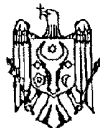




MD 2149 F1 2003.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2149** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.⁷: C 12 N 15/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2001 0385 (22) Data depozit: 2001.11.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.04.30, BOPI nr. 4/2003
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: MITIN Valentin, MD; TUMANOVA Lidia, MD; TARNOVSCAIA Tatiana, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Primer oligonucleotidic pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la genetică și poate fi utilizată pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C.

Primerul oligonucleotidic conține 19 nucleotide în următoarea succesiune: tgcggaaccg gtgagtaca.

2
5 Rezultatul invenției constă în mărirea numărului de tipuri depistate ale ARN-ului virusului hepatitei C.

Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la genetică și poate fi utilizată pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C.

5 Primerii se utilizează în reacțiile PCR și RT-PCR (reacția polimerazei în lanț și transcripția reversă – reacția polimerazei în lanț) pentru determinarea succesiunilor nucleotidice specifice și pentru depistarea ADN/ARN virale și bacteriene, inclusiv a ARN-ului virusului hepatitei C.

Se cunoaște utilizarea domeniilor conservative ale ARN-ului virusului C, așa ca domeniul 5' – netranslat sau domeniul de gena "core" [1]. Însă primerii cunoscuți nu permit a depista toate tipurile ARN-ului virusului, aceasta fiind condiționat de diversitatea mare a virusului hepatitei C. La moment sunt cunoscute 8 tipuri de virusuri HCV, fiecare din ele incluzând încă câteva subgrupuri. Astfel, dacă doi ani în urmă pentru grupul „1” HCV erau cunoscute 3 subgrupuri – 1a, 1b, 1c, în prezent numărul lor s-a mărit până la 1f. În afară de aceasta, numărul succesiunilor clonate și secvențiate ale ARN-ului virusului C permanent se mărește. Din această cauză primerii brevetați anterior nu mai pot cuprinde tot spectrul succesiunilor cunoscute ale ARN-ului virusului hepatitei C.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în crearea unui primer oligonucleotidic (succesiune oligonucleotidică specifică) care va fi omolog pentru multe tipuri de ARN al virusului hepatitei C în comparație cu cei cunoscuți.

Problema dată poate fi rezolvată dacă în calitate de primer oligonucleotidic pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C se va utiliza succesiunea oligonucleotidică din 19 nucleotide tgcggaaccg gtgagtaca.

20 Rezultatul invenției constă în mărirea numărului de tipuri depistate ale ARN-ului virusului hepatitei C, întrucât primerul oligonucleotidic tgcggaaccg gtgagtaca permite a depista mai multe tipuri de ARN al virusului hepatitei C, prezentând omologie de 100% cu 1000 de succesiuni nucleotidice diferite ale ARN-ului hepatitei C.

Exemplu

25 Crearea primerului oligonucleotidic (succesiune oligonucleotidică specifică) pentru depistarea sigură a virusului hepatitei C prin intermediul metodei RT-PCR s-a efectuat cu ajutorul softului PCGene. Trebuie de menționat că depistarea oricărei succesiuni prin metoda RT-PCR este posibilă când se utilizează o pereche de primeri – un primer de la 5' – regiune (plus–primerul) și altul de la 3' – regiune (minus–primerul). Invenția dată se referă la crearea plus–primerului. Pentru rezolvarea problemei în evidență s-au pus următoarele condiții:

30 a) temperatura de renaturare (T_m – temperature of melting) a fost limitată la $53^\circ \dots 57^\circ \text{C}$ în condițiile standard ale reacției PCR (TrisHCl pH 8,3, KCl 50 mM, concentrația primerilor 250 μM). Temperatura s-a calculat prin formula Rychlik, Spenser și Rhoads (Ruchlik W., Spenser W.J., Rhoads R.E., Nucleic Acids Res., 1990, 18: 6409-6412; Rychlik W., Rhoads R.E., Nucleic Acids Res., 1989, 17: 8543-8551).

35 $T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(c/4)} - 273,15 + 16,61 \log[K^+]$,

în care: ΔH este entalpia formării helixului,

ΔS – entropia formării helixului,

R – constanta molară a gazului (1,987 cal/grad C· mol),

40 c – concentrația molară totală a oligonucleotidelor renaturate în cazul când oligonucleotidele nu sunt autocomplementare.

K^+ – concentrația potasiului în reacție;

b) lungimea primerului: 20 ± 2 nucleotide;

c) numărul maxim acceptabil de repetiție al unei singure nucleotide: 4;

d) numărul de GC-perechi de la 3' – capăt: 0;

45 e) conținutul minim acceptabil de GC-perechi: 40%;

f) conținutul maxim acceptabil de GC-perechi: 60%;

g) numărul maxim al nucleotidelor la autocomplementația primerului: 4;

h) întinderea helixului dublu în interiorul primerului cel mult 4 nucleotide;

i) procentajul maxim de complementație cu alte regiuni ale ARN-ului: 70%;

50 j) numărul maxim al nucleotidelor la complementație cu altele ale primerului: 3.

Pe baza condițiilor fixate s-au examinat succesiuni nucleotidice ale ADN și ARN din Banca mondială de nucleotide (GenBank, softul BLAST: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Rezultatele obținute au permis construirea plus–primerului oligonucleotidic din 19 nucleotide 5'-tgcggaaccggtgagtaca-3'. Etapa următoare a constat în analiza comparativă a nivelului de omologie a primerului oligonucleotidic 5'-tgcggaaccggtgagtaca-3' și primerului oligonucleotidic proxim 5'-cccggaggctctgtagaccgtgca-3' cu succesiunile nucleotidice ale ADN și ARN din baza de date GenBank. Prin intermediul softului BLAST s-au analizat 1000 de succesiuni nucleotidice ale diferitelor tipuri de virus al hepatitei C. Conform analizei s-a constatat că primerul creat are o omologie de 100% (19 nucleotide) cu 1000 (probabil și mai multe) succesiuni din GenBank. Totodată

MD 2149 F1 2003.04.30

4

primerul proxim are o omologie de 100% (25 nucleotide) numai cu 389 succesiuni asemănătoare. În tabelul 1 sunt prezentate unele succesiuni analizate.

Tabelul 1

Gradul de omologie al primerilor oligonucleotidici cu unele succesiuni în GenBank

5

Sursa succesiunilor nucleotidice în GenBank și lungimea succesiunii corespunzătoare	Succesiunile omoloage	Gradul de identitate
gi 5441837 emb AJ242653.1 SSE242653 Repliconul I389/NS2-3' UTR al virusului hepatitei C Lungimea=8649	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 	19/19
	149 tgcggaaccggtgagtaca 167 	
	1 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 25 	25/25
	315 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 339 	
gi 7650251 gb AF207767.1 AF 207767 Genomul complet al tulpinii MD26 virusului hepatitei C Lungimea=9379	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 	19/19
	137 tgcggaaccggtgagtaca 155 	
	1 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 25 	24/25
	303 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 327 	
gi 13122269 dbj AB047643.1 AB047643 Gena virusului hepatitei C pentru poliproteină, clona: JCH-4 Lungimea=9641	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 	19/19
	148 tgcggaaccggtgagtaca 166 	
	1 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 25 	24/25
	314 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 338 	
gi 9757541 dbj AB030907.1 AB030907 Gena de tipul 2b a virusului hepatitei C pentru poliproteină, izolatul: JPUT971017 Lungimea=9654	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 	19/19
	149 tgcggaaccggtgagtaca 167 	
	1 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 25 	24/25
	315 cccgggaggtctcgtagaccgtgca 339 	
gi 3152974 emb AJ006317.1 HCV6317 Tipul 3a 5' UTR al virusului hepatitei C, izolatul tx 33.6, parțial Lungimea=230	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 	19/19
	45 tgcggaaccggtgagtaca 63 	
	1 cccgggaggtctcgta 16 	16/25
	213 cccgggaggtctcgta 228 	

MD 2149 F1 2003.04.30

5

(57) Revendicare:

Primer oligonucleotidic pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C, care conține 19 nucleotide în următoarea succesiune: tgcggaaccg gtgagtaca.

5

(56) Referințe bibliografice:

1. EP 0984068 2000.03.08

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2001 0385		
(22) Data depozit: 2001.11.23		
(51) ⁷ : C 12 N 15/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Primerul oligonucleotidic pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : nucleotide, oligonucleotide, praimerile pentru depustarea ARN-ului virusului hepatitei C		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
(MD, EA, SU) MD 1993-2002; EA – 1996-2002; certificate de autor (BRIT)		
Int. Cl. ⁷		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2003.02.03
Examinatorul		Bazarenco Tatiana

RAPORT DE DOCUMENTARE

Informația referitoare la brevete paralele		(21) Nr depozit:	
Date de identificare ale documentelor citate în raport	Data publicării	Brevete paralele	Data publicării
1	2	3	4