная система 1900 для обнаружения наличия транскрипта-мишени в клетке, которая основана на цис-репрессорном механизме, нацеленно воздействующем на кодирующую область ("AUG") 1901 репортерной последовательности 1702 в репортерном транскрипте 1703. Цис-репрессорную последовательность 1705 конструировали таким образом, чтобы она связывалась с (например, была комплементарна) кодирующей области 1901 репортерной последовательности 1702. Стартовый кодон "AUG" показан, как часть кодирующей области 1901. Связывание цис-репрессорной последовательности 1705 и кодирующей области 1901 приводит к конформации, которая приводит к расщеплению 1902 репортерного конструкта 1703. Расщепление репортерного транскрипта 1703 предотвращает трансляцию.

Когда транскрипт-мишень 1709 присутствует в клетке, транскрипт-мишень 1709 связывается с цис-репрессорной последовательностью 1705 таким образом, что вызывает конформационное изменение в репортерном транскрипте 1703. Это конформационное изменение препятствует или удаляет взаимодействие между цис-репрессорной последовательностью 1705 и кодирующей областью 1901 репортерной последовательности 1702, таким образом, позволяя трансляцию репортерной последовательности 1702.

На фиг. 20 показана иллюстративная система 2000 для обнаружения наличия транскрипта-мишени в клетке, которая основана на механизме репрессии с использованием нестабильного репортерного транскрипта 2001. Репортерный транскрипт 2001 разработан быть нестабильным таким образом, чтобы он образовывал нестабильную конформацию, которая предотвращает трансляцию репортерного транскрипта 2001. Репортерный транскрипт 2001 определяется как неустойчивый, если он склонен к быстрой деградации под воздействием различных факторов, таких как

активность экзосомных комплексов или деградосом. Транскрипт-мишень 1709 в клетке связывается с участком неустойчивого репортерного транскрипта 2001. В этом примере участок, отвечающий за дестабилизацию транскрипта, находится в 3' UTR 2005 репортерной последовательности, и 3' UTR 2005 действует как цис-репрессорная последовательность репортерного конструкта 1703. Связывание транскрипта-мишени 1709 с UTR 3' 2005 репортерной последовательности приводит к событию расщепления 2003, которое стабилизирует репортерный транскрипт 2001 и позволяет трансляцию 2004 репортерного транскрипта 2001. Расщепление происходит при связывании транскрипта-мишени 1709 и служит для удаления части последовательности, которая отвечает за дестабилизацию транскрипта. В этом примере, транскрипт-мишень 1709 связывается с 3' UTR 405 репортерной последовательности, но система 400 также может быть разработана таким образом, что связывание и расщепление происходит в 5' UTR, выше против хода транскрипции от 5' UTR или ниже по ходу транскрипции 3' UTR. Связывание и расщепление может происходить в любом месте за пределами областей, необходимых для трансляции репортерной последовательности 1702.

Согласно некоторым вариантам осуществления цис-репрессорная последовательность содержит две последовательности, которые могут связываться друг с другом (например, быть комплементарными друг другу), и конформация репортерного транскрипта, которая представляет собой результат связывания двух последовательностей цис-репрессорной последовательности, предотвращает трансляцию репортерной последовательности в репортерный транскрипт.

### 3) Природные и синтетические системы для механизмов репрессии/активации

Описаны несколько природных и синтетически произведенных механизмов на транскриптном уровне, которые демонстрируют отдельные механизмы (т.е. конформационное изменение и расщепление), используемые в каждом из примеров, представленных на фигурах 17-20.

Терминация транскрипции наблюдалась в опосредованном антисмысловой РНК (асРНК) ослаблении транскрипции. В одном примере, за двумя взаимодействиями петля-петля между RNAIII/repR мРНК впоследствии следует образование стабильного дуплекса. Этот комплекс стабилизирует Rho-независимую структуру терминатора для остановки удлинения РНК-полимеразой (RNAP).

Механизм секвестрации RBS был описан с помощью разработки синтетической системы рибосвитч. В этой системе последовательность, комплементарная к RBS, находится выше против хода транскрипции RBS, позволяя наличие линкерной последовательности двух областей. После транскрипции мРНК, две комплементарные области гибридизуются, создавая шпильку, которая предотвращает стыковку рибосомы. Для активации трансляции синтетическая РНК транс-активации, несущая последовательность RBS, связывается с гибридизованной РНК, позволяя RBS подвергаться воздействию и быть доступной для трансляции.

Предотвращение трансляции из-за раскалывания РНК было также описано в природной системе, где асРНК MicC направленно воздействует на последовательность внутри кодирующей области ompD мРНК. Взаимодействие, которое обеспечивается Hfq, вызывает расщепление мРНК по РНКазы E.

Еще один природный механизм демонстрирует событие расщепления для активации скорее трансляции, а не ее ингибирования. асРНК GadY E. coli нацеленно воздействует на межгенную область между двумя генами оперона gadXW. После образования стабильной спирали между GadY и 3' UTR из gadX, происходит расщепление РНКазы в транскрипте, и стабилизация транскрипта gadX делает возможным его трансляцию.

4) Механизм конформационного изменения путем цис-репрессии репортерной последовательности и путем связывания транскрипта-мишени

Общие механизмы, используемые в настоящем изобретении, представляют собой межмолекулярные взаимодействия между нуклеиновыми кислотами, которые могут приводить к двум последующим механизмам: (1) конформационному изменению во вторичной структуре молекул нуклеиновых кислот и (2) событию расщепления. В настоящем документе описаны способы разработки репортерных транскриптов, которые могут подвергаться конформационному изменению между цис-репрессорной конформацией и дерепрессорной конформацией, так что конформационное изменение индуцируется связыванием транскрипта-мишени с репортерным транскриптом.

Как описано выше, репортерный транскрипт может содержать репортерную последовательность и быть разработан таким образом, чтобы трансляция репортерной генной последовательности блокировалась цис-репрессией связывающего сайта рибосомы (RBS) репортерного гена.

Согласно некоторым вариантам осуществления следующие инструменты могут быть использованы для разработки репортерных транскриптов согласно настоящему изобретению.

1) вторичная структура РНК рассчитывается с использованием программы вторичной структуры, такой как Mfold, доступной на сервере, поддерживаемом Институтом РНК колледжа гуманитарных и естественных наук, Университетом в Олбани, Государственным университетом Нью-Йорка (веб-сервер Mfold для упаковки нуклеиновой кислоты и прогнозирования гибридизации. Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-15, (2003)) (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)).

2) Межмолекулярные взаимодействия РНК рассчитываются с использованием программного обеспечения, такого как предсказания взаимодействия РНК-РНК с использованием Integer Programming (RactIP), доступного на сервере, поддерживаемом Высшей школой информатики, Институтом Нара науки и технологий (NAIST), Департаментом биологических наук и информатики, Университет Кейо Япония (<http://rna.naist.jp/ractip/>).

3) вторичную структуру РНК визуализируют с использованием приложения для визуализации для РНК (VARNA) (<http://varna.lri.fr/>), которое представляет собой легкий апплет Java, посвященный разработке вторичной структуры РНК.

Вторичная структура транскрипта-мишени может быть создана на основе конформации с самой низкой энергией, рассчитанной с помощью MFold и визуализированной с VARNA.

Области оцРНК или области-мишени могут быть идентифицированы к транскрипте-мишени, который может идеально подходить для связывания с репортерным транскриптом. В некоторых случаях вторичная структура транскрипта-мишени включает в себя консенсусную последовательность или последовательность петли, которая может связываться с частью репортерной последовательности. Например, в транскрипте *mesA* метициллин-устойчивого *S. aureus* существует терминальная петля, которая включает в себя консенсусную последовательность YUNR ("UUGG"), которая может быть использована для связывания с цис-репрессорной последовательностью репортерного транскрипта. Анализ вторичной структуры транскрипта-мишени может выявить только эти или более областей оцРНК, которые могут быть пригодны для связывания с цис-репрессорной последовательностью. Цис-репрессорная последовательность репортерного транскрипта может быть разработана для связывания только с этими или более областями оцРНК.

Согласно некоторым вариантам осуществления цис-репрессорная последовательность может быть разработана для связывания с RBS репортерной последовательности в репортерном транскрипте и образовывать структуру стебель-петля в репортерном транскрипте, так что цис-репрессорная последовательность блокирует связывание РНК-полимеразы с RBS репортерной последовательности. После связывания цис-репрессорной последовательности с областью оцРНК транскрипта-мишени, RBS репортерной последовательности может подвергаться воздействию и может быть инициирована трансляция репортерной последовательности.

Согласно некоторым вариантам осуществления цис-репрессорная последовательность репортерного транскрипта может быть разработана для того, чтобы располагаться на 5'-конце репортерной последовательности, и быть разработана для создания структуры стебель-петля в репортерной последовательности, такой, что последовательность RBS репортерной последовательности блокируется. Цис-репрессорная структура стебель-петля может быть разработана, чтобы блокировать последовательность RBS на основании конформации с наименьшей энергией репортерного транскрипта, рассчитанного с помощью MFold и визуализированного с VARNA. Предсказанные межмолекулярные взаимодействия между транскриптом-мишенью и цис-репрессорной последовательностью репортерного транскрипта можно рассчитать с помощью RactIP и визуализировать с помощью VARNA. Может быть изображена схема для визуализации спаривания оснований между транскриптом-мишенью и цис-репрессорной последовательностью репортерного транскрипта, как показано на фиг. 28 ниже.

Взаимодействие может включать в себя спаривание оснований между 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 или более нуклеотидами в последовательности-мишени и цис-репрессорной последовательности. Комплементарное связывание между двумя последовательностями может быть полностью комплементарным, по существу комплементарным или частично комплементарным. Спаривание оснований может происходить вдоль смежных нуклеотидных последовательностей или областей внутри мишени и цис-репрессорной последовательности, например, как показано на фиг. 28.

5) Механизмы расщепления для цис-репрессорных транскриптов или репортерных транскриптов

Общие механизмы, используемые в настоящем изобретении, представляют собой межмолекулярные взаимодействия между молекулами нуклеиновых кислот, которые могут приводить к двум последующим механизмам: (1) конформационному изменению во вторичной структуре молекул нуклеиновых кислот и (2) событию расщепления. В настоящем документе описаны способы и системы для разработки репортерных транскриптов, которые используются для события расщепления.

Согласно некоторым вариантам осуществления механизм для расщепления может быть использован в системе и способах согласно настоящему изобретению для цис-репрессии или для транс-активации. Например, как описано выше на фигурах 17, 19 и 20, система может быть разработана, чтобы получить преимущество механизма раскалывания, подвергая последовательность нуклеиновой кислоты репортерного транскрипта воздействию расщепляющего фермента (РНКаза) или секвестрации одноцепочечной последовательности, которая распознается специфической к последовательности РНКазой.

В одном примере сайт рибонуклеазы E (РНКаза E) может быть разработан в

репортерном транскрипте ("\*" указывает на расщепляющийся сайт): (G,A)N(C,A)N(G)(G,U,A)\*(A,U)(C,U)N(C,A)(C,A). Смотрите Kaberdin et al., Probing the substrate specificity of E. coli RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 16 (doi: 10.1093/nar/gkg690).

5 В цис-репрессорной системе цис-репрессорная последовательность может быть включена в конструкцию репортерного транскрипта, например, такую, что при транскрипции конформация репортерного транскрипта подвергает одноцепочечную область, содержащую мотив распознавания последовательности РНКазы E, воздействию в желаемом месте для расщепления. Согласно некоторым вариантам осуществления  
10 сайт расщепления может быть вовлечен в репрессию транскрипции репортерного транскрипта, например, если сайт расщепления находится в кодирующей области репортерного гена.

Для системы транс-дерепрессии, цис-репрессорный транскрипт может быть сконструирован для связывания с транскриптом-мишенью, например, таким, что  
15 взаимодействие приводит к конформационному изменению в репортерном транскрипте, которое изолирует одноцепочечную область, содержащую сайт РНКазы E.

Система может быть разработана так, чтобы цис-репрессорный механизм был связан с конкретной вторичной структурой, создаваемой конформацией цис-репрессорной последовательности, такая как описанная выше структура терминации транскрипции.  
20 В этом примере событие раскалывания служит для де-репрессии репортерной последовательности. Это может быть достигнуто путем разработки цис-репрессорной последовательности для взаимодействия с (связывания с) встречающейся в природе плазмидой или другим клеточным транскриптом, так что взаимодействие приводит к созданию одноцепочечной области, содержащей сайт РНКазы E, который может  
25 расщепляться и, таким образом, удаляет цис-репрессорную последовательность из репортерного транскрипта.

Согласно некоторым вариантам осуществления, когда событие расщепления используется для экспрессии репортера, сайт РНКазы E разрабатывается для того, чтобы быть вне кодирующей области репортерной последовательности с достаточной  
30 длиной последовательности в 5' и 3' UTR для обеспечения жизнеспособного репортерного транскрипта. В этом случае сайт РНКазы E разрабатывается, чтобы составлять по меньшей мере 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 или более пар оснований выше против хода транскрипции от стартового кодона в прокариотических системах и по меньшей мере 18, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200,  
35 300, 400, 500 или более пар оснований выше против хода транскрипции от стартового кодона в эукариотических системах, или по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 или более пар оснований ниже по ходу транскрипции от стоп-кодона. Согласно другим вариантам осуществления, когда событие расщепления используется для репрессии репортера, сайт РНКазы E предназначен для того, чтобы  
40 быть в пределах кодирующей области репортерной последовательности или размещаться иным образом, чтобы ингибировать экспрессию репортера.

#### 6) Транскрипты

Как описано выше, транскрипт представляет собой длину нуклеотидной последовательности (ДНК или РНК), транскрибированной с матричной  
45 последовательности ДНК или РНК или гена. Транскрипт может представлять собой последовательность кДНК, транскрибированную с РНК-матрицы, или последовательности мРНК, транскрибированную с ДНК-матрицы. Транскрипт может быть транскрибирован со сконструированного конструкта нуклеиновой кислоты.

Транскрипт может содержать области комплементарности таким образом, что транскрипт включает в себя две области, которые могут образовывать внутримолекулярный дуплекс. Одна область может быть отнесена к "цис-репрессорной последовательности", которая связывается с и блокирует трансляцию репортерной последовательности. Вторая область транскрипта называется "репортерная последовательность", которая кодирует репортерную молекулу, например, обнаруживаемый или селективный маркер.

Транскрипты согласно настоящему изобретению могут представлять собой последовательность транскрипта, которая может составлять 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов в длину. Согласно другим вариантам осуществления транскрипт может составлять по меньшей мере 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 или более нуклеотидов в длину. Цис-репрессорная последовательность и репортерная последовательность могут быть одинаковой длины или разной длины.

Согласно некоторым вариантам осуществления цис-репрессорная последовательность отделена от репортерной последовательности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более разделительными нуклеотидами.

#### 7) Векторы

Согласно другому аспекту транскрипты (включающие в себя антисмысловые и смысловые последовательности) согласно настоящему изобретению экспрессируются с единиц транскрипции, вставленных в ДНК или РНК векторы (смотрите, например, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22114 и Conrad, патент США №6054299). Эти последовательности могут быть введены в виде линейного конструкта, круговой плазмиды или вирусного вектора, включая в себя основанные на бактериофагах векторы, которые могут быть включены и унаследованы в качестве трангена, интегрированного в геном хозяина. Транскрипт также может быть построен для обеспечения того, чтобы быть унаследованным как внехромосомная плазида (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

Последовательности транскриптов могут быть транскрибированы с помощью промотора, расположенного на плазмиде экспрессии. Согласно одному варианту осуществления цис-репрессорная и репортерная последовательности экспрессируются в виде инвертированного повтора, соединенного линкерной полинуклеотидной последовательностью, так что транскрипт содержит структуру стебля и петли.

Рекомбинантные экспрессирующие векторы могут быть использованы для экспрессии транскриптов согласно настоящему изобретению. Рекомбинантные экспрессирующие векторы, как правило, представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Вирусные векторы, экспрессирующие транскрипты, могут быть построены на основании, но без ограничения, аденоассоциированного вируса (для обзора смотрите Muzyczka, et al., Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129)); аденовируса (смотрите, например, Berkner, et al., BioTechniques (1998) 6:616), Rosenfeld et al. (1991, Science 252:431-434) и Rosenfeld et al. (1992), Cell 68:143-155)) или альфавируса, а также других известных в настоящей области техники. Ретровирусы были использованы для введения различных генов в различные типы клеток, включающие в себя эпителиальные клетки, *in vitro* и/или *in vivo* (смотрите, например, Egltis, et al, Science (1985) 230:1395-1398; Danos and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464; Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:61416145; Huber

et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., 1991, Science 254:1802-1805; van Beusechem. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-19; Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150: 4104-4115; патент США №4868116; патент США №4980286; заявку согласно PCT WO 89/07136; заявку согласно PCT WO 89/02468; заявку согласно PCT WO 89/05345 к заявке согласно PCT WO 92/07573). Рекомбинантные ретровирусные векторы, способные к трансдукции и экспрессии генов, вставленных в геном клетки, могут быть получены путем трансфекции рекомбинантного ретровирусного генома в соответствующим образом упакованные клеточные линии, такие как PA317 и Psi-CRIP (Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349). Рекомбинантные аденовирусные векторы могут быть использованы для инфицирования широкого спектра клеток и тканей у восприимчивых хозяев (например, крыса, хомяк, собака и шимпанзе) (Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769), а также они характеризуются тем преимуществом, что не требуют митотически активных клеток для инфекции.

Может быть использован любой вирусный вектор, способный принимать кодирующие последовательности для транскрипта(ов), которые будут экспрессироваться, например, векторы, полученные из аденовируса (AV); аденоассоциированного вируса (AAV); ретровирусов (например, лентивирусов (LV), рабдовирусов, вируса мышинного лейкоза); вируса герпеса и т.п. Тропизм вирусных векторов может быть модифицирован с помощью псевдотипирования векторов с белками оболочки или другими поверхностными антигенами от других вирусов, или путем замены различных белков капсида вируса, в случае необходимости.

Например, представленные в настоящем изобретении лентивирусные векторы могут быть псевдотипированы с поверхностными белками из вируса везикулярного стоматита (VSV), бешенства, лихорадки Эбола, Мокола и т.п. Представленные в настоящем изобретении AAV векторы могут быть сделаны для нацеленного воздействия на различные клетки путем конструирования векторов для экспрессии различных серотипов капсидных белков. Способы конструирования AAV векторов, которые экспрессируют различные серотипы капсидных белков, известны специалистам в настоящей области техники; смотрите, например, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801, полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Выбор рекомбинантных вирусных векторов, пригодных для использования в настоящем изобретении, способы вставки последовательностей нуклеиновых кислот для экспрессии транскриптов в вектор и способы доставки вирусного вектора в представляющие интерес клетки известны специалистам в настоящей области техники. Смотрите, например, Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30 и Robinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406, полное описание которых приведено в настоящем документе посредством ссылки.

Вирусные векторы могут быть получены из AV и AAV. Подходящий AV вектор для экспрессии транскриптов, приведенный в настоящем изобретении, способ построения рекомбинантного вектора AV, а также способ доставки вектора в клетки-мишени, описан в Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010. Подходящие векторы AAV для экспрессии транскриптов, показанных в настоящем изобретении, способы построения рекомбинантного вектора AV и способы доставки векторов в клетки-мишени описаны в Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70: 520-532;

Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; патенте США №5252479; патенте США №5139941; международной патентной заявке № WO 94/13788 и международной патентной заявке № WO 93/24641, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

5 Промотор, запускающий экспрессию транскриптов либо в ДНК плазмиды, либо в вирусном векторе, представленный в настоящем изобретении, может представлять собой эукариотическую РНК-полимеразу I (например, рибосомальный РНК промотор), РНК-полимеразу II (например, ранний промотор ЦМВ или промотор актина или промотор мяРНК U1) или вообще промотор РНК-полимеразу III (например, промотор мяРНК U6 или 7SK РНК) или прокариотической промотор, например, промотор T7, включающий, что экспрессия плазмиды также кодирует РНК-полимеразу T7, 10 необходимую для транскрипции с промотора T7. Промотор может также направлять экспрессию трансгена в поджелудочную железу (смотрите, например, регуляторную последовательность инсулина для поджелудочной железы (Bucchini et al, 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515)). 15

Кроме того, экспрессия транскрипта может точно регулироваться, например, с использованием индуцируемой регуляторной последовательности и систем экспрессии, таких как регуляторная последовательность, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням циркулирующей глюкозы или 20 гормонам (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Такие индуцируемые системы экспрессии, пригодные для контроля экспрессии трансгена в клетках или в млекопитающих, включают в себя регулирование с помощью экдизона, с помощью эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в настоящей области 25 техники сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность на основании предполагаемого использования трансгена дцРНК.

Как правило, рекомбинантные векторы, способные экспрессировать молекулы транскриптов, доставляются, как описано ниже, и сохраняются в клетках-мишенях. Кроме того, могут быть использованы вирусные векторы, которые обеспечивают 30 временную экспрессию молекул транскрипта. Такие векторы могут быть введены повторно по мере необходимости. После экспрессии транскрипт связывается с РНК-мишенью и модулирует свою функцию или экспрессию. Доставка экспрессирующих транскрипт векторов может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени эксплантировано от 35 пациента с последующей реинтродукцией в пациента, или любыми другими средствами, которые позволяют введение в желаемую клетку-мишень.

Экспрессирующие транскрипты ДНК плазмиды, как правило, трансфицируют в клетки-мишени в виде комплекса с катионными липидными носителями (например, Oligofectamine) или не катионными основанными на липидах носителями (например, 40 Transit-ТКО™). Множественные липидные трансфекции для опосредованных дцРНК нокдаунов, нацелено воздействующие на различные области единственного гена PROC или нескольких генов PROC в течение недели или более, также рассматриваются в соответствии с настоящим изобретением. Успешное внедрение векторов в клетки-хозяева можно контролировать с использованием различных известных способов. Например, 45 временная трансфекция может быть сигнальной с репортером, таким как флуоресцентный маркер, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток ex vivo может быть обеспечена с использованием маркеров, которые обеспечивают трансфицированную клетку с резистентностью к конкретным факторам



окружающей среды (например, антибиотикам и лекарствам), например, резистентностью к гигромицину В.

Доставка вектора, содержащего рекомбинантную ДНК, может быть выполнена с помощью небиологических или биологических систем. Включая в себя без ограничения липосомы, вирусоподобные частицы, полученные из фагов или вирусов трансдукторные частицы и конъюгацию.

#### 8) Репортеры для анализа транскриптов

Согласно некоторым вариантам осуществления конструкт нуклеиновой кислоты содержит репортерную последовательность (например, последовательность репортерного гена). Репортерный ген кодирует репортерную молекулу, которая вырабатывает сигнал при экспрессии в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула может представлять собой обнаруживаемый или селективный маркер. Согласно некоторым вариантам осуществления репортерная молекула может представлять собой флуоресцентную репортерную молекулу, такую как зеленый флуоресцентный белок (GFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), синий флуоресцентный белок (BFP) или красный флуоресцентный белок (RFP). Согласно другим вариантам осуществления репортерная молекула может представлять собой хемилюминесцентный белок.

Репортерные молекулы могут представлять собой бактериальную люциферазу, эукариотическую люциферазу, флуоресцентный белок, фермент, подходящий для колориметрического обнаружения, белок, подходящий для иммунологического обнаружения, пептид, подходящий для иммунологического обнаружения, или нуклеиновую кислоту, которая функционирует в качестве аптамера или которая проявляет ферментативную активность.

Селективные маркеры также могут быть использованы в качестве репортера. Селективный маркер может представлять собой ген устойчивости к антибиотику, например.

#### 9) Клетки и гены-мишени для анализа репортерных транскриптов

Примеры клеток, которые могут быть использованы для обнаружения, включают в себя грамположительные и грамотрицательные бактерии, такие как *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и т.д., грибы, такие как *Streptomyces coelicolor*, и другие эукариотические клетки, включающие в себя клетки от человека, других млекопитающих, насекомых, беспозвоночных или растений.

Транскрипты-мишени могут включать в себя любой эндогенный транскрипт, как кодирующий, так и не кодирующий. Транскрипты-мишени могут быть получены из эукариотических и прокариотических клеток, включающих в себя, например, транскрипт *tesA* в клетках *S. aureus* (указывающий на MRSA), транскрипт *tcdB* в *C. difficile* (указывающий на токсигенный *C. diff*) и транскрипты HPV E6/E7 в эпителиальных клетках шейки матки (указывающие на злокачественную опухоль шейки матки). Гены, связанные с инфекционными патогенами, такими как вирусы, могут также представлять собой мишени, включая в себя ВИЧ, HPV и т.д. Другие примеры генов-мишеней включают в себя не кодирующую РНК, такую как транспортная РНК (тРНК) и рибосомальная РНК (рРНК), а также такие РНК, как мнРНК, микроРНК, миРНК, мяРНК, экзосомальные РНК и riРНК и не кодируемые РНК.

#### ПРИМЕРЫ

Ниже приведены примеры определенных вариантов осуществления для выполнения настоящего изобретения. Примеры предлагаются только в целях иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Были

приложены усилия для того, чтобы гарантировать точность в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но некоторая экспериментальная ошибка и отклонение, конечно же, должна приниматься во внимание.

В практическом осуществлении настоящего изобретения применяют, если не указано иначе, общепринятые среди специалистов в данной области способы белковой химии, биохимии, способы рекомбинантной ДНК и фармакологии. Такие методики полностью описаны в литературе. Смотри, например, Т.Е. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3<sup>rd</sup> Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)

Пример 1: система упаковки с молчащей мутацией/комплементацией

Ниже представлен пример разработки и конструирования системы упаковки на основе молчащей мутации/комплементации для получения нерепликативных частиц для трансдукции.

Материалы, используемые для разработки системы упаковки, перечислены ниже:

Бактериальные штаммы:

N1706, лизоген *E. coli* K-12 P1 c1-100 Tn9

Векторы:

Y14439 (основная цепь pBHR1)

Следующие ниже инвентарные номера Genbank (N.B., последовательности, обозначенные инвентарным номером, представляют собой последовательности, приведенные в базе данных на момент приоритетной даты данной заявки) или SEQ ID №№ можно использовать для основной цепи вектора и кассетных последовательностей:

- X06758 (гены бактериальной люциферазы luxAB)

- SEQ ID №1 (нативный рас-сайт P1)

- SEQ ID №3 (литический репликон P1, содержащий контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловую последовательность к промотору P53, гены *repL* и делецию гена *kilA* внутри рамки считывания)

- SEQ ID №4 (промотор Pblast, запускающий экспрессию luxAB)

Конструирование мутированного штамма N1706(рас): расA: иллюстративная последовательность мутированной последовательности расA показана в SEQ ID №2, приведенной в неформальном списке последовательностей ниже. Мутацию можно провести, конструируя мутированную последовательность посредством синтеза гена и затем заменяя нативную последовательность в N1706 на мутированную последовательность посредством подхода аллельной замены.

Конструирование репортерного вектора GWP10001: вектор GWP10001 содержит участок начала репликации pBHR1, проявляющего широкую грамотрицательную активность, два селективных маркера для канамицина и хлорамфеникола, нативную последовательность рас-сайта бактериофага P1, гены *luxA* и *luxB*, которые происходят из *Vibrio harveyi*, функционально связанные с конститутивным промотором бластициллина (Pblast), и литический репликон P1, содержащий контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловую последовательность к промотору P53, гены *repL* и делецию гена *kilA* внутри рамки считывания.

На фигуре 2 показан полученный вектор (GWP10001, SEQ ID №11), который можно сконструировать множеством способов, которые известны специалисту в данной

области, включая получение кассет при помощи ПЦР из их нативных источников или при помощи синтеза гена и сборки вектора при помощи традиционного клонирования на основе рестриктазы или альтернативных методик, таких как сборка по Гибсону.

Система упаковки с молчащей мутацией/комплементацией: Система упаковки включает в себя мутантный по *расА* штамм N1706(*рас*), дополненный вектором pGWP10001. Как известно специалисту в данной области, способ конструирования данной системы можно осуществить трансформацией N1706(*рас*) вектором pGWP10001. Вектор pGWP10001 может поддерживаться в культурах трансформированного N1706(*рас*) посредством выращивания трансформанта в присутствии 50 мкг/мл канамицина.

Получение частиц для трансдукции, несущих плазмидную ДНК: Нерепликативные частицы трансдукции, несущие вектор pGWP10001, можно получить из трансформантов N1706(*рас*) посредством термической индукции при 42°C. Инкубация при 42°C приводит к индукции литического цикла P1, при котором профаг исключается из генома N1706, приводит к получению структурных элементов фага и упаковке конкатемерной ДНК pGWP10001, образуемых литическим репликоном в фаговых частицах потомства, как изображено на фигуре 1. Полученный клеточный лизат затем собирают, и он содержит нерепликативные частицы для трансдукции, каждая из которых состоит из частиц бактериофага P1, несущих линейный конкатемер ДНК pGWP10001.

Пример 2: система упаковки с делецией/комплементацией

Ниже представлен пример разработки и конструирования системы упаковки на основе делеции/комплементации для получения нерепликативных частиц для трансдукции.

Материалы, используемые для разработки системы упаковки, перечислены ниже:

Бактериальные штаммы:

RN4220 представляет собой штамм *S. aureus* с нарушенной рестрикцией, который является нелизогенным производным NCTC 8325 и является эффективным реципиентом для ДНК *E. coli*. Он был впервые описан у Kreiswirth, B.N. et al., The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 1983. 305(5936): p. 709-712.

RN10616 получают при лизогенизации RN4220 бактериофагом  $\phi 80\alpha$ . Ubeda, C. et al., Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 2009. 72(1): p. 98-108.

ST24 получают при делеции гена малой субъединицы терминазы *terS* из лизогенизированного бактериофага  $\phi 80\alpha$  в RN10616. Ubeda, C. et al., Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 2009. 72(1): p. 98-108.

Векторы:

Примеры плазмид, которые можно использовать в качестве исходных плазмид для кассет в некоторых вариантах осуществления по изобретению, описаны в публикации Charpentier, E., et al., Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(10): p. 6076-6085.

Следующие ниже инвентарные номера в Genbank можно использовать для кассетных последовательностей:

- SEQ ID №5 (первоисточник плазмиды pT181 *S. aureus* или вариант по числу копий репликации pT181 *cop-623 repC*)

- M21136 (*tetA(M)*)

- SEQ ID №12 (последовательность промотора *P<sub>clpB</sub>*)

- SEQ ID №9 (последовательность гена малой субъединицы терминазы (*terS*)  $\phi 11$ )

- L09137 (amp ColE1 ori)
- X06758 (luxAB)
- M62650 (терминация транскрипции)

Делеция *terS*: Конструирование штамма с выключением гена *terS* ST24 можно выполнить при помощи основанной на аллельной замене стратегии, приводящей к получению делеции в рамке считывания, удаляющей большую часть кодирующей последовательности гена малой субъединицы терминазы ф80α. Детали данной стратегии описаны в публикации Ubeda, C. et al., Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 2009. 72 (1): p. 98-108.

Иллюстративная последовательность штамма с выключением гена *terS* показана в SEQ ID №13, (показана в списке последовательностей ниже). SEQ ID №13 представляет собой локусы геномной последовательности RN10616, демонстрирующие делецию *terS* и комплементацию ф80α.

Конструирование вектора: Вектор GW80A0001 представляет собой челночный вектор *E. coli*/*S. aureus*. Вектор содержит участки начала репликации *S. aureus* (pT181cop-623 *repC*) и *E. coli* (ColE1ori), селективные маркеры по устойчивости к ампициллину (amp) и тетрациклину (tet(M)) для селекции *E. coli* и *S. aureus*, соответственно, последовательность гена малой субъединицы терминазы (*terS*) ф11, которая включает в себя свой собственный промотор, гены *luxA* и *luxB*, которые происходят из *Vibrio harveyi*, функционально связанные с конститутивным промотором *P<sub>clpB</sub>* *S. aureus*, и последовательность терминации транскрипции (TT).

На 4 фигуре показан полученный в результате вектор (pGW80A0001, SEQ ID №14), который можно конструировать множеством способов, которые известны специалистам в данной области. В одном примере кассету tet(M) и гены *luxAB* можно получать при амплификации ПЦР из общедоступных векторов pCN36 и pCN58 (Charpentier, E., et al.). *P<sub>clpB</sub>* можно получать при амплификации ПЦР из RN4220S. *aureus* и *terS* можно получать при амплификации ПЦР из RN10616. Основную цепь вектора можно получать, удаляя ген *ermC* общедоступного вектора pCN48 (Charpentier, E., et al.), и различные компоненты готового вектора pGW80A0001 можно собирать в данную основную цепь вектора посредством соответствующим образом разработанного клонирования на основе рестриктазы.

Система упаковки с делецией/комплементацией: Система упаковки может включать в себя штамм с выключением гена *terS* ST24, дополненный вектором pGW80A0001, чтобы получить штамм GW24. Как известно специалисту в данной области, способ конструирования данной системы можно осуществить посредством трансформации ST24 вектором pGW80A0001. Вектор pGW80A0001 может сохраняться в культурах трансформированного ST24 посредством выращивания трансформанта в присутствии 5 мкг/мл тетрациклина.

Получение частиц для трансдукции, несущих плазмидную ДНК: Нерепликативные частицы для трансдукции, несущие вектор pGW80A0001, можно получить из GW24 посредством способа индукции митомицином C, который был впервые продемонстрирован в *E. coli* и в настоящее время является стандартной методикой для получения профагов из лизогенизированных бактерий. Otsuji, N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. 184(4692): p. 1079-1080. Данный способ индукции профага приводит к индукции литического цикла ф80α, в котором профаг исключается из генома GW24, , получению структурных элементов фага и упаковки конкатемерной ДНК pGW80A0001 в фаговых частицах

потомства, как изображено на фигуре 2. Полученный клеточный лизат затем собирают, и он содержит нерепликативные частицы для трандукции, каждая из которых содержит частицы бактериофага  $\phi 80\alpha$ , несущие линейный конкатемер ДНК pGW80A0001.

Пример 3: система упаковки на основе SaPI<sub>bov2</sub>, лишенной интегразы

Ниже представлен пример разработки и конструирования системы упаковки на основе SaPI<sub>bov2</sub> для получения нерепликативных частиц для трандукции.

Материалы, используемые для разработки системы упаковки, перечислены ниже:

Следующие ниже материалы можно использовать для разработки системы упаковки на основе SaPI<sub>bov2</sub>, лишенной интегразы.

Бактериальные штаммы:

RN451 представляет собой штамм *S. aureus*, лизогенизированный бактериофагом  $\phi 11$ .

JP2131 представляет собой RN451, который был лизогенизирован SaPI<sub>bov2</sub>. Смотри Maiques, E. et al., Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. J. Bacteriol., 2007. 189(15): p. 5608-5616.

JP2488 представляет собой штамм JP2131, в котором ген *int* был удален из SaPI<sub>bov2</sub> (SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int*). Maiques, E. et al., Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. J. Bacteriol., 2007. 189(15): p. 5608-5616.

Бактериофаг:

Бактериофаг  $\phi 11$  можно получить из штамма RN0451 *S. aureus* посредством способа индукции митомицином C, который был впервые описан в *E. coli* и в настоящее время является стандартной методикой для получения профагов из лизогенизированных бактерий. Otsuji, N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080.

Промоторы:

P<sub>clpB</sub> можно использовать в качестве промотора в данном примере. Промотор гена *clpB* представляет собой конститутивный промотор, используемый для контроля экспрессии гена *int*. Последовательность промотора гена *clpB* (P<sub>clpB</sub>) *S. aureus* была впервые описана в 2004. Frees, D., et al., Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology, 2004. 54(5): p. 1445-1462. Ее также впервые применили для контроля экспрессии гена в плазмиде в 2004. rnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille, New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 2004. 70(11): p. 6887-6891. Промотор можно получать из RN4220 *S. Aureus*, применяя праймеры, описанные в 2004. Id.

Получение совместного лизогена  $\phi 11$ /SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int* (RN451( $\phi 11$  SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int*)): Штамм JP2488( $\phi 11$  SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int*) можно получать при лизогенизации JP2488 бактериофагом  $\phi 11$ .

Деления *terS*  $\phi 11$  (RN451( $\phi 11\Delta$ *terS* SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int*)): Штамм RN451( $\phi 11\Delta$ *terS* SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int*) можно получить делецией гена *terS*  $\phi 11$  из RN451( $\phi 11$  SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int*), как описано в публикации Tormo, M.A. et al., *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island DNA Is Packaged in Particles Composed of Phage Proteins. J. Bacteriol., 2008. 190(7): p. 2434-2440.

Встраивание P<sub>clpB</sub>-*int* в геном *S. aureus* (RN451( $\phi 11\Delta$ *terS* SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int* P<sub>clpB</sub>-*int*)): RN451( $\phi 11\Delta$ *terS* SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int* P<sub>clpB</sub>-*int*) можно получить при помощи первоначального слияния P<sub>clpB</sub> и *int* посредством стандартных методик молекулярной биологии, затем вводя продукт слияния P<sub>clpB</sub>-*int* в геном RN451( $\phi 11\Delta$ *terS* SaPI<sub>bov2</sub> $\Delta$ *int*) и затем, отбирая клоны, которые обладают P<sub>clpB</sub>-*int*, встроенным за пределами участков  $\phi 11$  и SaPI<sub>bov2</sub>.

Получение частиц  $\phi 11$ , несущих только конкатемеры SaPI<sub>bov</sub>2 $\Delta$ int P<sub>clpB</sub>-int: частицы  $\phi 11$ , несущие только конкатемеры SaPI<sub>bov</sub>2 $\Delta$ int P<sub>clpB</sub>-int, можно получить при помощи индукции митомицином C RN451( $\phi 11\Delta$ terS SaPI<sub>bov</sub>2 $\Delta$ int P<sub>clpB</sub>-int), как описано у Otsuji, N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080. Клеточный лизат содержит нерепликативные частицы для трандукции, каждая из которых содержит структурные белки бактериофага  $\phi 11$ , несущие линейный конкатемер происходящей из GI ДНК.

Специалист в данной области поймет, как конструировать NRTP по изобретению, используя указанные выше материалы и хорошо известные методики молекулярной биологии и генетические методики в данной области.

Пример 4: частицы для трандукции репортера в отношении SarS на основе terS делеции/комплементации

Ниже представлен пример репортерной системы по SarS на основе репортера-индуктора, которая использует нерепликативную частицу для трандукции на основе terS делеции/комплементации.

Репортерный ген: Бактериальная люцифераза (luxAB). Гены luxA и luxB происходят из Vibrio harveyi. У них отсутствует транскрипционный промотор и каждый из них содержит свой собственный участок связывания рибосомы.

Промотор гена Spa (P<sub>spa</sub>): Промотор гена spa будет использоваться для контроля экспрессии генов luxAB.

Конструирование слитого P<sub>spa</sub>-luxAB: Гены luxAB можно подвергать слиянию с последовательностью промотора P<sub>spa</sub>, таким образом, что гены luxAB функционально связаны с промотором P<sub>spa</sub>.

Конструирование репортерного вектора, экспрессирующего luxAB

Экспрессирующий luxAB репортерный вектор можно конструировать при помощи стандартных молекулярно-биологических методик, встраивая продукт слияния P<sub>spa</sub>-luxAB в MCS челночного вектора, изображенного ниже.



Челночный вектор E. coli/S. Aureu, который несет участки начала репликации S. aureus (pT181cop-623 repC) и E. coli (ColE1ori), гены устойчивости к ампициллину (amp) и тетрациклину (tet(M)), ген малой субъединицы терминазы (terS)  $\phi 11$  под контролем конститутивного промотора (P<sub>clpB</sub>), участок множественного клонирования (MCS) и последовательность терминации транскрипции (TT).

Инвентарные номера Genbank для кассетных последовательностей:

J01764 (репликоны pT181)

M21136 (tetA(M))

Инвентарный номер пока не доступен (P<sub>clpB</sub>)

AF424781 УЧАСТОК: 16526...16966 (terS)

L09137(amp ColE1 ori)

M62650 (TT)

Репродукцию вектора для проведения манипуляций in vitro и для верификации манипуляций можно осуществить при помощи E. coli Top 10 и готовый модифицированный вектор можно затем вводить в RN0451 $\Delta$ terS S. aureus. Частицы для трандукции, несущие челночный вектор, можно получить из трансформантов RN0451 $\Delta$ terS посредством способа индукции митомицином C, который был впервые

описан в *E. coli* в 1959 г. и в настоящее время представляет собой стандартную методику для получения профагов из лизогенизированных бактерий. Otsuji, N., et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. 184 (4692): p. 1079-1080. Затем собирают клеточный лизат, и он содержит нерепликативные частицы для трандукции, каждая из которых содержит структурные белки бактериофага  $\phi 11$ , несущие линейный конкатемер плазмидной ДНК, способной выступать в качестве репортерной молекулы в присутствии *SarS* в целевых клетках *S. aureus*.

Пример 5: частицы для трандукции репортера  $\beta$ -лактамазы на основе *terS* делеции/комплементации

Ниже следует пример репортерной системы по  $\beta$ -лактамазе на основе репортера внутриклеточного фермента, которая использует нерепликативную частицу для трандукции на основе *terS* делеции/комплементации.

Репортерный ген: люцифераза *Renilla* (*luc*)

Промотор: Промотор может представлять собой  $P_{blaZ}$ . Конститутивный промотор бета-лактамазы можно использовать для запуска экспрессии гена *luc*.

Внутриклеточный субстрат: внутриклеточный коэлектрантин-фосфат как описано в Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007, Zymera, Inc.

Конструирование слитого продукта  $P_{blaZ}$ -*luc*: Гены *luc* можно подвергнуть слиянию с последовательностью промотора  $P_{blaZ}$ , так, чтобы гены *luc* были функционально связаны с промотором  $P_{blaZ}$ .

Конструирование экспрессирующего *luc* репортерного вектора: экспрессирующий *luc* репортерный вектор можно конструировать при помощи стандартных молекулярно-биологических методик, встраивая продукт слияния  $P_{blaZ}$ -*luc* в MCS челночного вектора, изображенного выше в разделе V, A, 3), i).

Репродукцию вектора для проведения манипуляций *in vitro* и для верификации манипуляций можно осуществить при помощи *E. coli* Top 10 и готовый модифицированный вектор можно затем вводить в RN0451 $\Delta$ *terS* *S. aureus*. Частицы для трандукции, несущие челночный вектор, можно получить из трансформантов RN0451 $\Delta$ *terS* посредством способа индукции митомицином C, который был впервые описан в *E. coli* в 1959 г. и в настоящее время представляет собой стандартную методику для получения профагов из лизогенизированных бактерий. Otsuji, N., et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. 184 (4692): p. 1079-1080. Затем собирают клеточный лизат, и он содержит NRTP, каждая из которых содержит структурные белки бактериофага  $\phi 11$ , несущие линейный конкатемер плазмидной ДНК, способной экспрессировать люциферазу *Renilla* в жизнеспособных клетках *S. aureus* в пределах круга хозяев  $\phi 11$ .

Пример 6: частицы для трандукции репортера внутриклеточной молекулы на основе *terS* делеции/комплементации

Ниже следует пример репортерной системы на основе репортера внутриклеточной молекулы, которая использует нерепликативную частицу для трандукции на основе *terS* делеции/комплементации.

Промотор: Промотор может представлять собой  $P_{blaZ}$ . Конститутивный промотор бета-лактамазы можно использовать для запуска экспрессии гена *luc*.

Переключаемый аптамер: Переключаемые аптамеры можно разрабатывать и конструировать, как описано в Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for *in vivo* and *in vitro* use, 2010, Cornell University.

Флуорофорный субстрат: Соответствующие флуорофорные субстраты в сочетании

с указанными выше переключаемыми аптамерами можно разрабатывать и конструировать, как описано в Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University.

Конструирование слитого продукта  $P_{blaZ}$ -SA: Ген SA можно подвергнуть слиянию с последовательностью промотора  $P_{blaZ}$ , таким образом, чтобы ген SA был функционально связан с промотором  $P_{blaZ}$ .

Конструирование экспрессирующего SA репортерного вектора: Экспрессирующий SA репортерный вектор можно конструировать при помощи стандартных молекулярно-биологических методик, встраивая продукт слияния  $P_{blaZ}$ -SA в MCS челночного вектора, указанного выше в примере 4. Репродукцию вектора для проведения манипуляций in vitro и для верификации манипуляций можно осуществить при помощи E. coli Top 10 и готовый модифицированный вектор можно затем вводить в RN0451 $\Delta$ terS S. aureus.

Частицы для трансдукции, несущие челночный вектор, можно получить из трансформантов RN0451 $\Delta$ terS посредством способа индукции митомицином C, который был впервые описан в E. coli в 1959 г. и в настоящее время представляет собой стандартную методику для получения профагов из лизогенизированных бактерий. Otsuji, N., et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080. Клеточный лизат затем собирают, и он содержит нерепликативные частицы для трансдукции, каждая из которых содержит структурные белки бактериофага  $\phi 11$ , несущие линейный конкатемер плазмидной ДНК, способной экспрессировать SA в жизнеспособных клетках S. aureus в пределах круга хозяев  $\phi 11$ .

Пример 7: репортерная система на основе нерепликативной частицы для трансдукции. Нерепликативные частицы для трансдукции, описываемые выше, можно использовать в репортерной системе для определения наличия жизнеспособных бактерий посредством экспрессии репортерной молекулы (например, luxAB). Когда данная частица для трансдукции вводит репортерный вектор (например, pGW80A0001) в клетку в пределах круга хозяев частицы для трансдукции, клетки, в которых промотор (например,  $P_{clpB}$ ) распознается транскрипционным аппаратом клеток, способны запускать экспрессию репортерной молекулы в клетке.

Для проверки функционального состояния нерепликативных частиц для трансдукции в качестве репортеров для определения наличия клеток S. aureus, разработаны различные анализы репортерного гена MSSA/MRSA. В варианте осуществления нерепликативную частицу для трансдукции создавали из специфичного для S. aureus бактериофага, и встраивали гены бактериальной люциферазы luxAB под контролем конститутивного промотора. Когда нерепликативная частица для трансдукции доставляла репортерную нуклеиновую кислоту в S. aureus, конститутивный промотор запускал экспрессию luxAB, подходящих для репортирования о наличии жизнеспособных S. aureus.

Кроме того, антибиотик цефокситин добавляли до, одновременно или после добавления частиц для трансдукции в образец, содержащий клетки S. aureus. Если клетки не были фенотипически резистентны к цефокситину (то есть, не являлись MRSA), люминесценция снижалась или исчезала, указывая на то, что клетки являлись MSSA. Тем не менее, если клетки фенотипически были резистентны к цефокситину (то есть, являлись MRSA), наблюдали увеличение люминесценции или детектируемый уровень люминесценции, указывающие на то, что клетки являлись MRSA.

Анализ функционирования гена-репортера жизнеспособных клеток на основе нерепликативной частицы для трансдукции



Анализировали функционирование нерепликативной частицы для трансдукции в качестве репортера. Круг хозяев для трансдукции нерепликативной частицы для трансдукции на основе бактериофага ф80α проверяли в 101 клиническом изоляте MRSA. Анализ трансдукции проводили, подвергая культуры каждого бактериального изолята, выращенного в модифицированном TSB, действию клеточного лизата GW24, содержащего нерепликативные частицы для трансдукции, и культивируя смесь на твердых средах, содержащих тетрациклин.

В данном примере нерепликативная частица для трансдукции несла селективируемый маркер по тетрациклину. Клетки, трансдуцированные нерепликативными частицами для трансдукции, как ожидали, были устойчивы к тетрациклину. Кроме того, трансдукцию проверяли при помощи люминесцентного анализа, подвергая каждый бактериальный изолят в жидкой культуре действию клеточного лизата, содержащего нерепликативные частицы для трансдукции и оценивая смеси в отношении люминесцентной активности бактериальной люциферазы после инкубационного периода.

Анализ трансдукции показал, что нерепликативная частица для трансдукции на основе ф80α была способна трансдуцировать все из 101 клинического изолята MRSA и ни одного из стафилококков, не являющихся *S. aureus*.

На фигуре 21 показаны результаты анализа трансдукции, в котором 36 тетрациклин-чувствительных MRSA подвергали действию частиц для трансдукции, несущих рGW80A0001, и затем наносили на планшеты со средой, содержащей 5 мкг/мл тетрациклина. Результаты показали, что все 36 штаммов MRSA росли на среде, содержащей тетрациклин вследствие трансдукции рGW80A0001. Контрольные эксперименты, в которых изоляты MRSA наносили на содержащие тетрациклин среды, не подвергая действию частиц для трансдукции, не показали никакого роста (не показано). Кроме того, выделение плазмиды из трансдуцированных штаммов MRSA демонстрировало восстановление плазмиды рGW80A0001, как подтверждалось при секвенировании выделенной плазмиды. Результаты трансдукции, таким образом, демонстрировали, что участок начала репликации репортерной плазмиды проявлял активность во всех проверяемых изолятах MRSA.

На фигуре 22 иллюстрируется люминесценция, измеренная в 80 клинических изолятах MRSA и 28 клинических изолятах метициллин-чувствительного *S. aureus* (MSSA), трансдуцированных частицей для трансдукции. В эксперименте культуры MRSA и MSSA растили до оптической плотности 0,1 при 600 нм, и затем 100 мкл культур, выращенных в модифицированном TSB, смешивали с 10 мкл клеточного лизата GW24, содержащего частицы для трансдукции, и дополнительно инкубировали при 37°C на протяжении 4 часов до проведения анализа люминесценции. Измерения люминесценции проводили, добавляя 10 мкл 1 мМ раствора деканала, альдегида, который запускает люминесцентную реакцию в клетках, экспрессирующих бактериальную люциферазу. Как ожидалось, люминесценцию наблюдали как в MRSA, так и в MSSA, трансдуцированных специфичной для *S. aureus* нерепликативной частицей для трансдукции. Кроме того, когда цефокситин добавляли в клеточные культуры в то же самое время, когда добавляли частицы для трансдукции, люминесценцию наблюдали в MRSA, но не в MSSA, таким образом, демонстрируя способность частиц для трансдукции быть репортерами как на присутствие MSSA, так и MRSA. Результаты люминесценции, таким образом, демонстрируют, что промотор, запускающий экспрессию luxAB, проявляет активность во всех проверяемых изолятах *S. aureus*.

Оптимизация анализа MRSA по репортеру жизнеспособности клеток на основе нерепликативной частицы для трансдукции - препарат реагента частицы для трансдукции

Получение и создание препарата реагента нерепликативной частицы для трансдукции оптимизировали для готового препарата. Вкратце, ферментацию в объеме 15 л проводили, используя среды TSB, включая индукцию GW24 пероксидом. Партию для ферментера объемом 15 л инокулировали из 200 мл ночной высеваемой культуры (соотношение инокулята 1,3% (об./об.)). Культуру индуцировали пероксидом водорода при O.D. равной 0,8 и охлаждали до 25°C после индукции без контроля величины pH или DO. Надосадочную жидкость культуры собирали посредством тангенциальной поточной фильтрации (TFF) следующим утром с целью отстаивания фаговых частиц для трансдукции из клеточного дебриса. Вещество затем дополнительно концентрировали и диафильтровали в буфере SM без желатина и хранили при 2-8°C до окончательного стерилизующего фильтрования и хранения.

Подробные сводные данные способа приведены ниже:

Рост в бутылки для высева материала

(1) Инокулировать 200 мл TSB, содержащего 5 мкг/мл тетрациклина с использованием GW24

(2) Инкубировать при 37°C, 200 об/мин в течение 10-18 часов.

Высевание для ферментации (15 л TSB с 5 мкг/мл тетрациклина)

(1) Подготовить модуль ферментера при следующих ниже условиях ферментации: 37°C, перемешивание при 250 об/мин, обдув воздухом при 15 л/мин и обратное давление при 3 фунт/кв. дюйм (избыточное).

(2) Инокулировать ферментер, используя 200 мл ночной высеваемой культуры.

Индукция культуры

(1) Как только OD при 600 нм достигает 0,8 (0,6-0,9), индуцировать культуру с использованием 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(2) Увеличить заданное значение температуры ферментера до 42°C

Условия после индукции и контроль

(1) Как только закончиться 30 минут индукции, установите целевую температуру для ферментера на 25°C

(2) Через один час после охлаждения выключите подачу воздуха к ферментеру и установите перемешивание на ноль

(3) Проверяйте культуру при ферментации с часовым интервалом или чаще по мере необходимости, пока OD при 600 нм не снизится до 0,40 или ниже.

Сбор/очистка

(1) После того, как культура при ферментации достигнет минимума OD<sub>600</sub> менее чем или равного 0,40, возьмите 20 мл асептического образца и добавьте 30 мкл бензоназы в ферментер.

(2) Снова установите перемешивание на 250 об/мин предоставьте возможность перемешиваться в течение 60 минут для инкубации с бензоназой.

(3) Очистите образец EOF с использованием центрифугирования в течение 15 минут при 3000 g.

(4) Пропустите очищенное вещество через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм

Концентрация и замена буфера

(1) Концентрируйте очищенную культуру посредством TFF, 10-кратно используя мембрану с плоским слоем 500 кДа.

(2) Проведите диафильтрование концентрированной культуры при постоянном объеме в обмен на буфер SM Buffer без желатина, применяя мембрану 500 кДа для TFF, используемую для концентрации

### Окончательная фильтрация

(1) Проведите фильтрацию концентрированного материала с замененным буфером через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

(2) Храните готовый отфильтрованный фаговый материал при 2-8°C.

5 Можно использовать различные другие реагенты и препараты, как известно специалистам в данной области, чтобы получить препарат.

Оптимизация анализа MRSA по репортеру жизнеспособности клеток на основе нерепликативной частицы для трансдукции - препарат сред для выращивания

10 Препарат среды для выращивания оптимизировали для анализа по репортеру выживаемости клеток MRSA на основе NRTP. Для того чтобы получить люминесценцию в анализе MRSA на основе NRTP, необходимо сбалансировать среду для роста *Staphylococcus aureus* и она должна содержать достаточную концентрацию катионов и вспомогательных веществ, чтобы способствовать трансдукции NRTP. Среда TSBmod, используемая в анализах до данного исследования по разработке препарата, как  
15 известно, имела проблемы осаждения, которые повлияли на стабильность среды. Для препаратов сред для выращивания требуется стабильность в готовом препарате с заданным показателем 1 год при комнатной температуре.

Способы/процедуры: приготовление клеток для анализа MRSA

20 (1) Десять уникальных штаммов MRSA для анализа выборки и один уникальный штамм из MSSA тестировали в анализе MRSA.

(2) Ночные культуры выращивали в глубоком 96-луночном планшете при разведении 1:50 в TSB из замороженного маточного раствора для однократного использования и инкубировали при 37°C на круговой качалке в течение >15 часов. MRSA/MSSA (8 мкл) в TSB (392 мкл)

25 (3) На следующий день выращивали дневную культуру при разведении ночной культуры в соотношении 1:50 в 96-луночном планшете с глубокими лунками (392 мкл TSB+8 мкл клеток) и инкубировали при 37°C на круговой качалке в течение 4 часов.

(4) Клетки центрифугировали в центрифуге в течение 5 минут при мощности 1800 g и 10°C, отработанные среды отбирали аспирацией, не разрушая осадка.

30 (5) Центрифугированные клетки промывали в 50 mM Tris-HCl pH 7,2, центрифугировали, отбирали аспирацией буфер, не разрушая осадка и ресуспендировали в 400 мкл RPMI. RPMI использовали для того, чтобы уменьшить вариабельность метаболического состояния клеток и имитировать низкий уровень метаболизма, как обнаружено в клинических образцах.

35 (6) Планшеты закрывали пленкой с микропорами и инкубировали на платформе в течение 48 ч.

(7) OD считывали, перенося 200 мкл культуры в RPMI в мелколуночный планшет для определения OD и контрольную лунку только со средой RPMI использовали для вычитания OD контроля.

40 (8) Клетки нормализовали до OD равной 0,1 в 100 мкл

(9) Другое разведение 1:10 было сделано в RPMI для того, чтобы получить OD равную 0,005

45 Основные среды для анализа готовили для проведения тестирования, как показано в таблице 2, и репрезентативный ряд модификаций сред в препарате для анализа MRSA показан в таблице 3.

**Таблица 2: основные среды для получения препарата сред для выращивания**

Компоненты	TSB	B2	BSS-2	Примечания
Ферментативный продукт переваривания жмыха соевых бобов (г)	3	0	3	Довести величину pH до 7,2 с использованием 10 N NaOH.  Автоклавировать или стерилизовать фильтрацией
Ферментативный продукт переваривания казеина (г)	17	10	10	
Дрожжевой экстракт (г)	N/A	25	25	
Хлорид натрия (г)	5	25	25	
Дикалийфосфат (г)	2,5	1	0	
Альфа-D-глюкоза (г)	2,5	5	5	
Объем (литр)	1	1	1	

**Таблица 3: модификация основных сред для получения препарата сред для выращивания**

Концентрация соли/вспомогательных веществ для модификации							
Основные среды (30 мл)	Номер модификац	CaCl <sub>2</sub> (мМ)	MgCl <sub>2</sub> (мМ)	BGP (мМ)	Tris-HCl pH 7,0 (мМ)	ЭДТА (мМ)	HEPES (мМ)

	III						
B2	M53	5,0	2,0	0,0	50,0	10,0	0,0
BSS-2	M50	10,0	2,0	60,0	50,0	10,0	0,0
BSS-2	M54	6,7	3,3	60,0	50,0	0,0	0,0
BSS-2	M55	5,0	5,0	60,0	50,0	0,0	0,0
BSS-2	M56	6,7	3,3	60,0	0,0	0,0	10,0
BSS-2	M57	5,0	5,0	60,0	0,0	0,0	10,0
TSB	M1 (исходная)	5,0	10,0	60,0	0,0	0,0	0,0
TSB	M58	5,0	10,0	60,0	0,0	11,1	0,0

В каждый препарат сред добавляли NRTP и цефокситин согласно приведенной ниже таблице 4, чтобы приготовить реагент сред с NRTP:

**Таблица 4: комбинация реагента сред для выращивания / частицы для трансдукции в анализе MRSA**

30 мл среды	Конечная концентрация
Цефокситин	5 мкг/мл
Лизат GW24	30X

Анализ MRSA проводили с использованием следующих ниже стадий:

(1) Подготовить к работе аналитический планшет: добавить 198 мкл реагента сред с фагом и 2,0 мкл каждого разведения бактерий при OD равной 0,05 и OD равной 0,005 в RPMI (приблизительно соответствующей 20000 и 2000 КОЕ/мл, соответственно) или 2,0 мкл RPMI в качестве контроля.

(2) Инкубировать аналитический планшет: инкубировать аналитический планшет на круговой качалке при ~100 об/мин в течение 4 часов при 37°C.

(3) Подготовить люминометр (Molecular Devices SpectraMax L): промыть реагентную линию 70% этанолом, после чего DI водой, затем заполнить субстратным реагентом. Настроить программное обеспечение как Fast Kinetic с вводом 50 мкл субстратного реагента при 250 мкл/сек после 10 точек исходной линии и считывать 40 точек каждые 0,25 секунд.

(4) Провести анализ: тестировать планшет с каждым бактериальным разведением после доведения до комнатной температуры в течение 5 минут.

Анализ

(1) Определить пороговое значение, усредняя RLU контроля среди всех повторов и временных точек и добавляя три стандартных отклонения.

(2) Определить максимальную RLU для каждого образца, используя SoftMaxPro.

5 (3) Определить, не является ли максимальная RLU большей, чем пороговое значение RLU, и если так, то данные по образцу использовали для сравнения эффективности сред.

(4) Нормализовать все максимальные величины RLU к максимальной RLU в TSB M1 (среде, применяемой до начала разработки препарата) для анализируемого штамма при определенном разведении.

10 (5) Усреднить нормализованные величины RLU по всем штаммам MRSA для определенных сред и их модификаций

(6) Усреднить средние величины для планшетов с двумя разведениями, в конечном счете, получая одно численное значение, отражающее кратность увеличения эффективности, основанного на RLU, определенных сред среди 10 различных штаммов MRSA в 2 тестируемых клеточных разведениях.

15 Результаты анализа MRSA по репортеру жизнеспособности клеток на основе NRTP

Определение порогового значения RLU: Среднее значение и стандартное отклонение RLU вычисляли для всех временных точек (25) для каждого контрольного повтора (4). Пороговое значение вычисляли для каждого планшета как среднее значение RLU

20 контроля плюс три стандартных отклонения.

Определение относительного улучшения характеристик: максимальные RLU экспортировали из SoftMaxPro для каждого образца (контроли, MSSA и MRSA при всех разведениях) и сравнивали в порогом отсечения RLU. Если для образца имелись 2 точки данных больших, чем пороговое значение для концентрации фага, то для анализа

25 использовали максимальную величину RLU.

Величины нормализовали делением максимальной RLU на максимальную RLU его контрольного состояния (такого как штамм в исходной среде TSB M1, при анализируемом разведении). Полученные соотношения усредняли для 10 MRSA для каждого условия сред и каждого разведения, как показано в таблице 5. Средние значения

30 для двух разведений также показаны в таблице.

35

40

45

**Таблица 5: Результаты анализа MRSA из различных препаратов сред для выращивания**

Среды		Планшет 1	Планшет 2	Среднее значение для обоих разведений
B2	M53	1,89	1,88	1,89
BSS-2	M50	1,37	1,47	1,42
BSS-2	M54	1,50	1,76	1,63
BSS-2	M55	1,82	2,90	2,36
BSS-2	M56	2,38	6,00	4,19
BSS-2	M57	2,00	3,92	2,96
TSB	M1	1,00	1,00	1,00
TSB	M58	1,18	0,96	1,07

#### Заключение

BSS2-M56 показала наилучшую эффективность по среднему значению среди различных исследуемых сред. Среды на основе буфера HEPES работали лучше, чем буферные среды с Tris-HCl. HEPES, как известно, является биологически благоприятной буферной системой в отличие от Tris-HCl. Основанная на B2 основа/бульон обладал лучшей эффективностью, чем бульон на основе TSB.

Различные другие реагенты и препараты можно использовать, как известно специалистам в данной области, чтобы получить препарат. Другие подходящие препараты были разработаны посредством схожих экспериментов, как описано выше. Примеры других подходящих препаратов включены ниже в таблицах 6, 7 и 8.

**Таблица 6: Препарат сред BSC**

Компоненты BSC	Количество
Ферментативный продукт переваривания казеина	14,5 г
Дрожжевой экстракт	35,5 г
Хлорид натрия	35,5 г
альфа-D-глюкоза	7 г
Общий объем	1 л

**Таблица 7: Модификация сред BSC**

BSC-M64	
Химическое название	Конечная концентрация (в анализе)
BGP (мМ)	60,0
HEPES (мМ)	10,0

LiCl (мМ)	84,0
BSC	До 1 л



**Таблица 8: Модификация сред для частиц для трансдукции**

<b><u>Препарат частицы для трансдукции</u></b> <b><u>(PM4)</u></b>	
<b><u>Химические вещества</u></b>	<b><u>Конечная концентрация (при анализе)</u></b>
CaCl <sub>2</sub> (M)	0,00667
MgCl <sub>2</sub> (M)	0,00335
HEPES (M)	0,01000
Маточный раствор лизата GW24	0,01250
Азид натрия (%)	0,0006
Вода	До 1 мл

Оптимизация анализа MRSA по репортеру жизнеспособности клеток на основе нерепликативной частицы для трансдукции - препарат субстратного реагента

Для того чтобы получить люминесценцию в анализе MRSA, субстратный реагент должен включать в себя альдегид в качестве субстрата для люциферазы. Первоначально разработанный препарат алифатического альдегида (4,2 мМ тридеканаль в TSB) не был стабилен, и в нем образовывалась гетерогенная эмульсия, а не раствор. Данный пример в общих чертах обрисовывает разработку препарата субстратного реагента, который решает данные проблемы с заданным показателем стабильности в течение 6

месяцев при комнатной температуре или 2-8°C.

Данный пример описывает стадии, которые предпринимали для разработки реагента субстрата для готового препарата.

#### Способы/процедуры

Все эксперименты скрининга и эксперименты в отношении стабильности проводили, используя «модельную систему», которая состояла из штамма RN4220S. aureus, содержащего экспрессирующую LuxAB плазмиду. Типичные подготовка и способ тестирования представлены ниже.

(1) Ночная культура: 2 мл TSB+1 мкл тетрациклина в концентрации 10 мг/мл+1 колония бактерий модельной системы из планшета с TSA, перемешиваемая при 225 об/мин в течение ночи при 37°C

(2) Дневная культура: разведенная ночная культура в соотношении 1:50 или 1:100 в TSB + 5 мкг/мл тетрациклина, перемешиваемая при 225 об/мин в течение 1,5-2 часов при 37°C.

(3) Нормализовать дневную культуру: измеряли 1 мл дневной культуры на Nanodrop с использованием кюветы при 600 нм, с контролем в виде TSB+5 мкг/мл тетрациклина. Разбавляли до OD равной 0,1 с использованием TSB+5 мкг/мл тетрациклина.

(4) Разбавить культуру для исследования: Разбавляли культуру с OD равной 0,1 с использованием TSB+5 мкг/мл тетрациклина до разведений 1:200, 1:2000 и 1:20000, которые приблизительно соответствуют 100000, 10000 и 1000 КОЕ/мл.

(5) Высеять бактерии: добавляли 200 мкл каждого разведения и контроль (TSB+5 мкг/мл тетрациклина без бактерий) в трех повторах в белый аналитический планшет Greiner Bio-one для каждого субстрата, который было необходимо исследовать.

(6) Подготовить люминометр (SpectraMax L): промыть реагентную линию 70%

этанолом, после чего DI водой, затем заполнить субстратом. Настроить программное обеспечение как Fast Kinetic с вводом 50 мкл субстрата при 250 мкл/сек после 10 точек исходной линии и считывать 40 точек каждые 0,25 секунд.

- 5 (7) Провести анализ: тестировать каждый препарат субстратных реагентов с использованием промывки и наполнения SpectraMax L после каждого субстрата. Довести все субстратные реагенты до комнатной температуры перед исследованием.

Все подтверждающие эксперименты проверяли, используя анализ MRSA для того, чтобы обеспечить схожие результаты в действительном анализе, поскольку модельная система использовалась при скрининге новых препаратов.

- 10 (1) Приготовить культуру: десять низкоэффективных штаммов MRSA и один штамм MSSA выращивали до логарифмической фазы роста в TSB в блоке с глубокими лунками объемом 2 мл. Клетки центрифугировали, промывали 1x PBS, затем ресуспендировали в средах RPMI.

- 15 (2) Нормализовать бактерии: провести измерения 200 мкл культуры в RPMI и контроля RPMI в прозрачном планшете Greiner Bio-one на приборе VersaMax при 600 нм. Вычесть OD контроля из результатов для каждого штамма. Нормализовать каждый штамм до OD равной 0,05 в средах RPMI.

(3) Развести бактерии: развести культуру с OD 0,05 в соотношении 1:10 в средах RPMI до OD 0,005.

- 20 (4) Приготовить реагент сред с фагами: добавить фаг, цефокситин и пируват натрия к BSS-M56, включая:

- а. Цефокситин (5 мкг/мл)
- б. Маточный раствор лизата GW24 (0,03X)
- с. Пируват натрия (0,025 M)

- 25 (5) Подготовить к работе аналитический планшет = добавить 198 мкл реагента сред с фагом и 2,0 мкл каждого разведения бактерий (OD равная 0,05 и OD равная 0,005 в RPMI, приблизительно соответствующая 20000 и 2000 КОЕ/мл) или 2,0 мкл RPMI в качестве контроля в двух повторях.

- 30 (6) Инкубировать аналитический планшет = инкубировать аналитический планшет на круговой качалке при ~100 об/мин (3 скорость) в течение 4 часов при 37°C.

(7) Подготовить люминометр (SpectraMax L) = промыть реагентную линию 70% этанолом, после чего DI водой, затем заполнить субстратом. Настроить программное обеспечение как Fast Kinetic с вводом 50 мкл субстрата при 250 мкл/сек после 10 точек исходной линии и считывать 40 точек каждые 0,25 секунд.

- 35 (8) Провести анализ = тестировать каждый препарат субстратных реагентов с использованием промывки и наполнения SpectraMax L после каждого субстрата.

Эксперименты по усовершенствованию препарата субстратного реагента разрабатывали, чтобы улучшить следующие ниже параметры:

- 40 (1) Улучшить растворимость, добавляя поверхностно-активные вещества (Tween 20, Triton X-100, NP-40, Brij-35, SNS и т.д.), добавляя растворителя (этанол, метанол, DMSO и т.д.), добавляя нелетучие масла (касторовое масло)

- 45 (2) Улучшить стабильность, добавляя стабилизаторы (триэтаноламин, циклодекстрин и т.д.), добавляя антиоксиданты (витамин Е, ацетат витамина Е, PEG 1000 витамина Е, оксиразу и т.д.), корректировать способ добавления тридеканала (с поверхностно-активным веществом, с растворителем, в готовый раствор, с антиоксидантом и т.д.), хранение тридеканала и субстратного реагента в азоте для снижения окисления альдегида, и снижение возможности микробного загрязнения, добавляя консерванты, такие как ProClin, и стерилизующим фильтрованием субстратного реагента.

(3) Улучшить эффективность анализа, корректируя величину рН препарата и величину рН буферной системы

(4) Улучшить общую эффективность посредством определения альдегида с самым высоким результатом RLU (исследовали альдегиды из 6-14 атомов углерода во множественных препаратах, чтобы определить наблюдается ли улучшение растворимости, стабильности и эффективности анализа).

(5) Улучшить общую эффективность, добавляя противовспенивающее средство для того, чтобы снизить пенообразование во время приготовления реагента и добавления реагента к образцу при анализе.

#### Анализ и результаты

Данные кинетической реакции наносили на график для каждого образца и линию соотносили со средним значением в каждой точке считывания из трех повторов. Типично, результаты показаны при разведении 1:2000 модельной системы бактерий с OD равной 0,1, приблизительно соответствующей 10000 КОЕ/мл или 2000 КОЕ/анализ.

Нормализованную максимальную RLU к максимальной RLU субстратного реагента сравнения анализировали для экспериментов в отношении стабильности. В каждой временной точке для стабильности максимальную RLU для каждого образца нормализовали к максимальной RLU субстрата сравнения. Нормализованную максимальную RLU наносили на график в зависимости от временной точки и линейную регрессию с CI 95% наносили на график. Заключение

Основные параметры, скорректированные исходя из препарата сравнения для получения препарата субстратного реагента, кратко изложены в таблице 9.

**Таблица 9: краткое изложение результатов разработки препарата реагента**

Модификация до субстратного реагента	Объяснение
4,2 мМ тридеканаль+TSB	Исходный субстратный реагент
Удалить TSB	Снижение возможности контаминации
добавить 1% Tween 20	Улучшенная растворимость
Довести величину pH до 3 с использованием 79,45% 0,1 М лимонной кислоты-19,55% 0,2 М буфера д в у х о с н о в н о г о ф о с ф а т а н а т р и я	Улучшенная эффективность анализа
Добавить тридеканаль непосредственно к концентрированному поверхностно-активному веществу	Улучшенная стабильность
Добавить фильтрацию субстратного реагента через мембрану PES с размером пор 0,2 мкм	Улучшенная стабильность
Добавить 0,05% ProClin 300	Улучшенная стабильность

	Добавить триэтаноламин	Улучшенная стабильность
5	Заменить 1% Tween 200 на 0,5% Triton X-100	Улучшенная стабильность, улучшенная растворимость
10	Заменить 79,45% 0,1 М лимонную кислоту-19,55% 0,2 М буфер	Улучшенная эффективность анализа, уменьшенная возможность осаждения с удаленным фосфатным буфером
15	д в у х о с н о в н о г о ф о с ф а т а н а т р и я н а 82% 0,1 М лимонную кислоту-18% 0,1 М Цитрат натрия Buffer, remain at pH3	
20	Добавить 100 м.д. противовспенивающего средства Y30	
25	Добавить 0,5% ацетат витамина Е	Улучшенная стабильность, пониженное осаждение
30	Заменить первоначального производителя тридеканала Alfa Aesar на Sigma/OmegaChem	Улучшенная эффективность анализа
35	Заменить 0,5% ацетат витамина Е на 1-2% PEG 1000 витамина Е	Улучшенная эффективность анализа, улучшенная растворимость, улучшенная стабильность

Два препарата субстратных реагентов получили для двух разных температур хранения, один - для хранения при 2-8°C и один - при 18-24°C.

Готовые препараты субстратных реагентов, хранящиеся при 2-8°C. Препарат: 0,5% Triton X-100 + 4,2 мМ тридеканала + 0,5% ацетат витамина Е + 100 м.д.

противовспенивающего средства Y30 + 0,5% триэтаноламин + 82% 0,1 М лимонной кислоты + 18% 0,1 М цитрата натрия @pH3 + 0,05% ProClin 300. Препарат не выпадал в осадок через 1 месяц при 2-8°C и был способен определять штаммы MRSA так же, как и в день 0.

Готовые препараты субстратных реагентов, хранящиеся при 18-24°C. Препарат: 05,% Triton X-100 + 6,3 мМ тридеканала + 100 м.д. противовспенивающего средства Y30 + 0,5% триэтаноламин + 82% 0,1 М лимонной кислоты + 18% 0,1 М цитрата натрия @pH3 + 2% а-токоферол-PEG 1000-сукцинат + 0,05% ProClin 300. Препарат не выпадал в осадок через 1 месяц при 18-24°C и был способен определять штаммы MRSA так же,

как и в день 0.

Различные другие реагенты и препараты можно использовать, как известно специалистам в данной области, чтобы получить препарат.

Аналитическая эффективность анализа MRSA по репортеру жизнеспособности клеток на основе нерепликативной частицы для трансдукции

Аналитическую эффективность оптимизированного анализа MRSA с NRTP проверяли, включая анализ предела детектирования в исследовании и анализ перекрестной реактивности и нежелательного микробного взаимодействия в анализе, при критической оценке с использованием нецелевых организмов.

А) анализ предела детектирования

Предел детектирования анализа с NRTP оценивали посредством определения наименьшего количества клеток MRSA, представляющих различные штаммы, которые могут произвести сигнал в относительной световой единице (RLU) выше, чем порог, определяемый для контрольных образцов. Штаммы MRSA включали в себя SCCmec I, II, и IV типа, а также штамм MRSA, несущий вариант гена mecA - mecC, - штамм MRSA, который общепринятые разрешенные FDA анализы MRSA при помощи ПЦР не были способны определить.

Следующие ниже основные материалы использовали в исследовании клинической эффективности:

Реагент сред для выращивания: BSS-M56S

Субстратный реагент: готовые препараты субстратных реагентов, которые необходимо хранить при 18-24°C, как описано выше.

Реагент с частицей для трансдукции: основа BSS-M56 с 10 мкг/мл (то есть, 2X концентрацией) цефокситина и реагент с частицей для трансдукции, как описано выше, в 2X концентрации.

Протокол исследования LoD:

Ночная культура: Для каждого штамма MRSA и штамма MSSA в качестве отрицательного контроля 2 мл TSB инокулировали колонией штамма, предварительно выращенного в планшетах с TSA. Ночные культуры MRSA содержали 5 мкг/мл цефокситина. Все образцы инкубировали в течение ночи при 37°C во встряхивателе-инкубаторе.

Дневная культура: 20 мкл каждой из ночных культур переносили в новую культуральную пробирку, содержащую 2 мл реагента сред для выращивания.

Инокуляты затем инкубировали при 37°C при встряхивании в течение приблизительно 1 ч 45 мин, пока OD (при 600 нм) не достигала 0,1.

Серийные разведения:

а) 1000 мкл каждого образца распределяли в ряд А 96-луночного планшета с глубокими лунками объемом 2 мл.

б) Оставшиеся ряды (В-Н) затем заполняли 900 мкл реагента сред для выращивания.

с) 10-кратные серийные разведения затем готовили, забирая 100 мкл из ряда А и смешивая их в ряду В и так далее таким образом, чтобы ряд Н содержал образцы из материала ряда А в разведении  $10^{-7}$ .

Пересчет бактериальной загрузки: 5 мкл из каждой лунки ряда Е помещали в планшет с TSA, который затем наклоняли, позволяя капле жидкости распределиться по планшету (для того, чтобы позднее облегчить подсчет колоний). (Ряд Е представляет собой разведение  $10^{-4}$  из ряда А). Планшеты затем инкубировали в течение ночи при 37°C.

Подготовка к анализу:

а) Лунки белого 96-луночного аналитического планшета заполняли 100 мкл 2х

реагента частицы для трансдукции.

б) Затем ряды F и G (то есть,  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$ -кратные разведения ряда A, соответственно) использовали для заполнения лунок 96-луночного аналитического планшета, содержащего реагент с частицей для трансдукции таким образом, чтобы каждый образец

с) Затем планшет герметично закрывали воздухопроницаемой крышкой и инкубировали в течение 4 часов при  $37^{\circ}\text{C}$  при умеренном встряхивании, 50 об/мин.

В конце 4 часов планшет убирали из инкубатора и сразу же измеряли люминесценцию на приборе SpectraMax L, в который вводили 50 мкл субстратного реагента, и определяли люминесценцию в течение периода времени 1 минута.

Анализ:

Данные по люминесценции от каждого образца наносили на график в виде RLU в зависимости от времени. Контрольные образцы использовали для того, чтобы определить пороговое значение, рассчитанный для всех временных точек контрольных образцов, применяя следующую ниже формулу: (среднее значение RLU контроля +  $3 \times \text{SD RLU}$  контроля).

Среднее значение пика RLU для ввода после субстрата затем получали для каждого образца, для того, чтобы определить образец в наибольшем разведении, для которого получали величину RLU, которая превышала пороговое значение контрольных образцов. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) при наибольшем разведении, для которого получали величину RLU, которая превышала пороговое значение контрольных образцов, определяли из исследования по подсчету загрузки, и данное число КОЕ отражалось как LoD в данном исследовании.

Результаты:

LoD для всех исследуемых образцов MRSA, как определили, был ниже 10 КОЕ. В таблице кратко изложены результаты наименьших LoD, полученные в исследовании:

Результаты наименьших LoD, полученные в исследовании LoD.

Тип SCCmec	LoD (КОЕ)
I	3
II	2
IV	3
mecC	1

Все исследуемые штаммы MRSA показали в результате менее чем 10 КОЕ, определяемых в анализе с NRTP выше порогового значения, вычисленного по контрольным образцам. Для MSSA не получили величин RLU выше порогового значения контрольных образцов.

Величины RLU показаны при наибольшем разведении, для которого получали величину RLU, которая превышала пороговое значение контрольных образцов, их наносили на график в виде средней величины RLU и стандартного отклонения для исследуемых четырех повторов для каждого образца. Горизонтальная ось представляет

собой набор пороговых значений контрольных образцов и число КОЕ для образца, которое получали для каждой точки данных RLU, совмещены с данными. Для всех образцов MRSA получали величины RLU выше порогового значения, в то время как для MSSA - не получали.

#### 5 Исследование перекрестной реактивности и нежелательного микробного взаимодействия

Проводили исследование перекрестной реактивности и нежелательного микробного взаимодействия. Цель исследования заключалась в том, чтобы проверить ряд бактериальных штаммов, с которыми обычно сталкиваются в клинических образцах и которые, как известно, потенциально находятся в кругу хозяев бактериофага ф80α, в анализе MRSA, чтобы увидеть имела ли место перекрестная реактивность или нежелательное микробное взаимодействие данных штаммов с фагом или субстратом, используемым в исследовании.

Проведенные ранее эксперименты с клиническими образцами привели к получению ложноположительных результатов в присутствии *Enterococci faecalis* и *Staphylococcus epidermidis*, как показано исходя из наличия синих и белых колоний при нанесении на планшеты с BBL™ CHROMagar™ *Staph aureus*. Кроме того, *Listeria monocytogenes* и *Listeria innocua* могут находиться в инфекционном кругу хозяев или быть проникающими для фага ф80α, которые также могут вносить вклад в перекрестную реактивность при анализе MRSA. В исследовании проверяли *Enterococci faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* и *Listeria innocua* перекрестной реактивности / нежелательного взаимодействия в анализе жизнеспособности MRSA. Каждый штамм проверяли при большом количестве клеток порядка  $10^6$ ,  $10^7$  или  $10^8$  клеток в анализируемом объеме. Тестирования проводили без добавления лизата GW24, чтобы разрешить проблему, связанную с аутолюминесценцией штаммов.

В эксперименте 1 исследовали различные штаммы (MSSA-S121, NRS# 9- *Staphylococcus haemolyticus*, NRS # 6- *Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228-*Staphylococcus epidermidis*, ATCC 15305- *Staphylococcus saprophyticus*, ATCC 29212-*Enterococcus faecalis*, ATCC 60193- *Candida albicans*, ATCC 12453-*Proteus mirabilis*) в отношении люминесценции при большом количестве клеток в нормальных условиях анализа.

Эксперимент 2: подвыборку штаммов, которые являлись люминесцентными в эксперименте 1, повторно анализировали в присутствии различных антибиотиков в различных концентрациях, чтобы погасить фоновую люминесценцию.

Эксперимент 3: *E. faecalis* и S32 (MRSA) исследовали с использованием различных препаратов субстратов, разработанных, как описано выше, без лизата GW24 и без инкубации.

Эксперимент 4: ATCC 33090-*Listeria innocua* и ATCC 19111-*Listeria monocytogenes* исследовали в отношении фонового сигнала и неспецифической люминесценции и повторно исследовали с использованием различных препаратов субстратов, разработанных, как описано выше, наряду с *E. faecalis* и *S. epidermidis*.

Эксперимент 5: *E. faecalis* повторно исследовали с использованием готового препарата субстрата, разработанного, как описано выше.

Препараты субстратных реагентов, тестируемых в данном исследовании, кратко описаны в таблице 10.



**Таблица 10: Препараты субстратных реагентов**

Эксперимент	Субстрат	Описание
1	Исходный субстрат	1% Tween20 + 4,2 мМ тридеканаль, pH 3,0
2	Исходный субстрат	
3	Субстрат 1	6,3 мМ тридеканаль + 05,% ацетат витамина Е, pH 3,0
	Субстрат 2	20 мМ нонаналь + 05,% ацетат витамина Е, pH 3,0,
	Субстрат 3	8,4 мМ тридеканаль + 05,% ацетат витамина Е, pH 3,0
	Субстрат 4	6,3 мМ тридеканаль + 1% α-токоферол-PEG 1000-сукцинат, pH 3,0
4	Исходный субстрат	1% Tween20 + 4,2 мМ тридеканаль, pH 3,0
	Субстрат 5	0,5% Triton + 4,2 мМ тридеканаль (Sigma) + 05,% ацетат витамина Е, pH 3,0
5	Субстрат 6	6,3 мМ тридеканаль + 2% VitE PEG, pH 3,0

Способы/процедуры:

Ниже следуют стадии, выполненные для анализа MRSA.

А) Выращивание штаммов для экспериментов 1-5

За день до анализа ночную культуру высевали в глубокий 96-луночный планшет при разведении 1:50 в TSB из замороженного маточного раствора для однократного использования и инкубировали при 37°C на круговой качалке в течение >15 часов. Бактерии (8 мкл) в TSB (392 мкл).

Поглощение культуры измеряли на приборе Versamax. TSB был установлен как контроль в шаблоне SoftmaxPro. Оптическую плотность (OD) измеряли при 600 нм.

В день анализа клетки ресуспендировали до OD 0,5 для подготовки к анализам. Получали BSS-M56 для экспериментов 1-5.

В) реагент сред с частицей для трансдукции получали для всех экспериментов 1, 2, 4 и 5 (реагент без частицы для трансдукции использовали в эксперименте 3): 15 мкг/мл цефокситина + маточный раствор лизата GW24, как описано выше, при 30X.

С) Приготовление образца: различные разведения делали из ночных культур штаммов. Все штаммы разводили BSS M56.

Д) Анализ MRSA был проведен для экспериментов 1-5

Среды загружали в присутствии или без фага и цефокситина при концентрации 5 мкг/мл в аналитический планшет. Добавляли 2,5 мкл клеток. Аналитический планшет инкубировали с крышкой для планшета при 37°C на круговой качалке со скоростью, установленной приблизительно при 100 об/мин в течение 4 часов.

Далее, проводили измерения на аналитических планшетах в приборе SpectraMax L

со следующими ниже параметрами анализа:

Люминесценция в режиме Fast Kinetic

Считывание 20 временных точек с интервалами в 0,5 секунд. Субстраты вводили при помощи инжектора М в количестве 50 мкл/лунку при 250 мкл/сек, включая 5 считываний исходной линии. Никакой температуры инкубации не устанавливали, и считывание происходило при комнатной температуре.

До начала анализа SpectraMax L наполняли субстратным реагентом.

Результаты анализировали с помощью следующего ниже:

А) Определяли пороговое значение, усредняя RLU контроля по всем повторам и временным точкам и добавляя три стандартных отклонения.

В) Определяли максимальную RLU для каждого образца, используя SoftMaxPro.

С) Определяли, была ли максимальная RLU больше чем пороговое значение RLU, и если так, то данные образца использовали для анализа.

Краткое описание результатов

Эксперимент 1: различные штаммы тестировали в отношении перекрестной реактивности и нежелательного взаимодействия, используя препарат исходного субстрата, из этих проверенных, NRS# 9- *S. haemolyticus*, NRS # 6- *S. epidermidis* и *E. faecalis* ложноположительно тестировали в анализе MRSA.

Эксперимент\_2: из трех исследуемых штаммов NRS #9 и *E. faecalis* положительно тестировали MRSA с использованием всех исследуемых условий цефокситина. Все три штамма (NRS #9, *E. faecalis*, NRS #6) положительно тестировали, когда в анализе не использовали никакого реагента с частицей для трансдукции, указывая на то, что неспецифическая люминесценция не являлась зависимой от реагента с частицей для трансдукции, а скорее зависимой от штамма и субстратного реагента. Carb (карбенициллин) во всех исследуемых концентрациях был эффективен для удаления ложноположительного сигнала.

Эксперимент 3: *E. faecalis* давал положительный сигнал без реагента с частицей для трансдукции. Штамм S32 MRSA давал положительный сигнал без реагента с частицей для трансдукции. Данный результат был показателем для субстратного реагента, вызывающего фоновую люминесценцию. Субстрат 4 был эффективен при удалении фонового сигнала в анализе.

Эксперимент 4: Штаммы ATCC 33090 -*Listeria innocua*, ATCC 19111-*Listeria monocytogenes*, тестировали в отношении люминесценции с реагентом с частицей для трансдукции и субстратным реагентом, поскольку *Listeria* sp. Может находиться в кругу хозяев бактериофага, используемого в анализе MRSA. Люминесценцию наблюдали в *L. innocua* с реагентом и без реагента с частицей для трансдукции, используя препарат исходного субстрата, указывающей на то, что люминесценция была следствием неспецифической реакции, возможно, с субстратом. Субстрат 5 был эффективен при удалении люминесценции в *Listeria*, но не *E. faecalis*.

Эксперимент 5: повторно тестировали *E. faecalis* с субстратом 6. В двух независимых прогонах в два разных дня с высокой загрузкой клеток при OD 0,5, анализ привел к получению отрицательных результатов.

Заключение

Исследование перекрестной реактивности демонстрируют фоновую люминесценцию в нескольких бактериальных видах при высокой загрузке. Для выходного излучения не требовалось реагента с частицей для трансдукции и определенные субстратные препараты, использующие фосфатные ионы вносили вклад в неспецифический сигнал. Поскольку не наблюдали никакого выходного излучения в видах с перекрестной

реактивностью при использовании реагента с частицей для трансдукции, в случае, когда ф80α проникает в виды с перекрестной реактивностью, выходное излучение предотвращается из-за отсутствия активности промотора PclpB *S. Aureus*, который функционально связан с генами бактериальной люциферазы и/или отсутствия активности участка начала репликации pT181 *S. aureus* в данных видах.

Замена буфера с двухосновного фосфата натрия на цитрат натрия и лимонную кислоту убирала фоновую люминесценцию из всех исследуемых видов с перекрестной реактивностью, за исключением *E. faecalis*. Субстрат 6 с добавленным ингредиентом α токоферол-PEG 1000-сукцинат устранял оставшийся неспецифический сигнал в *E. faecalis*.

Клиническая эффективность анализа MRSA по репортеру клеточной выживаемости на основе нерепликативной частицы для трансдукции - результаты в сравнении с прямым высеванием на CHROMAgar MRSA II

Скрининговое исследование MRSA было разработано, используя экспрессирующие luxAB нерепликативные частицы для трансдукции (NRTP) на основе ф80α. Анализ состоял из добавления NRTP в клинический образец с подозрением на содержание MRSA, инкубации образца в течение периода из 4 часов при 37°C и затем исследования инкубированных образцов посредством введения альдегида в образец то время как проводилось измерение люминесценции с фотоэлектронным умножителем. Результаты анализа сравнивали с результатами коммерчески доступных хромогенных сред, разработанных для определения MRSA, в качестве эталона сравнения для того, чтобы определить чувствительность и специфичность анализа. Анализ на основе NRTP, как ожидали, хорошо коррелировал с эталоном сравнения на основе культур, поскольку для обоих необходимо присутствие жизнеспособных клеток MRSA и обе зависят от экспрессии фенотипа MRSA. Результаты показали превосходную корреляцию с эталоном сравнения.

Цель исследования заключалась в том, чтобы определить эффективность анализа MRSA на основе NRTP относительно CHROMAgar MRSA II из остатков образцов мазков из носа, собранных с целью скрининга MRSA.

Объем исследования:

Деидентифицированные образцы мазков из носа, собранные у пациентов в целях наблюдения за MRSA клиническим учреждением, тестировали в отношении присутствия MRSA, используя анализ MRSA на основе NRTP, CHROMAgar MRSA II, CHROMAgar SA и Blood Agar TSA посредством прямого высевания и посредством обогащения культуры после высевания. Результаты анализа MRSA на основе NRTP сравнивали с результатами анализа с CHROMAgar MRSA II для того, чтобы вычислить чувствительность и специфичность анализа MRSA на основе NRTP относительно CHROMAgar MRSA II.

Следующие ниже основные материалы использовали в исследовании клинической эффективности:

Реагент сред для выращивания: BSS-M56

Субстратный реагент: готовые препараты субстратных реагентов, которые необходимо хранить при 18-24°C, как описано выше.

Реагент с частицей для трансдукции: основа BSS-M56 с 10 мкг/мл (то есть, 2X концентрацией) цефокситина и реагент с частицей для трансдукции, как описано выше, в 2X концентрации.

Способы/процедуры

Описание клинического образца: пробирки для транспортировки образца, содержащие

жидкий Amies (220093 - BD BBL™ CultureSwab™ Liquid Amies) предоставляли в клиническое учреждение для сбора деидентифицированных остатков мазков из носа, собираемых клиническим учреждением. До размещения мазков из носа в предоставленные пробирки для транспортировки клиническое учреждение использовало мазок для проведения своего собственного прямого скрининга MRSA в культуре, делая посев мазка штрихом на культуральный планшет. Более конкретно, образцы из ноздрей собирали по внутренней стандартной процедуре клинического учреждения и используя стандарты сбора мазков клинического учреждения. Клиническое учреждение затем проводило скрининг непосредственно в культуре с использованием мазка. Оставшийся тампон на стержне для сбора мазка затем добавляли в пробирку для переноса образца, в которой кончик тампона на стержне с мазком погружали в буфер Amies в пробирке для переноса образца. Затем образцы хранили при комнатной температуре в течение периода 2-24 часов до дальнейшей обработки.

Манипуляции с образцом: После получения образцы хранились в течение ночи при комнатной температуре в боксе микробиологической безопасности вертикально, чтобы гарантировать погружение тампона на стержне с мазком в буфер Amies в пробирке для переноса образца. После хранения в течение ночи образцы далее обрабатывали следующим ниже образом.

Приготовление клинического образца

Используя пипетку объемом 1 мл, 300 мкл реагента сред для выращивания добавляли в пробирки фирмы Falcon объемом 15 мл.

Тампон на стержне из оставшихся мазков из носа удаляли из первоначальной пробирки для транспортировки и помещали в реагент сред для выращивания в соответствующую в пробирку фирмы Falcon. Содержимое тампона на стержне затем смывали в реагенте сред для выращивания в пробирке фирмы Falcon, перекачивая его назад и вперед в реагенте среды для выращивания 4-6 раз. Тампон на стержне затем помещали обратно в первоначальную пробирку для транспортировки и хранили при 2-3°C до конца исследования, в то время как смытые клинические образцы в пробирке фирмы Falcon переносили в пробирки объемом 1,5 мл и хранили при комнатной температуре до дальнейшей обработки.

Проведение анализа MRSA с NRTP: следующие ниже образцы загружали непосредственно в белый 96-луночный аналитический планшет.

Клинические образцы: 100 мкл смытого материала из каждого клинического образца в одном повторе.

Положительный контроль MRSA: 2 мкл тщательно перемешенной культуры известного изолята MRSA при OD 0,1 в 98 мкл реагента сред для выращивания в трех повторах.

Отрицательный контроль MSSA: 2 мкл тщательно перемешенной культуры известного изолята MSSA при OD 0,1 в 98 мкл реагента сред для выращивания в трех повторах.

Контроли: 100 мкл реагента сред для выращивания в трех повторах.

К каждому образцу добавляли 100 мкл реагента с частицей для трансдукции. Затем аналитический планшет помещали в инкубатор, установленный на 37°C, встряхивая на круговой качалке в течение 4 часов. В конце 4 часов, планшет удаляли из инкубатора и сразу же измеряли люминесценцию на SpectraMax L, в который вводили 50 мкл субстратного реагента и определяли люминесценцию в течение периода времени 1 минута.

Высевание бактерий для подсчета КОЕ в клинических образцах: каждый смытый клинический образец высевали для того, чтобы определить число бактериальных

колоний на CHROMAgar MRSA II, CHROMAgar SA и Blood Agar (TSA II) посредством прямого и обогащенного культивирования, как указано ниже. Число КОЕ организмов определяли при прямом высевании. Число КОЕ MRSA определяли, высевая на CHROMAgar MRSA II. Число КОЕ *S. aureus* КОЕ определяли, высевая на планшет с CHROMAgar SA. Число КОЕ любого организма, чей рост поддерживается КОЕ Blood Agar TSA, определяли, высевая на Blood Agar TSA. В случае, когда прямое высевание не приводило к появлению колоний из-за того, что загрузка организмов была ниже предела детектирования используемого планшета, также проводили обогащение образца, инкубируя часть смывного клинического образца в TSB в течение ночи при 37°C при встряхивании и затем снова высеивая обогащенную культуру на CHROMAgar MRSA II. Все планшеты инкубировали в течение 20-24 часов при 37°C. После инкубации регистрировали число КОЕ любых колоний, появившихся на каждом планшете.

Анализ: присутствие и загрузку КОЕ MRSA, *S. aureus* и всех микроорганизмов в пересчете на смывный клинический образец вычисляли на основе числа КОЕ, полученного на CHROMAgar MRSA II, CHROMAgar SA и Blood Agar TSA, соответственно.

Анализ исследования с NRTP: данные каждого образца наносили на график в виде RLU в зависимости от времени.

Определение порогового значения: пороговое значение для анализа рассчитывали по всем временным точкам для контрольных образцов, используя следующую ниже формулу: (среднее значение RLU контроля + 3\* SD RLU контроля).

Определение MRSA-положительного образца: RLU каждой временной точки после введения субстрата, как определяли, было выше или ниже порогового значения в анализе. Если две или более точек данных после введения были выше порогового значения в анализе, то образец рассматривали как «MRSA-положительный».

Результаты: MRSA-положительные результаты анализа с NRTP сравнивали с MRSA-положительными результатами прямого высевания и высевания обогащенной культуры на CHROMAgar MRSA II. Следующие ниже вычисления проводили для того, чтобы определить чувствительность и специфичность анализа с NRTP по сравнению с CHROMAgar MRSA II.

- Истинно положительный (TP)

Образец, для которого получили MRSA-положительный результат как при анализе с NRTP, так и с CHROMAgar MRSA II

- Истинно отрицательный (TN)

Образец, для которого получили MRSA-отрицательный результат как при анализе с NRTP, так и с CHROMAgar MRSA II

- Ложно положительный (FP)

Образец, для которого получили MRSA-положительный результат при анализе с NRTP и MRSA-отрицательный результат на CHROMAgar MRSA II

- Ложно отрицательный (FN)

Образец, для которого получили MRSA-отрицательный результат при анализе с NRTP и MRSA-положительный результат на CHROMAgar MRSA II

- Чувствительность =  $TP / (TP + FN)$
- Специфичность =  $TN / (TN + FP)$

Результаты в сравнении с прямым высеванием на CHROMAgar MRSA II

В таблице 11 показаны следующие ниже результаты, которые были получены при сравнении анализа с NRTP относительно прямого высевания на CHROMAgar MRSA II.

**Таблица 11. Результаты анализа с NRTP относительно результатов прямого высевания на CHROMAgar MRSA II**

Общее количество образцов	Положительный при CHROMAgar MRSA II	Отрицательный при CHROMAgar MRSA II	Положительный при анализе с NRTP	Отрицательный при анализе с NRTP	Истинно положительный	Истинно отрицательный	Ложно положительный	Ложно отрицательный
69	7	62	12	57	7	57	5	0

На основании указанных выше данных чувствительность и специфичность анализа в сравнении с прямым высеванием на CHROMAgar MRSA II, как вычислили, составляла:

Чувствительность = 100%

Специфичность = 92%

Клиническая эффективность анализа MRSA по репортеру клеточной выживаемости на основе нерепликативной частицы для трансдукции - результаты в сравнении с обогащающим культивированием с последующим высеванием на CHROMAgar MRSA II

На основании результатов в сравнении с прямым высеванием на CHROMAgar MRSA II, все клинические образцы повторно тестировали в сравнении с обогащенной культурой с последующим высеванием на CHROMAgar MRSA II. Мотивация для последующего тестирования была основана на возможности того, что ложноположительные результаты, при сравнении с прямым высеванием на самом деле могут быть истинно положительными, что было определено при анализе с NRTP, но, возможно, было пропущено при прямом высевании. Часть оставшихся образцов мазка повторно тестировали посредством анализа с NRTP, как описано выше. Другую часть оставшихся смывных образцов мазка также тестировали посредством обогащающего культивирования с последующим высеванием на CHROMAgar MRSA II. Тестирование обогащающего культивирования состояло из добавления 100 мкл оставшегося смывного материала мазка в 2 мл TSB и инкубирования при 37°C при встряхивании в течение периода 18-24 часов. Полученные культуры затем высевали штрихом на CHROMAgar MRSA II для того, чтобы определить присутствие MRSA в культуре. В таблице 12 просуммированы данные из обоих анализов с прямым высеванием и обогащением с последующим высеванием - показаны только те образцы, для которых получили MRSA-положительный результат либо в анализе с NRTP, либо на CHROMAgar MRSA II.

**Таблица 12: Результаты анализа с NRTP относительно результатов прямого высевания и обогащающего культивирования с последующим высеванием на CHROMAgar MRSA II**

Показаны только те образцы, для которых получили MRSA-положительный результат либо в анализе с NRTP, либо на CHROMAgar MRSA II.

# образца	Анализ с NRTP	Прямой на CHROMAgar MRSA II	Обогащение + анализ с NRTP	Обогащение + CHROMAgar MRSA II
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+
10	+	-	+	+
11	+	-	+	+
12	+	-	+	-

В таблице 13 показаны следующие ниже результаты, которые были получены при сравнении анализа с NRTP относительно обогащенной культуры клинических образцов с последующим высеванием на CHROMAgar MRSA II.

**Таблица 13. Результаты анализа с NRTP относительно результатов обогащенной культуры с последующим высеванием CHROMAgar MRSA II Results**

Общее количество образцов	Положительный на CHROM Agar MRSA II	Отрицательный на CHROMAgar MRSA II	Положительный при анализе с NRTP	Отрицательный при анализе с NRTP	Истинно положительный	Истинно отрицательный	Ложно положительный	Ложно отрицательный
69	11	58	12	57	11	57	1	0

На основании указанных выше данных чувствительность и специфичность анализа в сравнении обогащающим культивированием с последующим высеванием на CHROMAgar MRSA II, как вычислили, составляла:

- Чувствительность = 100%
- Специфичность = 983, %

Пример 8: анализ на основе NRTP для тестирования антимикробной чувствительности - корреляция минимальной ингибирующей концентрации с выходной люминесценцией

В другом примере анализ чувствительности *S. aureus* к цефокситину был разработан для определения минимальной ингибирующей концентрации цефокситина, необходимой для ингибирования роста устойчивого к цефокситину *S. aureus*. В отличие от анализа устойчивости MRSA к цефокситину, как описано выше, который позволяет различить чувствительные к цефокситину от устойчивого к цефокситину *S. aureus*, анализ чувствительности MRSA к цефокситину в данном примере описывает разработку анализа для определения минимального количества цефокситина, необходимого для ингибирования роста *S. aureus* в присутствии цефокситина.

Следующие ниже основные материалы использовали в исследовании клинической эффективности:

Реагент сред для выращивания: BSS-M56S

Субстратный реагент: готовые препараты субстратных реагентов, которые необходимо хранить при 18-24°C, как описано в примере 7.

Реагент с частицей для трансдукции: основа BSS-M56 с 10 мкг/мл (то есть, 2X концентрацией) цефокситина и реагент с частицей для трансдукции, как описано в примере 7, в 2X концентрации. Протокол исследования MIC.

Ночная культура: для каждого штамма MRSA (NRS35 и S7) и штамма отрицательного контроля MSSA (MSSA121) 2 мл TSB инокулировали колонией штамма, предварительно



выращенного на планшетах с TSA. Ночные культуры MRSA включали в себя 5 мкг/мл цефокситина. Все образцы инкубировали в течение ночи при 37°C во встряхивателе-инкубаторе.

Дневная культура: 20 мкл каждой из ночных культур переносили в новую культуральную пробирку, содержащую 2 мл реагента сред для выращивания. Затем инокуляты инкубировали при 37°C при встряхивании в течение приблизительно 1 ч 45 мин, пока OD (600 нм) не достигнет 0,1.

Определение MIC посредством высевания:

а) Каждую из дневных культур высевали штрихом в планшеты с TSA, содержащих цефокситин в концентрации 4, 8, 16, 32, 64, и 128 мкг/мл.

б) Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C, чтобы определить рост.

Подготовка к анализу с NRTP:

а) Лунки белого 96-луночного аналитического планшета заполняли 100 мкл 2х реагента с частицей для трансдукции.

б) Для каждой из дневных культур пять лунок затем заполняли 100 мкл дневной культуры.

с) Для каждой из дневных культур добавляли цефокситин в одну лунку так чтобы концентрация цефокситина в лунке составляла 4, 8, 16, 32, 64 и 128 мкг/мл.

д) Затем планшет герметично закрывали воздухопроницаемой крышкой и инкубировали в течение 4 часов при 37°C при умеренном встряхивании, 50 об/мин.

В конце 4 часов планшет убирали из инкубатора и сразу же измеряли люминесценцию на приборе SpectraMax L, в который вводили 50 мкл субстратного реагента, и определяли люминесценцию в течение периода времени 1 минута.

Анализ:

Максимальную величину люминесценции после добавления субстратного реагента для каждого образца наносили на график. Величины RLU образца MSSA использовали для того, чтобы определить пороговое значение, рассчитанное, используя следующую ниже формулу: (среднее значение RLU MSSA + 3\* SD RLU MSSA).

Результаты:

На фигуре 23 показаны результаты роста *S. aureus* при концентрации цефокситина 4, 8, 16, 32, 64 и 128 мкг/мл. На фигуре 24 показаны величины RLU, полученные в анализе с NRTP в присутствии 4, 8, 16, 32, 64 и 128 мкг/мл цефокситина. X-ось на фигуре 24 представляет собой ряд величин порогового значения RLU MSSA.

Как можно увидеть на фигуре 23, MRSA NRS25 демонстрирует MIC 128 мкг/мл цефокситина, в то время как MRSA S7 демонстрирует MIC 64 мкг/мл цефокситина. Соответственно, MRSA NRS25 демонстрирует люминесценцию заметно выше порогового значения RLU MSSA для концентрации цефокситина вплоть до 64 мкг/мл цефокситина, в то время как MRSA S7 демонстрирует люминесценцию выше порогового значения RLU MSSA для концентрации цефокситина вплоть до 32 мкг/мл.

Основываясь на указанных выше данных в анализе с NRTP демонстрируют, что величины RLU, получаемые при анализе, коррелируют с результатами MIC и, таким образом, анализ с NRTP можно использовать для разработки анализов чувствительности к антибиотикам.

Пример 9: анализ по репортерному транскрипту: механизм конформационного изменения посредством блокирующей RBS цис-репрессии трансляции Luxab, активированной транскриптом гена *mecA* Mrsa

Как описано выше, репортерный транскрипт можно сконструировать таким, образом, чтобы трансляция последовательности репортерного гена блокировалась цис-репрессией

участка связывания рибосомы (RBS) репортерного гена.

Следующие ниже средства использовали для конструирования репортерных транскриптов по изобретению.

1) Вторичную структуру РНК рассчитывали, используя программу для вторичной структуры, такую как Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>).

2) Межмолекулярные взаимодействия РНК рассчитывали, используя программное обеспечение, такое как InterACTioN для предсказания взаимодействия РНК-РНК, используя интегральное программирование (RactIP) (<http://rna.naist.jp/ractip/>).

3) Вторичную структуру РНК визуализировали, используя приложение для визуализации РНК (VARNA) (<http://varna.lri.fr/>).

На фигуре 25 показана вторичная структура транскрипта *mesA*, полученная на основе конформации с наименьшей энергией, рассчитанной при помощи Mfold и визуализированной при помощи VARNA. Терминальная петля 23 (T23) содержит последовательность YUNR UUGG, состоящую из оснований 1487-1490

последовательности транскрипта *mesA*. Анализ вторичной структуры транскрипта гена *mesA* выявил несколько участков оцРНК, которые подходят для конструирования цис-репрессированного репортера *luxAB*, который можно дерепрессировать посредством взаимодействий репортера и участка оцРНК.

Как подробно показано на фигуре 26, терминальная петля 23 (T23) транскрипта *mesA* содержит консенсусную последовательность YUNR. Консенсусная последовательность YUNR (пиримидин-урацил-нуклеотид-пурин), как было показано, является особо важной мишенью для межмолекулярных комплексов РНК в природных системах. Цис-репрессировавшая последовательность конструировали так, чтобы образовалась структура типа «стебель - петля» с RBS репортерной последовательности, такой что цис-репрессировавшая последовательность блокирует связывание РНК-полимеразы с RBS репортерной последовательности. Репортерную последовательность подвергали действию связывания петли цис-репрессировавшей структуры типа «стебель - петля» с T23 транскрипта *mesA*.

Как показано на фигуре 27, цис-репрессировавшую последовательность 2701 добавляли к 5'-концу генов *luxAB* и конструировали так, чтобы образовалась структура типа «стебель - петля», которая блокирует последовательность RBS («AAGGAA») 2702 гена *luxA*. Цис-репрессировавшая структура типа «стебель - петля» блокирует последовательность RBS *luxA* («AAGGAA»), как предсказывали на основе конформации с наименьшей энергией транскрипта *luxAB*, включающего в себя цис-репрессировавшую последовательность на 5'-конце транскрипта *luxAB*, как рассчитано при помощи Mfold и визуализировано при помощи VARNA.

Первые 61 нуклеотидов цис-репрессированных генов *luxAB* показаны на ФИГ. 7, вплоть до иницирующего кодона AUG гена *luxA*. Последовательность RBS «AAGGAA» включает в себя основания 47-52. Данную терминальную петлю репортерного транскрипта конструировали так, чтобы происходило взаимодействие (связывание) с терминальной петлей 23 (T23) транскрипта *mesA*, которая содержит последовательность YUNR.

Терминальную петлю цис-репрессировавшей последовательности конструировали так, чтобы происходило взаимодействие с T23 транскрипта *mesA*, так, чтобы гибридизация цис-репрессированного транскрипта *luxAB* и транскрипта *mesA* при взаимодействии петли из цис-репрессировавшей структуры типа «стебель - петля» и T23 транскрипта *mesA* приводило к воздействию на RBS гена *luxA*. На фигуре 28 показаны предсказанные межмолекулярные взаимодействия между последовательностью T23

месА и цис-репрессирующей последовательностью транскрипта luxAB, рассчитанные при помощи RactIP и визуализированные при помощи VARNA. Линии обозначают спаривание оснований между транскриптом месА и цис-репрессированным транскриптом luxAB. Взаимодействие между двумя последовательностями приводит к воздействию на последовательность RBS luxA AAGGAA и, таким образом, дерепрессированию репортера luxAB.

Пример 10: анализ по репортерному транскрипту: Способы определения целевых транскриптов или генов, используя репортерную систему месА-luxAB

В другом примере предлагается способ определения целевого гена месА, используя репортерную систему месА-luxAB. Здесь, месА представляет собой целевой транскрипт, и luxAB представляет собой репортерную молекулу.

#### 1. Создание репортерной конструкции

Вектор, содержащий репортерную конструкцию, кодирующую luxAB, можно конструировать при помощи стандартных молекулярно-биологических методик, встраивая репортерную конструкцию в челночный вектор, способный размножаться и в *E. coli*, и в *S. aureus*. Вектор может содержать участок начала репликации, который является функциональным в *E. coli*, и селективный маркер, который экспрессируется в *E. coli* и подходит для осуществления роста клеток *E. coli*, трансформированных вектором и растущих при селективирующих условиях. Вектор также может содержать участок начала репликации, который является функциональным в *S. aureus* и селективный маркер, который экспрессируется в *S. aureus* и подходит для осуществления роста клеток *E. coli*, трансформированных вектором и растущих при селективирующих условиях. Репродукцию вектора для проведения манипуляций *in vitro* и для верификации манипуляций можно осуществить при помощи подходящего лабораторного клонированного штамма *E. coli* и готовый модифицированный вектор можно затем вводить в штаммы *S. aureus*.

Репортерную конструкцию можно сначала вводить в клетку *S. aureus* для транскрибирования конструкции и получения репортерного транскрипта.

#### 2. Конструирование цис-репрессированного репортерного транскрипта

Предлагаются способы конструирования цис-репрессированного репортерного транскрипта, который может связываться с целевым транскриптом месА. Репортерный транскрипт можно конструировать при помощи стандартных молекулярно-биологических методик. Гены luxA и luxB служат в качестве репортерных генов и могут происходить из *Vibrio harveyi*. В генах отсутствует транскрипционный промотор, и каждый ген содержит свой собственный участок связывания рибосомы (RBS). Когда оба гена luxA и luxB транслируются в клетке, комплекс белков luxA и luxB может образовывать активный фермент люциферазу (LuxAB). См. Farinha, M.A. and A.M. Kropinski, Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *J. Bacteriol.*, 1990. 172(6): p. 3496-3499.

Цис-репрессирующую последовательность можно располагать против хода транскрипции генов luxAB и по ходу транскрипции промотора, и она включает в себя последовательность, которая комплементарна RBS luxA. Последовательность линкера может отделять комплементарные участки цис-репрессирующей последовательности и последовательности luxA. После транскрипции вектора комплементарные участки цис-репрессирующей последовательности и последовательность RBS luxA образуют комплекс, создавая структуру типа «стебель - петля», которая предотвращает присоединение рибосомы и, таким образом, трансляцию.

Структура типа «стебель - петля» репортерного транскрипта конструируют для

дестабилизации и образования открытого комплекса, когда он взаимодействует с встречающейся в природе последовательностью транскрипта *mesA* (эндогенной для клетки). Для того чтобы активировать трансляцию последовательности гена *luxA*, природный транскрипт *mesA* служит в качестве транс-активирующей РНК, которая связывается с цис-репрессированным репортерным транскриптом и открывает ингибирующую структуру типа «стебель - петля», которая блокирует RBS гена *luxA*. Как только RBS не блокируется цис-репрессировающей последовательностью, может происходить трансляция *luxA*. Транскрипцию репортерной конструкции проводят посредством функционального связывания репортерной последовательности с конститутивным промотором против хода транскрипции цис-репрессировающей последовательности.

Пример последовательности гена-мишени *mesA* показан на фигуре 29.

Последовательность представляет собой последовательность ДНК локусов гена *mesA* (из *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* SA40, полный геном в GenBank: CP0036041.; SEQ ID №15) и ее можно использовать для получения репортерной конструкции, содержащей репортерную последовательность и цис-репрессировающую последовательность. Показаны -10 позиция 2901, позиция инициации транскрипции 2902, RBS 2903, кодирующий участок (в сером 904) и последовательность терминации транскрипции 2905.

На фигуре 30 показана иллюстративная последовательность транскрипта *mesA*, которую можно использовать для конструирования репортерного транскрипта (SEQ ID №16) согласно варианту осуществления по изобретению. Для *mesA* показаны RBS 3001 и кодирующая последовательность 3002.

Фигура 31 представляет собой пример последовательности ДНК локусов гена *luxAB*, которую можно использовать для конструирования репортерного транскрипта согласно варианту осуществления по изобретению. Последовательность ДНК локусов гена *luxAB* получали из генов *Vibrio fischeri luxA* и *luxB* для альфа- и бета-субъединиц люциферазы (GenBank: X06758.1) (SEQ ID №17). Показаны -10 позиция 3101, позиция инициации транскрипции 3102, RBS для *luxA* 3103, кодирующая последовательность *luxA* 3104 (ретуширование серым тоном), RBS для *luxB* 3105 и кодирующая последовательность *luxB* (ретуширование серым тоном) 3106.

Фигура 32 представляет собой пример последовательности транскрипта *luxAB*, которую можно использовать для конструирования репортерного транскрипта (SEQ ID №18). Показаны RBS для *luxA* 3201, кодирующая последовательность *luxA* 3202 (ретуширование серым тоном), RBS для *luxB* 3203 и кодирующая последовательность *luxB* (ретуширование серым тоном) 3204.

Фигура 33 представляет собой пример последовательности цис-репрессированного транскрипта *luxAB*, которую можно использовать в репортерном транскрипте (SEQ ID №19). Показаны цис-репрессировающая последовательность (прямоугольник с пунктирной линией) 3301, RBS для *luxA* 3302, кодирующая последовательность *luxA* 3303 (ретуширование серым тоном), RBS для *luxB* 3304 и кодирующая последовательность *luxB* (ретуширование серым тоном) 3305.

3. Способы определения наличия или отсутствия целевого транскрипта *mesA*, используя репортерный транскрипт

Предлагаются примеры определения присутствия или отсутствия целевого транскрипта *mesA* в клетке с использованием репортерных транскриптов по изобретению. На фигуре 34 показан пример клетки, содержащей вектор 3400, который кодирует репортерный транскрипт 1410, где не существует эндогенного транскрипта *mesA* в клетке 3401 (например, геном клетки не содержит ген *mesA*). В данном случае

цис-репрессирующая последовательность 3420 связывается с RBS 3430 генов luxAB. В некоторых вариантах осуществления цис-репрессирующая последовательность 3420 может связываться с частью или всем RBS гена luxA, RBS гена luxB, или и тем, и другим. Данное событие связывания блокирует и предотвращает трансляцию генов luxAB, и репортерная молекула (например, люцифераза) не продуцируется в клетке. Таким образом, не определяется никакого сигнала, указывая на отсутствие гена месА в клетке.

В другом примере клетки содержат эндогенный транскрипт месА (например, геном клетки содержит ген месА). На фигуре 35 показан вектор 3400, встраиваемый в клетку 3401. Вектор 3400 кодирует репортерный транскрипт 3410, который включает в себя цис-репрессирующую последовательность 3420 и репортерную последовательность (гены luxA и luxB). Когда транскрипт месА 3510, присутствующий в клетке, связывается с цис-репрессирующей последовательностью 1420, ингибирующая петля шпильки открывается и RBS 3430 для гена luxA становится доступной для воздействия.

Трансляция репортерной последовательности (luxA и luxB) может произойти, приводя к образованию фермента luxAB 3520. Фермент luxAB 3520 позволяет получить детектируемый люминесцентный сигнал 3530. Таким образом, вектор с репортерным транскриптом 3400 отражает присутствие эндогенных транскриптов месА 3510 в клетке 3401.

В то время как изобретение особенным образом показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления и различные альтернативные варианты осуществления, специалисту в соответствующей области будет понятно, что различные изменения в форме и деталях можно сделать в настоящем документе, не отступая от сущности и объема изобретения.

Все ссылки, выданные патенты и патентные заявки, цитируемые в текста настоящей заявки, включены, таким образом, в качестве ссылки в полном объеме, во всех смыслах.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michael G. Schmidt, D.A.S., Caroline Westwater, Joseph W. Dolan, Brian D. Hoel, Philip A. Werner, James S. Norris, Laura M. Kasman, *Nucleic Acid Delivery and Expression*, 2005.

2. Kreiswirth, B.N. et al., The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 1983. 305(5936): p. 709-712.

3. Ubeda, C. et al., Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 2009. 72(1): p. 98-108.

4. Otsuji, N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. 184(4692): p. 1079-1080.

5. Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 102-109.

6. Isaacs, F.J. et al. (2004) Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat. Biotechnol.* 22, 841-847.

7. Pfeiffer, V. et al. (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 840-846.

8. Opdyke, J.A. et al. (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 6698-6705.

9. Carriere, C, et al., Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35(12): p. 3232-3239.

10. Merten, O.-W. and M. Al-Rubeai, *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Vol. 737. 2011.

11. Lofdahl, S., J.E. Sjostrom, and L. Philipson, *CLONING OF RESTRICTION FRAGMENTS*

OF DNA FROM STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE-PHI-11. *Journal of Virology*, 1981. 37(2): p. 795-801.

12. Charpentier, E., et al., Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(10): p. 6076-6085.

13. Novick, R.P., I. Edelman, and S. Lofdahl, Small staphylococcus-aureus plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *Journal of Molecular Biology*, 1986. 192(2): p. 209-220.

14. Westwater, C., et al., Development of a P1 phagemid system for the delivery of DNA into Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2002. 148(4): p. 943-950.

15. Norris, J.U., et al., Tissue-Specific and Pathogen-Specific Toxic Agents and Ribozymes. 1999.

16. Maiques, E., et al., Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. *J. Bacteriol.*, 2007. 189(15): p. 5608-5616.

17. Frees, D., et al., Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2004. 54(5): p. 1445-1462.

18. Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille, New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(11): p. 6887-6891.

19. Tormo, M.A., et al., *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island DNA Is Packaged in Particles Composed of Phage Proteins. *J. Bacteriol.*, 2008. 190(7): p. 2434-2440.

20. Arthur, M., et al., The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.*, 1997. 179(1): p. 97-106.

21. Karlsson, S., et al., Expression of *Clostridium difficile* Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. *Infect. Immun.*, 2003. 71(4): p. 1784-1793.

22. Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007, Zymera, Inc.

23. Sarnie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University.

24. Good, L., Translation repression by antisense sequences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003. 60(5): p. 854-861.

25. Samine, B., Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2002. 1575(1-3): p. 15-25.

#### (57) Формула изобретения

1. Упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная упаковочная система бактериальной клетки содержит бактериальную клетку, содержащую:

лизогенизированный геном бактериофага, не содержащий первый ген бактериофага, кодирующий первую последовательность сайта инициации упаковки, причем удаление указанного первого гена бактериофага предотвращает упаковку молекулы нуклеиновой кислоты бактериофага в указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и

плазмиду с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей репортерный ген, содержащую второй ген бактериофага, причем указанный второй ген бактериофага кодирует вторую последовательность сайта инициации упаковки и облегчает упаковку копии указанной плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанный второй ген бактериофага способен экспрессировать белок, который кодируется указанным вторым геном, причем

указанная копия указанной плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты образует репликон, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу,

причем указанный бактериофаг выбран из бактериофага P1 Enterobacteriaceae, бактериофага ф80α или бактериофага ф11 *S. aureus*.

2. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

3. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 2, в которой промотор выбирают для способствования реактивности репортерной молекулы, экспрессированной из указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанной бактериальной клетке.

4. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит точку начала репликации.

5. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный репликон содержит конкатемер, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

6. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный первый и указанный второй ген бактериофага каждый содержит ген *расА* бактериофага P1 Enterobacteriaceae и указанный первый и указанный второй ген бактериофага каждый содержит указанную первую и вторую последовательность сайта инициации упаковки.

7. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный второй ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 9.

8. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный репликон представляет собой литический репликон бактериофага P1 Enterobacteriaceae.

9. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный репликон содержит контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловой промотор P53, ген *герL* и делецию внутри рамки считывания гена *kilA*.

10. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

11. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный первый и указанный второй ген бактериофага каждый содержит ген малой терминазы (*terS*), содержащий указанную последовательность сайта инициации упаковки.

12. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 11, в которой указанный ген *terS* представляет собой ген *terS* бактериофага ф11 или ф80α *S. aureus*.

13. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный репликон реплицирован из точки начала репликации плазмиды pT181 *S. aureus*.

14. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 5.

15. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит *рас-сайт*.

16. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный *рас-сайт* указанного второго гена бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 7.

17. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит *cos-сайт*.

18. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная

последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит конкатемерное сцепление.

19. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный второй ген бактериофага функционально связан с промотором.

5 20. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный промотор представляет собой индуцируемый промотор или конститутивный промотор.

21. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный бактериофаг включает бактериофаг P1 Enterobacteriaceae.

22. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный  
10 бактериофаг включает бактериофаг ф80α или бактериофаг ф11 *S. aureus*.

23. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная бактериальная клетка включает клетку *E. coli*.

24. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная бактериальная клетка включает клетку *S. aureus*.

15 25. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная бактериальная клетка включает грамотрицательную клетку.

26. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная бактериальная клетка включает грамположительную клетку.

27. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанный  
20 репортерный ген кодирует обнаруживаемый и/или селективный маркер.

28. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 27, в которой указанный репортерный ген выбирают из группы, состоящей из ферментов, опосредующих люминесцентные реакции (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *guc*, *nluc*), ферментов, опосредующих колориметрические реакции (*LacZ*, *HRP*), флуоресцентных белков (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*,  
25 *CFP*, *BFP*, *mCherry*, флуоресцентных белков ближней инфракрасной области), аффинных пептидов (*His-Tag*, *3X-FLAG*) и селективных маркеров (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*).

29. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер.

30. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 1, в которой указанная  
30 репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты, причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

31. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 30, в которой указанная  
35 последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

32. Упаковочная система бактериальной клетки по любому из пп. 1-31, в которой указанная копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна  
40 второй последовательности в указанной копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

33. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 32, в которой указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному  
45 транскрипту.

34. Способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, включающий:

обеспечение условий для указанной упаковочной системы бактериальной клетки по



любому из пп. 1-29, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага, для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой кислоты; и

выделение указанной нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей репортерную молекулу нуклеиновой кислоты.

35. Способ по п. 34, при котором указанная нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага.

36. Упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная упаковочная система бактериальной клетки содержит бактериальную клетку, содержащую:

лизогенизированный геном бактериофага, содержащий первую последовательность сайта инициации упаковки бактериофага, причем указанная первая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит молчащую мутацию, которая предотвращает упаковку молекулы нуклеиновой кислоты бактериофага в указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и

плазмиду с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей репортерный ген, содержащую вторую последовательность сайта инициации упаковки бактериофага, причем указанная вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага не содержит указанную мутацию и облегчает упаковку копии указанной плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанная копия плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты образует репликон для упаковки в указанную нерепликативную трансдукторную частицу,

причем указанный бактериофаг выбран из бактериофага P1 Enterobacteriaceae, бактериофага  $\phi 80\alpha$  или бактериофага  $\phi 11$  S. aureus.

37. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

38. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 37, в которой указанный промотор выбирают для способствования реактивности репортерной молекулы, экспрессированной из указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанной бактериальной клетке.

39. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит точку начала репликации.

40. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный репликон содержит конкатемер, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

41. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная первая и указанная вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага каждая содержит последовательность сайта инициации упаковки из гена малой терминазы.

42. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная первая и указанная вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага каждая содержит последовательность рас-сайта из гена *racA* бактериофага P1 Enterobacteriaceae.

43. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная первая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит SEQ ID NO: 2.

44. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага содержит SEQ ID NO: 1.

45. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный

репликон содержит литический репликон бактериофага P1 Enterobacteriaceae.

46. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 45, в которой указанный репликон содержит контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловый промотор P53, ген *repL* и делецию внутри рамки считывания гена *kilA*.

5 47. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

48. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная первая и указанная вторая последовательность сайта инициации упаковки бактериофага каждая содержит последовательность рас-сайта из гена малой терминазы (*terS*) бактериофага  
10 ф11 или ф80α *S. aureus*.

49. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный репликон реплицирован из точки начала репликации плазмиды pT181 *S. aureus*.

50. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 5.

15 51. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой последовательность сайта инициации упаковки содержит рас-сайт.

52. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой последовательность сайта инициации упаковки содержит *cos*-сайт.

53. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой  
20 последовательность сайта инициации упаковки содержит конкатемерное сцепление.

54. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная мутация в указанной первой последовательности сайта инициации упаковки бактериофага предотвращает расщепление указанной последовательности инициации упаковки.

55. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный  
25 бактериофаг включает бактериофаг P1 Enterobacteriaceae.

56. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный бактериофаг включает бактериофаг ф11 или ф80α *S. aureus*.

57. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой бактериальная клетка включает клетку *E. coli*.

30 58. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой бактериальная клетка включает клетку *S. aureus*.

59. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой бактериальная клетка включает грамотрицательную бактериальную клетку.

60. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой бактериальная  
35 клетка включает грамположительную бактериальную клетку.

61. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанный репортерный ген кодирует обнаруживаемый маркер и/или селективируемый маркер.

62. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 61, в которой указанный репортерный ген выбирают из группы, состоящей из: генов, кодирующих ферменты, опосредующие люминесцентные реакции (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *gus*, *nluc*), генов, кодирующих ферменты, опосредующие колориметрические реакции (*LacZ*, *HRP*), генов, кодирующих флуоресцентные белки (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*, *CFP*, *BFP*, *mCherry*, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), молекул нуклеиновых кислот, кодирующих аффинные пептиды (*His-Tag*, *3X-FLAG*), и генов, кодирующих селективные  
45 маркеры (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*).

63. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер.

64. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 36, в которой указанная

репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, комплементарную второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты, причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

65. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 64, в которой указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

66. Упаковочная система бактериальной клетки по любому из пп. 36-65, в которой указанная копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты, причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

67. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 66, в которой указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

68. Способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, включающий:

обеспечение условий для указанной упаковочной системы бактериальной клетки по любому из пп. 36-63, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой кислоты; и

выделение указанной нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей репортерную молекулу нуклеиновой кислоты.

69. Способ по п. 68, при котором указанная нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага.

70. Упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная упаковочная система бактериальной клетки содержит бактериальную клетку, содержащую:

лизогенизированный геном бактериофага, содержащий первый ген бактериофага, содержащий делецию последовательности сайта инициации упаковки указанного первого гена бактериофага, который предотвращает упаковку молекулы нуклеиновой кислоты бактериофага в указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и

плазмиду с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей репортерный ген, содержащую второй ген бактериофага, содержащий вторую последовательность сайта инициации упаковки, которая облегчает упаковку копии указанной плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты в указанную нерепликативную трансдукторную частицу, причем указанный второй ген бактериофага способен экспрессировать белок, который кодируется указанным вторым геном, причем указанная копия плазмиды с репортерной молекулой нуклеиновой кислоты образует репликон для упаковки в указанную нерепликативную трансдукторную частицу,

причем указанный бактериофаг выбран из бактериофага P1 Enterobacteriaceae, бактериофага  $\phi 80\alpha$  или бактериофага  $\phi 11$  S. aureus.

71. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

72. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 71, в которой указанный промотор выбирают для содействия реактивности репортерной молекулы,

экспрессированной из указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в указанной бактериальной клетке.

73. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой репортерная нуклеиновая кислота содержит точку начала репликации.

74. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный репликон содержит конкатемер, поддающийся упаковке в указанную нерепликативную трансдукторную частицу.

75. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный первый и указанный второй гены бактериофага каждый содержит ген *расА* бактериофага P1 Enterobacteriaceae и указанный первый и указанный второй гены бактериофага каждый содержит указанную первую и вторую последовательность сайта инициации упаковки.

76. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный первый ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 6.

77. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный второй ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 7.

78. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный репликон содержит литический репликон бактериофага P1 Enterobacteriaceae.

79. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 78, в которой указанный репликон содержит контролируемый репрессором C1 промотор P53, антисмысловой промотор P53, ген *repL* и делецию внутри рамки считывания гена *kilA*.

80. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 3.

81. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный первый и указанный второй гены бактериофагов каждый содержит ген малой терминазы (*terS*), содержащий указанную последовательность сайта инициации упаковки.

82. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 81, в которой указанный ген *terS* представляет собой ген *terS* бактериофага  $\phi 11$  или  $\phi 80\alpha$  *S. aureus*.

83. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный первый ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 8.

84. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный второй ген бактериофага содержит последовательность SEQ ID NO: 9.

85. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный репликон реплицирован из точки начала репликации плазмиды pT181 *S. aureus*.

86. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный репликон содержит последовательность SEQ ID NO: 5.

87. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит *рас*-сайт.

88. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит *cos*-сайт.

89. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой последовательность сайта инициации упаковки указанного второго гена бактериофага содержит конкатемерное сцепление.

90. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный второй ген бактериофага функционально связан с промотором.

91. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 90, в которой указанный промотор представляет собой индуцируемый промотор или конститутивный промотор.

92. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный бактериофаг содержит бактериофаг P1 Enterobacteriaceae.

93. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный бактериофаг содержит бактериофаг  $\phi 80\alpha$  или бактериофага  $\phi 11$  *S. aureus*.

5 94. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанная бактериальная клетка включает клетку *E. coli*.

95. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанная бактериальная клетка включает клетку *S. aureus*.

10 96. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой бактериальная клетка включает грамотрицательную клетку.

97. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой бактериальная клетка включает грамположительную клетку.

98. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанный репортерный ген кодирует обнаруживаемый и/или селективный маркер.

15 99. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 98, в которой указанный репортерный ген выбирают из группы, состоящей из генов, кодирующих ферменты, опосредующие люминесцентные реакции (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *rus*, *nluc*), генов, кодирующих ферменты, опосредующие колориметрические реакции (*LacZ*, *HRP*), генов, кодирующих флуоресцентные белки (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*, *CFP*, *BFP*, *mCherry*,  
20 флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), молекул нуклеиновых кислот, кодирующих аффинные пептиды (*His-Tag*, *3X-FLAG*), и генов, кодирующих селективные маркеры (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*).

100. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер.

25 101. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 70, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, комплементарную второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты, причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

30 102. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 101, в которой указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

103. Упаковочная система бактериальной клетки по любому из пп. 70-102, в которой указанная копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит  
35 последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, которая комплементарна второй последовательности в указанной копии указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты, причем указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

40 104. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 103, в которой указанная последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

105. Способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, включающий:

45 обеспечение условий для указанной упаковочной системы бактериальной клетки по любому из пп. 70-104, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой кислоты; и

выделение указанной нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей

репортерную молекулу нуклеиновой кислоты.

106. Способ по п. 105, при котором указанная нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага.

107. Упаковочная система бактериальной клетки для упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, где указанная упаковочная система бактериальной клетки содержит бактериальную клетку, содержащую:

10 лизогенизированный геном бактериофага, не содержащий упаковочный ген и содержащий гены, которые кодируют белки, которые образуют указанную нерепликативную трансдукторную частицу; и

молекулу нуклеиновой кислоты геномного острова, содержащую репортерную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую репортерный ген, и упаковочный ген.

108. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанный упаковочный ген содержит ген малой терминазы (terS).

15 109. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 108, в которой указанный ген terS содержит ген terS бактериофага  $\phi 80\alpha$  S. aureus или ген terS бактериофага  $\phi 11$  S. aureus.

110. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 108, в которой указанный ген terS содержит последовательность SEQ ID NO: 9.

20 111. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная молекула нуклеиновой кислоты геномного острова содержит молекулу нуклеиновой кислоты геномного острова SaPIbov2.

112. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанную молекулу нуклеиновой кислоты геномного острова выбирают из группы, состоящей из молекул нуклеиновой кислоты геномного острова SaPI, SaPI1, SaPI2, SaPIbov1 и SaPIbov2.

113. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором.

114. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит точку начала репликации.

115. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанный бактериофаг включает бактериофаг  $\phi 80\alpha$  или бактериофаг  $\phi 11$  S. aureus.

116. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная бактериальная клетка включает клетку S. aureus.

35 117. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная молекула нуклеиновой кислоты геномного острова содержит ген интегразы и в которой указанный ген интегразы кодирует белок-интегразу для вырезания и интеграции указанной молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из и в бактериальный геном указанной бактериальной клетки.

40 118. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 117, в которой указанный ген интегразы содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

119. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная молекула нуклеиновой кислоты геномного острова интегрирована в бактериальный геном указанной бактериальной клетки.

45 120. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанный упаковочный ген содержит последовательность рас-сайта.

121. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанный упаковочный ген содержит последовательность cos-сайта.

122. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанный упаковочный ген содержит конкатемерное сцепление.

123. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанный репортерный ген кодирует обнаруживаемый маркер и/или селективируемый маркер.

5 124. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 123, в которой указанный репортерный ген выбирают из группы, состоящей из ферментов, опосредующих люминесцентные реакции (luxA, luxB, luxAB, luc, gus, nluc), ферментов, опосредующих колориметрические реакции (LacZ, HRP), флуоресцентных белков (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, флуоресцентные белки ближней инфракрасной области), аффинных пептидов (His-Tag, 3X-FLAG) и селективных маркеров (ampC, tet(M), CAT, erm).

125. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит аптамер.

126. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная молекула нуклеиновой кислоты геномного острова не содержит ген интегразы.

15 127. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 126, дополнительно содержащая бактериальный ген, содержащий ген интегразы, функционально связанный с промотором, и причем указанный ген интегразы кодирует белок-интегразу для вырезания и интеграции указанной молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из и в бактериальный геном указанной бактериальной клетки.

20 128. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 107, в которой указанная репортерная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, комплементарную второй последовательности в указанной репортерной молекуле нуклеиновой кислоты.

25 129. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 128, в которой последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

130. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 128, в которой последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

30 131. Упаковочная система бактериальной клетки по любому из пп. 107-130, в которой указанная копия указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты содержит последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты, комплементарную второй последовательности в указанной копии указанной репортерной молекулы нуклеиновой кислоты.

35 132. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 131, в которой последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты комплементарна клеточному транскрипту.

40 133. Упаковочная система бактериальной клетки по п. 131, в которой последовательность транскрипта нуклеиновой кислоты содержит цис-репрессорную последовательность.

134. Способ упаковки репортерной молекулы нуклеиновой кислоты в нерепликативную трансдукторную частицу, включающий:

45 обеспечение условий для указанной упаковочной системы бактериальной клетки по любому из пп. 107-133, которые индуцируют литическую фазу указанного бактериофага для получения нерепликативных трансдукторных частиц, упакованных с указанной репортерной молекулой нуклеиновой кислоты; и

выделение указанной нерепликативной трансдукторной частицы, содержащей указанную репортерную молекулу нуклеиновой кислоты.

135. Способ по п. 134, при котором указанная нерепликативная трансдукторная частица не содержит реплицируемый геном бактериофага.

136. Способ по п. 134, при котором указанная индукция указанной литической фазы запускает удаление указанной молекулы нуклеиновой кислоты геномного острова из  
5 указанного генома указанной бактериальной клетки.

10

15

20

25

30

35

40

45



## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ДЖЕНЕВИВ БИОСАЙНСИС, ИНК.

<120> НЕРЕПЛИКАТИВНЫЕ ТРАНСДУКТОРНЫЕ ЧАСТИЦЫ И ОСНОВАННЫЕ НА ТРАНСДУКТОРНЫХ ЧАСТИЦАХ РЕПОРТЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

<130> 28421-25938/РСТ

<140> РСТ/US2014/026536

<141> 2014-03-13

<150> 61/939,126

<151> 2014-02-12

<150> 61/897,040

<151> 2013-10-29

<150> 61/779,177

<151> 2013-03-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 177

<212> DNA

<213> Enterobacteria phage P1

<400> 1

ccactaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg 60

gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgttgta gtgccgcagt cgagaatgcg 120

aagcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcg 177

<210> 2

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 2

ccactaaaa gcatgataat agaccactct aacgaccaac atgcagggga gcacattgcg 60

gctgaaatag cggaaaagca gaggtgtaat gccgttgta gtgccgcagt cgagaatgcg 120

aagcgccaaa ataagcgcat aaacgaccgt tcagacgacc atgacgttat taccgcg 177

<210> 3

<211> 1727

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 3

cactataggg cgaattggcg gaaggccgtc aaggccgcat ttgggcccgg cgcgccggat 60

ccgctagctc tagactggca ggtttctgag cagatcgctc aaccgatctt ggatcgggtc 120

agaaaaattt gctctaataa atttcgtttt ctaagtgcaa agaataacca ttctgagctg 180

gtgattgaag gttgatgcaa atttgagaa aaaatgcaac aaacattcaa tgcggatatg 240

```

aatatatcaa accttcatca aaatgtcgat ccttcaacca ctctgcccgt tatttgtggt 300
gttgaaatta cgaccgaccg cgctggccgt tacaacctta atgctctaca cagagcgagc 360
ggactcggtg cccataaagc gccagctcaa tggctaagaa cgctgtcagc taaacagctc 420
atcgaagagc ttgaaaaaga aactatgcag aattgcatag tttcgttcac aagcaatgga 480
agcaggatth ctttcacgac tcgtataacc ggcaaaggct agcagtggct gatgaagcga 540
ttgcttgatg ctggtgtgct ggtacctgtc gcggcaacgc gctaacagac gtagtaagaa 600
ccaccagcat tgtaatgctg gctaaagtca ctttcctgag ctgtataacg atgagcgatt 660
ttactttttc tggctatgaa ttggcctgct ttgtaacaca ctccggtcta tcccgtagcg 720
ccgggcataat cctgtcgcaa tgtgcaaadc tcgcggaac aaccagtga tacttcattc 780
acaagcctca ccgctgatc gcggcagaaa ctggttatag ccaatcaacc gtcgttcgtg 840
cattccgtga agctgtaaac aaaggaattc tgtctgtaga gattgttacc ggcgatcacc 900
gtgaacgtcg cgtaacctg taccggttta caccatcctt tttggccttc gcacaacaag 960
ccaaaaatgc gctgatagaa agcaaatata agatctcttc agcggcaacc aagggttaag 1020
ctgttctcgc taagacattg gctttattta atttttatc cacaccccca tgtcaaaatg 1080
atccccctc cccctgtcag gatgacgtgg caataaagaa taagaagtca caagttaaaa 1140
aaacaaaaag atcagtttcc ggcggtgccg gaacaaccag cctcaaaaaa ttgacttcat 1200
ggatcgctaa ggcaaaagca aaggctgaca atctgcggtt atccaaaaaa cgcactcaaa 1260
aacatgagtt caagcagaaa gtagaggcgg ctgcgcgga atatgcttac ctgaagaaca 1320
agcgttcgcc tgatattggc gggatatcaa acttcgataa cctaccgcat tgcagacgg 1380
taaacgaagc tcttaatgcg gttttagcca aaaataaaga taacgaaca tggggtatac 1440
cggcaggatt cagagggtaa tgaattgctc taattataac catgcatact ttcaacacct 1500
ctagtttgcc atgaggcaaa ctcataggtg tcttggttaag aggacactgt tgccaaaact 1560
ggacgcccc ttattgcaat taataaaca ctaacggaca attctaccta acaataagt 1620
gcttaaaaa acccgcccc gcgggttttt ttatctagag ctacgggatc cggcgcgccg 1680
ggcccttctg ggcctcatgg gccttcgct cactgcccgc tttccag 1727

```

```

<210> 4
<211> 131
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide

```

```

<400> 4
cgtcagggtg cacttttcgg gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat ttctaaata 60
cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga 120
aaaggaagag t 131

```

```

<210> 5
<211> 4681
<212> DNA

```

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<220>

<221> modified\_base

<222> (301)..(301)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220>

<221> modified\_base

<222> (4056)..(4056)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 5

```

tttgcggaag gagttagtaa gttaacagaa gacgagccaa acctaaatgg tttagcagga      60
aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac aggaacagca acaagagcaa      120
caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtatg cacttataga acatgcattt atgccgagaa      180
aacttattgg ttggaatggg ctatgtgtta gctaaacttg tagcgagttg gttggacttg      240
aattgggatt aatcccaaga aagtaccggc tcaacaaccc ataaagccct gtaggttccg      300
nccaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagttga agaaatgaaa ttcagagaag      360
cctttgagaa ttttataaca agtaagtatg tacttgggtg tttagtagtc ttaactgttt      420
accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc tgattagacc aaatcttttg      480
atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca cgccctacca aagtttgtag      540
acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgtttttat aatcttgtag atttagatat      600
taaacgatat ttaaataatac atcaagatat atatttgggt gagcgattac ttaaagaaa      660
ttgagattaa ggagtcgatt ttttatgtat aaaaacaatc atgcaaatca ttcaaatcat      720
ttggaaaaatc acgatttaga caatttttct aaaaccggct actctaatag ccggttggac      780
gcacatactg tgtgcatatc tgatccaaaa ttaagttttg atgcaatgac gatcgttggg      840
aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaaattta tgagtgtaga gccccaaata      900
agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag cacttcaaga aaaagtttat      960
attgaatatg acaaagtgaag agcagatagt tgggatatag gtaatatgag tattgaattt     1020
aatccaaaca aacttacacg agatgaaatg atttgggtta aacaaaatat aataagctac     1080
atggaagatg acggttttac aagattagat tttagccttg attttgaaga tgatttgagt     1140
gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaaacta ttttttatgg tcgtaatggg     1200
aagccagaaa caaaatatat tggcgtgaga gatagtaata gatttattag aattttataat     1260
aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta tgtctgaaca tttatggcgt     1320
gtagaaatcg aacttaaaag agatatggtg gattactgga atgattgctt tagtgattta     1380
catatcttgc aaccagattg gaaaactatc caacgcactg cggatagagc aatagttttt     1440
atgttattga gtgatgaaga agaattggga aagcttcaca gaaattctag aacaaaatat     1500
aagaatttga taaaagaaat ttcgccagtc gatttaacgg acttaatgaa atcgacttta     1560
aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaa atcgattttt ggcaaatga atttaaatat     1620

```

tggaatagt gtacatatta atattactga acaaaatga tatatttaa ctattcta	1680
ttaggaggat ttttttatga agtgtctatt taaaaattg gggaatttat atgaggtgaa	1740
agaataattht acccctataa acttttagcca cctcaagtaa agaggtaaaa ttgtttagtt	1800
tatataaaaa atttaaaggt ttgttttata gcgttttatt ttggctttgt attctttcat	1860
tttttagtgt attaaatgaa atggttttta atgtttcttt acctgatatt gcaaatcatt	1920
ttaatactac tcctggaatt acaaaactggg taaacactgc atatatgtta actttttcga	1980
taggaacagc agtatatgga aaattatctg attatataaa tataaaaaa ttgttaatta	2040
ttgggtattag tttagctgt cttggttcat tgattgcttt tattgggccc acctaggcaa	2100
atatgtctctt acgtgctatt atttaagtga ctatttaaaa ggagttaata aatatgcggc	2160
aagggtattct taaataaact gtcaatttga tagcgggaac aaataattag atgtcctttt	2220
ttaggagggc ttagtttttt gtaccagtt taagaatacc tttatcatgt gattctaaag	2280
tatccagaga atatctgtat gctttgtata cctatggta tgataaaaa tcccagtgat	2340
aaaagtattt atcactggga tttttatgcc cttttgggtt ttgaaatgga ggaaaatcac	2400
atgaaaatta ttaatatgg agtttttagct catgttgatg caggaaaaac taccttaaca	2460
gaaagcttat tatataacag tggagcgatt acagaattag gaagcgtgga caaaggta	2520
acgaggacgg ataatacgt tttagaacgt cagagaggaa ttacaattca gacaggata	2580
acctcttttc agtgggaaaa tacgaagggt aacatcatag acacgccagg acatatggat	2640
ttcttagcag aagtatatcg ttcattatca gtttttagatg gggcaattct actgatttct	2700
gcaaaagatg gcgtacaagc acaaaactcg atattatttc atgcacttag gaaaatggg	2760
attcccacaa tcttttttat caataagatt gaccaaaatg gaattgattt atcaacggtt	2820
tatcaggata ttaaagagaa actttctgcc gaaattgtaa tcaaacagaa ggtagaactg	2880
tatcctaata tgtgtgtgac gaactttacc gaatctgaac aatgggatac ggtaatagag	2940
ggaaacgata accttttaga gaaatatatg tccggtaaat cattagaagc attggaactc	3000
gaacaagagg aaagcataag atttcagaat tgttctctgt tccctcttta tcatggaagt	3060
gcaaaaagta atatagggat tgataacctt atagaagtta ttactaataa attttattca	3120
tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc ggaatgttt tcaaaattga atatacaaaa	3180
aaaagacaac gtcttgcata tatacgcttt tatagtggag tactacattt acgagattcg	3240
gtagagtat cagaaaaaga aaaaataaaa gttacagaaa tgtatacttc aataaatggt	3300
gaattatgta agattgatag agcttattct ggagaaattg ttattttgca aaatgagttt	3360
ttgaagttaa atagtgttct tggagataca aaactattgc cacagagaaa aaagattgaa	3420
aatccgcacc ctctactaca acaactgtt gaaccgagta aacctgaaca gagagaaatg	3480
ttgcttgatg cctttttgga aatctcagat agtgatccgc ttctacgata ttacgtggat	3540
tctacgacac atgaaattat actttctttc ttagggaag tacaatgga agtgattagt	3600
gcactgttgc aagaaaagta tcatgtggag atagaactaa aagagcctac agtcatttat	3660
atggagagac cgtaaaaaa tgcagaatat accattcaca tcgaagtgcc gccaaatcct	3720
ttctgggctt ccattggtt atctgtatca ccgcttccgt tgggaagtgg aatgcagtat	3780

gagagctcgg tttctcttgg atacttaa at caatcatttc aaaatgcagt tatggaagg 3840  
 gtacgctatg gttgcgaaca aggattatat ggttggaatg tgacggattg taaaatctgt 3900  
 tttaagtacg gtttatacta tagccctgtt agtactccag cagattttcg gatgcttact 3960  
 cctattgtac tggagcaagc ctttagaaaa gctggaacag aattgttaga gccatatctt 4020  
 agttttaaag tttatgcacc acaggaatat ctttcncggg catataacga tgctcccaaa 4080  
 tattgtgcaa atatcgtaaa tactcaactg aaaaataatg aggtcattat tattggagaa 4140  
 attcctgctc gatgtattca agattatcgc aatgatttaa ctttttttac aaatgggctt 4200  
 agtgtttgtt tagcagagct aaaaggatat caggttacca ctggcgaaac tgtttgccag 4260  
 acccgctgctc taaatagtcg gatagataaa gtaagatata tgttcaataa aataacttag 4320  
 tgcgttttat gttgttatat aaatatggtt tcttattaaa taagatgaaa tattctttaa 4380  
 tatagatttg aattaaagtg gaaaggagga gattgttatt ataaactaca agtggatatt 4440  
 gtgtcctatt tgtggaaata aaacaagact acgaatacga gtggatacta tacttaaaaa 4500  
 tttcccttta tacagcccca aatgtaagaa cgaaacttta attaatgttc aaaaaatgaa 4560  
 tataataaca atcaaagagc cagacgcaa gacgcagagc cgataatttg agaaatgaaa 4620  
 ctctcatctt atcggctctt tttgtttatc tgaattttac tgactagcct tcaatatttc 4680  
 c 4681

<210> 6  
 <211> 1194  
 <212> DNA  
 <213> Enterobacteria phage P1

<400> 6  
 gtgacctggg acgatcacia gaagaatttt gctcgcctgg cgcgagatgg tggttacacc 60  
 atcgcacagt atgccgccga gtttaatctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt 120  
 gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag 180  
 ccactaaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcy 240  
 gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgttgtca gtgccgcagt cgagaatgcy 300  
 aagcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgcc 360  
 caccggacct tacgtgatcg cctggaacgc gacaccctgg atgatgatgg tgaacgcttt 420  
 gaattcgaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgcggaaggc cgcgcgcgct 480  
 atgttgcgct ggtccggggc cgatgttctg gaaaccactc ttctggaaaa gtctctttct 540  
 catctcctta tgctggagaa cgccagggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcgc 600  
 gatcagcaaa aagacgatga tgaaggatct ccgctgaat accgtatcgc gagcatgcta 660  
 aacagctgtt ccgcgcagat aagcagcctg atcaacacca ttacagcat ccggaataac 720  
 tatcgaaaag aaagccggga ggcgaaaaag cagcgtttat ctatggggca agctggcatt 780  
 gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgcctgga agcggctgaa 840  
 ttcacgagg cgcatggagg aaaagtgcg cccctgatgc tggagcaaat caaagccgat 900  
 ctgcgtgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aaacagcatc tggcgctcca 960  
 tcacttgaag atctggataa aatcgcgcga gaacgggccc ccagccgccg cgctgatgcc 1020

```

gcattgtgga ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatac aggtggttat 1080
ggtgatgtcg atgcggaagg catatcaaac gaagcatggc ttgaacagga tctggacgaa 1140
gacgaggagg aagacgaaga agttacccgc aaactgtacg gggatgatga ttaa 1194

```

```

<210> 7
<211> 1194
<212> DNA
<213> Enterobacteria phage P1

```

```

<400> 7
gtgacctggg acgatcaca gaagaatttt gctcgcttgg cgcgagatgg tggttacacc 60
atcgacacagt atgccgccga gtttaattctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt 120
gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag 180
ccactaaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcagggtga tcacattgcy 240
gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgttgtca gtgccgcagt cgagaatgcy 300
aagcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgcc 360
caccggacct tacgtgatcg cctggaacgc gacaccctgg atgatgatgg tgaacgcttt 420
gaattcgaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgcggaaggc cgcgcgcgt 480
atgttgcgtc ggtccggggc cgatgttctg gaaaccctc ttctggaaaa gtctctttct 540
catctcctta tgctggagaa cgccagggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcgc 600
gatcagcaaa aagacgatga tgaaggctact ccgcctgaat accgtatcgc gagcatgcta 660
aacagctggt ccgcgcgat aagcagcctg atcaacacca ttacagcat ccggaataac 720
tatcgaaaag aaagccggga ggcggaag cagcgtttat ctatggggca agctggcatt 780
gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgcgtga agcggctgaa 840
ttcatcgagg cgcattggagg aaaagtgcg cccctgatgc tggagcaaat caaagccgat 900
ctgcgtgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aaacagcatc tggcgctcca 960
tcacttgaag atctggataa aatcgcgga gaacggggcc ccagccgccg cgtgatgcc 1020
gcattgtgga ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatac aggtggttat 1080
ggtgatgtcg atgcggaagg catatcaaac gaagcatggc ttgaacagga tctggacgaa 1140
gacgaggagg aagacgaaga agttacccgc aaactgtacg gggatgatga ttaa 1194

```

```

<210> 8
<211> 525
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
        polynucleotide

<400> 8
atgaacgaaa acaaaaagag attcgagat gaatatataa tgaatggatg taatggtaa 60
aaagcagcaa tttagcagg ttatagtaag aaaacagcag agtcttttagc aagtcgattg 120
ttaagaaatg ttaatgtttc ggaatatatt aaagaacgat tagaacagat acaagaagag 180
cgtttaatga gcattacaga agcttttagc ttatctgctt ctattgctag aggagaacct 240

```

caagaggctt acagtaagaa atatgaccat ttaaacgatg aagtggaaaa agaggttact 300  
 tacacaatca caccaacttt tgaagagcgt cagagatcta ttgaccacat actaaaagtt 360  
 catggtgcgt atatcgacaa aaaagaaatt actcagaaga atattgagat taatattaga 420  
 tctattgacc acatactaaa agttcatggt gcgtatatcg acaaaaaaga aattactcag 480  
 aagaatattg agattaatat tggtagtac gatgacgaaa gttaa 525

<210> 9  
 <211> 663  
 <212> DNA  
 <213> Staphylococcus phage 80alpha

<400> 9  
 aattggcagt aaagtggcag tttttgatac ctaaaatgag atattatgat agtgtaggat 60  
 attgactatc ttactgcgtt tcccttatcg caattaggaa taaaggatct atgtgggttg 120  
 gctgattata gccaatcctt ttttaatttt aaaaagcgta tagcgcgaga gttggtggta 180  
 aatgaaatga acgaaaaaca aaagagattc gcagatgaat atataatgaa tggatgtaat 240  
 ggtaaaaaag cagcaatttc agcaggttat agtaagaaaa cagcagagtc tttagcaagt 300  
 cgattgttaa gaaatgttaa tgtttcggaa tatattaaag aacgattaga acagatacaa 360  
 gaagagcgtt taatgagcat tacagaagct tttagcgttat ctgcttctat tgctagagga 420  
 gaacctcaag aggcttacag taagaaatat gacctttaa acgatgaagt ggaaaaagag 480  
 gttacttaca caatcacacc aacttttgaa gagcgtcaga gatctattga ccacatacta 540  
 aaagttcatg gtgcgtatat cgacaaaaaa gaaattactc agaagaatat tgagattaat 600  
 attggtgagt acgatgacga aagttaaatt aaactttaac aaaccatcta atgttttcaa 660  
 cag 663

<210> 10  
 <211> 1116  
 <212> DNA  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 10  
 tcataaatat ttaactatct ttttctgtgt actaggggtac aaatgaccgt atcggttata 60  
 tacttcatta ctatcagcat ggcctaaacg ctgtgctatt accatgatac ttgcgccatg 120  
 attgactagc atagacgcat ggctatgtct taactcatga attacaattc tagggaatgt 180  
 ctgaccgtct ggtagttgtt catctaatac ttttaatgca gcggtaaacc aacgatctat 240  
 agttgattca ctataagctt tgaagaatgt accgaataat acataatcat ctttatatac 300  
 attgttttct ttgtaccatt ttaaatattc tttgatatac ttcatcatgt gaacaggtaa 360  
 gtatatatac cgtattgctg cttttgtttt aggggctgtc acttcaccgt gatagtctgt 420  
 tttgttaata tgtatgaaat catcatcata gttaatatca cgccatgtga gggctctaatt 480  
 ttcgccctta cgtgcaccag agtaaaacag tagcttaaag aataactttt gttgttgtgt 540  
 agctaaagcc tcatagaatt gattgaattg ttctaattgc caatagttca aacgcttatt 600  
 tgattctatt tcaaagttac ctactagaga ggctacattt tgcttttagat catgaaactt 660  
 catagcatgg ttaagtaacg atactaagaa cacgtgcatt ttcttttaggt actctccaga 720

```

gtgtccctct ttttaacttcg tattctgaaa cttcataata tcttgtgtag tcatattaaa 780
cacgtccata gacttaaaat agggtagcaa atggttggtt gtatgtgtct ttaatgcttt 840
cacactagat gacttacgac gtgcagaata ccactctata tactcatcta cgagcttatac 900
aaagggcagt ttgtttatct gtcttacacc ctctaactcg tccataattt cattacattt 960
cttcaatgcc tctttacgct gtttaaagcc actctttttt atttctttac gttgattaaa 1020
tttatcatag tttttatatac gaaaatagta tgtaccacgt ttagcgctctt tatatatgtt 1080
gtgggatagg ttttaagttgt gttctatggg aatcac 1116

```

```

<210> 11
<211> 10844
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide

```

```

<220>
<221> modified_base
<222> (8807)..(8807)
<223> a, c, t, g, unknown or other

```

```

<400> 11
ctcgggccgt ctcttgggct tgatcggcct tcttgcgcat ctcacgcgct cctgcggcgg 60
cctgtagggc aggtcatata ccctgccgaa ccgcttttgt cagccggctc gccacggctt 120
ccggcgcttc aacgcgcttt gagattccca gcttttcggc caatccctgc ggtgcatagg 180
cgcgtggctc gaccgcttgc gggctgatgg tgacgtggcc cactggtggc cgctccaggg 240
cctcgtagaa cgcctgaatg cgcgtgtgac gtgccttgct gccctcgaag ccccgttgca 300
gccctagatc ggccacagcg gccgcaaacg tggctctggc gcgggtcatc tgcgctttgt 360
tgccgatgaa ctccttggcc gacagcctgc cgtcctgcgt cagcggcacc acgaacgcgg 420
tcatgtgcgg gctggtttcg tcacggtgga tgctggccgt cagcatgcga tccgccccgt 480
acttgctcgc cagccacttg tgcgccttct cgaagaacgc cgcctgctgt tcttggttgg 540
ccgacttcca ccattccggg ctggccgtca tgacgtactc gaccgccaac acagcgtcct 600
tgcgcgctt ctctggcagc aactcgcgca gtcggcccat cgcttcatcg gtgctgctgg 660
ccgcccagtg ctcgttctct ggcgtcctgc tggcgtcagc gttgggcgtc tcgcgctcgc 720
ggtaggcggt cttgagactg gccgccacgt tgccattttt cgcagcttc ttgcatcgca 780
tgatcgcgta tgccgccatg cctgccctc ccttttggtg tccaaccggc tcgacggggg 840
cagcgcaagg cgggtgcctc ggcggggcac tcaatgcttg agtatactca ctagactttg 900
cttcgcaaag tcgtgaccgc ctacggcggc tgccggccat tacgggcttg ctctccgggc 960
ttcgccctgc gcggtcgtc cgctcccttg ccagcccgtg gatatgtgga cgatggccgc 1020
gagcggccac cggctggctc gcttcgctcg gccctgggac aaccctgctg gacaagctga 1080
tggacaggct gcgctgccc acgagcttga ccacagggat tgcccaccgg ctaccactat 1140
agggcgaatt ggcggaaggc cgtcaaggcc gcatttgggc ccggcgcgcc ggatccgcta 1200

```



gctctagacc tctagaccag ccaggacaga aatgcctcga cttcgctgct gccaaggtt	1260
gccgggtgac gcacaccgtg gaaacggatg aaggcacgaa ccagtggtgac ataagcctgt	1320
tcggttcgta agctgtaatg caagtagcgt gcccgttccg ggccttttga catgtgactt	1380
tcgttacctt cgcgtcaaaa agagttttta cgaaggaag cataagtacg ctgggacgat	1440
cacaagaaga attttgctcg cctggcgca gatggtggtt acaccatcg acagtatgcc	1500
gccgagttta atcttaacct taataccgca cgtcgttatc tccgtgcctt caaagaagac	1560
accaggacta cggacagccg caagccaaat aagccagtca ggaagccact aaaaagcatg	1620
atcattgatc actctaata tcaacatgca ggtgatcaca ttgcggctga aatagcggaa	1680
aaacaaagag ttaatgccgt tgtcagtgcc gcagtcgaga atgcgaagcg ccaaaataag	1740
cgcataaatg atcgttcaga tgatcatgac gtgatcacc gcgcccaccg gaccttacgt	1800
gatcgctgga aacgcgacac cctggatgat gatggtgaac gctttgaatt cgaagtggc	1860
gattacctga tagataacgt tgaagcgcg aagccgcgc gcgctatgtt gcgtcggtcc	1920
ggggccgatg ttctgaaac cactcttctg gaaaagtctc tttctcatct cttatgctg	1980
gagaacgccg gggatacgtg tattcgctg gtgcaggaaa tgcgcatca gcaaaaagac	2040
gatgatgaag gtactccgca tgaataccgt atcgcgagca tgctaaacag ctgttccgca	2100
cagataagca gcctgatcaa caccatttac agcatccgga ataactatcg aaaagaaagc	2160
cgggagcgcg aaaagcacgc tttatctatg gggcaagctg gcattgttaa gctggcatac	2220
gaacgaaagc gtgaaaataa ctggtcagtg ctggaagcgc ctgaattcat cgaggcgcat	2280
ggaggaaaag tgccgcccct gatgctggag caaatcaaag ccgatctgca tgctcctaag	2340
accaataccg atgatgagga aaaccaaaca gcatctggcg ctccatcact tgaagatctg	2400
gataaaatcg cgcgagaacg ggccgccagc cgccgcgctg atgccgatt gtggattgag	2460
catcgtagag aagaaattgc cgatctgctg gatacagggt gttatggtga tgcgatgca	2520
gaaggcatat caaacgaagc atggcttgaa caggatctgg acgaagacga ggaggaaagc	2580
gaagaagtta cccgcaaact gtacggggat gatgattaat taacaaacc cgccccggcg	2640
ggttttttta tctagagcta gcggtaccgc cgccggggc cttctggtg ctcattggcc	2700
ttccgctcac tgcccgctt ccagcactat agggcgaatt ggcggaaggc cgtcaaggcc	2760
gcatttgggc ccggcgccgc ggatccgcta gctctagact ggcagggttc tgagcagatc	2820
gtccaaccgc atctggatcg ggtcagaaaa atttgctcta ataaatttcg ttttctaagt	2880
gcaaagaatc accatttcga gctggtgatt gaagggtgat gcaaatttg agaaaaaatg	2940
caacaaacat tcaatgcgga tatgaatata tcaaaccttc atcaaatgt cgatccttca	3000
accactctgc ccgttatctg tgggtgtgaa attacgaccg accgcgctgg ccgttacaac	3060
cttaatgctc tacacagagc gagcggactc ggtgcccata aagcgccagc tcaatggcta	3120
agaacgctgt cagctaaaca gctcatcgaa gagcttgaaa aagaaactat gcagaattgc	3180
atagtttcgt tcacaagcaa tggaagcagg atttctttca cgactcgat aaccggcaaa	3240
ggtcagcagt ggctgatgaa gcgattgctt gatgctggtg tgctggtacc tgcgcggca	3300
acgcgctaac agacgtagta agaaccacca gcattgtaat gctggctaaa gtcactttcc	3360

tgagctgtat aacgatgagc gattttactt tttctggcta tgaattggcc tgctttgtaa	3420
cacactccgg tctatcccgt agcgccgggc atatcctgtc gcaatgtgca aatctcgcgg	3430
caacaaccag tgaatacttc attcacaagc ctcaccgcct gatcgcggca gaaactggtt	3540
atagccaatc aaccgctcgt cgtgcattcc gtgaagctgt aaacaaagga attctgtctg	3600
tagagattgt tatcggcgat caccgtgaac gtcgcgctaa cctgtaccgg ttacacccat	3660
cctttttggc cttcgacaaa caagccaaaa atgcgctgat agaaagcaaa ttaaagatct	3720
cttcagcggc aaccaagggt aaagctgttc tcgctaagac attggcttta tttaattttt	3780
tatccacacc cccatgtcaa aatgataccc cctccccctg tcaggatgac gtggcaataa	3840
agaataagaa gtcacaagtt aaaaaaacia aaagatcagt ttccggcggg gccggaacia	3900
ccagcctcaa aaaattgact tcatggatcg ctaaggcaaa agcaaaggct gacaatctgc	3960
ggttatccaa aaaacgcact caaaaacatg agttcaagca gaaagtagag gcggctgcgc	4020
ggaaatatgc ttacctgaag aacaagcgtt cgcctgatat tggcgggata tcaaacctcg	4080
ataacctacc gcattgcatg acggtaaacg aagctcttaa tgcggtttta gccaaaaata	4140
aagataacga acaatggggg ataccggcag gattcagagg gtaatgaatt gctctaatta	4200
taacctgca tactttcaac acctctagtt tgccatgagg caaactcata ggtgtcctyg	4260
taagaggaca ctgttgccaa aactggacgc cccattattg caattaataa acaactaacg	4320
gacaattcta cctaacaata agtggcttaa aaaaaccgc cccggcgggt ttttttatct	4380
agagctagcg gatccggcgc gccgggccct tctgggcctc atgggccttc cgctcactgc	4440
ccgctttcca gccagccttc gaccacatac ccaccggctc caactgcgcg gcctgcggcc	4500
ttgccccatc aattttttta attttctctg gggaaaagcc tccggcctgc gcctgcgcg	4560
cttcgcttgc cggttggaac ccaagtggaa ggcgggtcaa ggctcgcga gcgaccgcgc	4620
agcggcttgg ccttgacgcg cctggaacga cccaagccta tgcgagtggg ggcagtcgaa	4680
ggcgaagccc gcccgctgc ccccgagac ctgcaggggg gggggggcgc tgaggctgc	4740
ctcgtgaaga aggtgttgt gactcatacc aggcctgaat cgccccatca tccagccaga	4800
aagtgaggga gccacggtg atgagagctt tgtttagagt ggaccagttg gtgattttga	4860
acttttgctt tgccacggaa cggctgcgt tgtcgggaag atgcgtgatc tgatccttca	4920
actcagcaaa agttcgattt attcaaaaa gccgccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgct	4980
ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg	5040
aaactgcaat ttattcatat caggattatc aataccatat ttttgaaaa gccgtttctg	5100
taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc	5160
tgcgattccg actcgtccaa catcaataca acctattaat ttccccctcg caaaaataag	5220
gttatcaagt gagaaatcac catgagtgc gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt	5280
atgcatttct ttccagactt gttcaacagg ccagccatta cgctcgtcat caaaatcact	5340
cgcatcaacc aaaccgttat tcattcgtga ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgatc	5400
gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat cgaatgcaac cggcgcagga aactgccag	5460
cgcatcaaca atattttcac ctgaatcagg atattcttct aatacctgga atgctgtttt	5520

```

ccccgggatc gcagtgggtga gtaaccatgc atcatcagga gtacggataa aatgcttgat 5580
ggctcggaaga ggcataaatt ccgtcagcca gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc 5640
attggcaacg ctacctttgc catgtttcag aaacaactct ggcgcacgag gcttcccata 5700
caatcगतag attgtcgcac ctgattgcc gacattatcg cgagcccatt tataaccata 5760
taaatacagca tccatgttgg aatttaatcg cggcctcgag caagacgttt cccgttgaat 5820
atggctcata acacccttg tattactgtt tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga 5880
tgatatattt ttatcttggt caatgtaaca tcagagattt tgagacacaa cgtggctttc 5940
ccccccccc ctgcaggctc cgagcctcac ggcggcgagt gcgggggttc caagggggca 6000
gcgccacctt gggcaaggcc gaaggccgag cagtcgatca acaagccccg gagggggcac 6060
tttttgccgg aggggggagcc gcgcgaagg cgtgggggaa ccccgaggg gtgcccttct 6120
ttgggcacca aagaactaga tataggcgga aatgcgaaag acttaaaaa caacaactta 6180
aaaaaggggg gtacgcaaca gctcattgag gcacccccg caatagctca ttgcgtaggt 6240
taaagaaaat ctgtaattga ctgccacttt tacgcaacgc ataattgtt tcgcgctgcc 6300
gaaaagtgtc agctgattgc gcatgggtgc gcaaccgtgc ggcacccta ccgcatggag 6360
ataagcatgg ccacgcagtc cagagaaatc ggcattcaag ccaagaacaa gcccggtcac 6420
tgggtgcaaa cggaacgcaa agcgcatgag gcgtgggccc ggcttattgc gaggaaaccc 6480
acggcgga ca tgctgtgca tcacctgtg gcgcagatgg gccaccagaa cgccgtggtg 6540
gtcagccaga agacactttc caagctcatc ggacgttctt tgcggacggt ccaatacgca 6600
gtcaaggact tgggtggcca gcgctggatc tccgtcgtga agctcaacgg ccccggcacc 6660
gtgtcggcct acgtgtgcaa tgaccggtg gcgtggggcc agccccgca ccagtgtgcg 6720
ctgtcgggtg tcagtgcgcg cgtgtgtgtt gatcacgagc accaggacga atcgtgttg 6780
gggcatggcg acctgcgcc catcccgacc ctgtatccgg gcgagcagca actaccgacc 6840
ggccccggcg aggagccgcc cagccagccc ggcattccgg gcatggaacc agacctgcca 6900
gccttgaccg aaacggagga atgggaacgg gcggggcagc agcgctgcc gatgccgat 6960
gagccgtgtt ttctggacga tggcgagccg ttggagccgc cgacacgggt cacgtgccg 7020
cgccggtagc acttgggttg cgcagcaacc cgtaagtgc ctgttcaga ctatcggctg 7080
tagccgcctc gccgccctat acctgtgtg cctccccg cggtgcgcg gtgcatggag 7140
ccgggccacc tcgacctgaa tggagccgg cggcacctcg ctaacggatt caccgttttt 7200
atcaggctct gggaggcaga ataatgatc atatcgtcaa ttattacctc cagggggaga 7260
gcctgagcaa actggcctca ggcatttgag aagcacacgg tcacactgct tccggtagtc 7320
aataaaccgg taaaccagca atagacataa gcggctatct aacgaccctg ccctgaaccg 7380
acgaccgggt cgaatttgct ttcgaaattc tgccattcat ccgttatta tacttattca 7440
ggcgtagcac caggcgttta agggcaccaa taactgcctt aaaaaatta cggccgccc 7500
tgccactcat cgcactcgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcg aaccctatt 7560
tgtttatttt tctaaatata ttcaaatatg tatccgtca tgagacaata accctgataa 7620
atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgaagtgtt gaaatatttg ttttctgtat 7680

```

caaccaccag	gtgaaactca	taagctaagt	aatggatcgc	tttgttcggc	ttggtatcgc	7740
ctcagaagag	taggggttga	tacatatagg	accttagaac	atcattttac	agagtttggt	7800
cttacgggaa	attttattgt	tgctcgggct	aacctgttag	gaagaactaa	aacattaaat	7860
gttggcacta	tgggggttgt	tattccgaca	gcacaccag	ttcgacagtt	agaagacggt	7920
ttattattag	atcaaatgtc	gaaaggctcg	tttaattttg	gaaccgttcg	agggctatac	7980
cataaagatt	ttcgagtatt	tgggtgtgat	atggaagagt	ctcgagcaat	tactcaaaat	8040
ttctaccaga	tgataatgga	aagcttacag	acaggaacca	ttagctctga	tagtgattac	8100
attcaatttc	ctaaggttga	tgtatatccc	aaagtgtact	caaaaaatgt	accaacctgt	8160
atgactgctg	agtccgcaag	tacgacagaa	tggctagcaa	tacaagggct	accaatgggt	8220
cttagttgga	ttattggtac	taatgaaaaa	aaagcacaga	tgggaactcta	taatgaaatt	8280
gcgacagaat	atgggtcatga	tatatctaaa	atagatcatt	gtatgactta	tatttgttct	8340
gttgatgatg	atgcacaaaa	ggcgcaagat	gtttgtcggg	agtttctgaa	aaattggtat	8400
gactcatatg	taaatgcgac	caatatcttt	aatgatagca	atcaaactcg	tggttatgat	8460
tatcataaag	gtcaatggcg	tgattttggt	ttacaaggac	atacaaacac	caatcgacgt	8520
gttgattata	gcaatgggat	taaccctgta	ggcactcctg	agcagtgtat	tgaaatcatt	8580
caacgtgata	ttgatgcaac	gggtattaca	aacattacat	gcggatttga	agctaattgga	8640
actgaagatg	aaataattgc	ttccatgcga	cgctttatga	cacaagtcgc	tcctttctta	8700
aaagaaccta	aataaattac	ttatttgata	ctagagataa	taaggaacaa	gttatgaaat	8760
ttggattatt	ttttctaaac	tttcagaaag	atggaataac	atctgangaa	acgttggata	8820
atatggtaaa	gactgtcacg	ttaattgatt	caactaaata	tcattttaat	actgcctttg	8880
ttaatgaaca	tcacttttca	aaaaatggta	ttgttggagc	acctattacc	gcagctyggt	8940
ttttattagg	gttaacaaat	aaattacata	ttggttcatt	aatcaagta	attaccaccc	9000
atcacccctgt	acgtgtagca	gaagaagcca	gtttattaga	tcaaattgtca	gagggacgct	9060
tcattcttgg	ttttagtgcg	tgcgaaagtg	atttcgaaat	ggaatttttt	agacgtcata	9120
tctcatcaag	gcaacaacaa	tttgaagcat	gctatgaaat	aattaatgac	gcattaacta	9180
cagggttattg	tcatcccca	aacgactttt	atgattttcc	aaagggtttca	attaatccac	9240
actgttacag	tgagaatgga	cctaagcaat	atgtatccgc	tacatcaaaa	gaagtcgtca	9300
tgtgggcagc	gaaaaaggca	ctgccttta	catttaagt	ggaggataat	ttagaaacca	9360
aagaacgcta	tgcaattcta	tataataaaa	cagcacaaca	atatggtatt	gatatttcgg	9420
atgttgatca	tcaattaaat	gtaattgcga	acttaaatgc	tgatagaagt	acggctcaag	9480
aagaagtgag	agaatactta	aaagactata	tcactgaaac	ttaccctcaa	atggacagag	9540
atgaaaaaat	taactgcatt	attgaagaga	atgcagttgg	gtctcatgat	gactattatg	9600
aatcgacaaa	attagcagtg	gaaaaaacag	ggctctaaaa	tattttatta	tcctttgaat	9660
caatgtccga	tattaaagat	gtaaaagata	ttattgatat	gttgaaccaa	aaaatcgaaa	9720
tgaatttacc	ataaagtagt	actgttgtaa	ttcattaagc	attctgccga	catggaagcc	9780
atcacagacg	gcatgatgaa	cctgaatcgc	cagcggcatc	agcaccttgt	cgccttgcgt	9840

```

ataatatttg cccatgggga aaacgggggc gaagaagttg tccatattgg ccacgtttaa 9900
atcaaaactg gtgaaactca cccaggggatt ggctgagacg aaaaacatat tctcaataaa 9960
cccttttaggg aaataggcca ggttttcacc gtaacacgcc acatcttgcg aatatatgtg 10020
tagaaactgc cggaaatcgt cgtggtattc actccagagc gatgaaaacg ttccagtttg 10080
ctcatggaaa acggtgtaac aagggtgaac actatcccat atcaccagct caccgtcttt 10140
cattgccata cgggaattccg gatgagcatt catcaggcgg gcaagaatgt gaataaaggc 10200
cggataaaac ttgtgcttat ttttctttac ggtctttaa aaggccgtaa tatccagctg 10260
aacggtctgg ttataggtac attgagcaac tgactgaaat gcctcaaat gttctttacg 10320
atgccattgg gatatatcaa cgggtgtata tccagtgtt ttttctcca ttttagcttc 10380
cttagctcct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacggcc ggtagtgatc ttatttcatt 10440
atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg atcaacgtct cattttcgcc aaaagtgggc 10500
ccagggtctc ccggtatcaa cagggacacc aggatttatt tattctgcga agtgatcttc 10560
cgtcacaggt atttattcga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta 10620
atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt cagggtggc ttttcgggga aatgtgcgcg 10680
cccgcgttcc tgctggcgct gggcctgttt ctggcgctgg acttcccgct gttccgtcag 10740
cagcttttcg cccacggcct tgatgatcgc ggcggccttg gcctgcata cccgattcaa 10800
cggccccagg gcgtccagaa cgggcttcag gcgtcccgga aggt 10844

```

<210> 12  
 <211> 128  
 <212> DNA  
 <213> Staphylococcus aureus

```

<400> 12
gtctagttaa tgtgtaacgt aacattagct agattttttt attcaaaaaa atatttaca 60
atattaggaa atttaagtgt aaaagagttg ataaatgatt atattgggac tataatata 120
ttaaggtc 128

```

<210> 13  
 <211> 2769  
 <212> DNA  
 <213> Staphylococcus phage 80alpha

```

<400> 13
attagacaac aaacaagtca ttgaaaattc cgacttatta ttcaaaaaga aatttgatag 60
cgcagatata caagctaggt taaaagtagg cgataaggta gaagttaaaa caatcggta 120
tagaatacac tttttaaatt tatatccggt cttatacgaa gtaaagaagg tagataaaca 180
atgattaaac aaatactaag actattattc ttactagcaa tgatgagtt aggtaagtat 240
gtaactgagc aagtatatat tatgatgacg gctaagatg atgtagaggt gccgagtgac 300
ttcgcgaagt tgagcgatca gtcagatttg atgagggcgg aggtgacgga gtagatgatg 360
tggttagtca tagcaattat attactagtc atcttattgt ttggtgtgat gttgcaagct 420
gaacagttaa aaggcgatgt gaaagttaaa gagcgggaga tagagatatt aagaagtaga 480
ttgagacatt ttgaagatta aaaatatttg tatggagggt attcatgact aaaaagaat 540

```

atggattaaa attatcaaca gttcgaaagt tagaagatga gttgtgtgat taccctaatt	600
atcataagca actcgaagat ttaagaagtg aaataatgac accatggatt ccaacagata	660
caaatatagg cggggagttt gtaccgtcta atacatcgaa aacagaaatg gcagtaacta	720
attatctttg tagtatacga agaggtaaaa tccttgagtt taagagcgct attgaacgta	780
taatcaacac atcaagtagg aaagaacgcg aattcattca agagtattat ttaataaaaa	840
aggaattagt gaaagtttgt gatgacatac acatttctga tagaactgct catagaatca	900
aaaggaaaat catatctaga ttggcgggaag agttagggga agagtgaat tggcagtaaa	960
gtggcagttt ttgataccta aaatgagata ttatgatagt gtaggatatt gactatctta	1020
ctgcgtttcc cttatcgcaa ttaggaataa aggatctatg tgggttggtt gattatagcc	1080
aatccttttt taattttaaa aagcgtatag cgcgagagtt ggtggtaaat gaaatgaacg	1140
aaaaacaaaa gagattcgca gatgaatata taatgaatgg atgtaatggg aaaaaagcag	1200
caatttcagc aggttatagt aagaaaacag cagagtcctt agcaagtcga ttgttaagaa	1260
atgttaatgt ttcggaatat attaaagaac gattagaaca gatacaagaa gagcgtttta	1320
tgagcattac agaagcttta gcgttatctg cttctattgc tagaggagaa cctcaagagg	1380
cttacagtaa gaaatatgac catttaaacg atgaagtgga aaaagagggt acttacacaa	1440
tcacaccaac ttttgaagag cgtcagagat ctattgacca catactaaaa gttcatgggtg	1500
cgtatatcga caaaaaagaa attactcaga agaattattga gattaatatt ggtgagtacg	1560
atgacgaaag ttaaattaaa ctttaacaaa ccattctaag ttttcaacag aaacatatc	1620
gaaatactaa ccaattacga taacttcaat gaagtacatt acggtggagg ttcgagtggt	1680
aagtctcacg gcgttataca aaaagttgta cttaaagcat tgcaagactg gaaatatcct	1740
aggcgtatag tatggcttag aaaagtccaa tcaacaatta aagatagttt attcgaagat	1800
gtcaaagatt gtttgataaa cttcgggtatt tgggacatgt gcctttggaa taagactgat	1860
aaacaaagttg aattgcaaaa cggcgcagtt tttttgttta aaggattaga taaccagag	1920
aaaataaagt cgataaaagg catatcagac atagtcattg aagaagcgtc tgaattcaca	1980
ctaatgatt acacgcaatt aacgttgcgt ttgagggagc gtaaacacgt gaataagcaa	2040
atatttttga tgtttaaccc agtatctaaa ctgaattggg ttataagta tttctttgaa	2100
catggtgaac caatggaaaa tgcattgatt agacaatcta gttatcgaga taataagttt	2160
cttgatgaaa tgacacgaca aaacttagag ttgtagcaa atcgtaatcc agcatattac	2220
aaaatttatg cgttaggtga attttctaca ctagacaaat tggttttccc taagtatgaa	2280
aaacgtttta taaataaaga tgagttaaga catttacctt cttatttttg attggacttt	2340
ggctacgtta atgatcctag tgcttttata cattctaaaa tagatgtaaa gaaaaagaag	2400
ttatacatca ttgaagagta tgtttaacaa ggtatgctga atgatgaaat agctaattgc	2460
ataaagcaac ttggttatgc taaagaagaa attacagcag atagtcgaga acaaaaaagt	2520
atagctgaat taaggaatct agggcttaaa aggattttac caacaaaaa aggggaagggc	2580
tcggttgtag aagggttaca attcttaatg caatttgaaa tcattgttga tgaacgttgt	2640
ttcaagacta ttgaagagtt tgacaactac acatggcaaa aggacaaaga tacaggtgaa	2700

tataccaatg aaccagtaga tacatacaat cattgtatcg attcgttgcg ttattcagtg 2760  
gaacgattc 2769

<210> 14  
<211> 10319  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 14  
ggcgccatgg ttaaggcccc ttgcggaag gagttagtaa gttaacagaa gacgaaccaa 60  
aactaaatgg tttagcagga aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac 120  
aggaacagca acaagaacaa caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtatg cacttataga 180  
acatgcattt atgccgagaa aacttattgg ttggaatggg ctatgtgtta gctaacttgt 240  
tagcgagttg gttggacttg aattgggatt aatcccaaga aagtaccaac tcaacaacac 300  
ataaagccct gtaggttccg accaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagtga 360  
agaaatgaaa ttcagagaag cttttgagaa ttttataaca agtaagtatg tacttggtgt 420  
tttagtagtc ttaactgttt accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc 480  
tgattagacc aaatcttttg atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca 540  
cgccctacca aagtttgta acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgtttttat 600  
aatcttgtat atttagatat taaacgatat ttaatatata atcaagatat atatttgggt 660  
gagcgattac ttaaagcaaa ttgagattaa ggagtcgatt ttttatgtat aaaaacaatc 720  
atgcaaatca ttcaaatcat ttggaaaatc acgattttaga caatttttct aaaaccggct 780  
actctaatag ccggttggaac gcacatactg tgtgcatatc tgatccaaaa ttaagttttg 840  
atgcaatgac gatcgttga aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaaattta 900  
tgagtgtaga gccccaaata agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag 960  
cacttcaaga aaaagtattat attgaatatg acaaaagtga agcagatagt tgggatagac 1020  
gtaatatgag tattgaattt aatccaaaca aacttacacg agatgaaatg atttggttaa 1080  
aacaaaatat aataagctac atggaagatg acggttttac aagattagat ttagccttg 1140  
attttgaaga tgatttgagt gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaaacta 1200  
ttttttatgg tcgtaatggt aagccagaaa caaaatattt tggcgtgaga gatagtaata 1260  
gatttattag aatttataat aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta 1320  
tgtctgaaca tttatggcgt gtagaaatcg aacttaaaag agatatggtg gattactgga 1380  
atgattgctt tagtgattta catatcttgc aaccagattg gaaaactatc caacgcactg 1440  
cggatagagc aatagttttt atgttattga gtgatgaaga agaattggga aagcttcaca 1500  
gaaattctag aacaaaatat aagaatttga taaaagaaat ttcgccagtc gatttaacgg 1560  
acttaatgaa atcgacttta aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaa atcgattttt 1620  
ggcaacatga atttaaatat tggaaatagt gtacatatta atattactga acaaaaatga 1680  
tatatttaaa ctattctaatt ttaggaggat ttttttatga agtgtctatt taaaaattg 1740

gggaatttat atgaggtgaa agaataat	1800
agaggtaaaa ttgtttagtt tatataaaaa	1850
ttggctttgt attctttcat tttttagtgt	1920
acctgatatt gcaaatcatt ttaatactac	1980
atatatgtta actttttcga taggaacagc	2040
tataaaaaaa ttgttaatta ttggtattag	2100
tattgggccc acctaggcaa atatgctctt	2160
ggagttaata aatatgcggc aaggatttct	2220
aaataattag atgtcctttt ttaggagggc	2280
tttatcatgt gattctaaag tatccagaga	2340
tgcataaaaa tcccagtgat aaaagtat	2400
tttgaatgga ggaaatcac atgaaaatta	2460
caggaaaaac taccttaaca gaaagcttat	2520
gaagcgtgga caaaggtaca acgaggacgg	2580
ttacaattca gacaggaata acctcttttc	2640
acacgccagg acatatggat ttcttagcag	2700
gggcaattct actgatttct gcaaaagatg	2760
atgcacttag gaaaatgggg attcccacaa	2820
gaattgattt atcaacgggt tatcaggata	2880
tcaaacagaa ggtagaactg tatcctaata	2940
aatgggatac ggtaatagag ggaacgata	3000
cattagaagc attggaactg gaacaagagg	3060
tccctcttta tcatggaagt gcaaaaagta	3120
ttactaataa attttattca tcaacacatc	3180
tcaaaattga atatacaaaa aaaagacaac	3240
tactacattt acgagattcg gttagagtat	3300
tgtatacttc aataaatggg gaattatgta	3360
ttattttgca aaatgagttt ttgaagttaa	3420
cacagagaaa aaagattgaa aatccgcacc	3480
aacctgaaca gagagaaatg ttgcttgatg	3540
ttctacgata ttacgtggat tctacgacac	3600
tacaaatgga agtgattagt gcaactgttc	3660
aagagcctac agtcatttat atggagagac	3720
tcgaagtgcc gccaaatcct ttctgggctt	3780
tggaagtgg aatgcagtat gagagctcgg	3840
aaaatgcagt tatggaaggg gtacgctatg	3900



tgacggattg taaaatctgt ttttaagtacg gtttatacta tagccctggt agtactccag	3960
cagatttttcg gatgcttact cctattgtac tggagcaagc ctttagaaaa gctggaacag	4020
aattgttaga gccatatctt agttttaaag tttatgcacc acaggaatat ctttcacggg	4080
catataacga tgctcccaa tattgtgcaa atatcgtaaa tactcaactg aaaaataatg	4140
aggtcattat tattggagaa attcctgctc gatgtattca agattatcgc aatgatttaa	4200
ctttttttac aaatgggctt agtggtttgt tagcagagct aaaaggatat caggttacca	4260
ctggcgaacc tgtttgccag acccgctcgc taaatagtcg gatagataaa gtaagatata	4320
tgttcaataa aataacttag tgcgttttat gttgttatat aaatatggtt tcttattaaa	4380
taagatgaaa tattctttta tatagatttg aattaaagt gaaaggagga gattgttatt	4440
ataaactaca agtggatatt gtgtcctagt tgtggaaata aaacaagact acgaatacga	4500
gtggatacta tacttaaaaa tttcccttta tacagcccca aatgtaagaa cgaaacttta	4560
attaatgttc aaaaaatgaa tataataaca atcaaagagc cagacgcca gacgcagagc	4620
cgataatttg agaaatgaaa ctctcatctt atcggctctt tttgtttatc tgaattttac	4680
tgactagcct tcaatatttc cgcgccagc ttactatgcc attattaagc ttgtaatatc	4740
ggaggggtta ttaattggca gtaaagtggc agtttttgat accttaaatg agatattatg	4800
atagtgtagg atattgacta tcgtactgcy tttccctacc gcaaattagg aataaaggat	4860
ctatgtgggt tggctgatta tagccaatcc ttttttaatt ttaaaaagcg tatagcgcga	4920
gagttggtgg taaatgaaat gaacgaaaaa caaaagagat tcgcagatga atatataatg	4980
aatggatgta atggtaaaaa agcagcaatt acagtaggtt atagtaagaa aacagcagag	5040
tcttttagca gtcgattgtt aagaaatgtt aatgtttcgg aatatattaa agaacgatta	5100
gaacaggtag aagaagagcg tttaatgagt attacagaag ctttagcgtt atctgttctt	5160
attgctagag gagaacctca agaggcttac agtaagaaat atgaccattt aaacgatgaa	5220
gtggaaaaag aggttactta cacaatcaca ccaacttttg aagagcgtca gagatctatt	5280
gaccacatac taaaagtaca tgggtgcgtat atcgataaaa aagaaattac tcagaagaat	5340
attgagatta atattggtga gtacgatgac gaaagttaaa ttgaacttta acaaaccgtc	5400
taatgttttc aatagccgcy ggggccaac acaccaactt ttgaagagcg tcagagatct	5460
attgaccaca tactaaaagt acatgggtgcy tatatcgata aaaaagaaat tactcagaag	5520
aatattgaga ttaatatggg tgagtacgat gacgaaagt aaattaaact ttaacaaacc	5580
gtctaattgt ttcaatagcc gcgggggccc aacgagcggc cgcatagtta agccagcccc	5640
gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt	5700
acagacaagc tgtgaccgct tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	5760
cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga	5820
taataatggt ttcttagacy tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccctta	5880
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat	5940
aaatgcttca ataatatgga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc	6000
ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggtga	6060

aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	6120
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt	6180
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg	6240
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccggtc acagaaaagc	6300
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata	6360
acactgccc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt	6420
tgcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag	6480
ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccgtgtagc aatggcaaca acgttgcgca	6540
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg	6600
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gtcgcccct tccggctggc tggtttattg	6660
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag	6720
atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gtagcaggca actatggatg	6780
aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag	6840
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga	6900
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt	6960
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaggatc ttcttgagat ctttttttc	7020
tgcgctaata ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcgggt gtttttttc	7080
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactg cttcagcaga gcgcagatac	7140
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac	7200
cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt	7260
cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggt	7320
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacac gaacctgaga	7380
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttccg aaggagagaa ggcggacagg	7440
tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgacga gggagcttcc agggggaaac	7500
gcctggtatc tttatagtcc tgcggggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg	7560
tgatgctcgt caggggggag gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg	7620
ttcctggcct tttgctggcc ttttctcac atgttctttc ctgcttatc ccctgattct	7680
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctggcgggt ctagttaatg tgtaacgtaa	7740
cattagctag atttttttat tcaaaaaaat atttacaat attaggaaat ttaagtgtaa	7800
aagagttgat aatgattat attgggacta taatataatt aaggctgatt gaattcgtta	7860
actaattaat caccaaaaag gaatagagta tgaagtttgg aatatttgt ttttcgtatc	7920
aaccaccagg tgaaactcat aagcaagtaa tggatcgctt gtctcggtt ggtatcgctt	7980
cagaagaggt aggggttgat acatattgga ccttagaaca tcattttaca gagtttggtc	8040
ttacgggaaa tttatttgtt gctgcggcta acctgttagg aagaactaaa acattaaatg	8100
ttggcactat gggggttgtt attccgacag cacaccagc tcgacagtta gaagacgttt	8160
tattattaga tcaaatgtcg aaaggtcgtt ttaatttttg aaccgttcga gggctatacc	8220

ataaagattt	tcgagtattt	ggtgttgata	tggaagagtc	tcgagcaatt	actcaaaatt	8280
tctaccagat	gataatggaa	agctttacaga	caggaacccat	tagctctgat	agtgattaca	8340
ttcaatttcc	taaggttgat	gtatatccca	aagtgtactc	aaaaaatgta	ccaacctgta	8400
tgactgctga	gtccgcaagt	acgacagaat	ggctagcaat	acaagggcta	ccaatggttc	8460
ttagttggat	tattggtact	aatgaaaaaa	aagcacagat	ggaactctat	aatgaaattg	8520
cgacagaata	tggtcatgat	atatctaaaa	tagatcattg	tatgacttat	atttgttctg	8580
ttgatgatga	tgacaaaaag	gcgcaagatg	tttgtcggga	gtttctgaaa	aattggatg	8640
actcatatgt	aatgcgacc	aatatcttta	atgatagcaa	tcaaactcgt	ggttatgatt	8700
atcataaagg	tcaatggcgt	gattttgttt	tacaaggaca	tacaaacacc	aatcgacgtg	8760
ttgattatag	caatggtatt	aaccccgtag	gcactcctga	gcagtgtatt	gaaatcattc	8820
aacgtgatat	tgatgcaacg	ggtattacaa	acattacatg	cggatttgaa	gctaattggaa	8880
ctgaagatga	aataattgct	tccatgcgac	gctttatgac	acaagtcgct	cctttcttaa	8940
aagaacctaa	ataaattact	tatttgatac	tagagataat	aaggaacaag	ttatgaaatt	9000
tggtattttt	tttctaaact	ttcagaaaga	tggaataaca	tctgaagaaa	cggtggataa	9060
tatggtaaag	actgtcacgt	taattgattc	aactaaatat	cattttaata	ctgcctttgt	9120
taatgaacat	cacttttcaa	aaaatgggtat	tggtggagca	cctattaccg	cagctggttt	9180
tttattaggg	ttaacaaata	aattacatat	tggttcatta	aatcaagtaa	ttaccacca	9240
tcaccctgta	cgtgtagcag	aagaagccag	tttattagat	caaatgtcag	agggacgctt	9300
cattcttgggt	tttagtgact	gcgaaagtga	tttcgaaatg	gaatttttta	gacgtcatat	9360
ctcatcaagg	caacaacaat	ttgaagcatg	ctatgaaata	attaatgacg	cattaactac	9420
aggttattgc	catcccaaaa	acgactttta	tgattttcca	aaggtttcaa	ttaatccaca	9480
ctgttacagt	gagaatggac	ctaagcaata	tgtatccgct	acatcaaaaag	aagtcgtcat	9540
gtgggcagcg	aaaaaggcac	tgcttttaac	gtttaagtgg	gaggataatt	tagaaaccaa	9600
agaacgctat	gcaattctat	ataataaaaac	agcacaacaa	tatgggtattg	atatttcgga	9660
tgttgatcat	caattaactg	taattgcgaa	cttaaatgct	gatagaagta	cggctcaaga	9720
agaagtgaga	gaatacttaa	aagactatat	cactgaaact	taccctcaaa	tggaacagaga	9780
tgaaaaaatt	aactgcatta	ttgaagagaa	tgagttggg	tctcatgatg	actattatga	9840
atcgacaaaa	ttagcagtgg	aaaaaacagg	gtctaaaaat	attttattat	cctttgaatc	9900
aatgtccgat	attaagatg	taaaagatat	tattgatatg	ttgaaccaa	aatcgaaat	9960
gaatttacca	taataaaaatt	aaaggcaatt	tctatattag	attgcctttt	tgccgcgcct	10020
attctaattgc	ataataaata	ctgataacat	cttatatttt	gtattatatt	ttgtattatc	10080
gttgacatgt	ataattttga	tatcaaaaac	tgattttccc	tctattattt	tcgagattta	10140
ttttcttaat	tctctttaac	aaactagaaa	tattgtatat	acaaaaaatt	ataaataata	10200
gatgaatagt	ttaattatag	gtgttcacat	atcgaaaaag	caacgtatct	tatttaaagt	10260
gcgttgcttt	tttctcattt	ataagggttaa	ataattctca	tatatcaagc	aaagtgaca	10319

<210> 15  
 <211> 2088  
 <212> DNA  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 15  
 tatactacaa atgtagtctt atataaggag gatattgatg aaaaagataa aaattgttcc 60  
 acttatttta atagtgttag ttgtcgggtt tggtatatat ttttatgctt caaaagataa 120  
 agaaattaat aatactattg atgcaattga agataaaaaat ttcaaacaag tttataaaga 180  
 tagcagttat atttctaaaa gcgataatgg tgaagtagaa atgactgaac gtccgataaa 240  
 aatatataat agtttaggcg ttaaagatat aaacattcag gatcgtaaaa taaaaaagt 300  
 atctaaaaat aaaaaacgag tagatgctca atataaaatt aaaacaaact acggtaacat 360  
 tgatcgcaac gttcaattta attttggtta agaagatggg atgtggaagt tagattggga 420  
 tcatagcgtc attattccag gaatgcagaa agaccaaagc atacatattg aaaattttaa 480  
 atcagaacgt ggtaaaattt tagaccgaaa caatgtggaa ttggccaata caggaacagc 540  
 atatgagata ggcacgttc caaagaatgt atctaaaaaa gattataaag caatcgctaa 600  
 agaactaagt atttctgaag actatatcaa acaacaaatg gatcaaaatt gggtaacaaga 660  
 tgataccttc gttccactta aaaccgttaa aaaaatggat gaatatttaa gtgatttcgc 720  
 aaaaaattt catcttcaa ctaatgaaac agaagtcgt aactatcctc tagaaaaagc 780  
 gacttcacat ctattaggtt atgttgggtc cattaactct gaagaattaa aacaaaaaga 840  
 atataaaggc tataaagatg atgcagttat tggtaaaaaa ggactcgaaa aactttacga 900  
 taaaaagctc caacatgaag atggctatcg tgtcacatc gttgacgata atagcaatac 960  
 aatcgacat acattaatag agaaaaagaa aaaagatggc aaagatattc aactaactat 1020  
 tgatgctaaa gttcaaaaga gtatttataa caacatgaaa aatgattatg gctcaggtac 1080  
 tgctatccac cctcaaacag gtgaattatt agcacttgta agcacacctt catatgacgt 1140  
 ctatccattt atgtatggca tgagtaacga agaataaat aaattaaccg aagataaaaa 1200  
 agaacctctg ctcaacaagt tccagattac aacttcacca ggttcaactc aaaaaatatt 1260  
 aacagcaatg attgggttaa ataacaaaac attagacgat aaaacaagtt ataaaatcga 1320  
 tggtaaaagg tggcaaaaag ataaatcttg ggggtggttac aacgttaca gatatgaagt 1380  
 ggtaaatggg aatatcgact taaaacaagc aatagaatca tcagataaca ttttctttgc 1440  
 tagagtagca ctcgaattag gcagtaagaa atttgaaaaa ggcataaaaa aactaggtgt 1500  
 tggatgaagt ataccaagt attatccatt ttataatgct caaatctca acaaaaattt 1560  
 agataatgaa atattattag ctgattcagg ttacggacaa ggtgaaatac tgattaaccc 1620  
 agtacagatc ctttcaatct atagcgcatt agaaaataat ggcaatatta acgcacctca 1680  
 cttattaaaa gacacgaaaa acaaagtttg gaagaaaaat attatttcca aagaaaatat 1740  
 caatctatta actgatggta tgcaacaagt cgtaataaaa acacataaag aagatatatta 1800  
 tagatcttat gcaaaactta ttggcaaatc cggtagtgca gaactcaaaa tgaaacaagg 1860  
 agaaactggc agacaaattg ggtggtttat atcatatgat aaagataatc caaacatgat 1920  
 gatggctatt aatgttaag atgtacaaga taaaggaatg gctagctaca atgccaaaat 1980

ctcaggtaaa gtgtatgatg agctatatga gaacggtaat aaaaaatacg atatagatga 2040  
ataacaaaac agtgaagcaa tccgtaacga tgggtgcttc actgtttt 2088

<210> 16  
<211> 2075  
<212> RNA  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 16  
uagucuuaua uaaggaggau auugaugaaa aagauaaaaa uuguuccacu uauuuuaaua 60  
guuguaguug ucggguuugg uauauuuuuu uaugcuuca aagauaaaga aauuaauau 120  
acuaauaug caauugaaga uaaaaauuuc aaacaaguuu auaaagauag caguuaauuu 180  
ucuaaaagcg auaauagguga aguagaaug acugaacguc cgauaaaaau auauaaugu 240  
uuaggcguaa aagauauaaa cauucaggau cguaaaauaa aaaaaguau uaaaaauaaa 300  
aaacgaguag augcucaua uaaaauuuaa acaacuacg guaacauuga ucgcaacguu 360  
cauuuuuuu uuguuaaaga agaugguaug uggaaguuag auugggauca uagcgucuu 420  
auuccaggaa ugcagaaaga ccaaagcaua cauauugaaa auuuuuuauc agaacguggu 480  
aaaauuuug accgaaacaa uguggaauug gccaaucag gaacagcaua ugagauaggc 540  
aucguuccaa agaauguau uaaaaaagau uauaaagcaa ugcuaaaga acuaaguauu 600  
ucugaagacu auaucaaca acaauaggau caaaauuggg uacaagauga uaccuucguu 660  
ccacuuaaaa ccguuaaaaa aauggaugaa uauuuuagug auuucgcaa aaaaauuau 720  
cuuacaacua augaaacaga aagucguaac uauccucuag aaaaagcgac uucacauua 780  
uuagguuuug uugguccau uaacucugaa gaauuuuuac aaaaagaaua uaaaggcuau 840  
aaagaugaug caguuaauug uaaaaaggga cucgaaaaac uuucgauaa aaagcuccaa 900  
caugaagaug gcuaucgugu cacaaucguu gacgauaua gcaauacaau cgcacauaca 960  
uuauuagaga aaaagaaaa agauggcaaa gauauucaac uacuauuga ugcuaaaguu 1020  
caaaagagua uuuaaaca caugaaaaau gauuauggcu cagguacugc uauccaccu 1080  
caaacaggug aauuuuagc acuuugaagc acaccuucuu augacgucua uccauuuuug 1140  
uauggcauga guaacgaaga auauauaaa uuaaccgaag auaaaaaga accucugcuc 1200  
aacaaguucc agauuacaac uucaccaggu ucaacucaa aaauuuuac agcaaugauu 1260  
ggguuaaua acaaaacau agacgauaaa acaaguuua aaucgaug uaaaggguug 1320  
caaaaagaua aaucuuuggg ugguuacaac guuacaagau augaaguggu aauggguau 1380  
aucgacuuu aacaagcau agaaucaua gauaacauu ucuuugcuag aguagcacuc 1440  
gaauuaggca guaagaaau ugaaaaaggc augaaaaac uagguguug ugaagauua 1500  
ccaagugau auccauuuu uauugcuca auuucaaaca aaaaauuaga uaaugaaaua 1560  
uuuuuagcug auucagguu cggaacaaggu gaaauacuga uuaaccagu acagaucuu 1620  
ucaaucuaua gcgcauuaga aaauauggc aaauuuuacg caccucacuu auuuuuagac 1680  
acgaaaaaca aaguuuugga gaaaaauuu auuuuccaaag aaaaaucaa ucuauuacu 1740  
gaugguaugc aacaagucgu aaauuuuaca cauuaagaag auuuuuuag aucuuuagca 1800  
aacuuuuuug gcaauccgg uacugcagaa cuaaaauga aacaaggaga aacuggcaga 1860

caaaauugggu gguuuuauauc auaugauaaa gavaauccaa acaugaugau ggcuauuuau 1920  
 guuaaagaug uacaagauaa aggaauggcu agcuacaauug ccaaaaucuc agguaaagug 1930  
 uaugaugagc uauaugagaa cgguauuaaa aaauacgava uagaugaaua acaaaacagu 2040  
 gaagcaaucc guaacgaugg uugcuucacu guuuu 2075

<210> 17  
 <211> 2166  
 <212> DNA  
 <213> *Vibrio fischeri*

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1194)..(1194)  
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 17  
 ggcttaaata aacagaatca ccaaaaagga atagagtatg aagtttgga atatttgttt 60  
 ttcgtatcaa ccaccagggtg aaactcataa gctaagtaat ggatcgcttt gttcggcttg 120  
 gtatcgcttc agaagagtag ggtttgatac atattggacc ttagaacatc attttacaga 180  
 gtttggtctt acgggaaatt tatttggtgc tgcggctaac ctgtaggaa gaactaaac 240  
 attaaatggt ggcatatgg gggttgttat tccgacagca caccagttc gacagttaga 300  
 agacgtttta ttattagatc aaatgtcgaa aggtcgtttt aattttgga ccgttcgagg 360  
 gctataccat aaagattttc gagtatttg tgttgatag gaagagtctc gagcaattac 420  
 tcaaaatttc taccagatga taatggaaag cttacagaca ggaaccatta gctctgatag 480  
 tgattacatt caatttccta aggttgatgt atatcccaa gtgtactcaa aaaatgtacc 540  
 aacctgtatg actgctgagt ccgcaagtac gacagaatgg ctagcaatac aagggtacc 600  
 aatggttctt agttggatta ttggtactaa tgaaaaaaa gcacagatgg aactctataa 660  
 tgaaattgag acagaatatg gtcatgatat atctaaaata gatcattgta tgacttatat 720  
 ttgttctggt gatgatgatg caaaaaggc gcaagatggt tgtcgggagt ttctgaaaaa 780  
 ttggtatgac tcatatgtaa atgcgaccaa tatctttaat gatagcaatc aaactcgttg 840  
 ttatgattat cataaaggtc aatggcgtga ttttgtttta caaggacata caaacaccaa 900  
 tcgacgtggt gattatagca atggtattaa ccctgtaggc actcctgagc agtgattga 960  
 aatcattcaa cgtgatattg atgcaacggg tattacaaac attacatgag gatttgaagc 1020  
 taatggaact gaagatgaaa taattgcttc catgagcgc tttatgacac aagtcgctcc 1080  
 tttcttaaaa gaacctaaat aaattactta ttgtacta gagataataa ggaacaagtt 1140  
 atgaaatttg gattattttt tctaaacttt cagaagatg gaataacatc tgangaacg 1200  
 ttggataata tggtaaagac tgtcacgtta attgattcaa ctaaatatca ttttaatact 1260  
 gcctttgtta atgaacatca cttttcaaaa aatggtattg ttggagcacc tattaccgca 1320  
 gctggttttt tattagggtt acaaaataaa ttacatattg gttcattaaa tcaagtaatt 1380  
 accaccatc accctgtacg ttagcagaa gaagccagtt tattagatca aatgtcagag 1440  
 ggacgcttca ttcttggttt tagtgactgc gaaagtgatt tcgaaatgga attttttaga 1500

cgctatatct catcaaggca acaacaattt gaagcatgct atgaaataat taatgacgca	1560
ttaactacag gttattgtca tccccaaaac gacttttatg attttccaaa ggtttcaatt	1620
aatccacact gttacagtga gaatggacct aagcaatatg tatccgctac atcaaaagaa	1680
gtcgtcatgt gggcagcgaa aaaggcactg cctttaacat ttaagtggga ggataattta	1740
gaaaccaaag aacgctatgc aattctatat aataaaacag cacaacaata tggatttgat	1800
atttcggatg ttgatcatca attaactgta attgcgaact taaatgctga tagaagtacg	1860
gctcaagaag aagtgagaga atacttaaaa gactatatca ctgaaactta ccctcaaatg	1920
gacagagatg aaaaaattaa ctgcattatt gaagagaatg cagttgggtc tcatgatgac	1980
tattatgaat cgacaaaatt agcagtggaa aaaacagggg ctaaaaatat tttattatcc	2040
tttgaatcaa tgtccgatat taaagatgta aaagatatta ttgatatgtt gaacccaaaa	2100
atcgaaatga atttaccata ataaaaattaa aggcaatttc tatattagat tgccttttta	2160
aatttc	2166

<210> 18  
 <211> 2143  
 <212> RNA  
 <213> *Vibrio fischeri*

<400> 18	
aaucacaaa aaggaauaga guaugaagu uggaaauuu uguuuuucgu aucaaccacc	60
aggugaaacu cauaagcuua guaauggauc gcuuuguucg gcuugguaucc gccucagaag	120
aguaggguuu gauacauuuu ggaccuuaga acaucauuuu acagaguuuu gucuuaaggg	180
aaauuuuuuu guugcugcgg cuaaccuguu aggaagaacu aaacauuaa auguuggcac	240
uauggggguu guuauuccga cagcacaccc aguucgacag uuagaagacg uuuuauuuuu	300
agaucaaaug ucgaagguc guuuuuuuuu uggaaccguu cgagggcuau accauaaaga	360
uuuucgagua uuugguguug auauuggaaga gucucgagca auuacuaaa auuucuaacca	420
gaugauaaug gaaagcuuac agacaggaac cauuagcucu gauagugauu acauucauuu	480
uccuaaggguu gauguauauc ccaaagugua cucaaaaaau guaccaaccu guaugacugc	540
ugaguccgca aguacgacag aauggcuagc aaucacaggg cuaccaaugg uucuuaguug	600
gauuuuuggu acuaaugaaa aaaaagcaca gauggaacuc uauaaugaaa uugcgacaga	660
auauggucau gauauaucua aaauagauca uuguauagcu uauuuuuguu cuguugauga	720
ugaugcacia aaggcgcaag auguuugucg ggaguuuucg aaaaauuggu augacucuaa	780
uguaaaugcg accauuauuc uuaugauag caaucaaacu cgugguuuug auuaucauaa	840
aggucaaugg cgugauuuug uuuuacaagg acauacaaac accaauccgac gugugauua	900
uagcaauggu auuaaccug uaggcacucc ugagcagugu auugaaauc uuaacuguga	960
uauugaugca acggguuuua caaacuuuac augcggauuu gaagcuauug gaacugaaga	1020
ugaaauuuuu gcuuccaugc gacgcuuuau gacacaaguc gcuccuuucu uaaaagaacc	1080
uaauuuuuuu acuuuuuuga uacuagagau aauaaggaa aaguuaugaa auuuggauua	1140
uuuuuuucua acuuucagaa agauuggaaua acaucugaag aaacguugga uauuuggua	1200
aagacuguca cguuuuuuga uucaacuaaa uaucauuuuu auacugccuu uguuuauugaa	1260

```

caucacuuuu caaaaaaugg uauuguugga gcaccuauua ccgcagcugg uuuuuuauua 1320
ggguuaacaa auaaaauaca uauugguuca uaaaaucaag uaauuaccac ccaucacccu 1380
guacguguag cagaagaagc caguuuauua gaucaaaugu cagagggacg cuucauucuu 1440
gguuuuagug acugcgaaag ugauuucgaa auggaauuuu uuagacguca uaucucauca 1500
aggcaacaac aauuugaagc augcuauuaa auauuuauug acgcauuuac uacagguuau 1560
ugucaucccc aaaacgacuu uuauuuuuu ccaaagguuu caauuaaucc acacuguuac 1620
agugagaaug gaccuaagca auauuuuucc gcuacaucaa aagaagucgu caugugggca 1680
gcgaaaaagg cacugccuuu aacauuuuag ugggaggaua auuuagaac caaagaacgc 1740
uauucaauuc uauauauuaa aacagcaca caauauggua uugauuuuuc ggauguugau 1800
caucauuuaa cuguauuugc gaacuuuuuu gcugauagaa guacggcuca agaagaagug 1860
agagaauacu uaaaagacua uaucacugaa acuuaccuc aaauggacag agaugaaaaa 1920
auuaacugca uuauugaaga gaauugcuguu gggucucaug augacuauua ugaucgaca 1980
aaauuagcag uggaaaaaac agggucuaaa auauuuuuu uauccuuuga aucaaugucc 2040
gauuuuaaag auguaaaaga uauuuuugau auguugaacc aaaaaaucga aaugaauuuu 2100
ccauauuaaa auuaaaggca auuucuaauu uagauugccu uuu 2143

```

```

<210> 19
<211> 2294
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide

```

```

<400> 19
aaaggcauga aaaaacuugg uaucuucacc aacaccuagc uuuuuugaagg aauugaguau 60
gaaguuuuga auauuugguu guucguauca accaccaggu gaaacucuaa agcuuaaggc 120
augaaaaaac uaggugauuc ucaccaacac cuaguuuuuu caaggauuug aguaugaagu 180
uuggaaauau uuguuuuucg uaucaaccac caggugaaac ucauaagcua aguuauggau 240
cgcuuuguuu ggcuugguau cgccucagaa gaguaggggu ugauacauau uggaccuug 300
aacaucuuuu uacagaguuu ggucuuacgg gaaauuuuuu uguugcugcg gcuuaccugu 360
uaggaagaac uaaaacauua aauguuggca cuauuggggu uguuuuuccg acagcacacc 420
caguucgaca guuagaagac guuuuuuuu uagaucuuu gucgaaaggu cguuuuuuuu 480
uuggaaccgu ucgagggcua uaccuuuuu auuuuucgag auuuugguuu gauuuggaag 540
agucucgagc aaauacuaa aaauucuaac agauuauuu ggaaagcuua cagacaggaa 600
ccauuagcuc ugauagugau uacauucaau uuccuaaggu ugauguauau cccaaagugu 660
acucaaaaaa uguaccaacc uguauagacug cugaguccgc aaguacgaca gaauggcuag 720
caauacaagg gcuaccaaug guucuuuugg ggauuuuugg uacuaaugaa aaaaaagcac 780
agauggaacu cuauaaugaa auugcgacag aaauugguca ugauuuuucu aaauuagauc 840
auuguaugac uuauuuuug ucuguugaug augaugcaca aaaggcgcaa gauguuuguc 900

```



```

gggaguuucu gaaaaauugg uaugacucau auguaaauugc gaccaauauc uuuuauugaua    960
gcaaucaaac ucgugguuuu gauuaucaua aaggucaaug gcgugauuuu guuuuacaag    1020
gacauacaaa caccaaucga cguguugauu auagcaaugg uauuaacccu guaggcacuc    1080
cugagcagug uauugaaauc auucaacgug auauugaugc aacggguuuu acaaacauua    1140
caugcggaau ugaagcuauu ggaacugaag augaaauauu ugcuuuccaug cgacgcuua    1200
ugacacaagu cgcuccuuuc uuaaaagaac cuaaauaaau uacuuuuuug auacuagaga    1260
uaauaaggaa caaguuauga aauuuggauu auuuuuucua aacuuucaga aagauggaau    1320
aacaucugaa gaaacguugg auauauuggu aaagacuguc acguuaauug auucaacuaa    1380
auaucuuuuu aaucugccu uuguuauga acaucacuuu ucaaaaaaug guauuguugg    1440
agcaccuauu accgcagcug guuuuuuuu aggguaaaca aaauuuuac auauugguuc    1500
auuaaucaaa guauuuacca ccaucacccc uguacgugua gcagaagaag ccaguuuuu    1560
agaucaauug ucagagggac gcuucauuc ugguuuuagu gacugcgaaa gugauuucga    1620
aauugaaauu uuugacguc auaucucauc aaggcaacaa cauuuugaag caugcuuga    1680
aauauuuauu gacgcauuu cuacagguua uugucauccc caaacgacu uuuuugauuu    1740
uccaaagguu ucauuuauc cacacuguua cagugagaau ggaccuaagc aauauguauc    1800
cgcuacauca aaagaagucg ucaugugggc agcgaaaaag gcacugccuu uaacauuuua    1860
gugggaggau aauuuagaaa ccaagaacg cuaugcauuu cuauauauua aaacagcaca    1920
acaauauggu auugauuuu cggauguuga ucaucaauua acuguaauug cgaacuuuaa    1980
ugcugauaga aguacggcuc aagaagaagu gagagaauac uuaaaagacu auaucacuga    2040
aacuuacccu caaauaggac gagaugaaa aauuaacugc auuauugaag agaauagcu    2100
ugggucucau gaugacuauu augaacgac aaaaauagca guggaaaaaa cagggucuaa    2160
aaauuuuuu uuauccuuug aaucaauguc cgauuuuaa gauguaaaa auauuuuuga    2220
uauuguuagc caaaaaaucg aaugaauuu accauauua auuuuaaggc aauuucuaa    2280
uuagauugcc uuuu                                2294

```

```

<210> 20
<211> 12
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
      oligonucleotide

```

```

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(2)
<223> a, c, u, g, unknown or other

```

```

<220>
<221> modified_base
<222> (7)..(9)
<223> a, c, u, g, unknown or other

```

```

<220>
<221> modified_base
<222> (12)..(12)

```

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>  
 <223> see specification as filed for detailed description of  
 substitutions and preferred embodiments

<400> 20  
 nnwawgnnnu un 12

<210> 21  
 <211> 13  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)..(1)  
 <223> a, c, u, g, unknown or other

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (4)..(7)  
 <223> a, c, u, g, unknown or other

<220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (12)..(13)  
 <223> a, c, u, g, unknown or other

<220>  
 <223> see specification as filed for detailed description of  
 substitutions and preferred embodiments

<400> 21  
 nagnnnncwu wnn 13

<210> 22  
 <211> 13  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 oligonucleotide

<400> 22  
 cagauaacau uuu 13

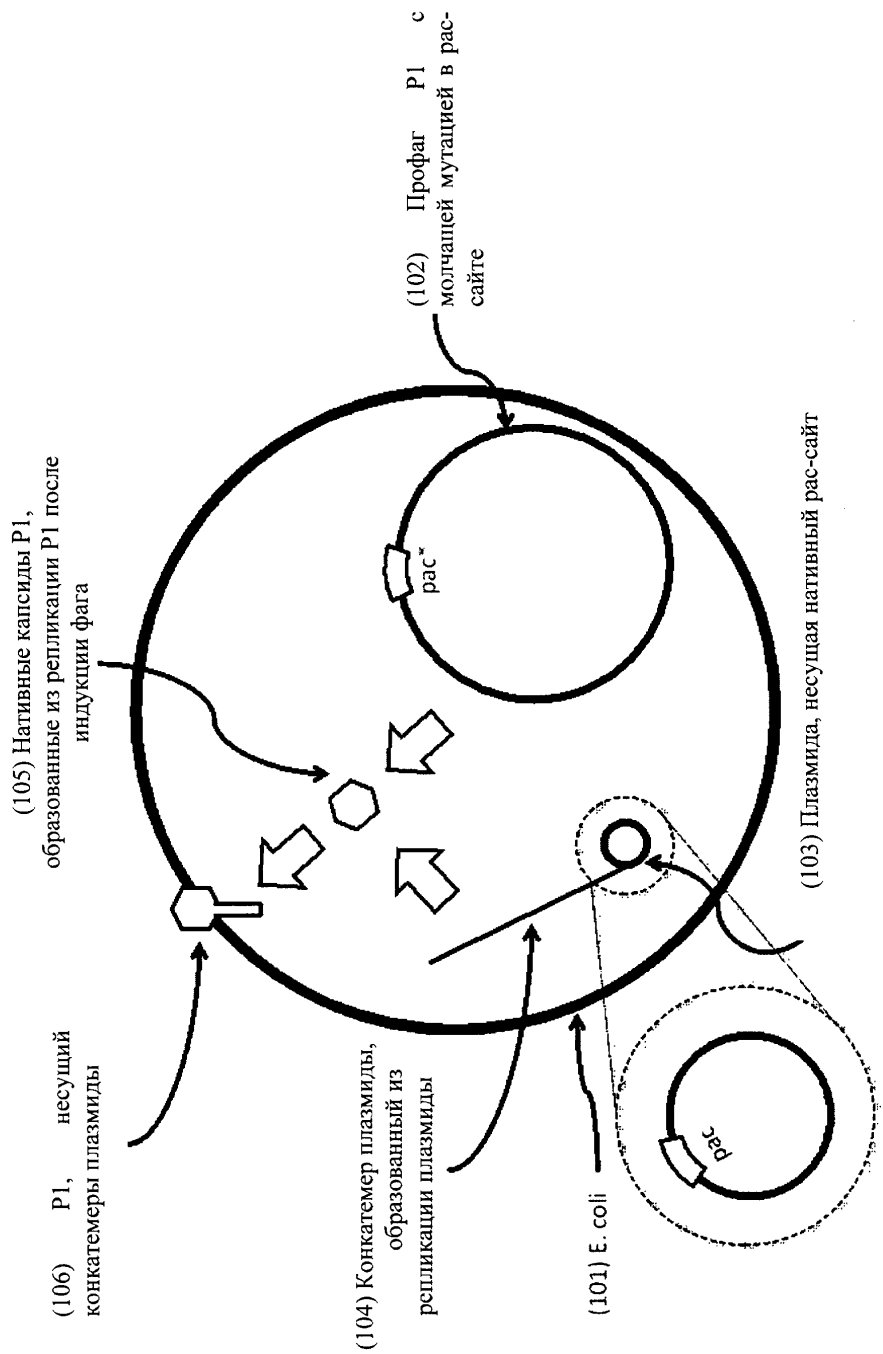


Схема основанной на R1 упаковочной системы (100)

Фиг. 1

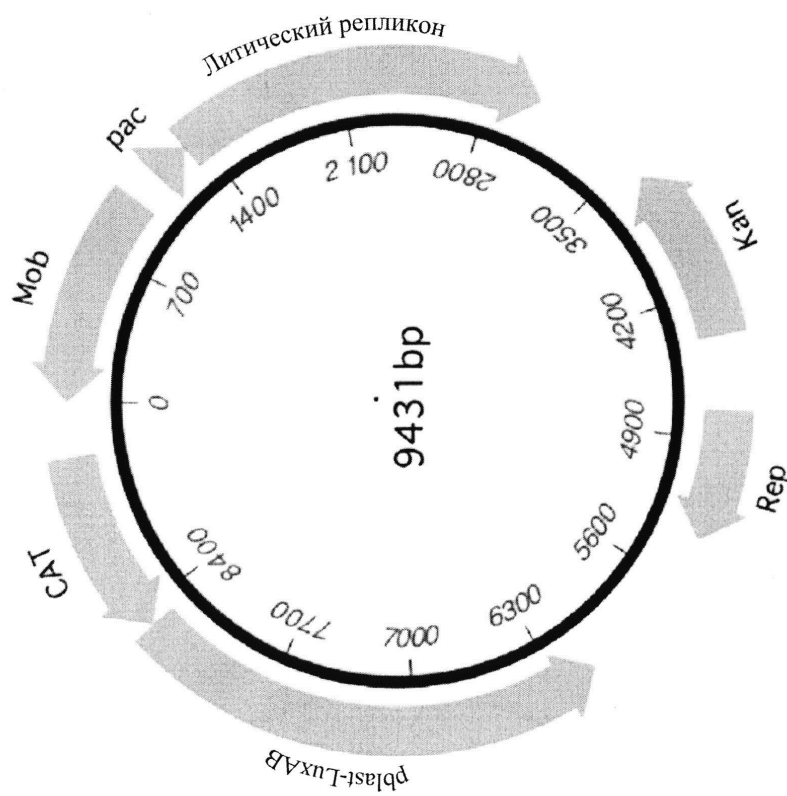


Схема pGWP10001

Фиг. 2

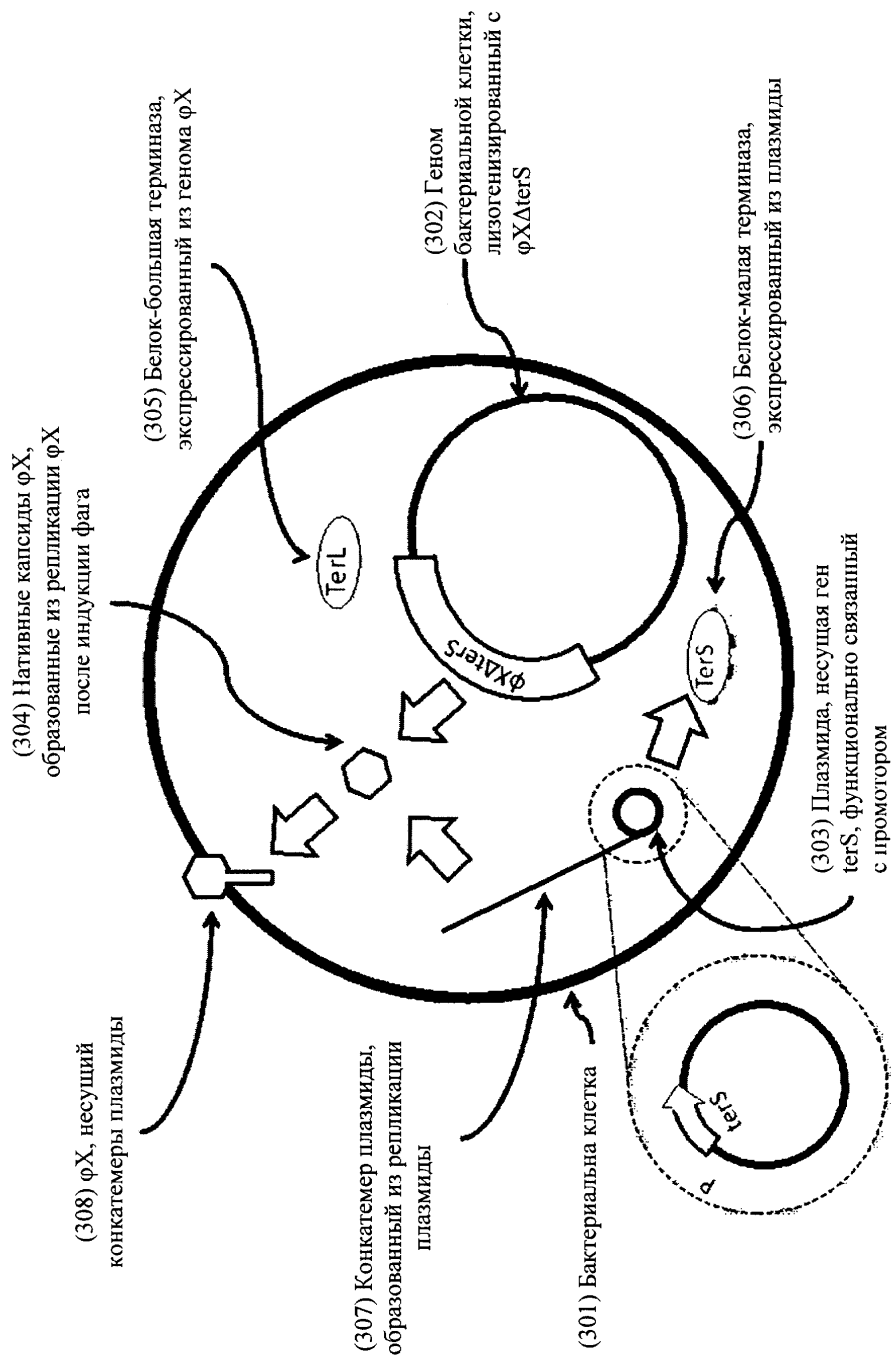


Схема упаковочной системы с делецией/комплементарией рас-сайта (300)

Фиг. 3

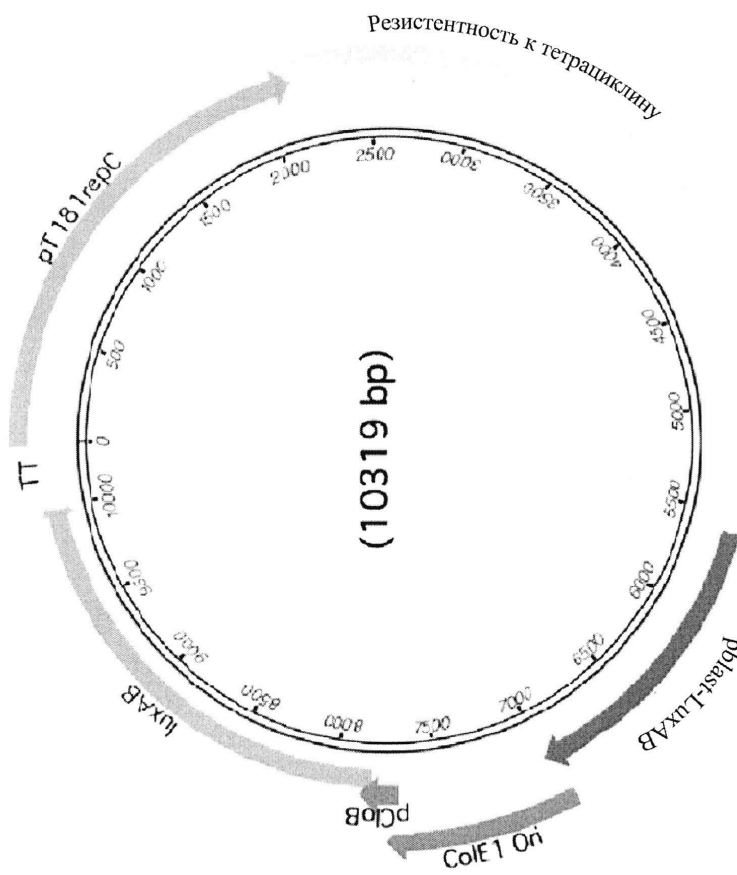


Схема pGW80A0001

Фиг. 4

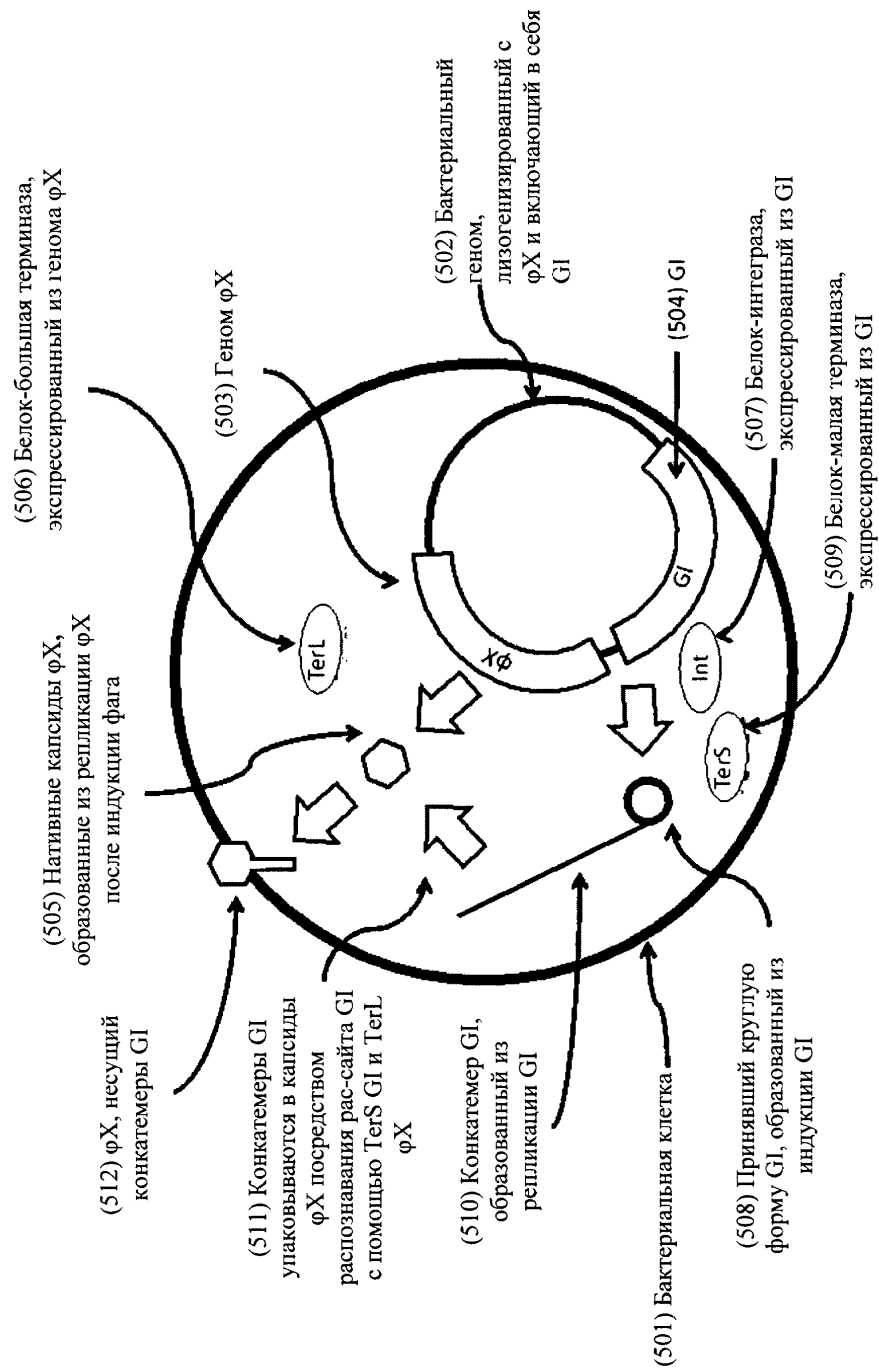


Схема упаковочной системы природного геномного острова

Фиг. 5

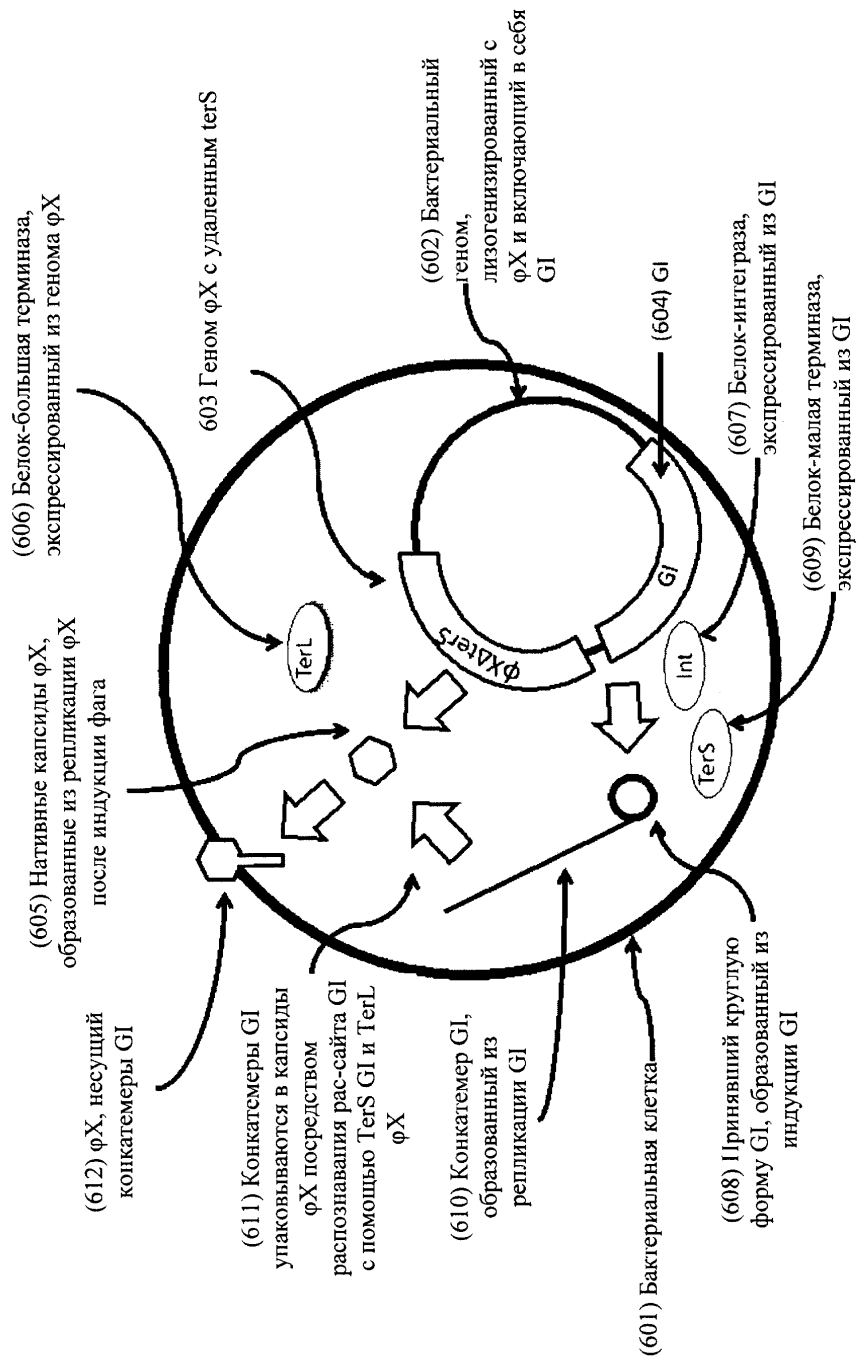


Схема основанной на геномном острове (GI) упаковочной системы

Фиг. 6



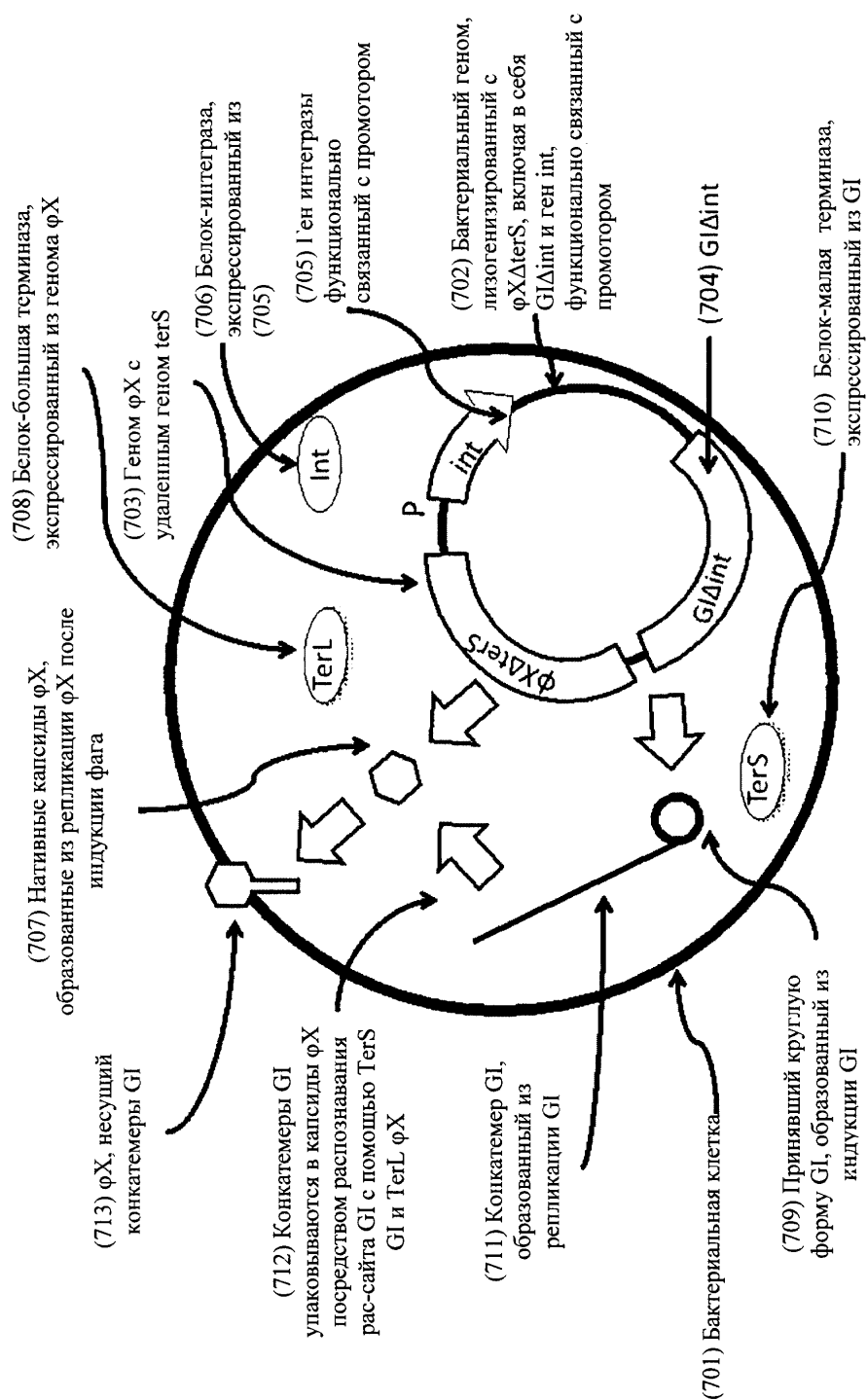
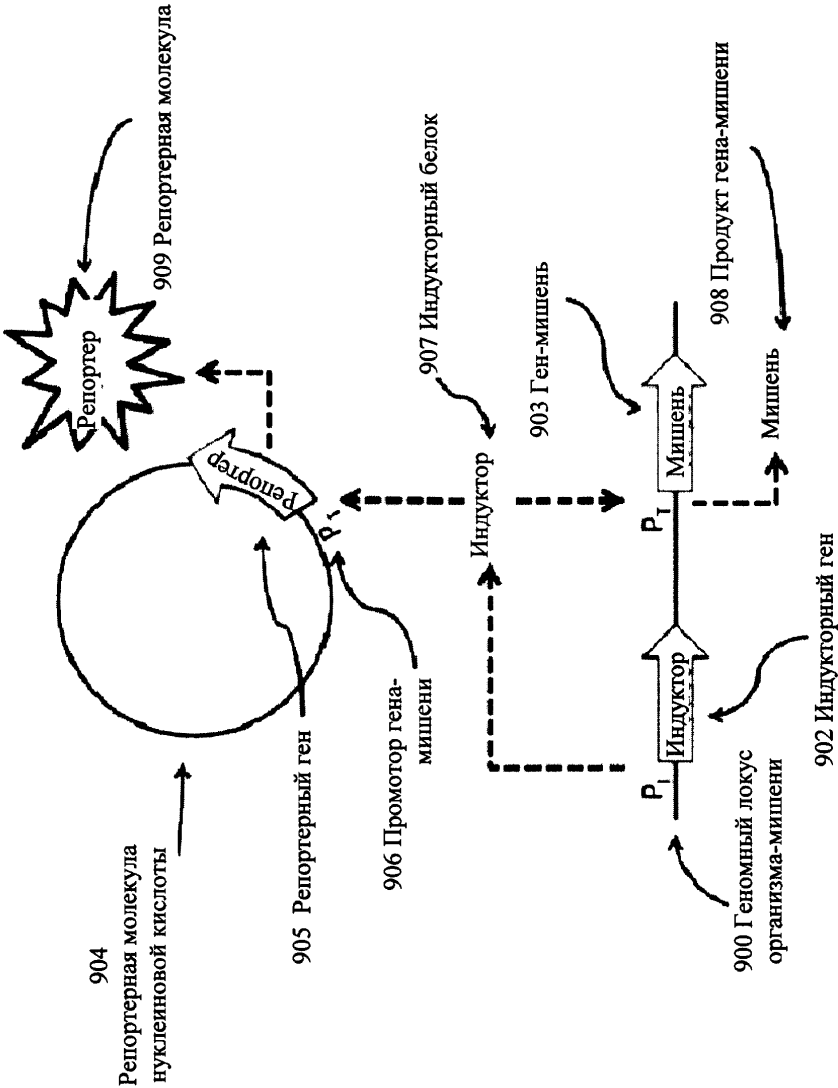


Схема упаковочной системы геномного острова, которая не интегрируется в геном хозяина (700)

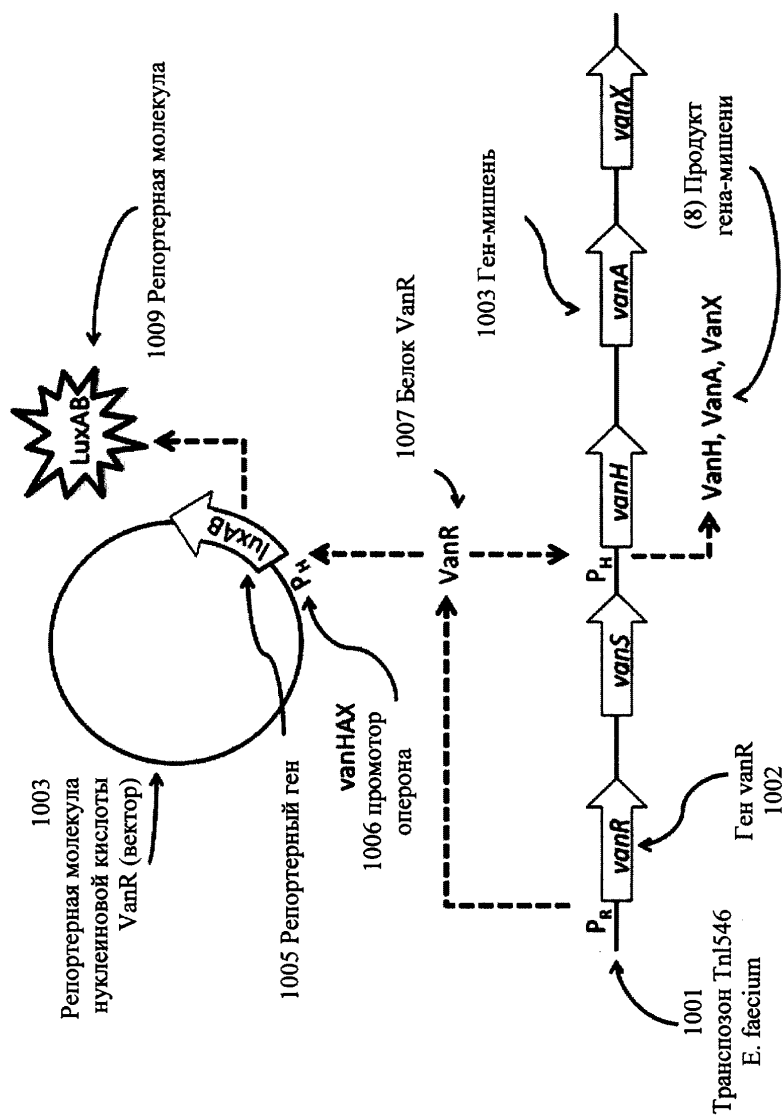
Фиг. 7



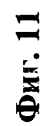
**Фиг. 8**

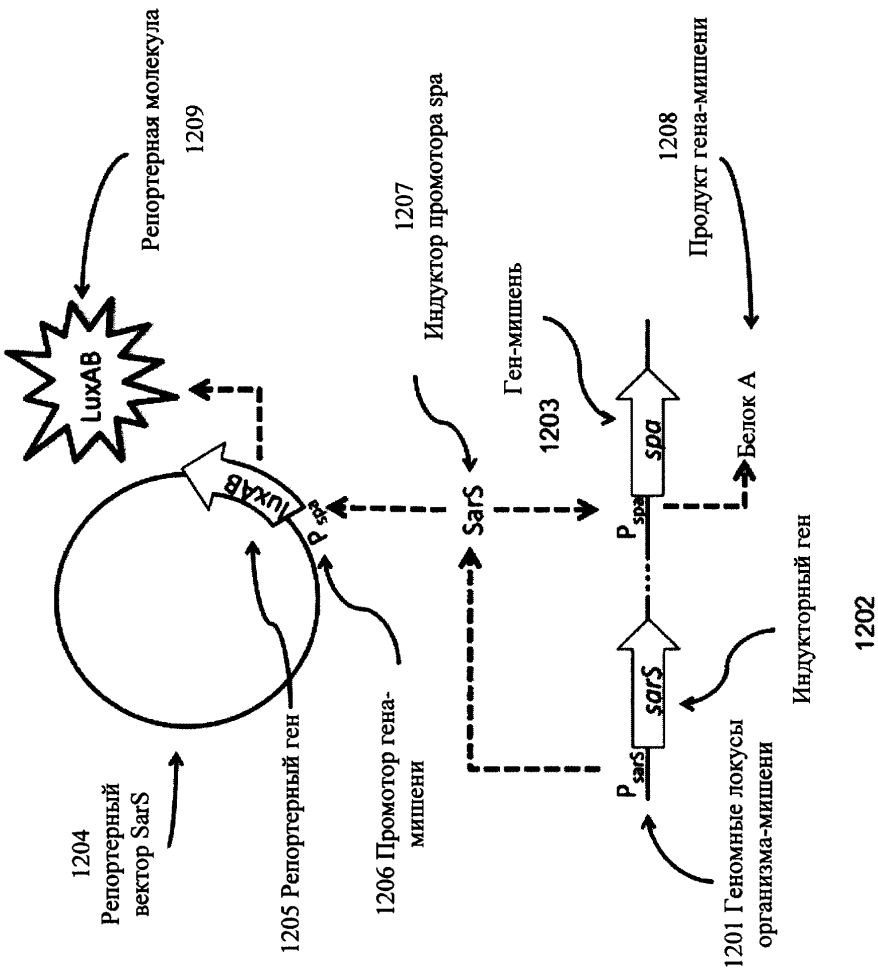


Фиг. 9

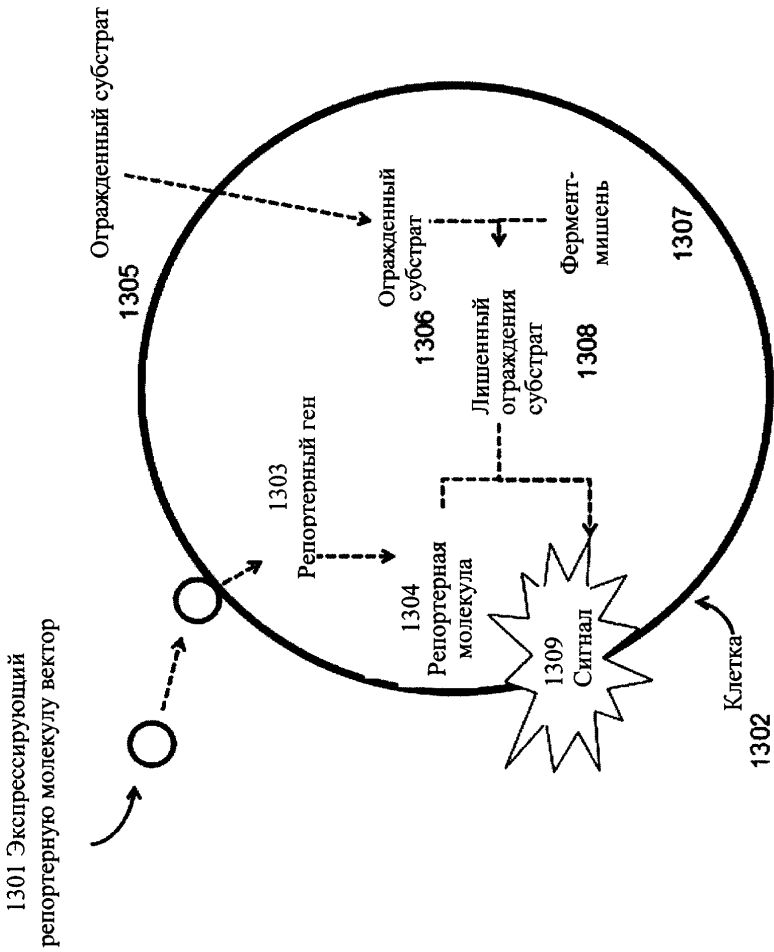


**Фиг. 10**

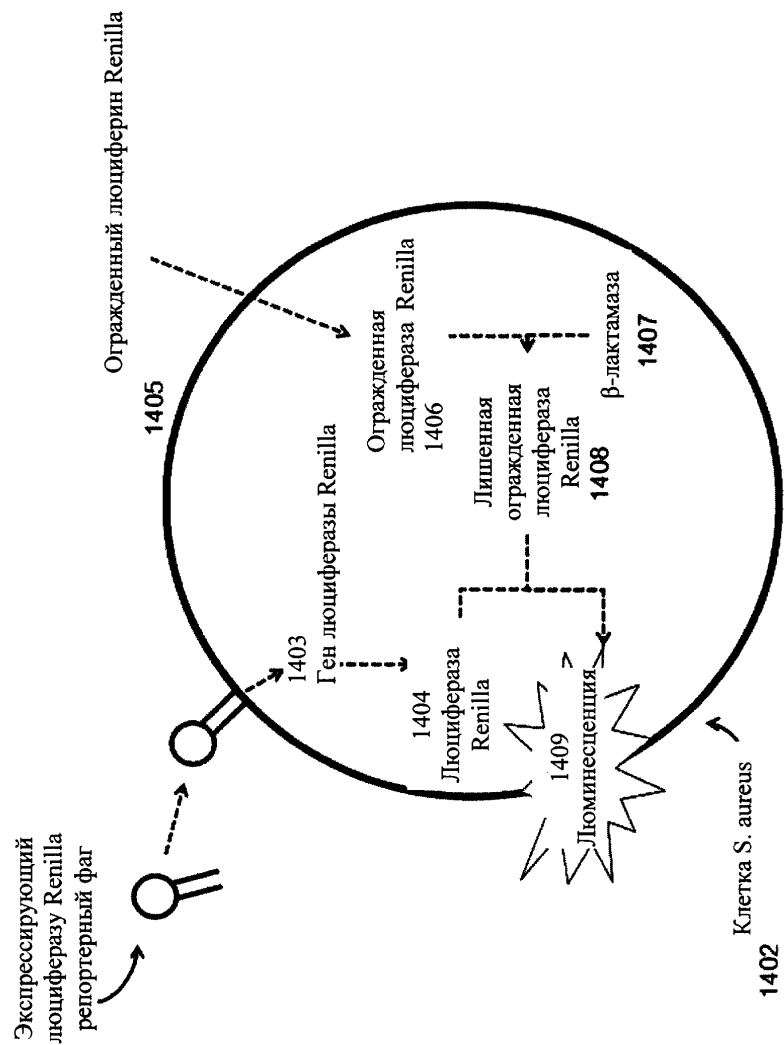




Фиг. 12

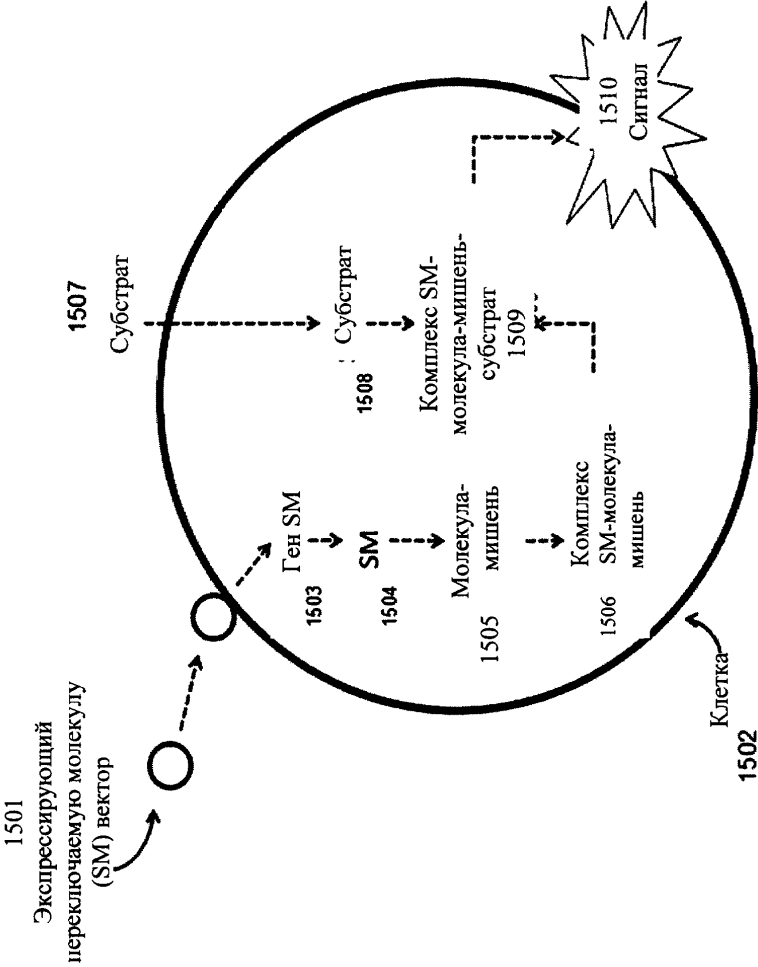


Фиг. 13

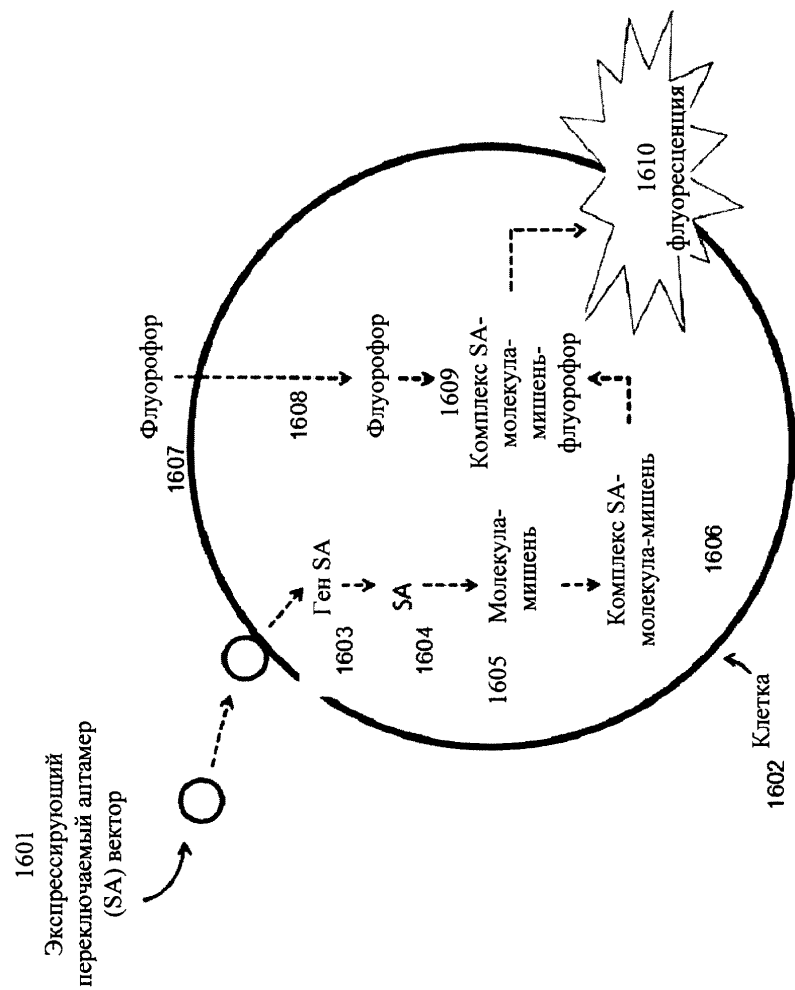


Фиг. 14

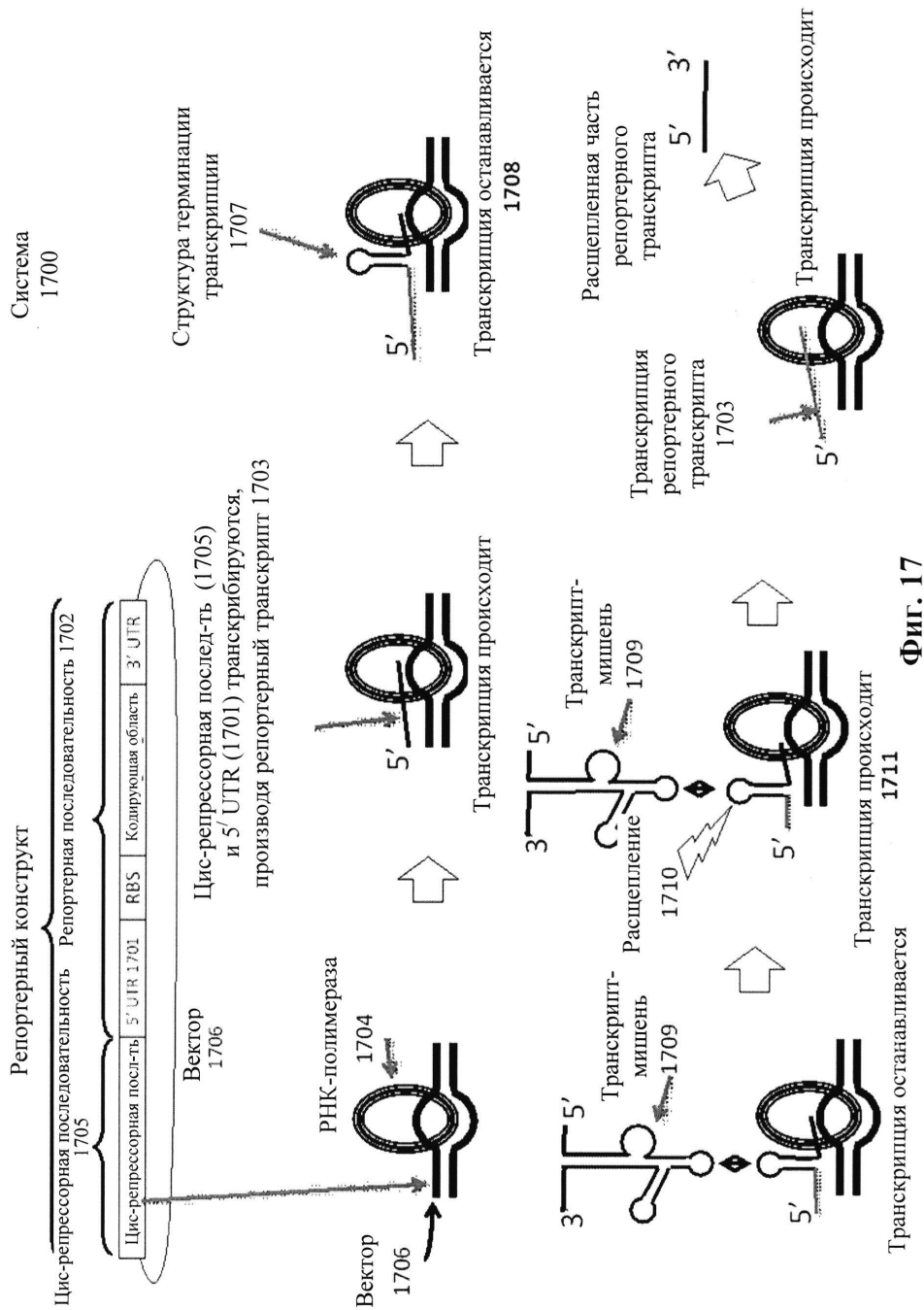


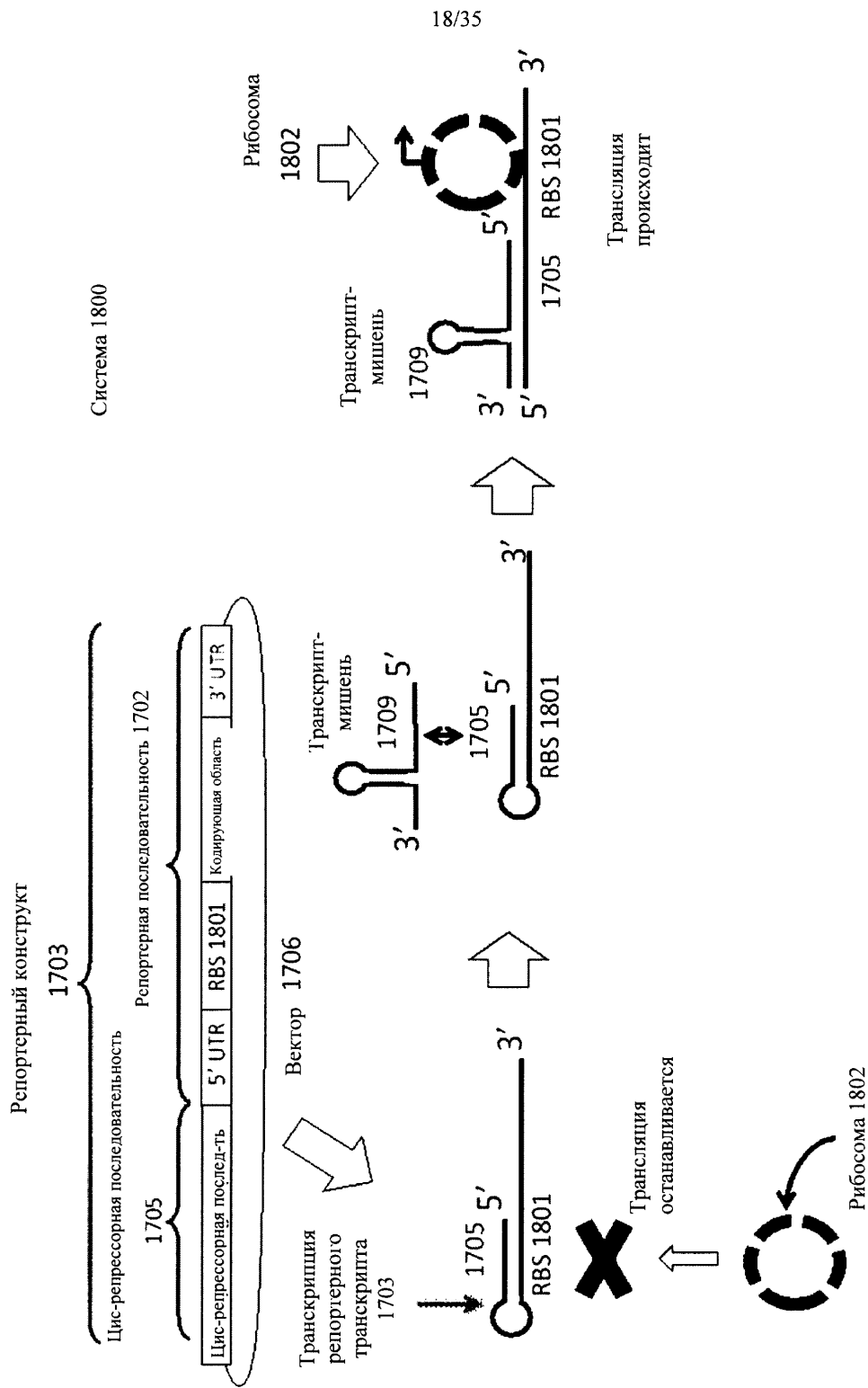


Фиг. 15

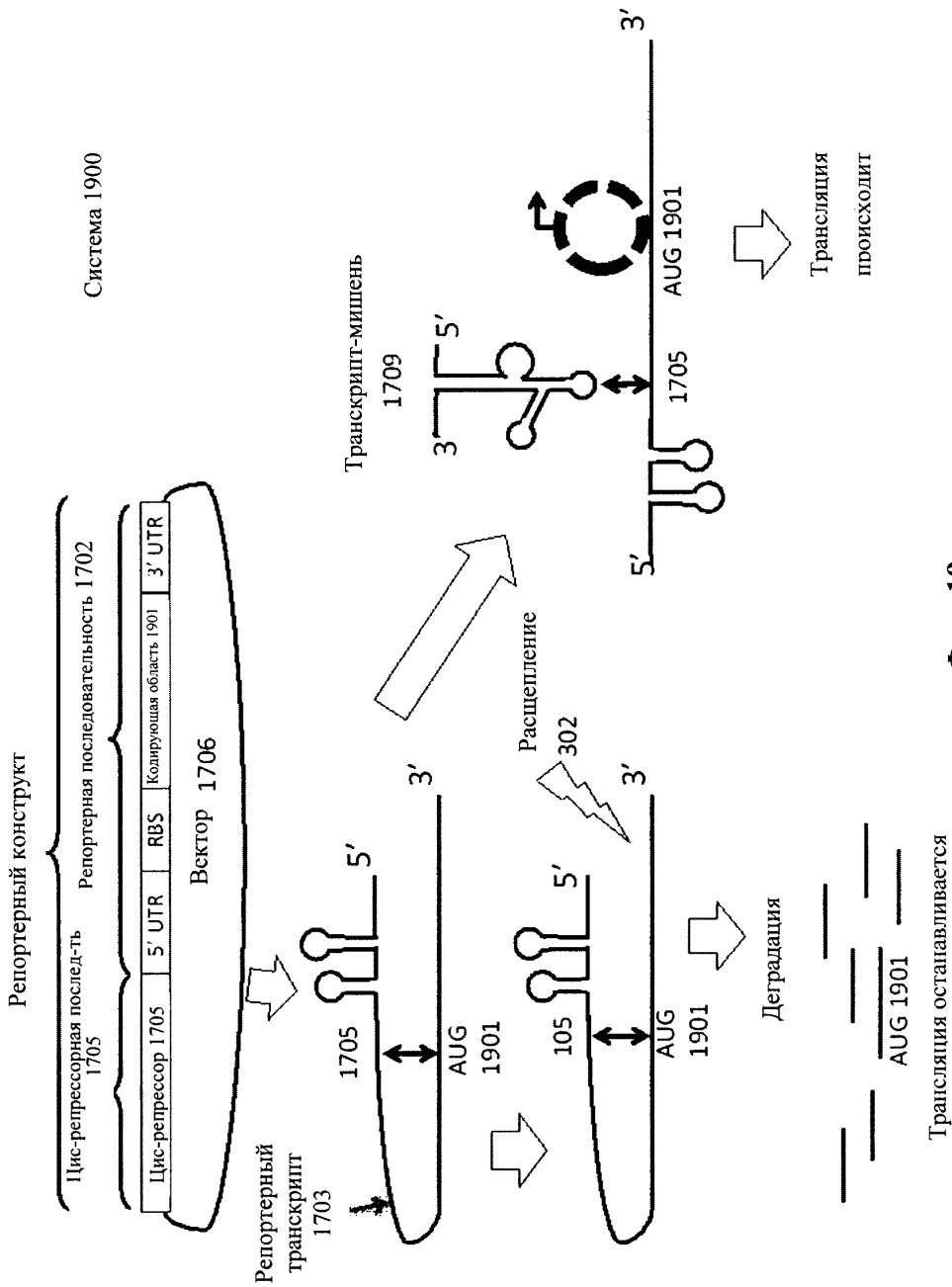


Фиг. 16

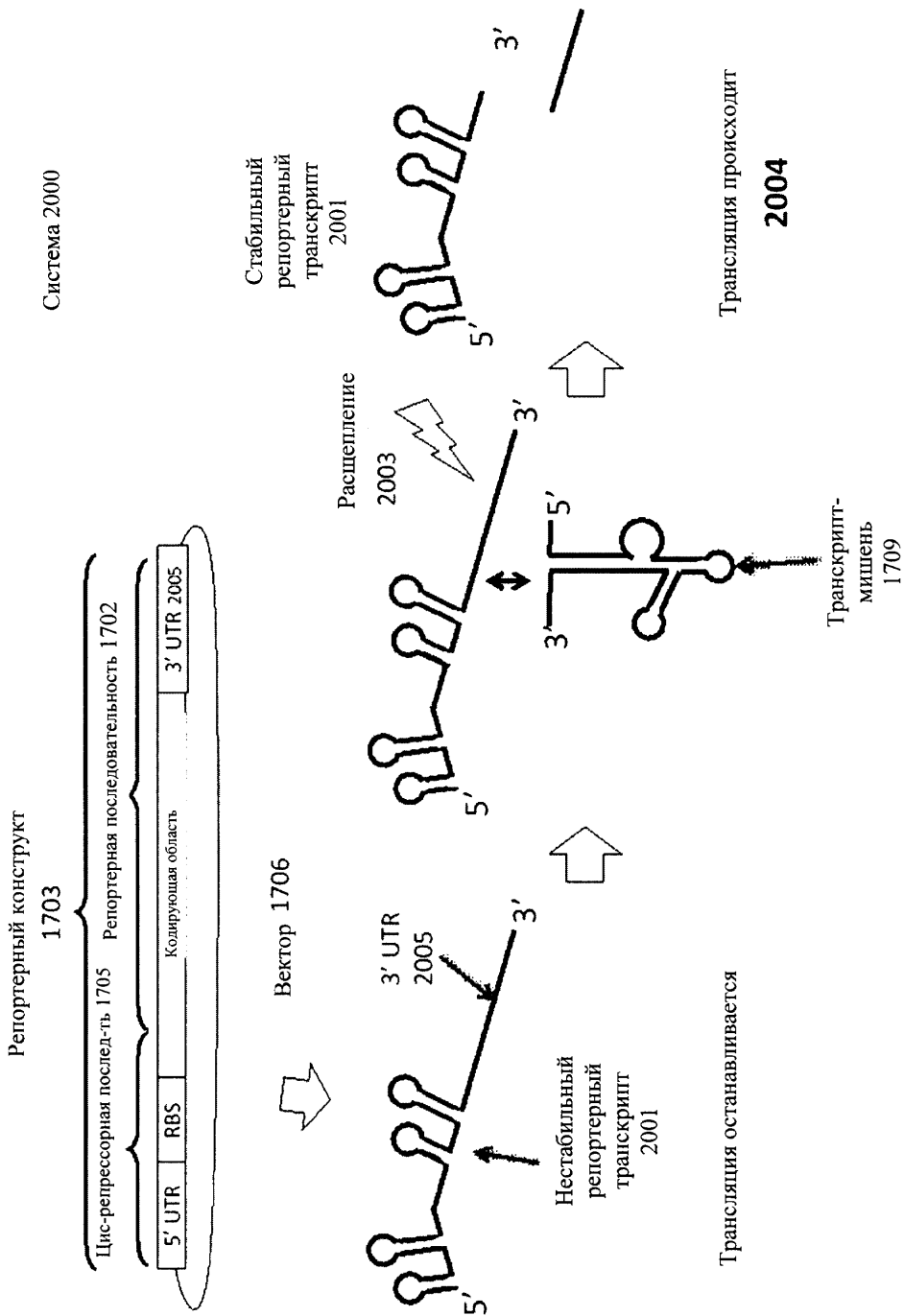




Фиг. 18

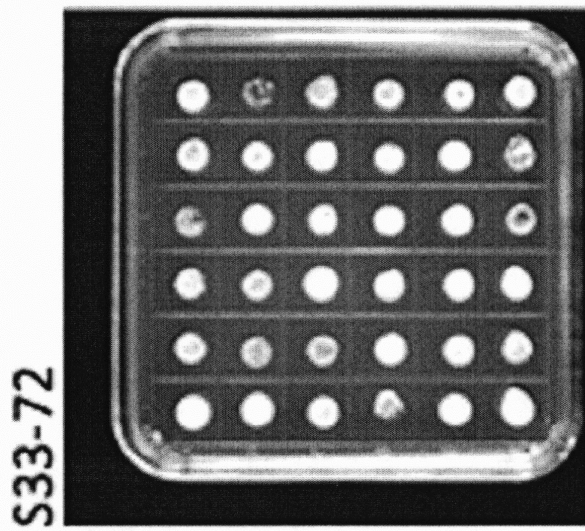


Фиг. 19



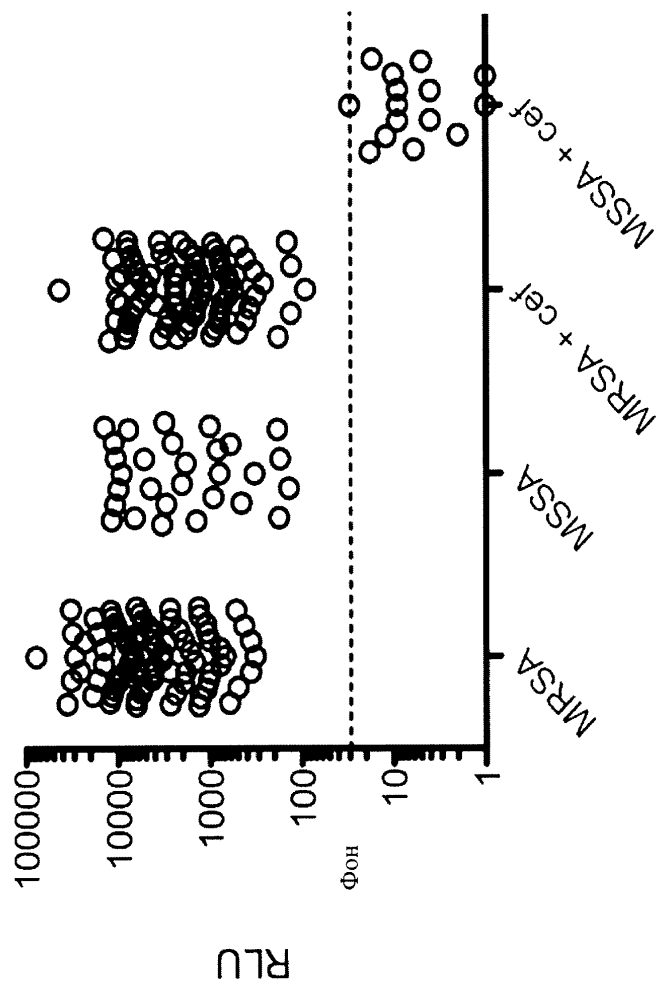
Фиг. 20

21/35



Фотография трансдуцированных клинических MRSA штаммов

**Фиг. 21**

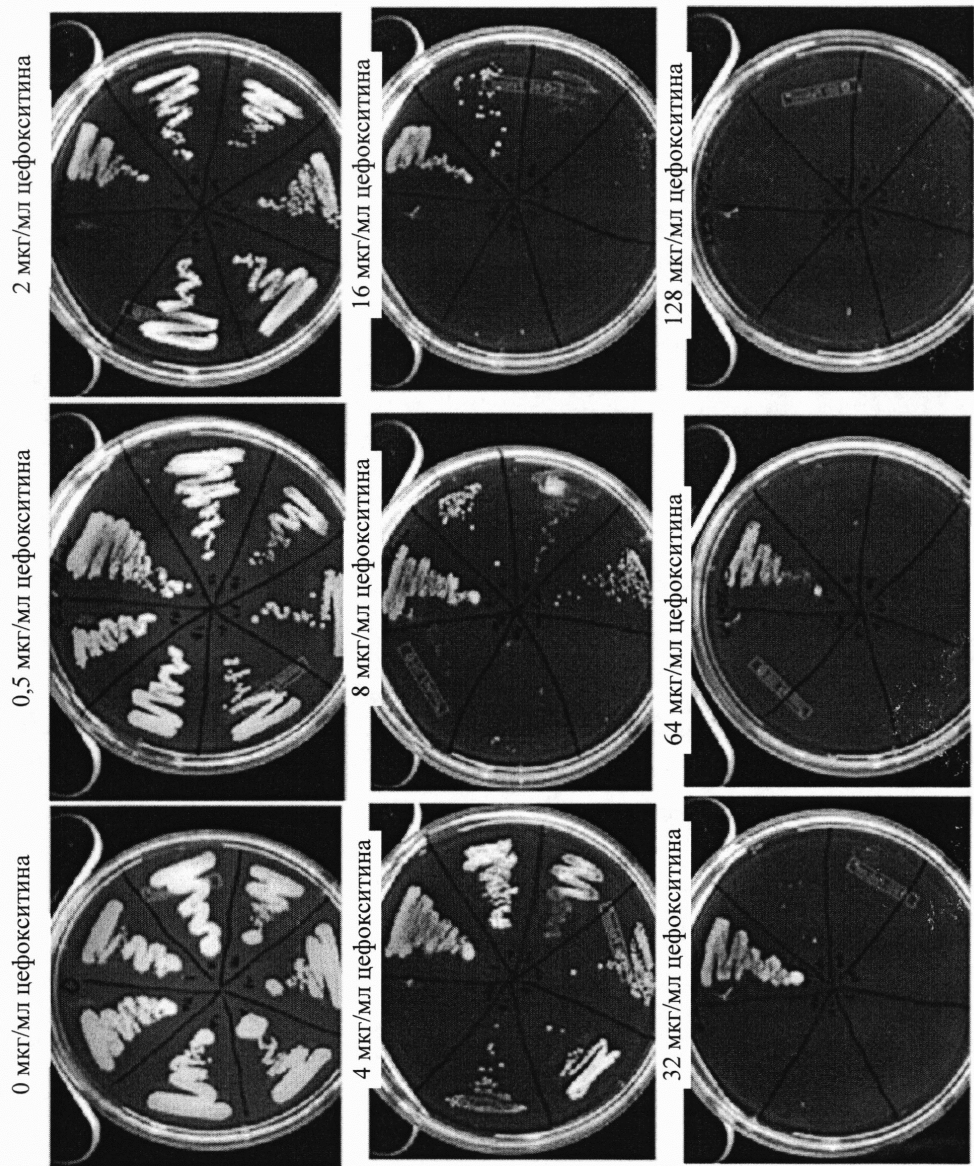


Люминесценция в *S. aureus* и различие MRSA и MSSA

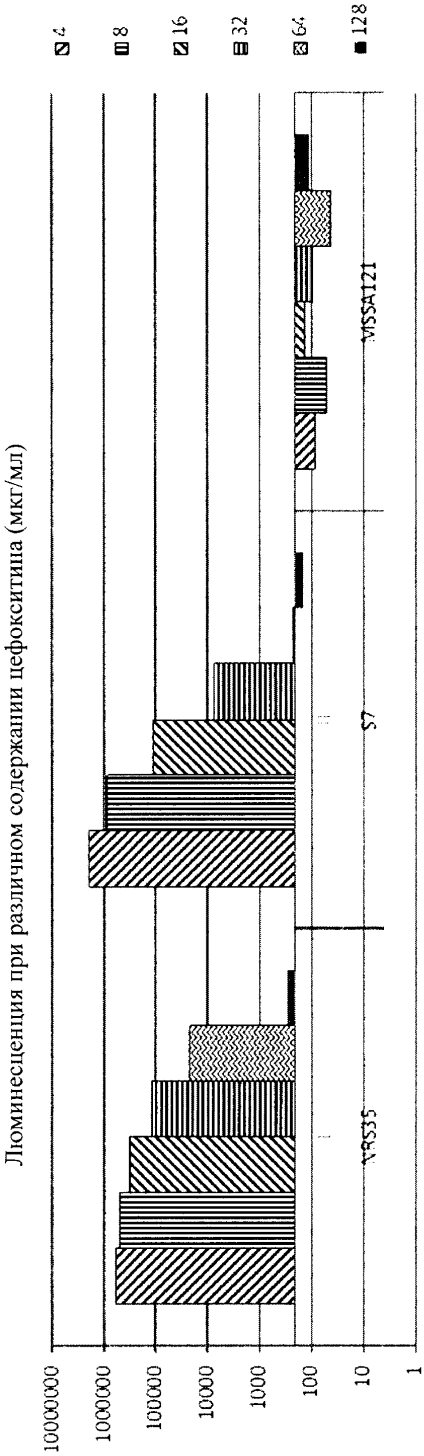
Фиг. 22



23/35



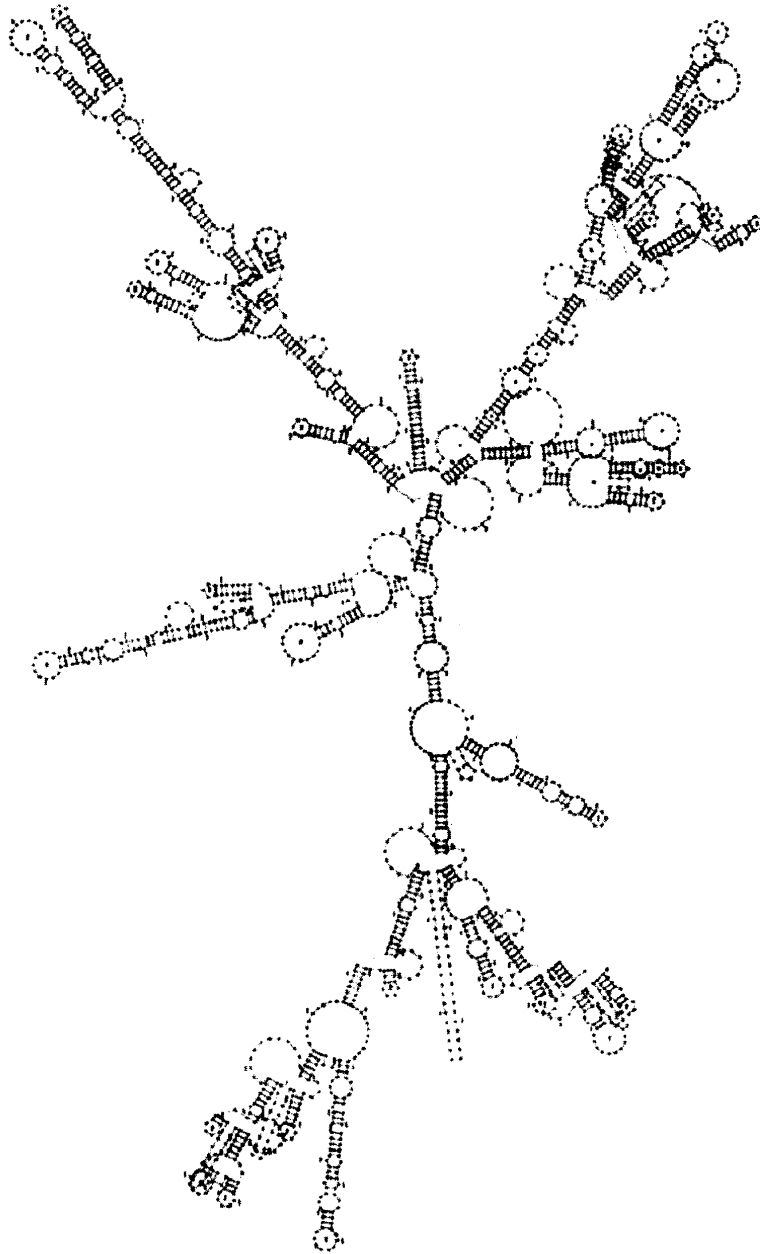
Фиг. 23



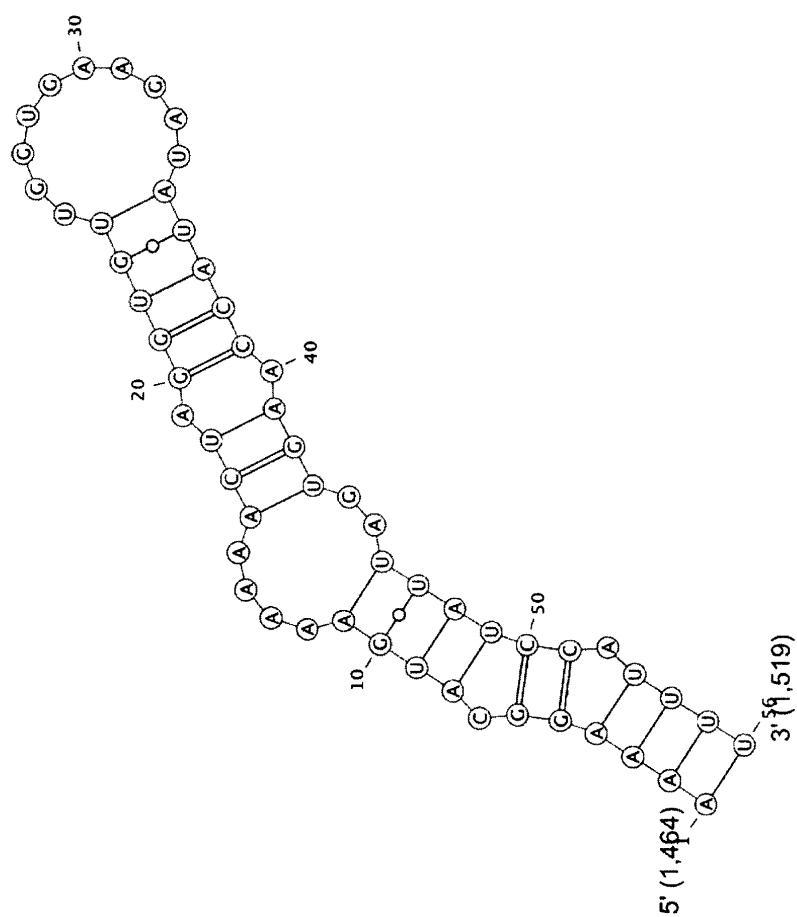
Люминесценция, полученная от MRSA и MSSA при различных концентрациях цефокситина

Фиг. 24

25/35



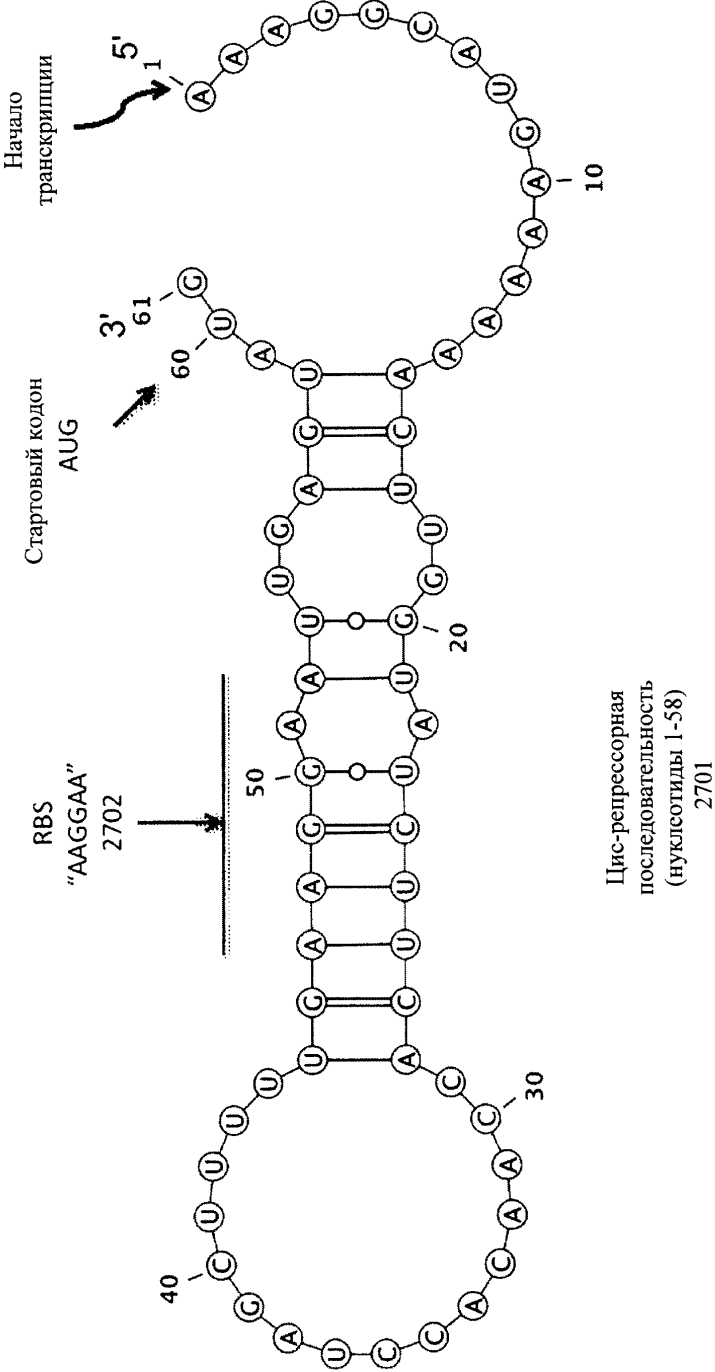
Фиг. 25



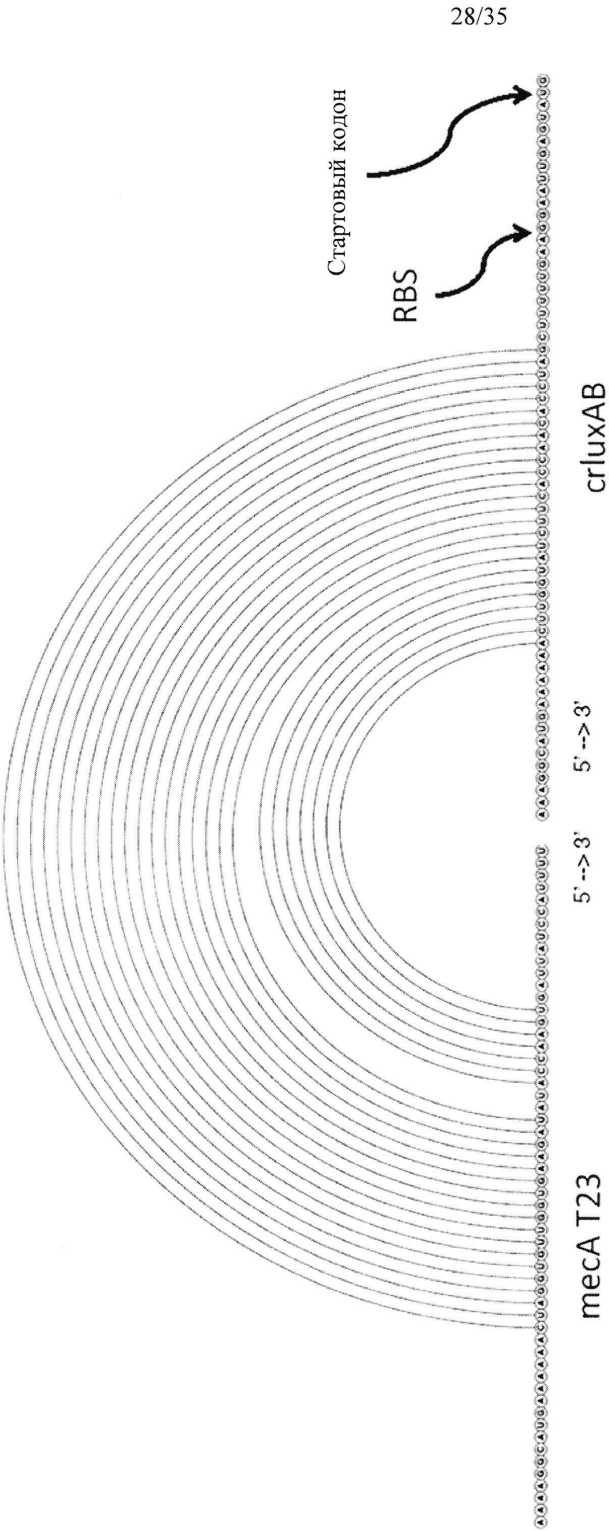
**mecA T23**

**Фиг. 26**

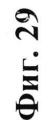
27/35



Фиг. 27



Фиг. 28

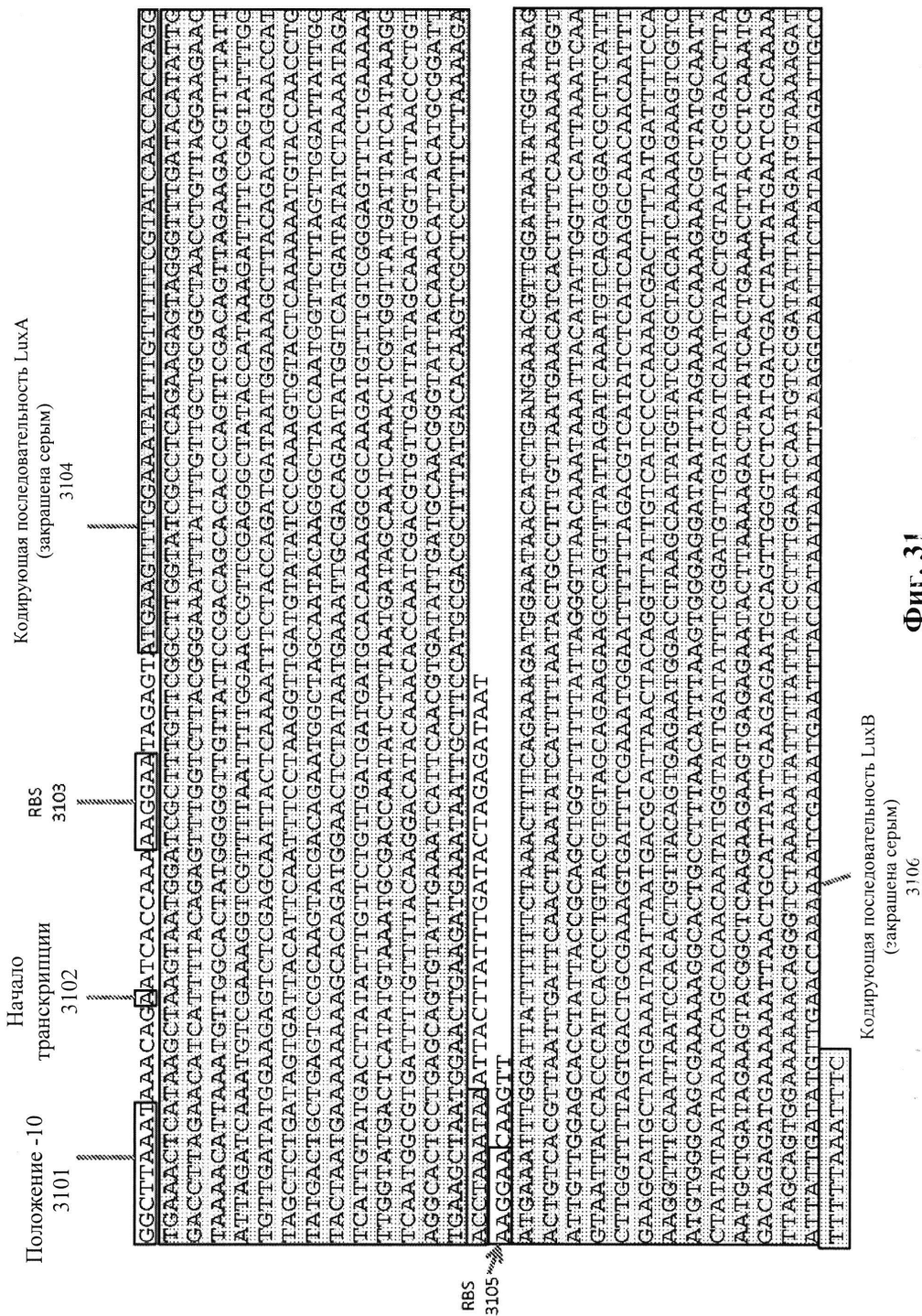


RBS  
3001

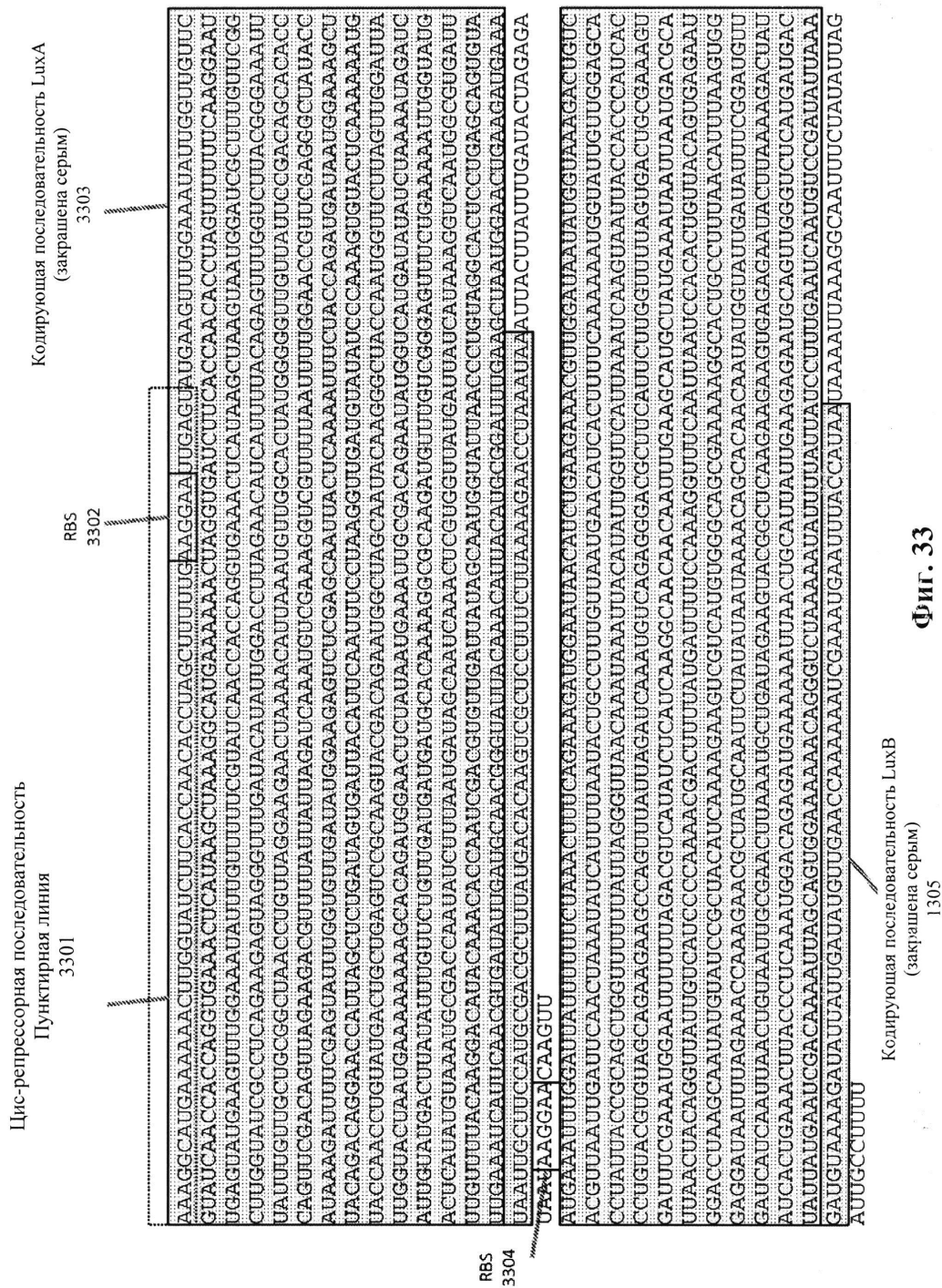
UAGUCUUAUAAGGAGGAUAUUGAUGAAAAAGAAAAAAUUGUCCCAUUAUUUAUAGUUGUGGGUUUGGUAUA  
UAUUUUUAUGCUUCAAAGAUAAGAAAAUUAAUAUAUAUUAUGAAUGCAAUUGAAUAUAAAUUAUAAACAAAGAU  
AGCAGUUAUAUUUCUAAAAAGCAUAUUGUGAAUGAAUAUGACUGAAACGUCGAUAAAAUAUAUAUAGUUUAGGCGUUA  
GAUAUAACAUIUCAGGUCGUAAAAUAUAAAGUAUCUAAAAUAUAAACGAGUAGUCUAAUAUAAAAUAAAACAAC  
UACGGUAACAUAUGACGCAACGUUCAUUAUUUUGUUAAGAGAGUUGUAUGGAGUAUGGGAUCAUAGCGUCUAU  
UCCAGGAUUGCAGAAAGACCAAGCAUAUAUUGAAAAUUAAAAUCAGAAACGUGGUAUAAUUUAAGACCGAAAAACA  
GAAUUUGGCCAAUAUCAGGAACAGCAUAUGAGAGGCAUCGUUCCAAAGAAUGUAUCUAAAAAGAUUAUAAAGCAUCGUA  
CUAAAGUAUUUCUGAAAGUAUAUUAACAACAACAAUUGGAUAAUUAUUGGUAUAAUUGGUAUCCUUGUCCACUA  
GUUAAAAUAUUGGAUAUAUUUAGUAUUUCGCAAAAAUUUCAUCUUAACAUAUGAAACAGAAAGUGCUAACUAUCU  
CUAGAAAAAGCGACUUGACAUCUAUUAUGGUUAUGUUGGUCUUAACUCUGAAGAAUUAUAAACAAAGAAUAAAGCU  
AAAAAGUAGUGCAGUUAUUGGUAUAAAGGCAUCGCAAAACUUAACGAUAAAAAGCUCCAACAUAGAAAGUUGGUAUCGUGUCACA  
AUCGUUGACGAUAUAGCAUAACAUAUCGCAUAUAUAUAGAAAAAGAAAAAGUAGGCAAAAGUAUUAUCAAACUAUAU  
GAUGCUAAAGUUCAAAAAGUAUUUAUAACAACAUAUAAUUAUGCUAGUAUCUGUAUCCUCCUCAAACAGGUGAA  
UUUUUAAGCAUUUGAAGCACCCUUAUAGACGCUUAUCCAUUUAUGUAUGGCAUGAUAACGAAGAAUUAUAAUAUAAAC  
GAAGAUAUAAAAAGAACUCUGUCUACAAGUUCGAGUAUACAACUUCACCGGUUCAAUCUAAAAUAUUAACAGCAUAU  
GGGUUAAAAUACAAACAUUAGACGAUAAAAACAAGUUAUAAAUUGGAUGUAAGGUUGGCAAAAAAGUAUAUUCUUGGGUGGU  
UACAAACGUACAAGAUUAUGAAGUGGUAUUAUUGCAUUAACAAGCAUAAGAAUAGAAUACAUAUUAUUCUUGCU  
AGAGUAGCACUCGAAUUAAGGCAGUAAGAAAAUUGAAAAAGGCAUGAAAAACUAGGUGUUGGGAAGAAUAUACCAAGUGAUUAU  
CCAUUUUAUAUUGUCUCAAUUUCUCAAACAAUUAUUAAGUAUUAUUAUAGCUUAUUAUAGCUUAACGGAACAAGUGAAAAUA  
CUGAUUAACCAAGUACAGUCCUUCAACUAUUGCGCAUUAAGAAAAUUAUGGCAUAUUAACGCAUUAUUAUAAAGAC  
ACGAAAAACAAAGUUUGGAAGAAAAUAUUUCCCAAGAAAAUAUCAAUCUAUUAACUGAUGGUAGCAACAGUCGUAUA  
AAAAACAUAUAAAGAUUAUUUAUGAUUUUAUGCAACUUAUUGGCAAUUCCGUACUGCAGAAUCUCAAUAGAAACAAGGA  
GAAAACUGGCAGACAAUUGGGUGUUUAUAUAUAUGAUAAAGUAUUAUCCAAACAUUGAUGGCUAUUAUUAUGUAAAGAUUA  
CAAGAUUAAGGAUUGGCUAGCUACAUGCCAAAAUCUCAGGUAAGUGUAUGAGCUUAUAGAGAACGGUAUUAUAAAAUAAC  
UAUAUAGAUAAUAACAAACAGUGAAACAAUCCGUAAACGAUGGUUGCUUACUGUUUU

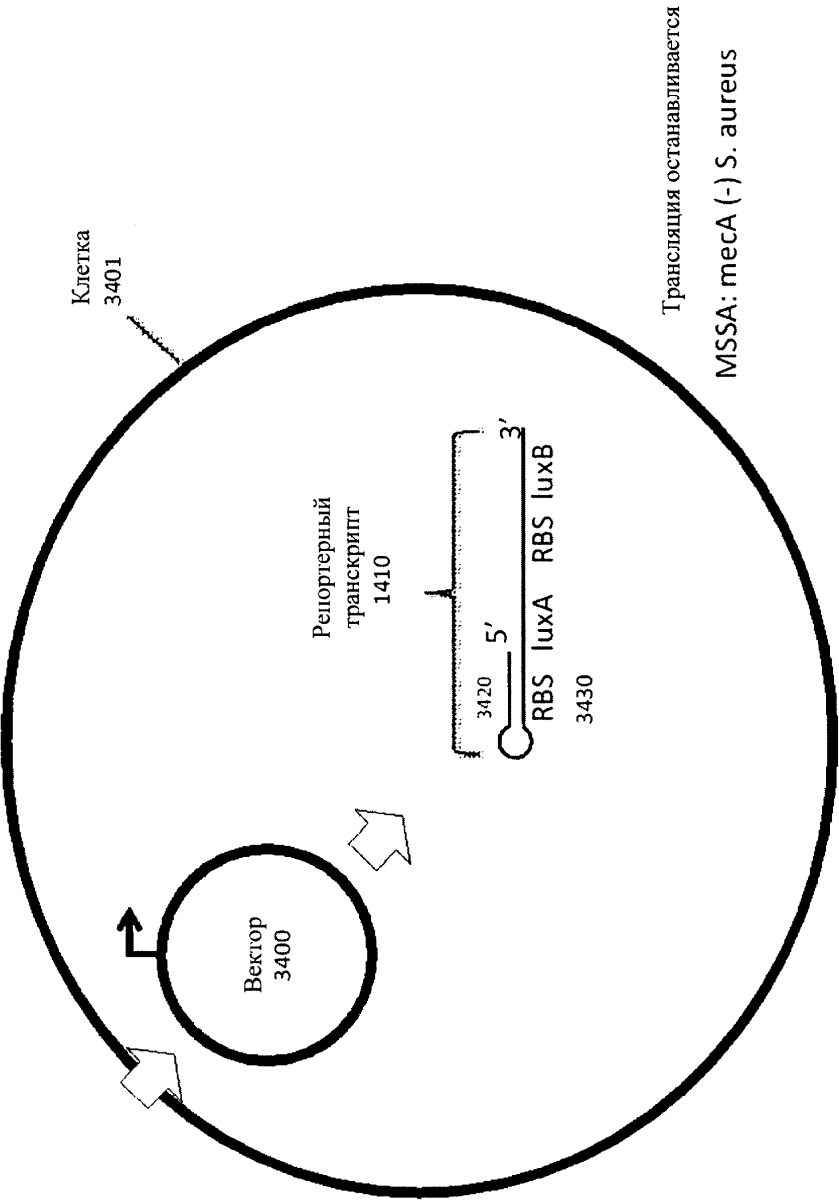
**Фиг. 30**



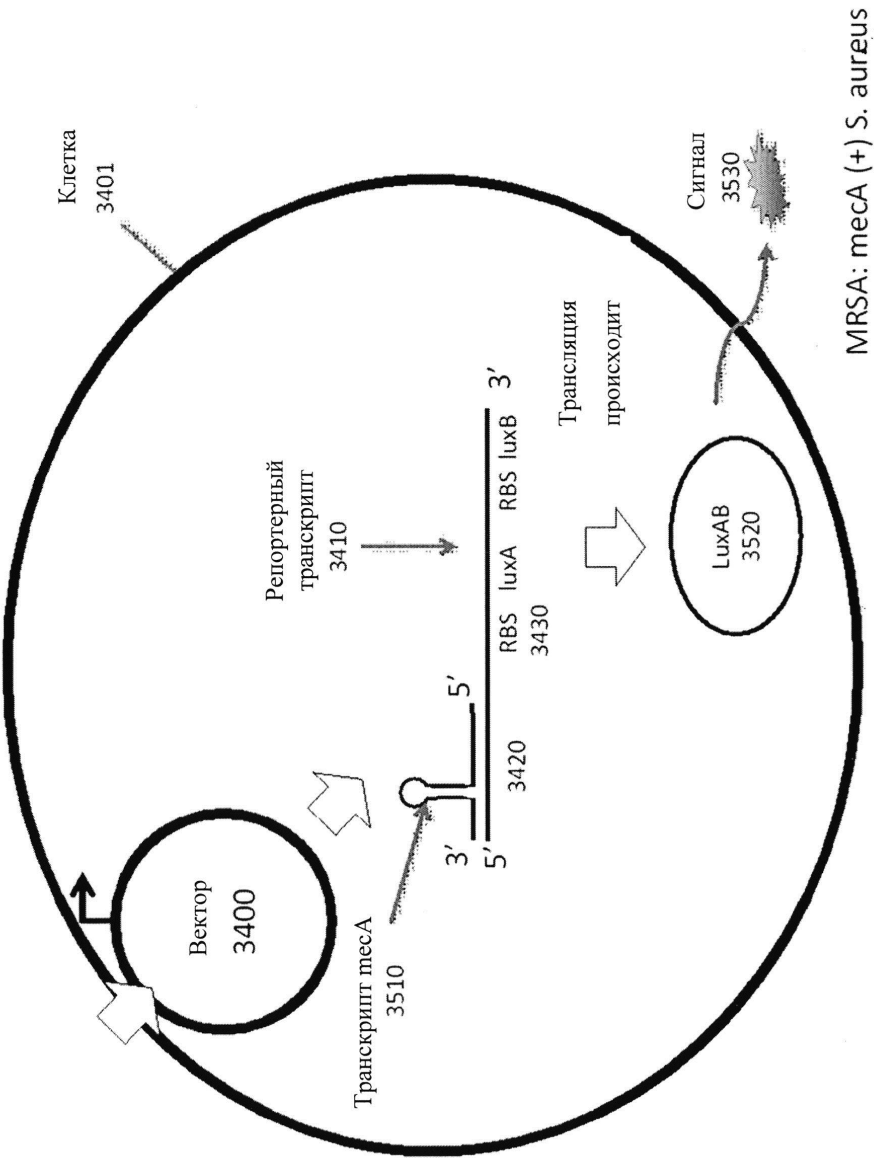


Кодирующая последовательность LuxV  
(закрашена серым)





Фиг. 34



MRSA: месА (+) *S. aureus*

Фиг. 35