

RU 2013113407 A

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU⁽¹¹⁾ 2013 113 407⁽¹³⁾ A

(51) МПК
C12Q I/68 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2013113407/10, 25.08.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
27.08.2010 US 61/402,350

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2014 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.03.2013

(86) Заявка РСТ:
US 2011/049151 (25.08.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/027572 (01.03.2012)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(71) Заявитель(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):
СЕШАГИРИ Сомасекар (US)

(54) СПОСОБЫ УЛАВЛИВАНИЯ И СЕКВЕНИРОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(57) Формула изобретения

1. Способ улавливания и секвенирования молекулы искомой нуклеиновой кислоты, включающий в себя:

(а) приведение твердой подложки в контакт со смесью нуклеиновых кислот, содержащей молекулу искомой нуклеиновой кислоты, в условиях гибридизации, при которых указанная молекула искомой нуклеиновой кислоты образует специфический гибридизационный комплекс с праймером, иммобилизованным на указанной твердой подложке в конфигурации, совместимой с его активностью в качестве праймера;

(б) отделение несвязанных нуклеиновых кислот и нуклеиновых кислот, связанных неспецифически, от твердой подложки;

(с) приведение твердой подложки в контакт с полимеразой и нуклеотидами в условиях полимеризации; и

(д) определение последовательности нуклеиновой кислоты молекулы искомой нуклеиновой кислоты посредством детектирования полимеризации нуклеиновой кислоты от иммобилизованного праймера, осуществляющей указанной полимеразой с использованием молекулы искомой нуклеиновой кислоты в качестве матрицы.

2. Способ по п.1, где молекула искомой нуклеиновой кислоты происходит из участка геномной ДНК.

3. Способ по п.2, где искомая нуклеиновая кислота содержит весь экзон или его часть.

RU 2013113407 A

4. Способ по п.1, где молекула искомой нуклеиновой кислоты представляет собой РНК, полимераза представляет собой обратную транскриптазу, а праймер содержит 3'-поли-Т-последовательность.

5. Способ по п.1, где молекула искомой нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК, а полимераза представляет собой ДНК-полимеразу.

6. Способ по п.1, где нуклеотиды являются меченными по их концевым фосфатам.

7. Способ по п.6, где полимераза является меченой донором FRET, а нуклеотиды являются меченными акцептором FRET.

8. Способ по п.7, где донор FRET представляет собой флуоресцентную наночастицу.

9. Способ определения статуса метилирования фрагмента геномной ДНК, причем указанный способ включает:

(а) иммобилизацию фрагмента геномной ДНК на твердой подложке;

(б) определение последовательности нуклеиновой кислоты иммобилизованного фрагмента геномной ДНК на твердой подложке посредством детектирования полимеризации нуклеиновой кислоты, осуществляющейся полимеразой с использованием иммобилизованного фрагмента геномной ДНК в качестве матрицы;

(с) обработку иммобилизованного фрагмента геномной ДНК бисульфитом;

(д) определение последовательности нуклеиновой кислоты иммобилизованного, обработанного бисульфитом, фрагмента геномной ДНК на твердой подложке посредством детектирования полимеризации нуклеиновой кислоты, осуществляющейся полимеразой с использованием иммобилизованного, обработанного бисульфитом, фрагмента геномной ДНК в качестве матрицы;

(е) сравнение последовательности нуклеиновой кислоты, определенной на стадии (б), с последовательностью, определенной на стадии (д), где преобразование остатка цитозина в фрагменте геномной ДНК свидетельствует о том, что в фрагменте геномной ДНК до его обработки бисульфитом указанный остаток был неметилированным, а отсутствие преобразования остатка цитозина в фрагменте геномной ДНК свидетельствует о том, что в фрагменте геномной ДНК до его обработки бисульфитом указанный остаток был метилированным.

10. Способ по п.9, где фрагмент геномной ДНК иммобилизован на твердой подложке посредством адаптера.

11. Способ по п.10, где адаптер содержит сайт связывания праймера и где цитозины в сайте связывания праймера являются защищенными.

12. Способ по п.11, где полимераза стадии (б) и/или (д) полимеризует цепь нуклеиновой кислоты от праймера, подвергнутого отжигу с сайтом связывания праймера.

13. Способ по п.9, где полимеризацию нуклеиновой кислоты стадии (б) и/или (д) детектируют посредством детектирования включения меченых нуклеотидов.

14. Способ по п.13, где меченные нуклеотиды являются меченными по их концевым фосфатам.

15. Способ по п.14, где полимераза стадии (б) и/или (д) является меченой донором FRET, а нуклеотиды являются меченными акцептором FRET.

16. Способ по п.15, где донор FRET представляет собой флуоресцентную наночастицу.