



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/6816 (2006.01); *C12Q 1/6825* (2006.01); *C12Q 1/6844* (2006.01); *C12Q 1/689* (2006.01); *C12Q 2600/16* (2006.01); *C12Q 2565/107* (2006.01); *C12Q 2563/107* (2006.01); *C12Q 2531/119* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016112354, 30.10.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.10.2014Дата регистрации:
26.09.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.10.2013 GB 1319180.4

(43) Дата публикации заявки: 01.12.2017 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 26.09.2018 Бюл. № 27

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 30.05.2016

(86) Заявка РСТ:
GB 2014/053238 (30.10.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/063498 (07.05.2015)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулингз Интернэшнл Инк.", Строкова Ольга
Владимировна

(72) Автор(ы):

СУВАРА Моника Ивона (GB),
ДЖЕЙВИД Саджид (GB),
ГИЛЛИС Элизабет Энн (GB)

(73) Патентообладатель(и):

МАСТ ГРУП ЛИМИТЕД (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: IkedaS. etal. Doubly thiazide orange-labeled cytidine for functional expansion of a hybridization-sensitive probe //Tetrahedron Letters. - 2009. - Vol. 50. - n. 51. - P. 7191-7195. IkedaS. etal. Doubly thiazide orange-labeled cytidine for functional expansion of a hybridization-sensitive probe //Tetrahedron Letters. - 2009. - Vol. 50. - n. 51. - (см. прод.)

(54) НУКЛЕИНОВО-КИСЛОТНЫЙ ЗОНД

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Изобретение включает новые зонды для изотермической амплификации нуклеиновой кислоты и способы обнаружения последовательности-мишени нуклеиновой кислоты с использованием этих зондов. Зонды содержат последовательность олигонуклеотидного зонда, комплементарную области последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Последовательность

олигонуклеотидного зонда имеет только одну флуорофорную метку, связанную с внутренним цитозиновым основанием, и не имеет терминатора на 3'-конце. Цитозиновое основание центрально расположено по длине олигонуклеотида, за исключением позиций 1-3 на 3'-конце и позиции 1 на 5'-конце. Данные зонды могут быть использованы для выявления хламидийной и гонорейной инфекций у пациента. 4 н. и 17 з.п. ф-лы, 12 ил., 1 табл., 12 пр.

(56) (продолжение):

P. 7191-7195. Tong C. Y. W., Malison H. Moving to nucleic acid-based detection of genital Chlamydia trachomatis //Expert review of molecular diagnostics. - 2002. - Vol. 2. - n. 3. - P. 257-266. Позняк А. Л. и др. Современные аспекты диагностики мочеполовой хламидийной инфекции //Редакционная коллегия. - 2009. - С. 7.

R U 2 6 6 8 1 5 4 C 2

R U 2 6 6 8 1 5 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/6816 (2006.01); C12Q 1/6825 (2006.01); C12Q 1/6844 (2006.01); C12Q 1/689 (2006.01); C12Q 2600/16 (2006.01); C12Q 2565/107 (2006.01); C12Q 2563/107 (2006.01); C12Q 2531/119 (2006.01)

(21)(22) Application: **2016112354, 30.10.2014**

(24) Effective date for property rights:
30.10.2014

Registration date:
26.09.2018

Priority:

(30) Convention priority:
30.10.2013 GB 1319180.4

(43) Application published: **01.12.2017 Bull. № 34**

(45) Date of publication: **26.09.2018 Bull. № 27**

(85) Commencement of national phase: **30.05.2016**

(86) PCT application:
GB 2014/053238 (30.10.2014)

(87) PCT publication:
WO 2015/063498 (07.05.2015)

Mail address:
**119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Goulingz Interneshnl Ink.", Strokova Olga
Vladimirovna**

(72) Inventor(s):

**SUWARA Monika Iwona (GB),
JAVED Sajid (GB),
GILLIES Elizabeth Ann (GB)**

(73) Proprietor(s):

MAST GROUP LIMITED (GB)

(54) **NUCLEIC ACID PROBE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention includes novel probes for isothermal amplification of a nucleic acid and methods for detecting a target nucleic acid sequence using these probes. Said probes comprise an oligonucleotide probe sequence complementary to the region of the target nucleic acid sequence. Said oligonucleotide probe sequence has only one fluorophore label associated with

the internal cytosine base, and does not have a 3'-end terminator. Above cytosine base is centrally located along the length of the oligonucleotide, except for positions 1–3 at 3'-end and position 1 at 5'-end.

EFFECT: these probes can be used to detect chlamydia and gonorrhoea infections in a patient.

21 cl, 12 dwg, 1 tbl, 12 ex

R U 2 6 6 8 1 5 4 C 2

R U 2 6 6 8 1 5 4 C 2

Настоящее изобретение относится к зонду для обнаружения нуклеиновой кислоты, способу с использованием упомянутого зонда и набору компонентов. Предпочтительно зонд по настоящему изобретению является применимым в способе обнаружения нуклеиновых кислот, происходящих из *Chlamydia trachomatis* и/или *Neisseria gonorrhoeae*, и может быть использован в диагностике хламидийной и/или гонорейной инфекций.

Амплификация нуклеиновых кислот является одним из наиболее ценных инструментов в области наук о жизни, включая такие ориентированные на практическое применение области, как клиническая медицина, где диагностика инфекционных заболеваний, генетических нарушений и генетических признаков особенно полезна. В дополнение к широко используемой детекции, основанной на ПЦР (полимерной цепной реакции, PCR, Saiki R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Amheim, N. (1985) *Science*, 230, 1350-1354), было изобретено несколько способов амплификации.

Примеры включают реакцию амплификации, основанной на последовательности нуклеиновой кислоты (nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)), самоподдерживающуюся репликацию последовательности (self-sustained sequence replication (3SR)) и петлевую изотермическую амплификацию (loop-mediated isothermal amplification (LAMP)). ПЦР использует тепловую денатурацию двухцепочечных ДНК-продуктов с тем, чтобы способствовать следующему раунду синтеза ДНК. При 3SR и NASBA удается обходиться без тепловой денатурации, используя набор реакций транскрипции и обратной транскрипции для амплификации последовательности-мишени.

Данные способы могут обеспечивать одинаковую степень амплификации нуклеиновых кислот-мишеней, причем все способы характеризуются порогом обнаружения в менее 10 копий, причем для анализов достаточно часа или около того. Данные способы требуют либо точных приборов для амплификации, либо сложных способов для обнаружения амплифицированных продуктов из-за плохой специфичности при селекции последовательности-мишени. Несмотря на простоту и высокую степень амплификации, требование высокой точности к термоциклеру при ПЦР препятствует широкому применению данного мощного способа, например, в частных клиниках в качестве рутинного диагностического прибора. В противоположность этому, LAMP представляет собой способ, который может амплифицировать несколько копий ДНК до более 100 менее чем за час в изотермических условиях и с большей специфичностью.

Наряду с другими, упомянутыми выше технологиями, основанными на применении молекулярных зондов, анализы, основанные на петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), могут использоваться для обнаружения присутствия специфических микроорганизмов в образце. Однако, данные способы обнаружения основаны на непосредственном визуальном обнаружении, оценке мутности или использовании неспецифичного ДНК-интеркалирующего красителя.

Непосредственное визуальное измерение представляет собой измерение в конечной точке и не в состоянии обеспечить анализ в реальном времени. Измерение мутности и неспецифические интеркалирующие красители действительно обеспечивают анализ происходящей амплификации в реальном времени, который, однако, является неспецифическим, т.е. детектируется вся амплификация, будь то истинная положительная амплификация или ложная амплификация из-за ошибочного праймирования, перекрестной специфичности.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения обеспечен зонд для применения при изотермической амплификации нуклеиновой кислоты, содержащий последовательность олигонуклеотидного зонда, комплементарную области целевой последовательности нуклеиновой кислоты, где упомянутая последовательность

олигонуклеотидного зонда имеет только один флуорофор-лиганд, и данный лиганд связан с внутренним цитозинным основанием, и где упомянутая последовательность олигонуклеотидного зонда не имеет терминатора на 3'-конце.

В предпочтительном варианте осуществления последовательность олигонуклеотидного зонда представляет собой ДНК-последовательность и целевая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК-последовательность.

Предпочтительно, флуоресценция увеличивается в том случае, когда надо указать на присутствие нуклеиновой кислоты-мишени в образце.

Предпочтительно, цитозинное основание, по существу, центрально расположено по длине олигонуклеотида. Имеются определенные преимущества, связанные со внутренним мечением зонда по цитозинному основанию. Специфичность ДНК-продукта, амплифицированного в изотермической реакции, может быть подтверждена с помощью анализа кривой плавления. Однако, из-за большого количества вариантов продукта, получаемых в данной реакции и низкого разрешения анализа кривой плавления с использованием интеркалирующих красителей, подобных V13, очень трудно различать специфические и неспецифические ДНК-продукты, полученные в изотермических условиях. Обычно используемые зонды, такие как зонд TaqMan®, не совместимы с LAMP-технологией в связи с активностью замещения цепи BST-полимеразы. Зонд по изобретению удлинен и оказывается включенным в ДНК-продукт в процессе изотермической амплификации, что позволяет осуществлять анализ кривой плавления на полученном продукте. В зонде по изобретению флуорофор конъюгирован с внутренним цитозином, комплементарным гуанину в антисмысловой цепи. Гуанин влияет на возбужденное состояние многих флуорофоров, что приводит к образованию уникальных "подписей" кривых плавления и позволяет различать специфические и неспецифические продукты, образующиеся в изотермических условиях.

Олигонуклеотид не содержит ддНТФ (дидезоксинуклеозидтрифосфата) с 3'-конца, что позволяет включение меченого олигонуклеотида в ампликон. Таким образом, 3'-конец зонда не "заблокирован".

Флуорофор может содержать любое одно или более из следующих: FAM, JOE, TET, HEX, TAMRA, ROX, ALEXA и ATTO.

Зонд может содержать следующую последовательность:

5' X_n C* X_m 3' (SEQ ID NO. 1)

где n>1, m>3, X представляет собой нуклеотидное основание; и * представляет собой флуорофор. Предпочтительно, нуклеотидное основание выбрано из А, Т, С и G.

Предпочтительно, n более чем от 1 до 20 или менее, более предпочтительно более чем от 1 до 10 или менее. Предпочтительно, m более, чем от 3 до 20 или менее, более предпочтительно более чем от 3 до 10 или менее. Предполагается, что вышеупомянутые интервалы значений раскрывают все комбинации длин зонда, охватываемые возможными значениями числа нуклеотидов, которые n или m могут принимать.

Предпочтительно, зонд может содержать последовательность, выбранную из любой из следующих последовательностей:

SEQ ID NO.3: **TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM internal)**

SEQ ID NO.5:

GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC porA7-joe loopF)

or

SEQ ID NO.6:

ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG (GC glnA7-ALEXA546 loopB)

Флуоресценция предпочтительно увеличивается, когда олигонуклеотид включается в последовательность нуклеиновой кислоты-мишени, что приводит к изменению в конфигурации комплекса ампликон-зонд, приводящему к изменению возбужденного состояния флуорофора.

5 Цитозин, связанный с флуорофором-лигандом, не расположен на 5'- или 3'-конце или в непосредственной близости к 5'- или 3'-концу. Более предпочтительно он не расположен в позиции, соответствующей первым 3 основаниям либо от 5'-, либо от 3'-конца. Предпочтительно цитозин, связанный с флуорофором, расположен в позиции, соответствующей основанию, расположенному посередине зонда.

10 В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения, обеспечивается зонд для изотермической амплификации нуклеиновой кислоты, как описано выше.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения, обеспечивается зонд для петлевой изотермической амплификации, как описано выше.

15 Способы и композиции для определения по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени в смеси нуклеиновых кислот, как правило, используют зонд, реагент гибридизации, а также один или более образующих фосфатную связь ферментов, ассоциированных с любыми требуемыми нуклеозидтрифосфатами, чтобы образовать цепь нуклеиновой кислоты.

20 Данные способы обычно включают амплификацию, такую, как включающую использование промотора вместе с РНК-полимеразой, сайта рестрикции, когда только одна цепь расщепляется и затем вытесняется удлинением с помощью ДНК-полимеразы, или реагента циклической гибридизации, когда производятся сцепленные повторы. Обнаружение амплифицированной нуклеиновой кислоты может осуществляться различными способами, но предпочтительно осуществляется с помощью флуорофора.

25 В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения обеспечивается способ обнаружения нуклеиновой кислоты-мишени в образце, включающий:

а. амплификацию нуклеиновой кислоты-мишени в образце, чтобы обеспечить амплифицированную нуклеиновую кислоту;

30 б. зондирование амплифицированной нуклеиновой кислоты с помощью зонда, как описано выше; и

с. обнаружение присутствия одной или нескольких нуклеиновых кислот-мишеней.

Нуклеиновая кислота-мишень может быть нуклеиновой кислотой из

микроорганизмов, грибов, дрожжей, вирусов, человека, животных, растений и т.д.

35 Нуклеиновая кислота-мишень для LAMP, как известно, допускает синтез LAMP-праймеров и соответствующих специфичных зондов. Таким образом, может быть определено наличие или отсутствие упомянутых микроорганизмов, грибов, дрожжей, вирусов, человека, животных, растений в образце. Предпочтительно нуклеиновая кислота-мишень происходит из *Chlamydia trachomatis* или *Neisseria gonorrhoeae*.

40 Предпочтительно, флуоресценция увеличивается, что указывает на присутствие нуклеиновой кислоты-мишени в образце.

Процесс является изотермическим и позволяет проведение амплификации в одну стадию или последовательными стадиями в одном сосуде, где все реагенты совместимы.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики хламидиоза и/или гонореи у пациента, включающему

45 предоставление образца, полученного от пациента;

добавление одного или более зондов по настоящему изобретению к образцу; и

детектирование присутствия нуклеиновой кислоты, полученной из *Chlamydia trachomatis* или *Neisseria gonorrhoeae*, причем увеличение флуоресценции зонда указывает на наличие

инфекции *Chlamydia trachomatis* и/или *Neisseria gonorrhoeae*.

Образец может быть обработан обычными способами для того, чтобы зонд связывался с любым нуклеотидом-мишенью, присутствующим в образце. Такая обработка может включать в себя центрифугирование и лизис образца, чтобы
5 высвободить любую нуклеиновую кислоту-мишень из инфицирующего микроорганизма.

В одном варианте осуществления один тип зонда, специфичного для нуклеиновой кислоты либо из *Chlamydia trachomatis* либо из *Neisseria gonorrhoeae*, используется в способе, так что в образце детектируется либо только *Chlamydia trachomatis*, либо только *Neisseria gonorrhoeae*.

10 В предпочтительном варианте осуществления к образцу добавляют по меньшей мере два различных зонда, причем первый зонд помечен первой флуоресцентной меткой и является специфическим для зондирования нуклеиновой кислоты *Chlamydia trachomatis* и второй зонд помечен флуоресцентной меткой, отличающейся от метки первого зонда, и является специфическим для зондирования нуклеиновой кислоты *Neisseria gonorrhoeae*.

15 В данном варианте осуществления можно одновременно обнаружить хламидийную и гонорейную инфекцию в одном образце, взятом у пациента.

В одном аспекте способа по настоящему изобретению образец от пациента может представлять собой образец крови, образец мочи, образец сыворотки или образец слюны.

20 В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения, обеспечивается набор, включающий зонд, как описано выше, буфер для проведения LAMP-реакции, содержащий фермент полимеразу, дНТФ и LAMP-праймеры для мишени.

В одном варианте осуществления положительный и отрицательный контроль могут быть включены в набор. Реагенты могут быть представлены в виде влажных реагентов
25 или в лиофилизированной форме.

Буфер, используемый в способе или наборе по настоящему изобретению, включает в себя дНТФ в концентрации от 1 до 10 мМ, одну или более солей в концентрации от 2 до 20 мМ, Трис-буфер рН 8,8 в концентрации от 10 до 100 мМ, трегалозу в концентрации от 10 до 100 мМ, BST-полимеразу в количестве от 1Е до 12Е и от 0,01%
30 до 1% 1,2-пропандиола.

Сокращения

СТ - *Chlamydia trachomatis*

GC - *Neisseria gonorrhoeae*

GlnA7 - глутаминсинтетаза

35 PorA7 - пориновый белок A7

LAMP - петлевая изотермическая амплификация

ПЦР - полимеразная цепная реакция.

Настоящее изобретение будет описано, только в качестве примера, со ссылкой на следующие примеры и фигуры.

40 LAMP-реакция

Основанную на V13 детекцию СТ и GT ДНК-мишени LAMP-реакцией проводили с использованием LAMP-реакционного буфера V6.21, разработанного заявителем.

Основанную на применении зонда детекцию ДНК-мишени проводили в V6.21p (без V13). Концентрации LAMP-праймеров были следующими: СТ PB1 - 0,8 мкМ FIP & VIP
45 праймера, 0,2 мкМ F3 & B3 и 0,4 мкМ Loop-праймеров, GC porA7 и GC glnA7 - 2 мкМ FIP & VIP праймера, 0,25 мкМ F3 & B3 и 0,5 мкМ Loop-праймеров. Все зонды использовали при конечной концентрации 0,625 мкМ. LAMP-реакции проводили в течение 60 мин при постоянной температуре 63°C с использованием прибора ABI7500

для проведения ПЦР в реальном времени. Показания флуоресцентного сигнала были получены в канале SybrGreen/FAM, Joe или Су3, в зависимости от обстоятельств.

Последовательности зондов

5 SEQ ID NO.2: GTGCACGC[C-FAM]CCAATAGAAT

SEQ ID NO.3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM internal)

SEQ ID NO.4:

TCGAGCAA[C-FAM]CGCTGTGAC[ddC] (CT PB1-FAM terminal)

SEQ ID NO.5:

10 GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC porA7-joe
loopF)

SEQ ID NO.6:

15 ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG (GC glnA7-ALEXA546 loopB)

или

SEQ ID NO.7: CCA GGG TAT CTA ATC CTG TTT G [C-FAM]

Целевые последовательности

Целевые последовательности ДНК, используемые в примерах, представляют собой

20 SEQ ID NO: 8: полная последовательность плазмиды pSotonG1 Chlamydia trachomatis
G/SotonG1 (GenBank: HE603235.1)

25

30

35

40

45

1 tttgcaactc ttgggtggtag actttgcaac tcttggtggt agactttgca actccttggtg
 61 gtagacttgg tcataatgga cttttgtaa aaaatttctt aaaatcttag agctccgatt
 121 ttgaatagct ttggttaaga aaatgggctc gatggcttcc cataaaagta gattgttctt
 5 181 aacttttggg gacgcgtcgg aaatttgggt atctacttta tctcatctaa ctgaaaaaaa
 241 ttatgcgtct gggattaact ttcttgtttc tttagagatt ctggatttat cggaaacctt
 301 gataaaggct atttctcttg accacagcga atctttgttt aaaatcaagt ctctagatgt
 361 ttttaaatgga aaagtcgttt cagaggcctc taaacaggct agagcggcat gctacatatc
 10 421 tttcaciaaag tttttgtata gattgaccaa gggatatatt aaaccgcta ttccattgaa
 481 agattttgga aacactacat tttttaaaat ccgagacaaa atcaaaacag aatcgatttc
 541 taagcaggaa tggacagttt tttttgaagc gtcctggata gtgaattata gagactattt
 601 aatcggtaaa ttgattgtac aagggatccg taagttagac gaaattttgt ctttgcgac
 661 agacgatcta ttttttgcac ccaatcagat ttctttcgc attaaaaaaa gacagaataa
 15 721 agaaacccaaa attctaatac catttctat cagcttaatg gaagagttgc aaaaatacac
 781 ttgtgggaga aatgggagag tatttgtttc taaaataggg attcctgtaa caacaagtca
 841 ggttgcgcat aattttaggc ttgcagagtt ccatagtgtc atgaaaataa aaattactcc
 901 cagagtactt cgtgcaagcg ctttgattca tttaaagcaa ataggattaa aagatgagga
 20 961 aatcatgcgt atttctctgc tctcatcgag acaaagtgtg tgttcttatt gttctgggga
 1021 agaggtaagt cctctagtac aaacaccac aatattgtga tataattaa attatattca
 1081 tattctgttg ccagaaaaaa cacctttagg ctatattaga gccatcttct ttgaagcgtt
 1141 gtcttctcga gaggatttat cgtacgcaaa tatcatcttt gcggttgcgt gtcccgtgac
 25 1201 cttcattatg tcggagtctg agcaccctag gcgtttgtac tccgtcacag cggttgctcg
 1261 aagcacgtgc ggggttatct taaaagggat tgcagcttgt agtctgctt gagagaacgt
 1321 gcgggcgatt tgccttaacc ccaccatttt tccggagcga gttacgaaga caaaacctct
 1381 tcgttgaccg atgtactctt gtagaaagtg cataaacttc tgaggataag ttataataat
 1441 cctcttttct gtctgacggt tcttaagctg ggagaaagaa atggtagctt gttggaaaca
 30 1501 aatctgacta atctccaagc ttaagacttc agaggagcgt ttacctctt ggagcattgt
 1561 ctgggcatc aaccaatccc gggcgttgat ttttttagc tcttttagga aggatgctgt
 1621 ttgcaactg ttcacgcac ccgtttttac tatttccctg gttttaaaaa atgttcgact
 1681 attttcttgt ttagaagggt gcgctatagc gactattcct tgagtcaccc tgtttaggaa
 35 1741 tcttgtaag gaaatatagc ttgctgctcg aacttgttta gtacctcgg tccaagaagt
 1801 cttggcagag gaaacttttt taatcgcac taggattaga ttatgattta aaagggaaaa
 1861 ctcttgacaga ttcatatcca aagacaatag accaatcttt tctaaagaca aaaaagatcc
 1921 tcgatatgat ctacaagtat gtttggtgag tgatgcggtc caatgcataa taacttcgaa
 40 1981 taaggagaag cttttcatgc gtttccaata ggattcttgg cgaattttta aaacttctg
 2041 ataagacttt tcgctatatt ctaacgacat ttcttgctgc aaagataaaa tccctttacc
 2101 catgaaatcc ctcgtgatat aacctatccg caaaatgtcc tgattagtga aataatcagg
 2161 ttgttaacag gatagcacgc tcggatatttt tttatataaa catgaaact cgttccgaaa
 2221 tagaaaatcg catgcaagat atcgagtatg cgttggttagg taaagctctg atatttgaag
 45 2281 actctactga gtatattctg aggcagcttg ctaattatga gtttaagtgt tcccatcata
 2341 aaaacatatt catagtattt aaatacttaa aagacaatgg attacctata actgtagact

2401 cggcttggga agagcttttg cggcgtcgta tcaaagatat ggacaaatcg tatctcgggt
 2461 taatgttgca tgatgcttta tcaaatgaca agcttagatc cgtttctcat acggttttcc
 2521 tcgatgattt gagcgtgtgt agcgcgtgaag aaaatttgag caatttcatt ttccgctcgt
 2581 ttaatgagta caatgaaaat ccattgcgta gatctccggt tctattgctt gagcgtataa
 5 2641 agggaaggct tgatagtgtc atagcaaaga ctttttctat tcgcagcgtc agaggccgggt
 2701 ctatttatga tatattctca cagtcagaaa ttggagtgtc ggctcgtata aaaaaagac
 2761 gagcagcgtt ctctgagaat caaaattctt tctttgatgg cttcccaaca ggatacaagg
 2821 atattgatga taaaggagtt atcttagcta aaggtaattt cgtgattata gcagctaggc
 10 2881 catctatagg gaaaacagct ttagctatag acatggcgat aaatcttgcg gttactcaac
 2941 agcgtagagt tggtttccta tctctagaaa tgagcgcagg tcaaatgtt gagcggattg
 3001 ttgctaattt aacaggaata tctgggtaaa aattacaaag aggggatctc tctaaagaag
 3061 aattattccg agtggagaag gctggagaaa cagttagaga atcacatttt tatatctgca
 3121 gtgatagtca gtataagctt aatttaatcg cgaatcagat ccggttgctg agaaaagaag
 15 3181 atcgagtaga cgtaatatth atcgattact tgcagttgat caactcatcg gttggagaaa
 3241 atcgtcaaaa tgaaatagca gatatactta gaaccttaag aggtttagcc tcagagctaa
 3301 acattcctat agtttgttta tcccaactat ctagaaaagt tgaggataga gcaaataaag
 3361 ttcccatgct ttcagatttg cgagacagcg gtcaaataga gcaagacgca gatgtgattt
 20 3421 tgtttatcaa taggaaggaa tcgtcttcta attgtgagat aactgttggg aaaaatagac
 3481 atggatcgggt tttctcttcg gtattacatt tcgatccaaa aattagtaaa ttctccgcta
 3541 ttaaaaaagt atggtaaatt atagtaactg ccacttcatc aaaagtccta tccacctga
 3601 aaatcagaag tttggaagaa gacctggtca atctattaag atatctccca aattggctca
 3661 aaatgggatg gtagaagtta taggtcttga ttttctttca tctcattacc atgcattagc
 25 3721 agctatccaa agattactga ccgcaacgaa ttacaagggg aacacaaaag gggttgtttt
 3781 atccagagaa tcaaatagtt ttcaatttga aggatggata ccaagaatcc gttttacaaa
 3841 aactgaattc ttagaggctt atggagttaa gcggtataaa acatccagaa ataagtatga
 3901 gtttagtgga aaagaagctg aaactgcttt agaagccttg taccatttag gacatcaacc
 30 3961 gtttttaata gtggcaacta gaactcgatg gactaatgga acacaaatag tagaccgtta
 4021 ccaaactctt tctccgatca ttaggattta cgaaggatgg gaaggtttaa ctgacgaaga
 4081 aaatatagat atagacttaa caccttttaa ttcaccatct acacggaaac ataaaggatt
 4141 cgttgtagag ccatgtccta tcttggtaga tcaaatagaa tctactttg taatcaagcc
 4201 tgcaaatgta taccaagaaa taaaaatgcy tttcccaaac gcatcaaagt atgcttacac
 35 4261 atttatcgac tgggtgatta cagcagctgc gaaaaagaga cgaaaattaa ctaaggataa
 4321 ttcttgcca gaaaacttgt tattaaactg taacgttaa agtcttgcat atattttaag
 4381 gatgaatcgg tacatctgta caaggaactg gaaaaaaatc gagttagcta tcgataaatg
 4441 tatagaaatc gccattcagc ttggctggtt atctagaaga aaacgcattg aatttctgga
 40 4501 ttcttctaaa ctctctaaaa aagaaattct atatctaaat aaagagcgtc ttgaagaat
 4561 aactaagaaa tctaaagaac aatggaaca agaacttatt aattaatagc aggcttgaaa
 4621 ctaaaaacct aatttattta aagctcaaaa taaaaaagag ttttaaaatg ggaaattctg
 4681 gtttttattt gtataacact gaaaactgcy tctttgctga taatatcaaa gttgggcaaa
 4741 tgacagagcc gctcaaggac cagcaaataa tcttgggac aaaatcaaca cctgtcgcag
 45 4801 ccaaatgac agcttctgat ggaatatctt taacagtctc caataattca tcaaccaatg
 4861 cttctattac aattggtttg gatgcggaaa aagcttacca gcttattcta gaaaagttgg
 4921 gaaatcaaat tcttgatgga attgctgata ctattggtga tagtacagtc caagatattt

4981 tagacaaaat cacaacagac ccttctctag gtttggtgaa agcttttaac aactttccaa
 5041 tcactaataa aattcaatgc aacgggttat tcactcccag taacattgaa actttattag
 5101 gaggaactga aataggaaaa ttcacagtca cacccaaaag ctctgggagc atgttcttag
 5161 tctcagcaga tattattgca tcaagaatgg aaggcggcgt tgttctagct ttggtacgag
 5 5221 aagggtgattc taagccctgc gcgattagtt atggatactc atcaggcgtt cctaatttat
 5281 gtagtctaag aaccagcatt actaatacag gattgactcc aacaacgtat tcattacgtg
 5341 taggcggttt agaaagcggg gtgggtatggg ttaatgccct ttctaattggc aatgatattt
 5401 taggaataac aaatacttct aatgtatctt ttttggaaagt aatacctcaa acaaacgctt
 10 5461 aaacaatttt tattggattt ttcttatagg ttttatattt agagaaaaca gttcgaatta
 5521 cgggggtttgt tatgcaaaat aaaagaaaag tgaggggacga ttttattaaa attgttaaag
 5581 atgtgaaaaa agatttcccc gaattagacc taaaaatagc agtaaacaag gaaaaagtaa
 5641 ctttcttaaa ttctccctta gaactctacc ataaaagtgt ctactaatt ctaggactgc
 15 5701 ttcaacaaat agaaaactct ttaggattat tcccagactc tcctgttctt gaaaaattag
 5761 aggataacag tttaaagcta aaaaaggctt tgattatgct tatcttgtct agaaaagaca
 5821 tgttttccaa ggctgaatag acaacttact ctaacgttgg agttgatttg cacaccttag
 5881 ttttttgctc ttttaaggga ggaactggaa aaacaacact ttctctaaac gtgggatgca
 5941 acttggccca atttttaggg aaaaaagtgt tacttgctga cctagacccg caatccaatt
 20 6001 tatcttctgg attgggggct agtgtcagaa ataaccaaaa aggcttgcac gacatagtat
 6061 acaaatcaaa cgatttaaaa tcaatcattt gcgaaacaaa aaaagatagt gtggacctaa
 6121 ttcttgcattc atttttatcc gaacagtta gagaattgga tattcataga ggacctagta
 6181 acaacttaaa gttatttctg aatgagtact gcgctccttt ttatgacatc tgcataatag
 25 6241 acactccacc tagcctagga gggttaacga aagaagcttt tgttgcagga gacaaattaa
 6301 ttgcttgttt aactccagaa cttttttcta ttctagggtt acaaaagata cgtgaattct
 6361 taagttcggc cggaacacct gaagaagaac acattcttgg aatagctttg tctttttggg
 6421 atgatcgtaa ctcgactaac caaatgtata tagacattat cgagtctatt taaaaaaca
 6481 agcttttttc aacaaaaaatt cgctcgagata tttctctcag ccgttctctt cttaaagaag
 30 6541 attctgtagc taatgtctat ccaaatctta gggccgcaga agatattctg aagttaacgc
 6601 atgaaatagc aaatattttg catatcgaat atgaacgaga ttactctcag aggacaacgt
 6661 gaacaaacta aaaaaagaag cggatgtctt ttttaaaaaa aatcaaactg ccgcttctct
 6721 agatttttaag aagacacttc cttccattga actattctca gcaactttga attctgagga
 35 6781 aagtcagagt ttggatcgat tatttttatc agagtcccaa aactattcgg atgaagaatt
 6841 ttatcaagaa gacatcctag cggtaaaaact gcttactggc cagataaaat ccatacagaa
 6901 gcaacacgta cttcttttag gagaaaaaat ctataatgct agaaaaatcc tgagtaagga
 6961 tcacttctcc tcaacaactt tttcatcttg gatagagtta gtttttagaa ctaagtcttc
 40 7021 tgcttacaat gctcttgcatt attacgagct ttttataaac ctccccacc aaactctaca
 7081 aaaagagttt caatcgatcc cctataaatc cgcataatatt ttggccgcta gaaaaggcga
 7141 tttaaaaacc aaggctcgatg tgatagggaa agtatgtgga atgtcgaact catcggcgat
 7201 aagggtggtg gatcaatttc ttccttcatc tagaaacaaa gacgttagag aaacgataga
 7261 taagtctgat ttagagaaga atcgccaatt atctgatttc ttaatagaga tacttcgcat
 45 7321 catatgttcc ggagtttctt tgcctccta taacgaaaaat cttctacaac agctttttga
 7381 acttttttaag caaaagagct gatcctccgt cagctcatat atatatttat tatatatata
 7441 tttatttagg gatttgattt tacgagagag a

SEQ ID NO: 9: частичный ген *porA* для белка класса 1 наружной мембраны *Neisseria*

gonorrhoeae, изолят GC3 (GenBank: HE681886.1)

1 gccgcgcgcg gcgcgaccg ttggggcaat agggaatcct ttgtcggctt ggcaggcgaa
 61 ttcggcacgc tgcgcgccgg ccgcggttgcg aatcagtttg acgatgccag ccaagccatt
 121 gatccttggg acagcaacaa tgatgtggct tcgcaattgg gtattttcaa acgccacgac
 5 181 gatatgccgg tttccgtacg ctacgactcc ccggactttt ccggtttcag cggcagcgtc
 241 caattcgttc cggctcaaaa cagcaagtcc gcctatacgc cggtcattg gactactgtg
 301 tataacacta acggtactac tactactttc gttccggctg ttgtcggcaa gcccgatcg
 361 gatgtgtatt atgccggtct gaattacaaa aatggcgggt ttgccgggaa ctatgccttt
 10 421 aaatatgcca gacacgcca tgctggacgt aatgcttttg agttgttctt gctcggcagt
 481 gggagtgatg aagccaaagg taccgatccc ttgaaaaacc atcaggtaca ccgctgacg
 541 ggcggctatg gggaaaggcg cttgaatctc gccttggcgg ctcagttgga tttgtctgaa
 601 aatgccgaca aaaccacaaa cagtacgacc gaaattgccg cactgcttc ctaccgcttc
 15 661 ggtaatacag tcccgcgcat cagctatgcc catggtttcg actttgtcga acgcagtcag
 721 aaacgcgaac ataccagcta tga

SEQ ID NO: 10: ген глутаминсинтетазы (glnA), аллель glnA-14, *Neisseria gonorrhoeae*
 частичная cds (GenBank: AF520262.1)

1 cccgctttgt cgatttgccg ttcaccgata ccaaaggcaa gcagcaccac tttaccgtgc
 20 61 ctgcgcgcat cgtgttgga gaccccgaa agtggtttga aaacggaccg gcgtttgacg
 121 gctcgtccat cggcggctgg aaaggcattg aggcttccga tatgcagctg cgtcccgatg
 181 cgtccacagc cttcgtcgat cttttttatg atgatgttac cgtcgtcatt acctgcgacg
 241 tcatcgaccc tgcgacggg cagggttacg accgcgaccc gcgctccatc gcacgcccgg
 25 301 ccgaagccta tttgaaatct tccggtatcg gcgacaccgc ctatttcggc cccgaaccgg
 361 aattcttcgt cttcgacggc gtagaatttg aaaccgacat gcacaaaacc cgttacgaaa
 421 tcacgtccga aagcggcggc tgggcaagcg gcctgcataat ggacgggtcaa aacaccggcc
 481 accgccccgc cgtcaaaggc ggctacgcgc ccgtcgcgcc gattgactgc ggtcaagatt
 541 tgcgctccgc catggtgaac attttggaag gactcggcat cgaagtcgaa gtccaccaca
 30 601 gcgaagtcgg taccggcagc caaatggaaa tcggcaccgg tttcgccact ttggtcaaac
 661 gcgcccacca aaccacagat atgaaatacg tcatcaaaa cgttgcccac aatttcggca
 721 aaaccgccac ctttatgccc aaaccgatta tgggcgacaa cggcagcggg atgcacgtcc
 781 accaatccat ttggaagac ggtcaaaaacc tgttcgcagg cgacggctat gccggtttgt
 35 841 ccgataccgc gctctactac atcggcggca tcatcaaaaca cgccaaagcc ctgaacgcga
 901 ttaccaatcc gtccaccaac tcctacaaac gcctcgtgcc gcactttgaa gcaccgacca
 961 aattggccta ttcgcca aaaaccgttccg cttccatccg tatcccgtct gtgaacagca
 1021 gcaaggcggc ccgcatcgaa gcgctttcc ccgaccggac cgccaaccgg tatttggcat
 40 1081 ttgccgcctt gctgatggcc ggtttggacg gcattcaaaa caaatccat ccgggcgacc
 1141 ctgccgataa aaacctgtac gacctgccgc ccggaagaaga cgcgctcgtc ccgaccgtct
 1201 gcgcttcttt ggaagaagca cttgccgccc tcaaggtcga ccacgaattc ctgctgcgcg
 1261 gcggcgtggt cagcaaagac tggatcgaca gctacatcgc ctttaaagag gaagatgtcc
 1321 gccgcatccg tatggcgccg caccgctgg aatttg

Последовательности праймеров, используемые в LAMP-реакции, являются
 следующими:

СТ плазмиды

F3 TCTACAAGAGTACATCGGTCA (SEQ ID No. 11)
 B3 TGAAGCGTTGTCTTCTCG (SEQ ID No. 12)
 FIP GCAGCTTGTAGTCCTGCTTGAGTCTTCGTAACCTCGCTCC (SEQ ID No. 13)
 5 BIP TCGAGCAACCGCTGTGACCCTTCATTATGTCGGAGTCTG (SEQ ID No. 14)
 LF1 CGGGCGATTTGCCTTAAC (SEQ ID No. 15)
 LB1 TACAAACGCCTAGGGTGC (SEQ ID No. 16)

10 GC porA7

F3 ACCAAAAACAGTACGACCGA (SEQ ID No. 17)
 B3 AAGTGCGCTTGGAAAAATCG (SEQ ID No. 18)
 FIPATGGGCATAGCTGATGCGCGAATTGCCGCCACTGCTTC (SEQ ID No.
 15 19)
 BIP TCGACTTTGTGCGAACGCGAGTCAAATCGACACCGGCGATGA (SEQ ID No.
 20)

LoopF1 GCGAACATACCAGCTATGATCAA (SEQ ID No. 21)

20 GC glnA7

F3 TCATATCTTGGGTTTGGTTCG (SEQ ID No. 22)
 B3 CTGCATATGGACGGTCAAA (SEQ ID No. 23)
 FiP CGAAGTCCACCACAGCGAATTTGACCAAAGTGCGCAA (SEQ ID No. 24)
 25 BiP CTTCGATGCCGAGTCCTCCGATTGACTGCGGTCAAGAT (SEQ ID No. 25)
 LF CAAATGGAAATCGGCACCC (SEQ ID No. 26)
 LB ATGTTACCATGGCGGAG (SEQ ID No. 27)

30 Буфер

Заявитель разработал буферную систему для использования с зондами по изобретению, которая обозначается V6.21 (или V6.21p без присутствующего красителя V13) в следующих примерах. Концентрации буферных компонентов после восстановления буфера:

35 V6.21

от 4 до 10 мМ дНТФ, 10 мМ соли, 30 мМ Трис pH 8,8, 30 мМ трегалозы, от 1 до 8Е Bst-полимеразы, краситель и 0,05% пропандиола.

V6.21p

от 4 до 10 мМ дНТФ, 10 мМ соли, 30 мМ Трис pH 8,8, 30 мМ трегалозы, от 1 до 8Е Bst-полимеразы и 0,05% пропандиола. ПЦР

40 Обнаружение СТ/GC в клинических образцах с помощью ПЦР в реальном времени проводили с использованием анализа АРТМА СТ/GC multiplex (Gen-Probe) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Электрофорез в агарозном геле

45 Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле в 1×ТАЕ буфере при 100 В. ДНК-продукты LAMP-реакции визуализировали с GelRed (Invitrogen) с трансиллюминатором.

Буферы V6.21 и V6.21p были разработаны заявителем. LAMP-праймеры были получены от Eurofins. Меченные флуорофором олигонуклеотиды были приобретены

у компании Integrated DNA technologies. Трис-буфер, агарозный гель и вода ПЦР-класса были приобретены у компании Sigma. Стандарты СТ и GC ДНК были получены от АТСС.

Фигуры

5 На фигуре 1 представлена схема ДНК-зонда по настоящему изобретению. Зонд состоит из олигонуклеотида с внутренним цитозином, конъюгированным с определенным флуорофором. Зонд может быть комплементарным к внутренней области ампликона, фланкированной праймерами FIP и VIP, или он может представлять собой модифицированный праймер LoopF или LoopB, изнутри меченный флуорофором.

10 Пример 1

На фигурах от 2A до 2F приведены графики амплификации, полученные с СТ PB1-праймерами (фигура 2A и фигура 2D), GC glnA7-праймерами (фигура 2B и фигура 2E) и GC rogA7-праймерами (фигура 2C и фигура 2F) в буфере V6.21, содержащем V13 (фигуры 2A, 2B и 2C), или буфере V6.21p без красителя V13 (фигуры 2D, 2E и 2F).

15 Целевые последовательности показаны в SEQ ID NO: от 8 до 10, с СТ PB1-внутренним зондом, конъюгированным с FAM, GC glnA7-петлевым зондом, конъюгированным с Joe, и GC rogA7-петлевым зондом, конъюгированным с Alexa546, соответственно. Все реакции проводили в течение 60 мин при постоянной температуре 63°C с прибором ABI7500.

20 Пример 2

Фигуры 3A и 3B представляют собой анализы кривых плавления LAMP-продуктов, образующихся с праймерами СТ PB1 в присутствии СТ PB1-внутреннего зонда, конъюгированного с FAM. 100 пг на реакцию стандартной АТТС СТ ДНК использовали в качестве положительного контроля. А - нормированный репортерный график, В

25 -производный репортерный график. Графики кривых плавления были получены на основе считываний в канале FAM с прибором ABI7500.

Пример 3

На фигурах 4A и B представлены анализы кривых плавления LAMP-продукта, образовавшегося с праймерами GC glnA7 в присутствии GC glnA7-петлевого зонда, конъюгированного с JOE. 100 пг на реакцию стандартной АТТС GC ДНК использовали в качестве положительного контроля. На фигуре 4A приведен нормированный репортерный график, и на фигуре 4 B приведен производный репортерный график. Графики кривых плавления были получены на основе считываний в канале JOE с прибором ABI7500.

35 Пример 4

Фигуры 5A и 5B представляют собой анализы кривых плавления LAMP-продукта, образовавшегося с праймерами GC rogA7 в присутствии GC rogA7-петлевого зонда, конъюгированного с ALEXA546. 100 пг на реакцию стандартной АТТС GC ДНК использовали в качестве положительного контроля. На фигуре 5A приведен

40 нормированный репортерный график и на фигуре 5B производный репортерный график. Графики кривых плавления были получены на основе считываний в канале Cy3 с прибором ABI7500

Пример 5

На фигурах 6A-6D показаны результаты теста для подтверждения специфичности ДНК-продукта с зондом по изобретению в петлевой изотермической амплификации. Запаздывание амплификации в ложно-положительных случаях (более чем на 30 минут относительно самой низкой концентрации ДНК-мишени, выявляемой в LAMP-реакции (100 фг GC ДНК), указывает на то, что неспецифическая амплификация может быть

результатом образования димера праймера. Стандартный анализ кривой плавления не позволяет различать специфический и неспецифический продукт в данной LAMP-реакции, но неспецифический продукт может быть распознан с помощью зонда по изобретению. GC ДНК амплифицировали с помощью праймеров GC *porA7* и визуализировали с помощью красителя V13 или GC *porA7*-ALEXA546-зондом, в зависимости от обстоятельств.

Пример 6

На фигуре 7 приведены графики амплификации, полученные с СТ PB1-праймерами в буфере V6.21, содержащем V13, или буфере V6.21p без красителя V13, но при наличии СТ PB1-терминального зонда (комплементарного к области петли) с внутренним C, конъюгированным с FAM, и 3'-терминатором (3'ddC). Несмотря на успешную амплификацию ДНК-мишени, подтвержденную возбуждением красителя V13 в контрольной реакции, зонд СТ PB1 с 3'-терминатором не дает положительного сигнала.

Пример 7

На фигурах 8А и 8В приведены графики амплификации, полученные в буфере V6.21p, содержащем ROX, в присутствии СТ PB1-праймеров и СТ PB1-терминального зонда с внутренним цитозином, конъюгированным с FAM (фигура 8А), и универсальных праймеров и зонда 3'UP с 3'-терминальным цитозином, конъюгированным с FAM (фигура 8В). Первая кривая представляет собой сигналы, генерируемые ROX, а вторая кривая соответствует сигналу, генерируемому в канале FAM. Связывание зонда с внутри меченным цитозином с ДНК-мишенью приводит к возбуждению FAM. Связывание зонда с меченым на 3'-конце цитозином с мишенью не изменяет возбужденное состояние FAM.

Пример 8

На фигурах 9А-9С приведены графики амплификации, полученные с СТ PB1-праймерами в буфере V6.21p без V13 в присутствии СТ PB1-внутреннего зонда с внутренним C, конъюгированным с FAM, и эталонного красителя (ROX). На фигуре 9А приведены необработанные данные, считывания из канала FAM в первой линии и из канала ROX во второй линии. На фигуре 9В приведены графики амплификации (генерируемые в канале FAM), нормированные в отношении ROX. На фигуре 9С приведены производные репортерные графики кривых плавления.

Пример 9

На фигурах 10А-10С представлены результаты проверки специфичности зонда СТ PB1-FAM. На фигуре 10А приведены графики амплификации, полученные с помощью зонда СТ PB1-FAM в присутствии СТ ДНК и СТ-праймеров. В качестве контроля, были проведены два набора реакций, где неспецифические гены, GC *glnA7* и GC *porA7*, амплифицировались с соответствующими LAMP-праймерами в присутствии зонда СТ PB1-FAM. При проведении эксперимента в буфере V6.21p, графики амплификации в присутствии зонда СТ PB1 в канале FAM были получены только в том случае, когда в реакционной смеси присутствовала СТ ДНК, и сигнал не генерировался, когда амплифицировались неспецифические гены (GC *glnA7* и GC *porA7*). Сигнал также не генерировался, когда в реакции использовали неспецифический зонд, где СТ ДНК амплифицировали с помощью СТ-праймеров. На фигуре 10С приведены данные, полученные в аналогичном эксперименте, но проведенном в буфере V6.21, содержащем интеркалирующий краситель V31. На фигуре 10С показаны ДНК-продукты, генерируемые в эксперименте, описанном на фигуре 10А.

Пример 10

На фигурах 11А и 11В представлены результаты проверки специфичности зонда СТ

PB1-FAM в отношении анализа АРТИМА СТ. Пятьдесят клинических образцов, подтвержденных как дающие положительный ответ (n=29) (фигура 11А) или дающие отрицательный ответ (n=21) (фигура 11В) на СТ, были протестированы в буфере V6.21p с зондом СТ PB1-FAM. Из 50 образцов 24 дали отрицательный результат (фигура 11А) и 26 дали положительный результат (фигура 11В) для СТ с зондом СТ PB1-FAM. Имелось 86%-ное согласие между тестами Artima и СТ PB-FAM.

Пример 11

На фигурах 12А и 12В приведены графики амплификации, полученные в мультиплексе СТ/GC с зондами СТ PB1-FAM+GC рога7-Alexa546. СТ и GC ДНК амплифицировали в отдельных реакциях или в конъюгировании в буфере V6.21p в присутствии зондов СТ Рb1-FAM и GC рога7-Alexa546. Считывания производились в каналах Су3 (фигура 12А) и FAM (фигура 12В). Эксперимент показал, что две ДНК-мишени могут быть амплифицированы и обнаружены в одновременном взаимодействии с зондами, меченными FAM и Alexa546, и что не было перекрестной реактивности между СТ PB1- и GC рога7-праймерами и зондами.

Пример 12

Таблица 1 показывает результаты сравнения между V13 LAMP для СТ и GC, СТ/GC Artima и СТ/GC мультиплексор (СТ PB1-FAM+GC рога7-Alexa546). ДНК, экстрагированную из 136 клинических образцов, испытывали с мультиплексом СТ/GC Artima, СТ PB1-праймерами и GC рога7-праймерами в буфере V6.21, содержащем V13, или в мультиплексной реакции в буфере v6.21p в присутствии СТ PB1-праймеров и GC рога7-праймеров и зондов СТ PB1-FAM и GC рога7-Alexa546. В контрольном эксперименте образцы были также испытаны в симплексной реакции с зондом GC glnA7-Joe. В таблице приведены показатели степени согласия результатов между испытаниями.

(57) Формула изобретения

1. Зонд для изотермической амплификации нуклеиновой кислоты, содержащий последовательность олигонуклеотидного зонда, комплементарную области последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, причем упомянутая последовательность олигонуклеотидного зонда имеет только одну флуорофорную метку, и данная метка связана с внутренним цитозинным основанием, и упомянутая последовательность олигонуклеотидного зонда не имеет терминатора на 3'-конце, причем цитозинное основание, по существу, центрально расположено по длине олигонуклеотида, за исключением позиций 1-3 на 3'-конце и позиции 1 на 5'-конце.
2. Зонд по п. 1, в котором последовательность олигонуклеотидного зонда представляет собой ДНК-последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты-мишени представляет собой ДНК-последовательность.
3. Зонд по п. 1, в котором флуорофор включает любой один или более, выбранный из следующего: FAM, JOE, TET, HEX, TAMRA, ROX, ALEXA и ATTO.
4. Зонд по п. 3, в котором флуорофор представляет собой FAM, Joe или Alexa546.
5. Зонд по любому из пп. 1 или 4, содержащий следующую последовательность: 5' X_n C * X_m 3' (SEQ ID NO. 1), где n>1, m>3, X представляет собой нуклеотидное основание и * представляет собой флуорофор.
6. Зонд по п. 5, в котором нуклеотидное основание выбрано из А, Т, С и G, n равен более чем 1 до 20 или менее, более предпочтительно более чем 1 до 10 или менее и m равен более чем 3 до 20 или менее, предпочтительно более чем 3 до 10 или менее.
7. Зонд по любому из пп. 1, 4 или 6, содержащий одну или более из следующих

последовательностей:

SEQ ID NO. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM internal)

SEQ ID NO. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC porA7-joe

5 loopF) или

SEQ ID NO. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG (GC glnA7-ALEXA546 loopB).

8. Зонд по любому из пп. 1, 4 или 6, в котором нуклеиновая кислота-мишень происходит из микроорганизма, грибов, дрожжей или вируса.

9. Зонд для петлевой изотермической амплификации по любому из пп. 1-4, 6.

10 10. Способ обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты-мишени в образце, включающий:

амплификацию нуклеиновой кислоты-мишени в образце, чтобы обеспечить амплифицированную нуклеиновую кислоту;

15 зондирование амплифицированной нуклеиновой кислоты зондом по любому из пп. 1-8; и

обнаружение присутствия нуклеиновой кислоты-мишени, причем увеличение флуоресценции зонда указывает на присутствие нуклеиновой кислоты-мишени в образце.

11. Способ по п. 10, в котором нуклеиновая кислота-мишень происходит из микроорганизма, грибов, дрожжей или вируса.

20 12. Способ по п. 10 или 11, в котором нуклеиновая кислота-мишень происходит из *Chlamydia trachomatis* или *Neisseria gonorrhoeae*.

13. Способ диагностики хламидийной и/или гонорейной инфекции у пациента, включающий:

предоставление образца, полученного от пациента;

25 добавление одного или более зондов по любому из пп. 1-8 к образцу; и

обнаружение присутствия нуклеиновой кислоты, происходящей из *Chlamydia trachomatis* и/или *Neisseria gonorrhoeae*, причем увеличение флуоресценции зонда указывает на наличие инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis* и/или *Neisseria gonorrhoeae*.

30 14. Способ по п. 13, в котором к образцу добавляют один тип зонда, специфического для нуклеиновой кислоты либо из *Chlamydia trachomatis*, либо из *Neisseria gonorrhoeae*.

15. Способ по п. 13, в котором к образцу добавляют по меньшей мере два различных зонда, причем первый зонд помечен первой флуоресцентной меткой и является специфическим для зондирования нуклеиновой кислоты из *Chlamydia trachomatis* и второй зонд помечен флуоресцентной меткой, отличающейся от метки первого зонда, и является специфическим для зондирования нуклеиновой кислоты из *Neisseria*
35 *gonorrhoeae*.

16. Способ по любому из пп. 10-15, в котором зонды предоставлены в буферной системе, содержащей дНТФы в концентрации от 1 до 10 мМ, одну или более солей в концентрации каждой соли от 2 до 20 мМ, Трис-буфер pH 8,8 в концентрации от 10 до
40 100 мМ, трегалозу в концентрации от 10 до 100 мМ, BST-полимеразу в количестве от 1Е до 12Е и от 0,01% до 1% 1,2-пропандиола.

17. Способ по п. 16, в котором одна или более солей выбраны из группы, состоящей из KCl, (NH₄)₂SO₄ и MgSO₄.

18. Набор для обнаружения нуклеиновой кислоты-мишени, содержащий зонд по
45 любому из пп. 1-9, реагентный буфер петлевой изотермической амплификации, фермент, дНТФ и один или более праймеров петлевой изотермической амплификации.

19. Набор по п. 18, дополнительно содержащий положительный и отрицательный контроль.

20. Набор по п. 18 или 19, в котором реагентный буфер содержит дНТФы в концентрации от 1 до 10 мМ, одну или более солей в концентрации от 2 до 20 мМ, Трис-буфер рН 8,8 в концентрации от 10 до 100 мМ, трегалозу в концентрации от 10 до 100 мМ, BST-полимеразу в количестве от 1Е до 12Е и от 0,01% до 1% 1,2-пропандиола.

5 21. Набор по п. 20, в котором одна или более солей выбраны из группы, состоящей из KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и MgSO_4 .

10

15

20

25

30

35

40

45

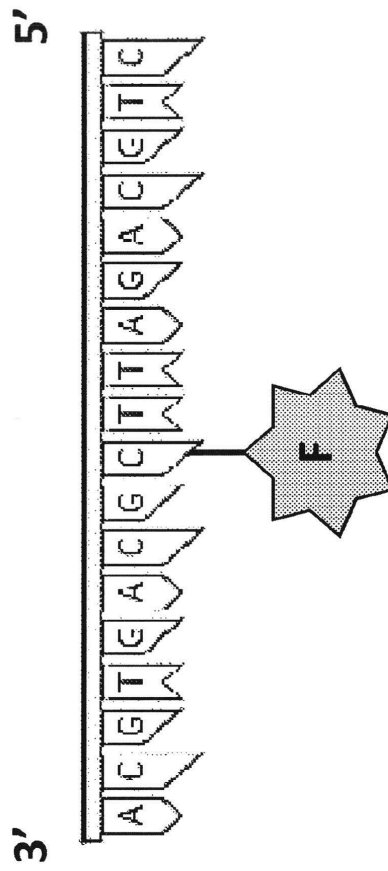
Таблица 1
Сравнение между основанной на V-13 LAMP для СТ и GC ,
СТ/GC Aptima- мультиплексом
и СТ/GC MAST- мультиплексом (СТ PB1-FAM + GC pоrA7-Alexa546)

Тест на 136 клинических образцах

Сравниваемые тесты	Показатель согласия
CE LAMP vs СТ PB1-FAM в мультиплексе	92%
CE LAMP vs GC pоrA7-Alexa546 в мультиплексе	94%
СТ в мультиплексе vs СТ Aptima	83%
GC в мультиплексе vs GC Aptima	86%

ФИГУРА 1

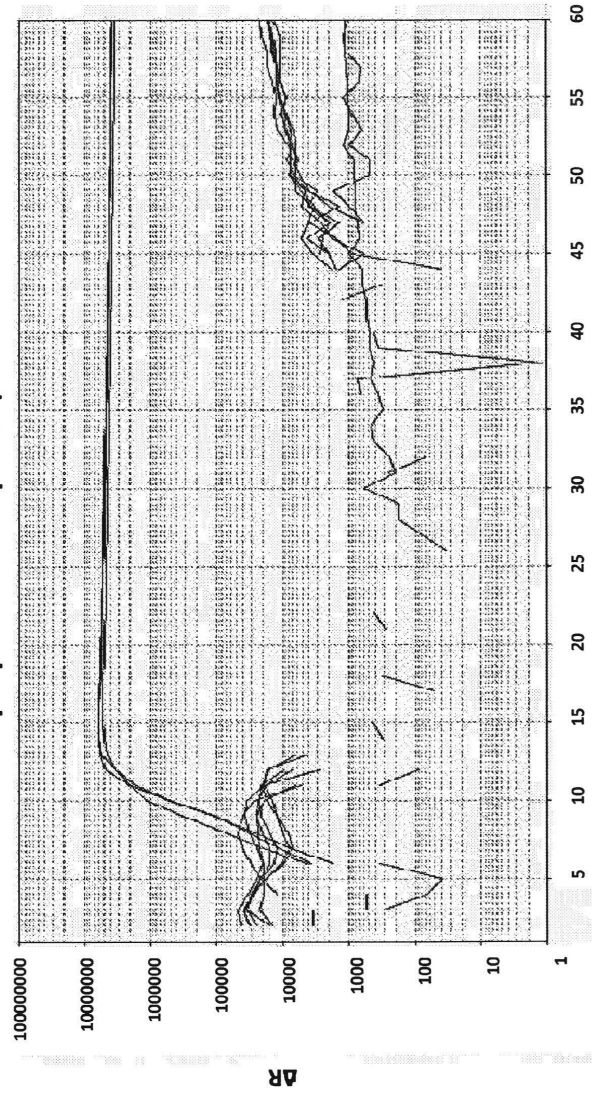
Схема ДНК-зонда MAST



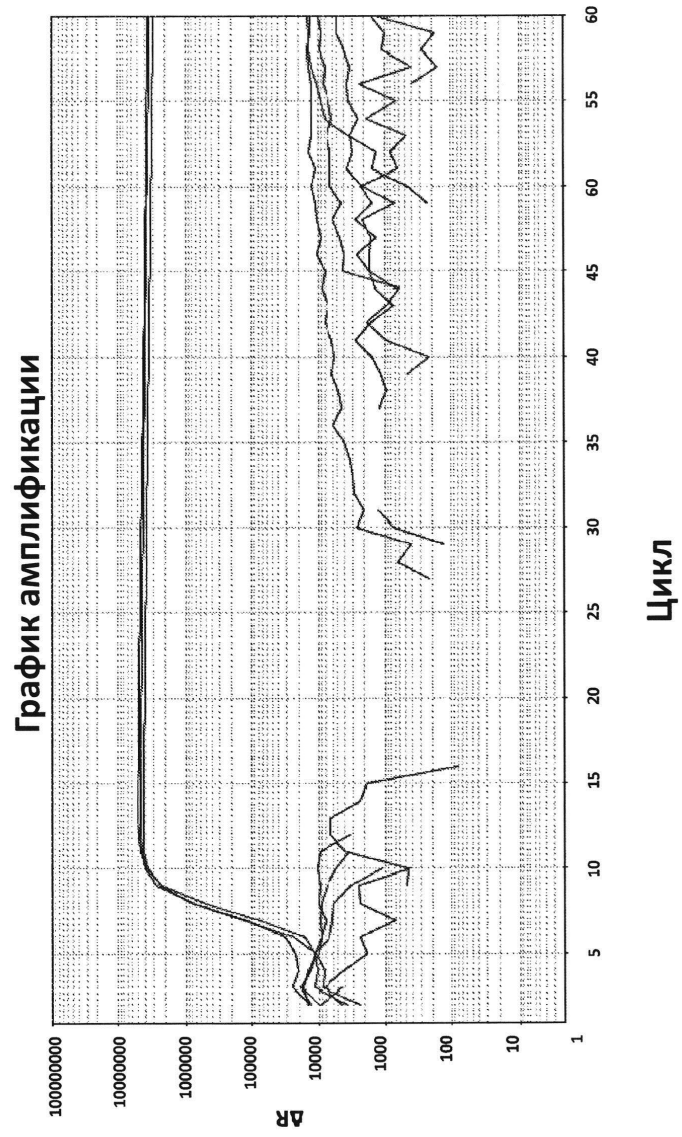
5' T G C A C T G C G A A T C T G C A G 3'

ФИГ 2А

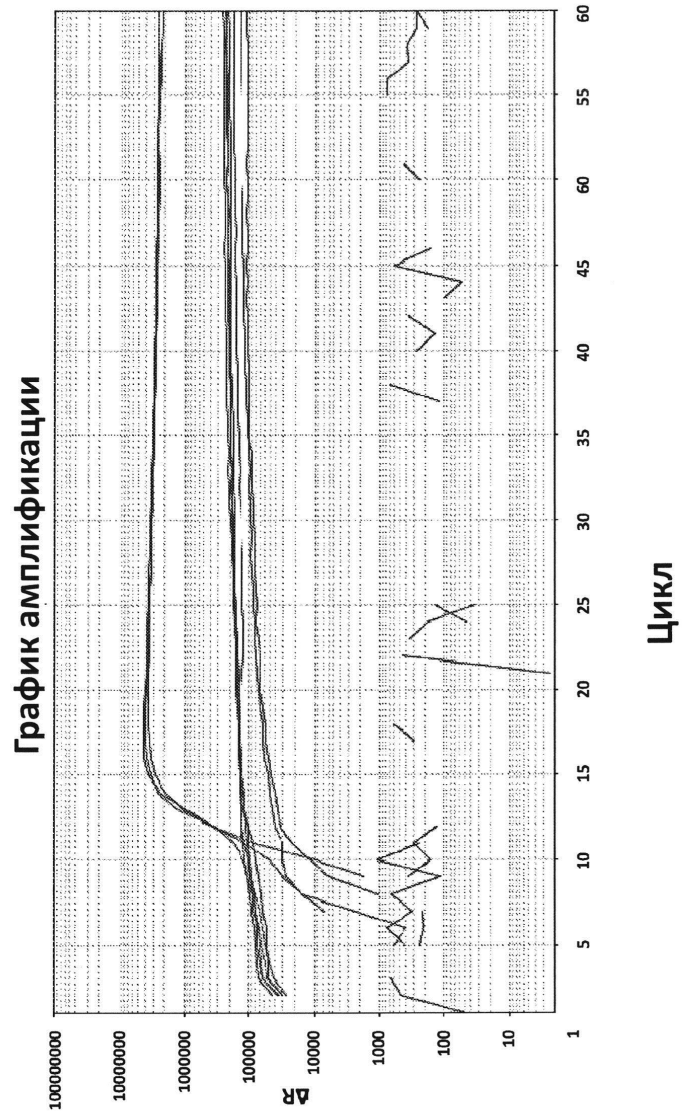
График амплификации



ФИГ 2В

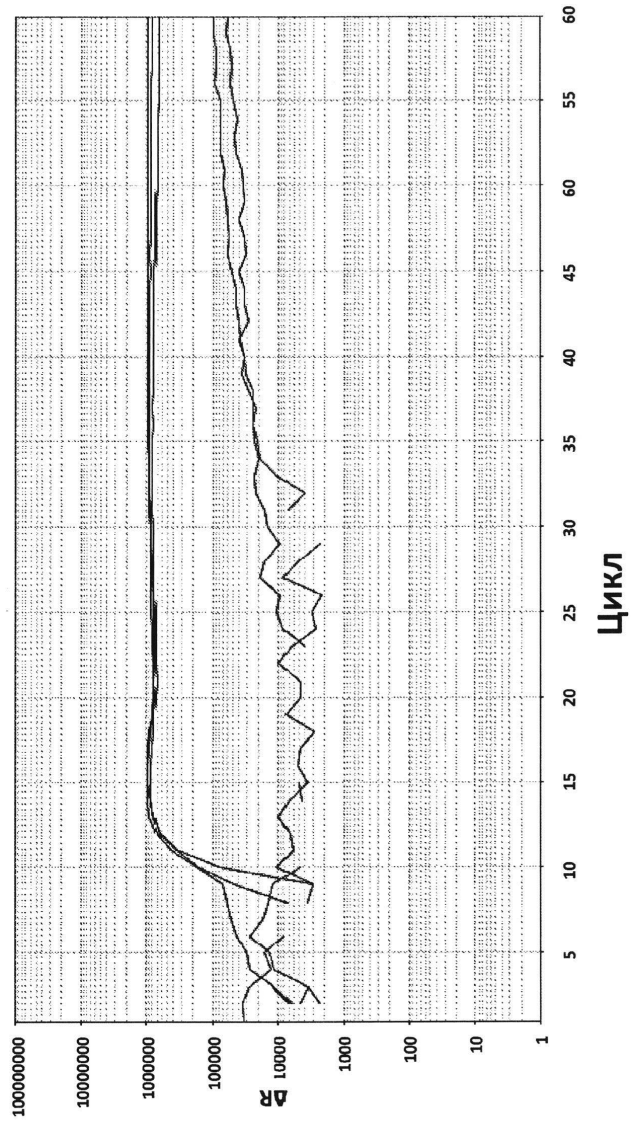


ФИГ 2С



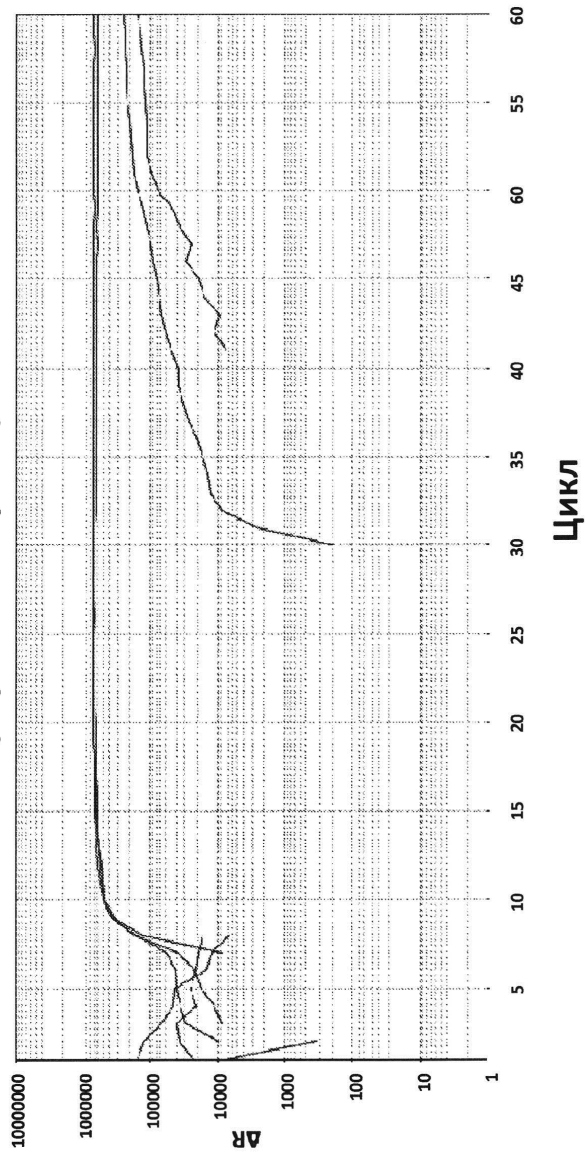
ФИГ 2D

График амплификации



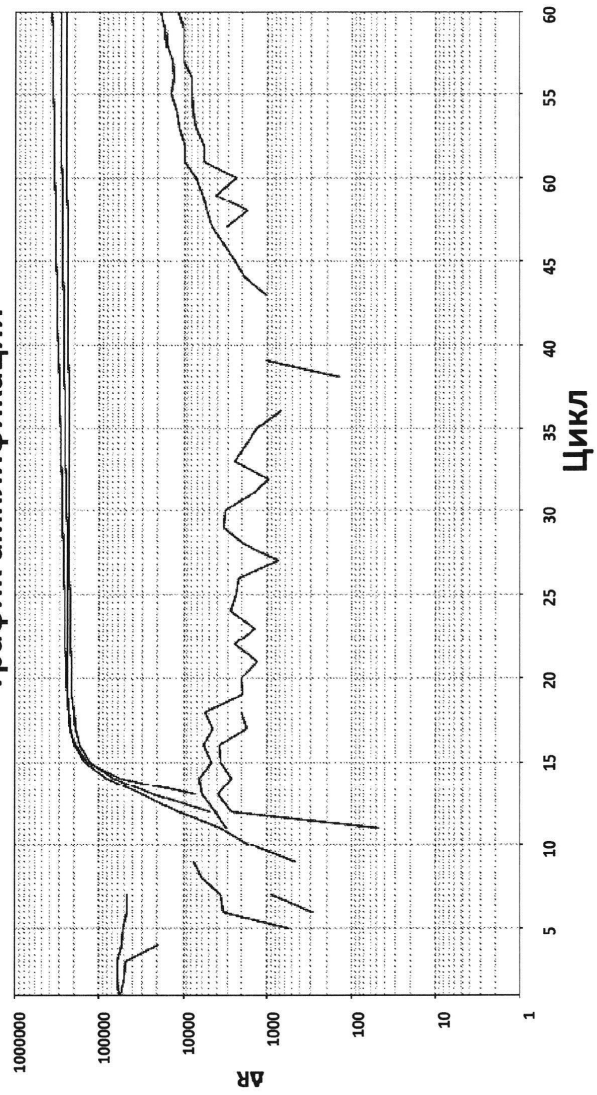
ФИГ 2Е

График амплификации



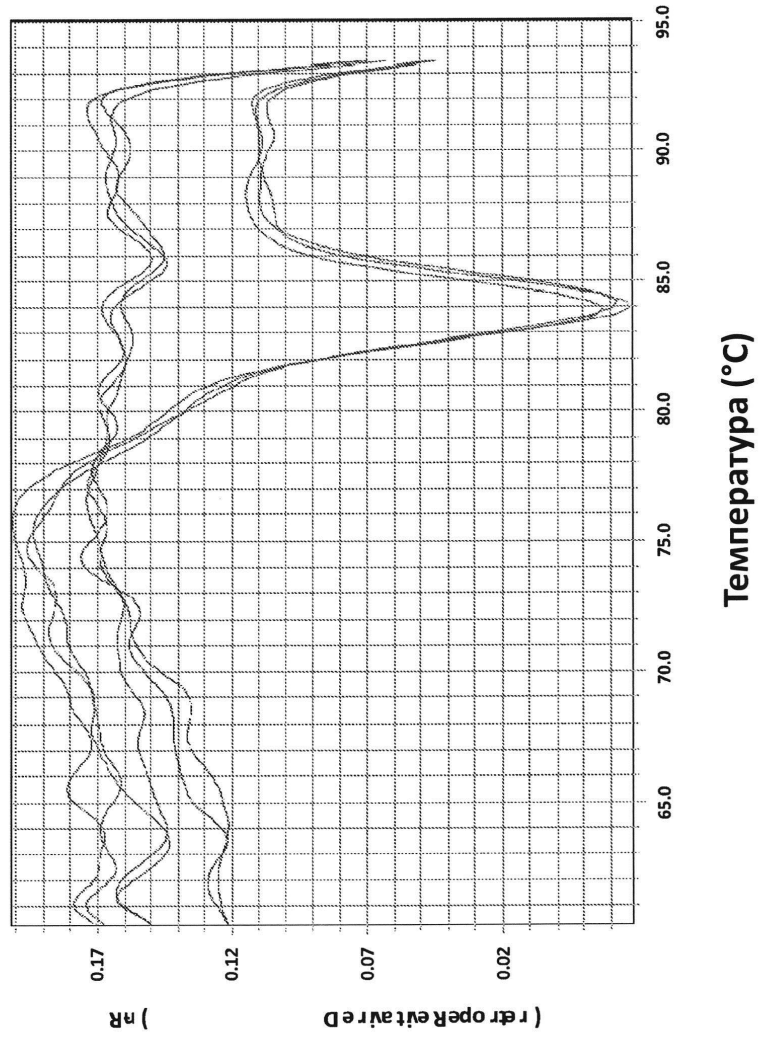
ФИГ 2F

График амплификации



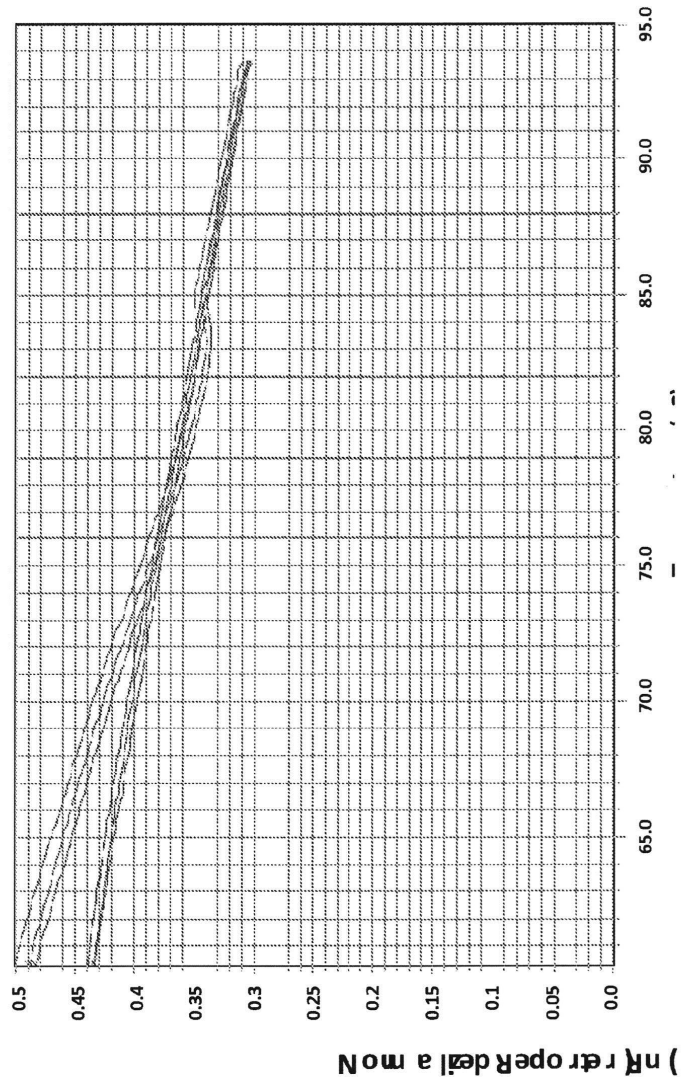
ФИГ 3А

График плавления



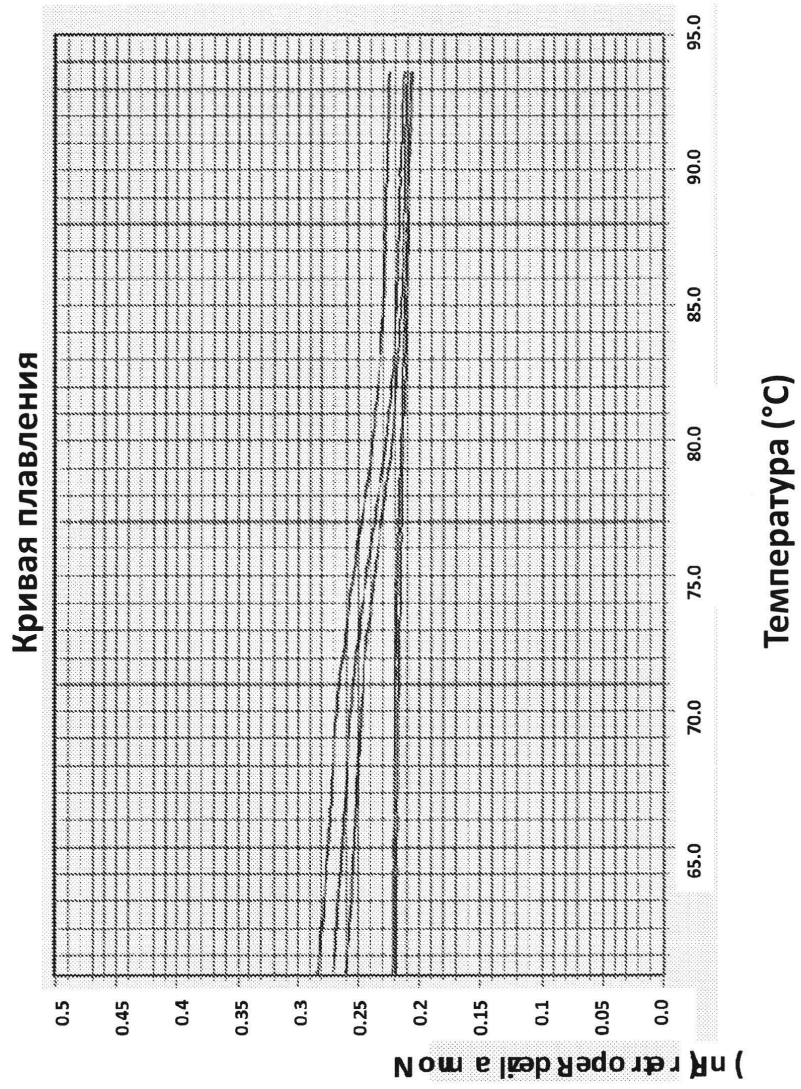
ФИГ 3В

Кривая плавления



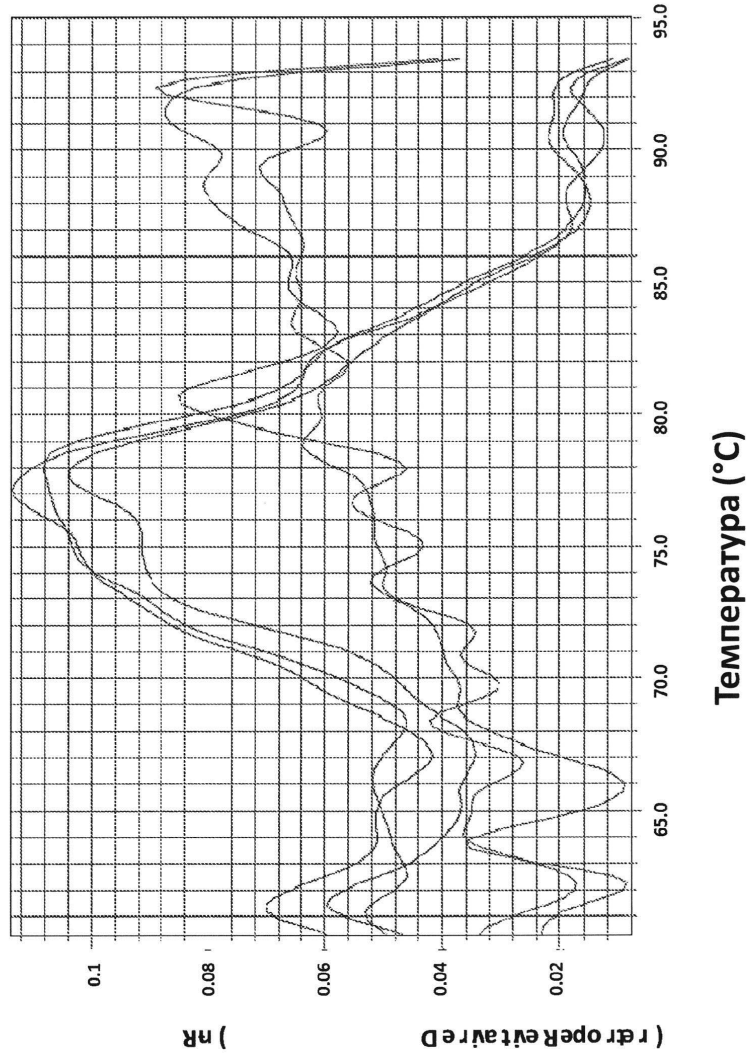
Температура (°C)

ФИГ 4А

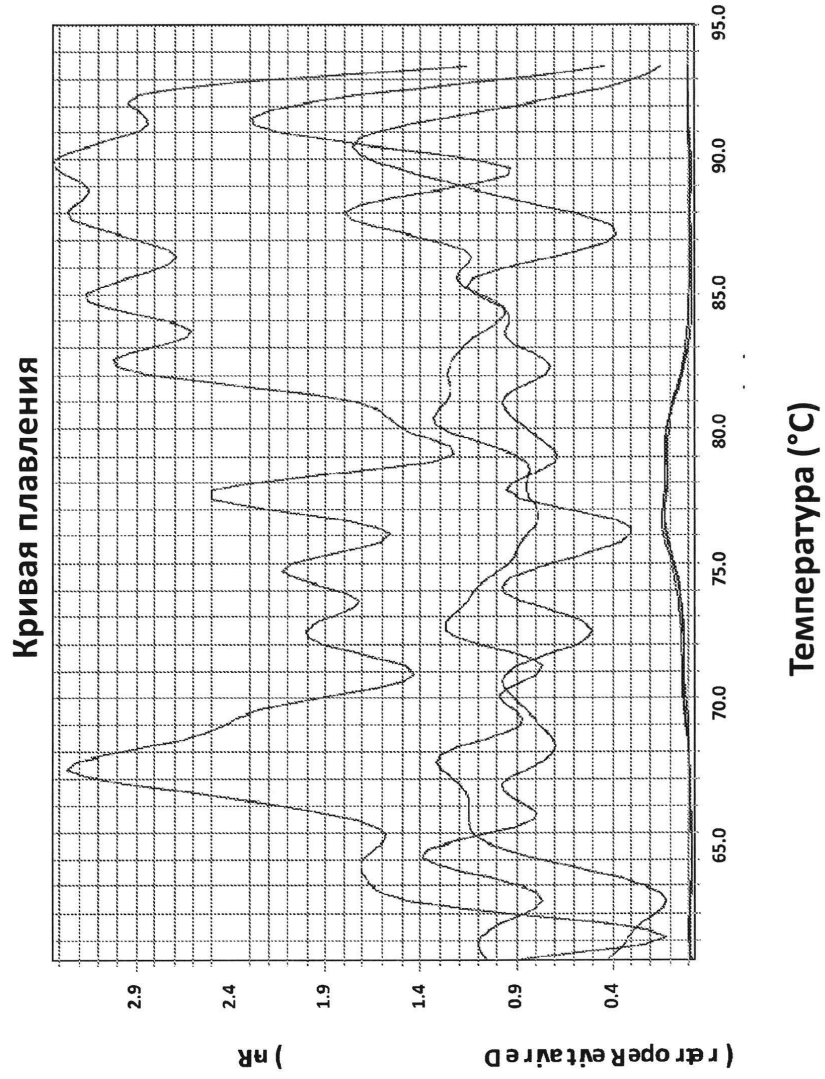


ФИГ 4В

Кривая плавления

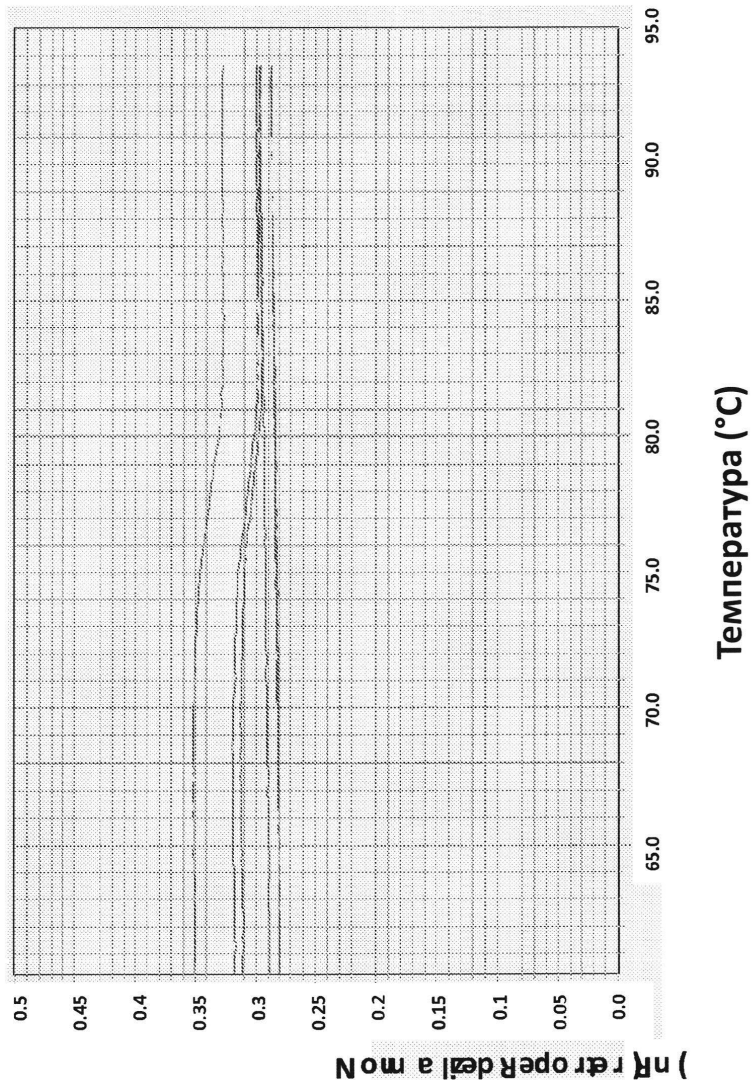


ФИГ 5А



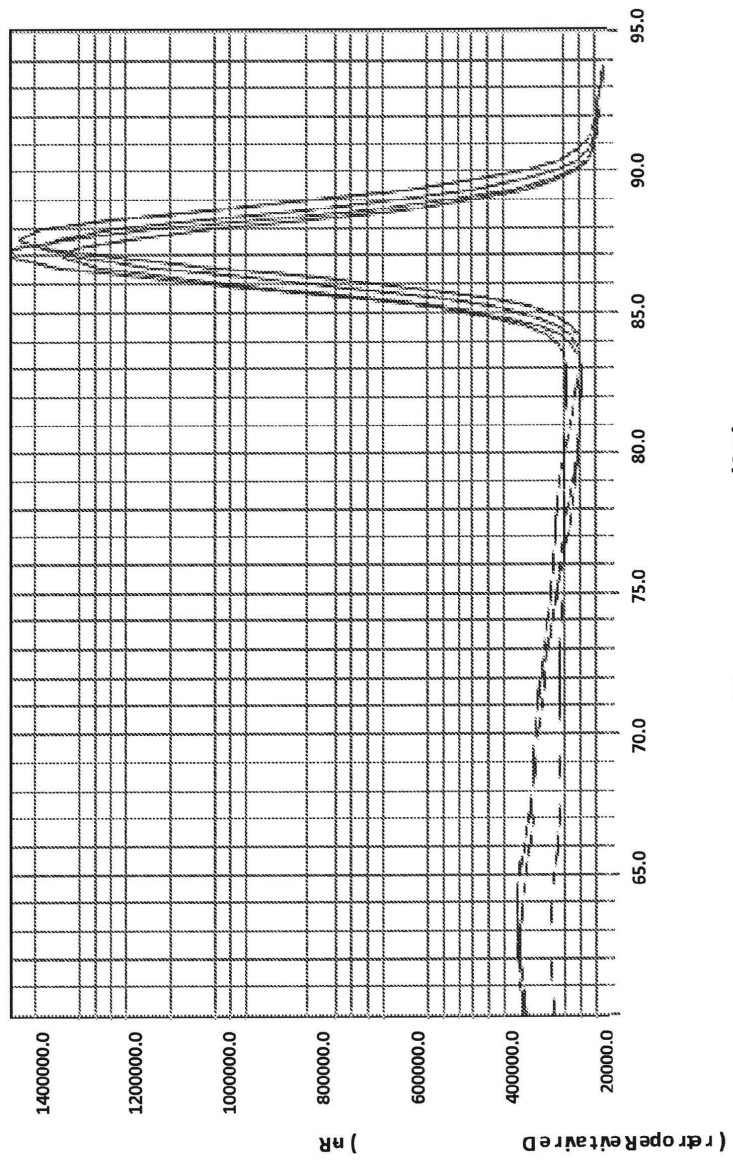
ФИГ 5В

Кривая плавления

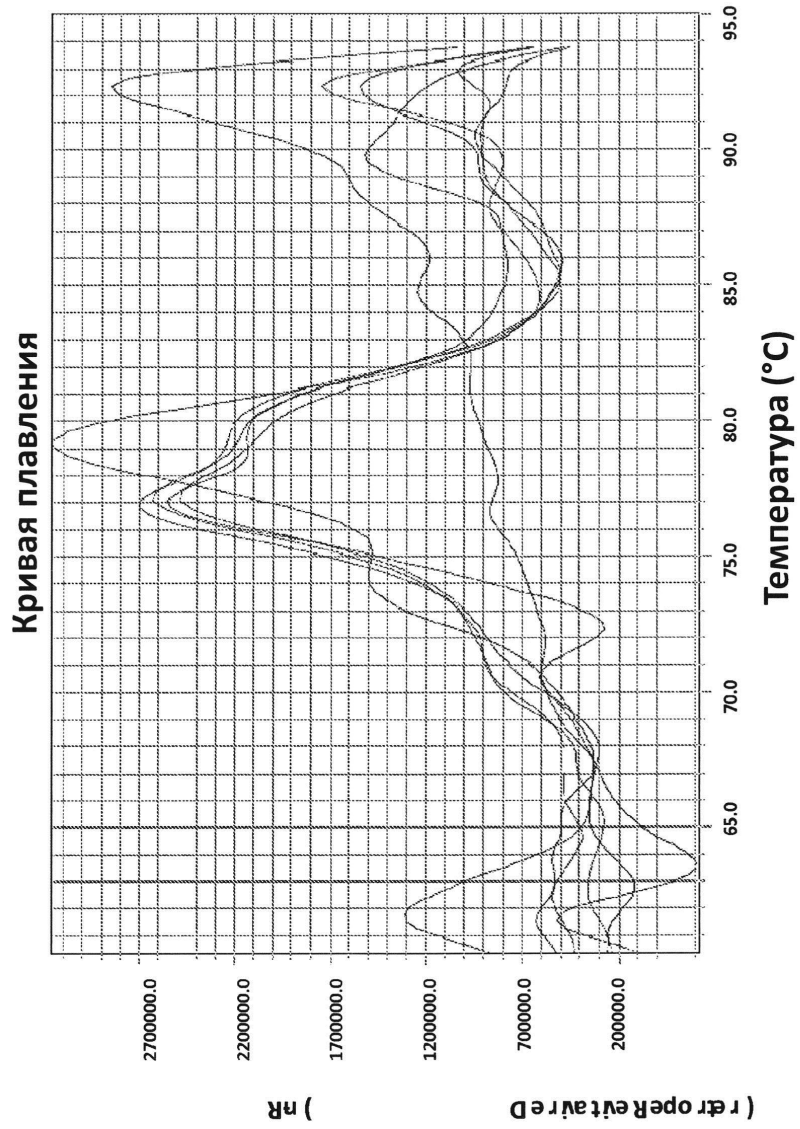


ФИГ 6А

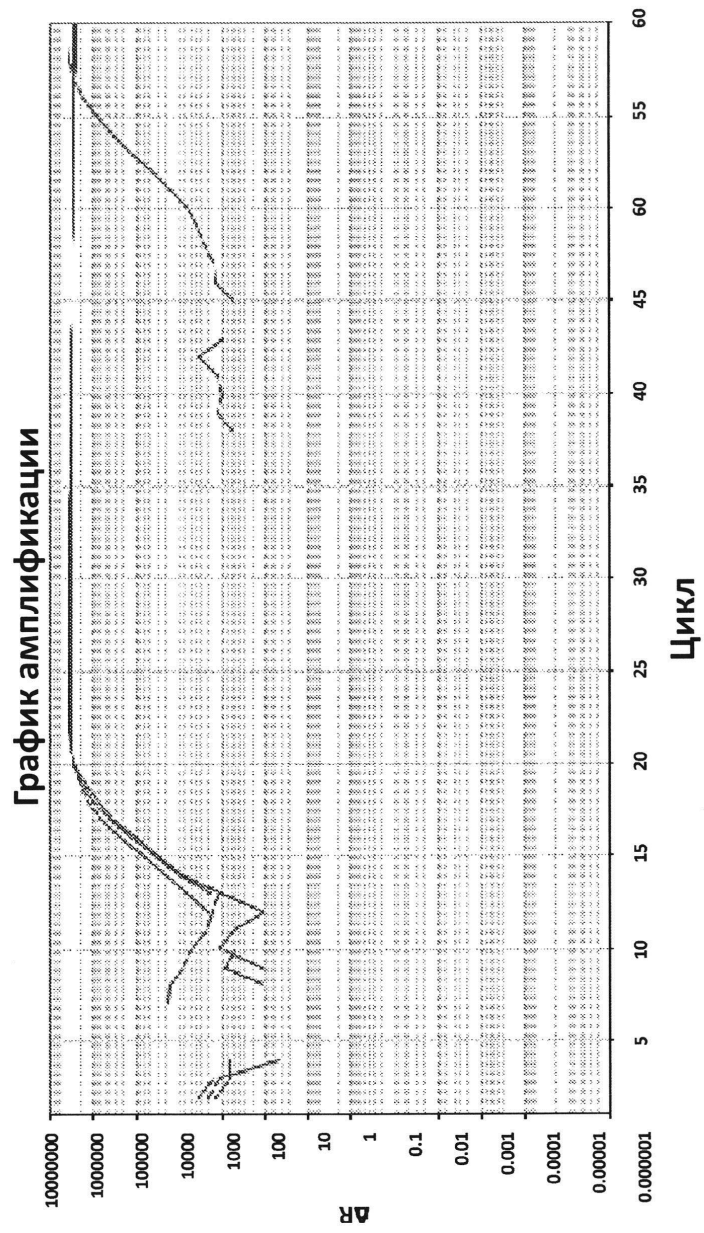
Кривая плавления



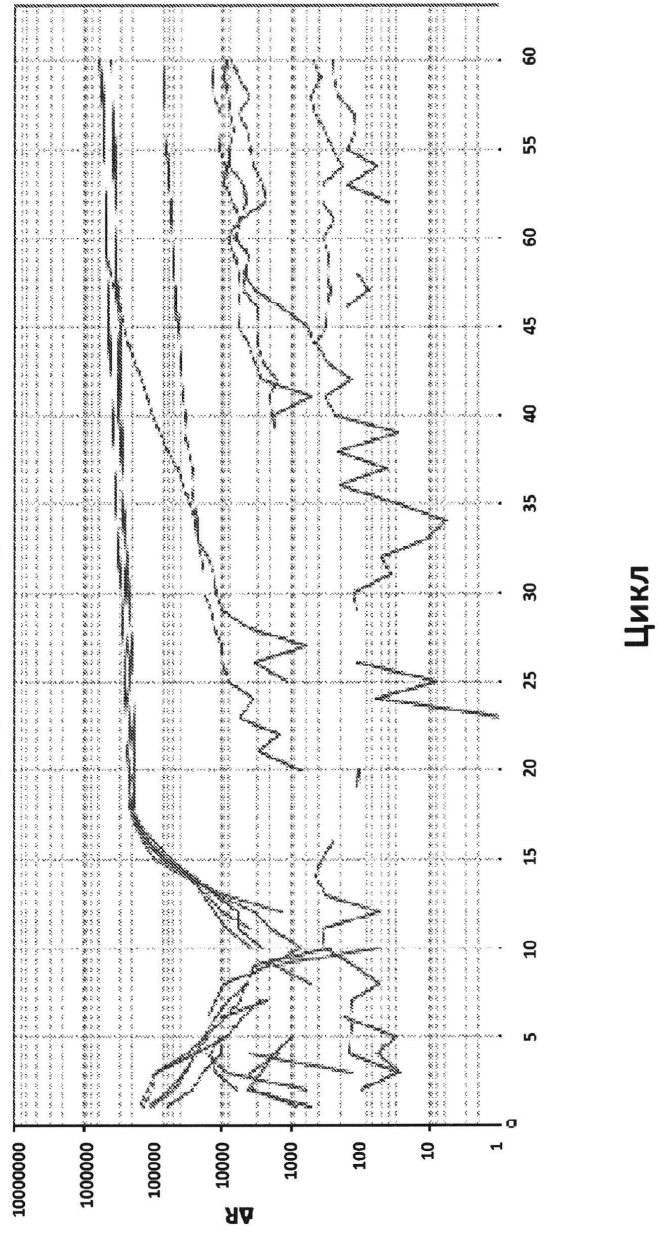
ФИГ 6В



ФИГ 6С

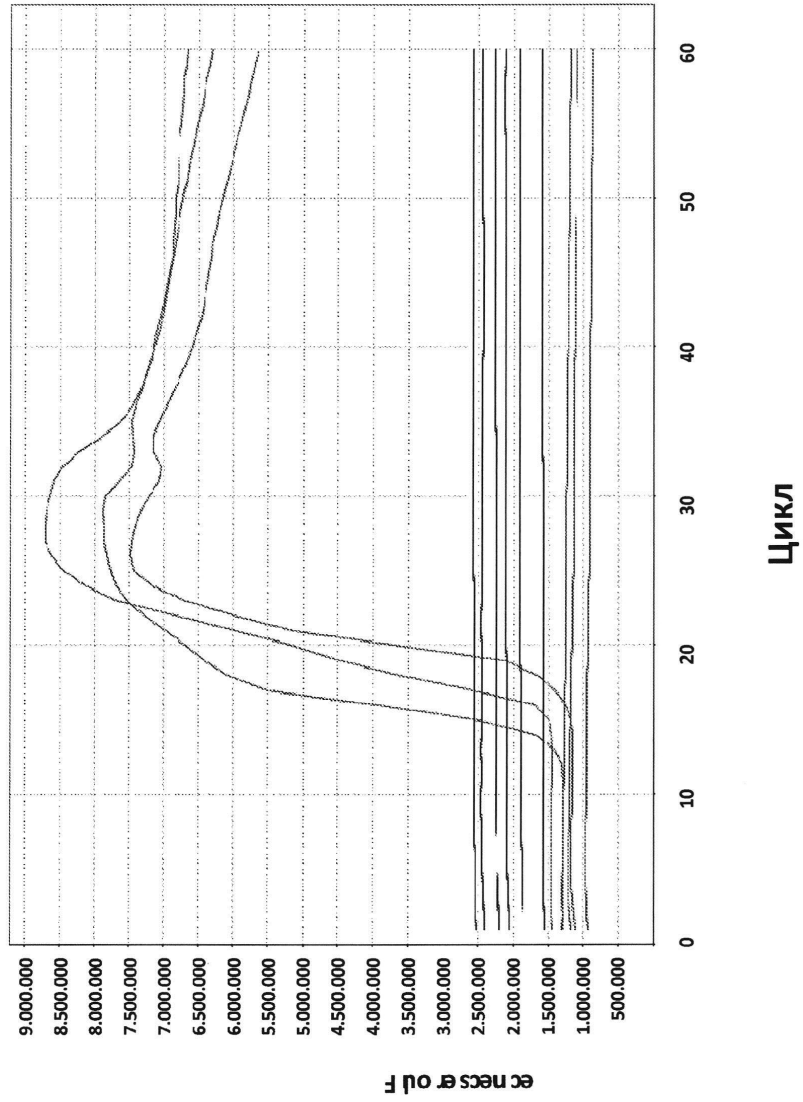


ФИГ 6D
График амплификации

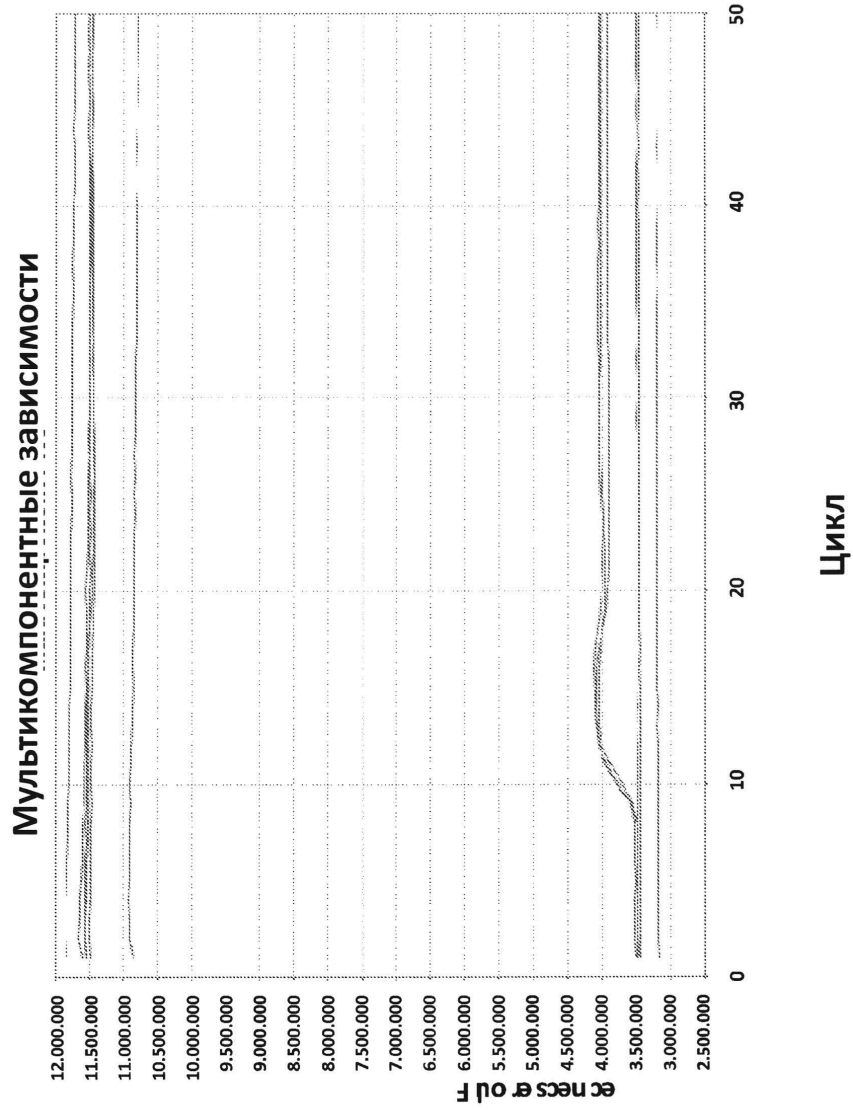


ФИГ 7

Мультикомпонентные зависимости

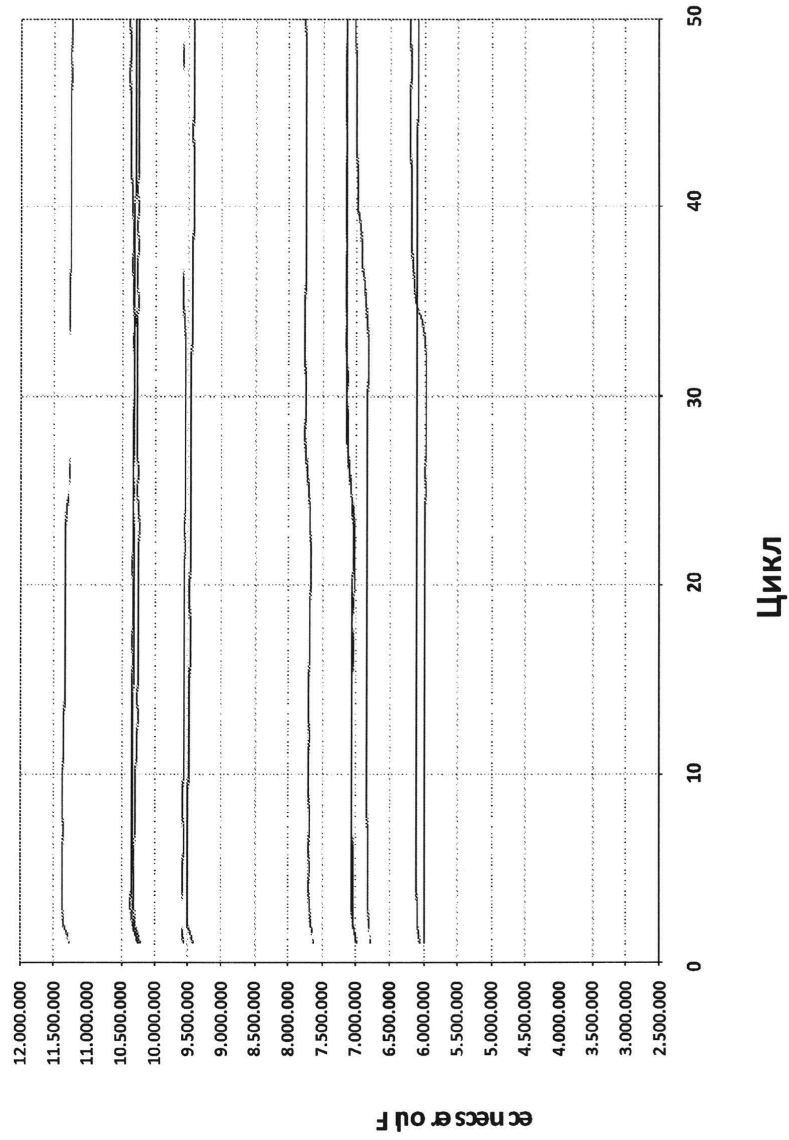


ФИГ 8А



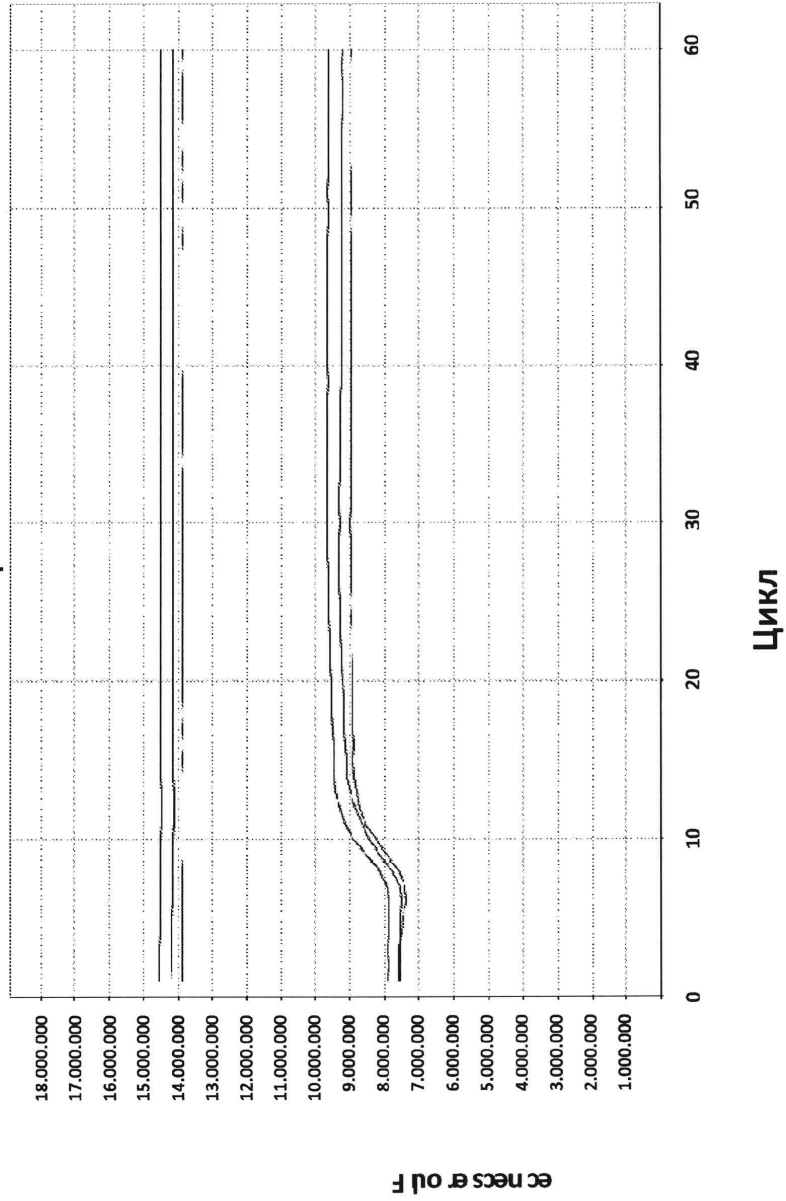
ФИГ 8В

Мультикомпонентные зависимости

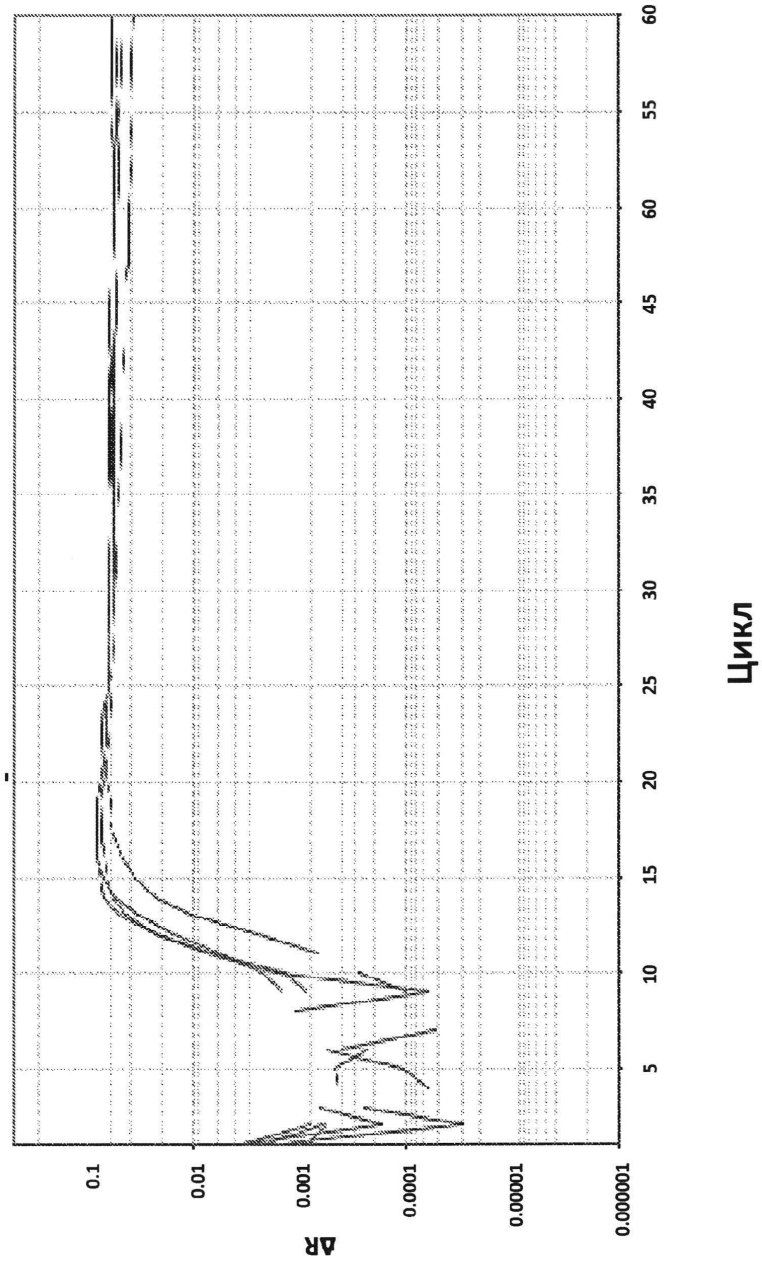


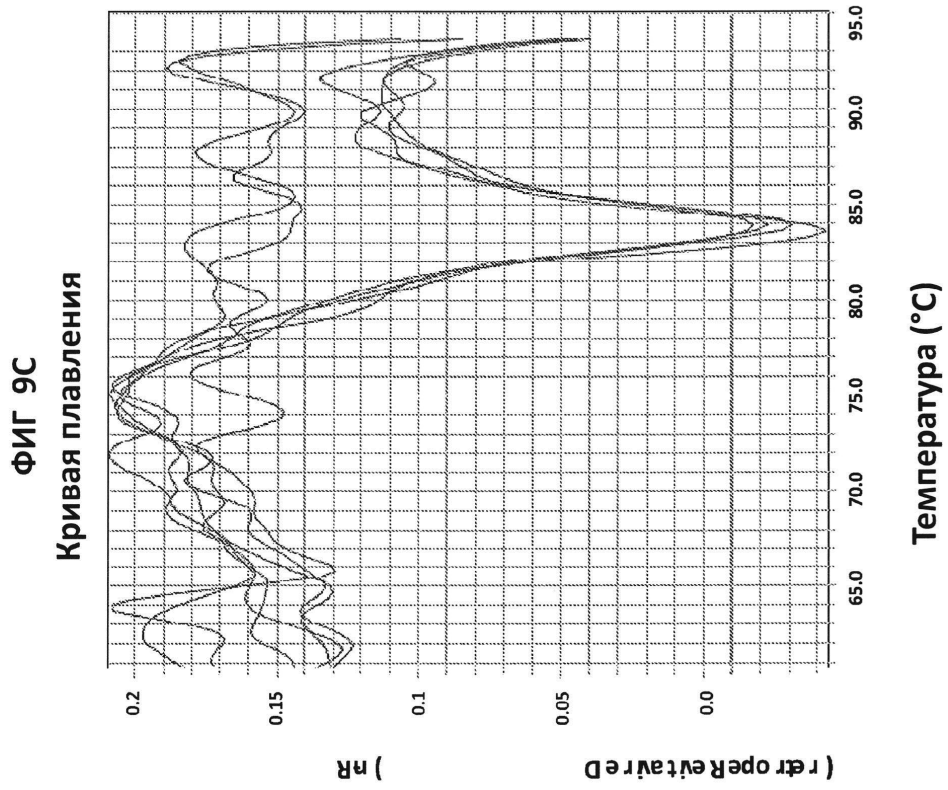
ФИГ 9А

Мультикомпонентные зависимости



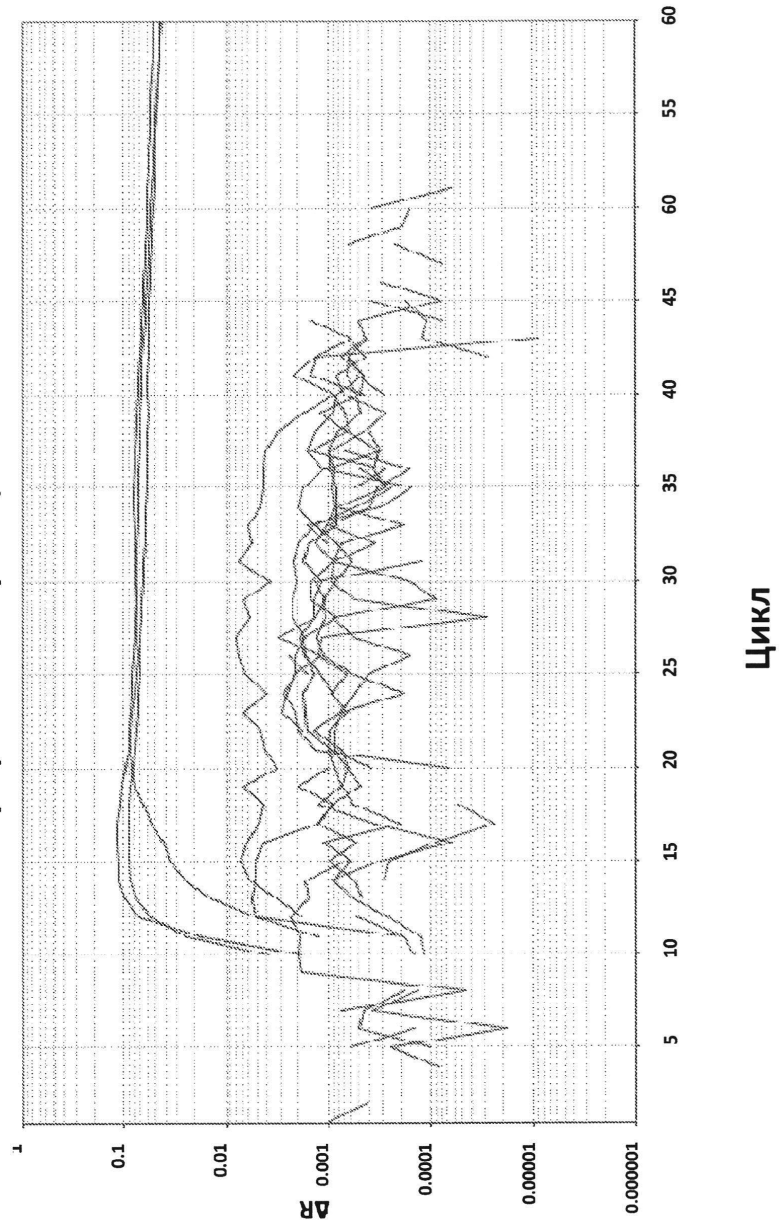
ФИГ 9В
График амплификации



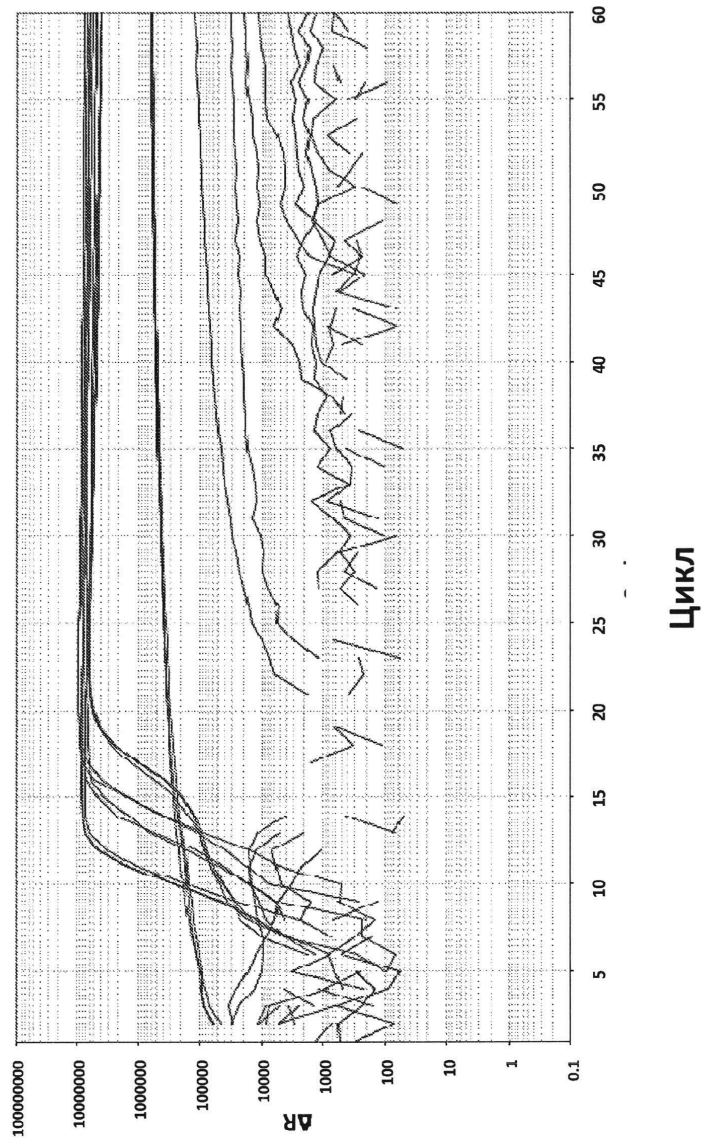


ФИГ 10А

График амплификации

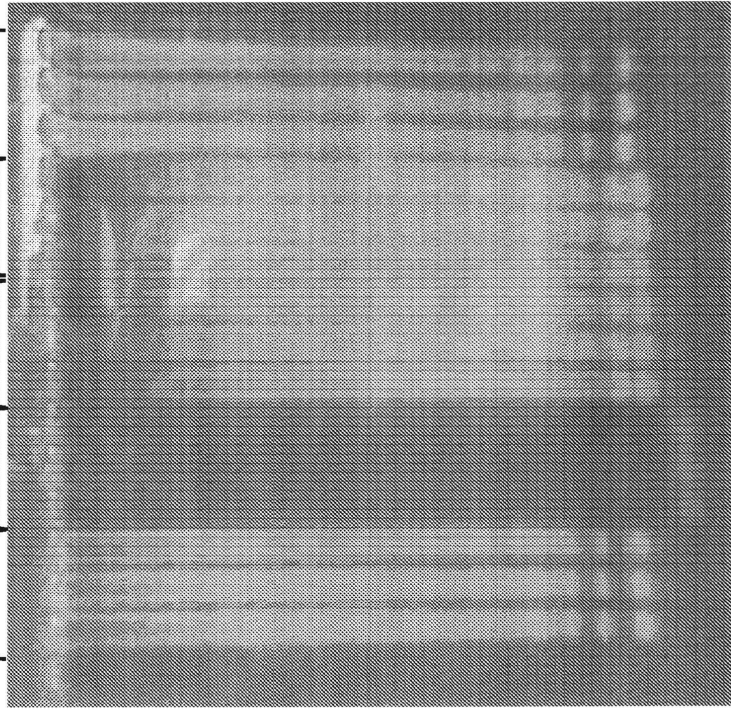


ФИГ 10В
График амплификации



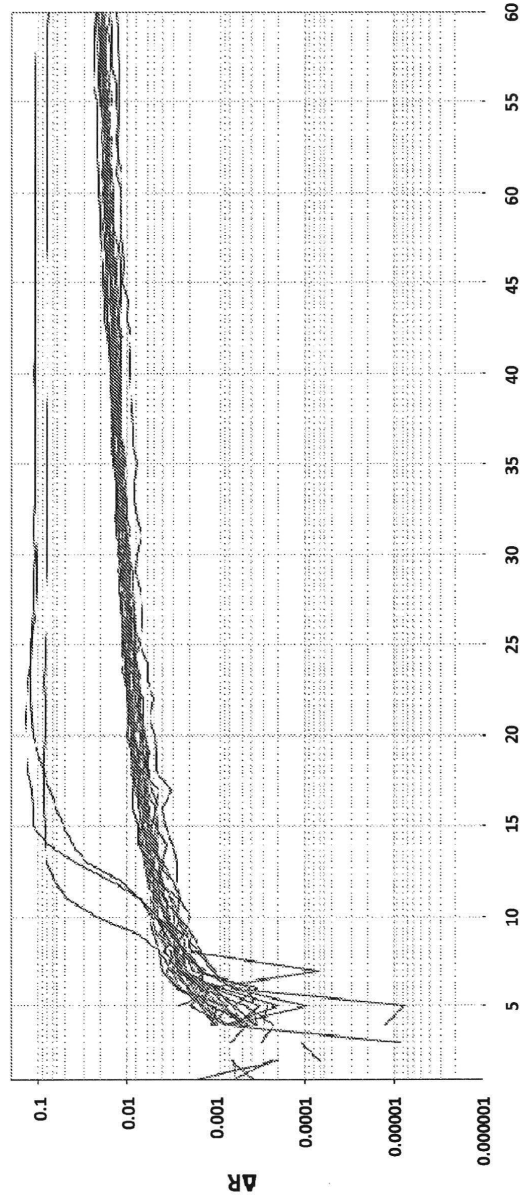
ФИГ 10С

СТ образец, СТ образец, СТ образец, неспец. образец,
СТ праймеры, СТ праймеры, СТ праймеры, СТ праймеры,
СТ ДНК нег ДНК ГС ДНК ГС ДНК ГС ДНК ГС ДНК



ФИГ 11А

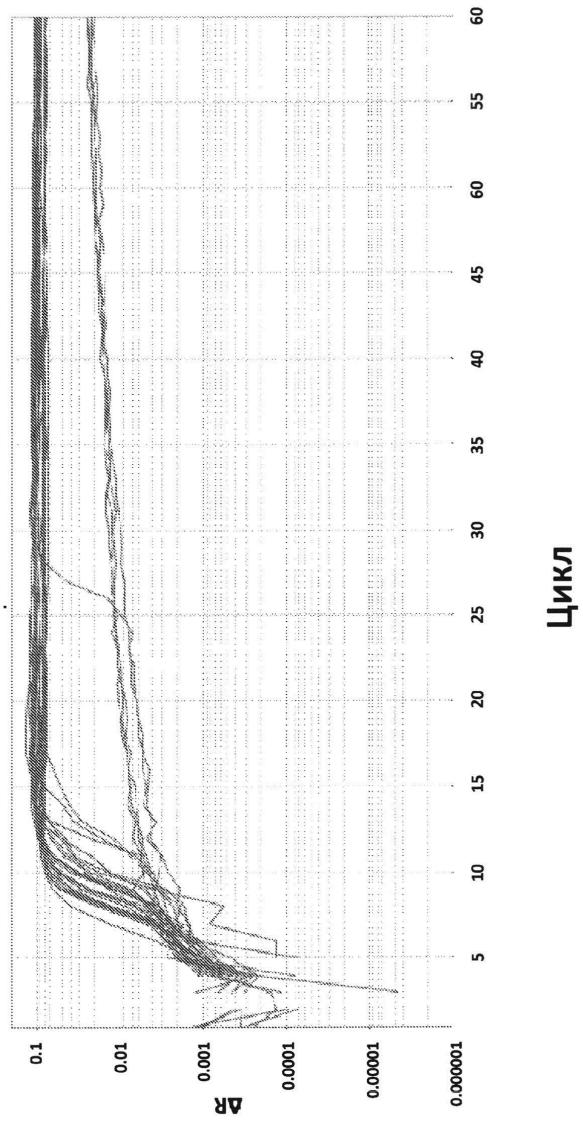
График амплификации



Цикл

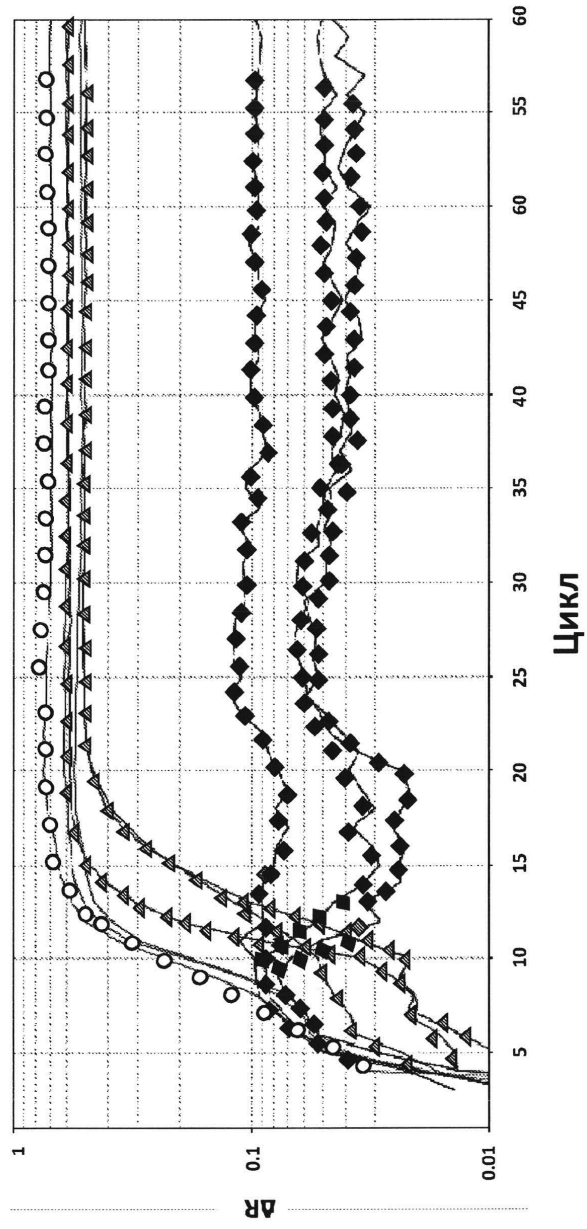
ФИГ 11В

График амплификации



ФИГ 12А

График амплификации



ФИГ 12В

