

Связанные заявки

Заявка на данное изобретение заявляет преимущество предварительной заявки США № 60/471827, поданной 20 мая 2003 г., которая включена здесь полностью посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам, композициям и системам анализа для обнаружения полинуклеотидов.

Уровень техники

Существует большая потребность в идентификации и количественном определении полинуклеотидов. Существующие способы идентификации мишеневых полинуклеотидов, таких как полинуклеотиды, связанные с патогенами, с патогенной инфекцией, со связанными с болезнями и нарушениями генами человека, с генетически модифицированными организмами (ГМО) (GMO), со средствами биологической борьбы, с применениями в ветеринарии и сельском хозяйстве, в настоящее время основаны на таких способах, как полимеразная цепная реакция (PCR), NASBA, TMA или bDNA. Эти способы требуют квалифицированного персонала и специализированного оборудования. Соответственно, существует большая потребность в удобных и экономичных методах обнаружения, идентификации и количественного определения мишеневых полинуклеотидов. Данное изобретение удовлетворяет эту и другие потребности.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в образце. В следующем аспекте один способ включает в себя следующие стадии.

Аналог нуклеиновой кислоты, который связывается специфичным образом с мишеневой последовательностью нуклеиновой кислоты мишеневого полинуклеотида в одну последовательность, и краситель, у которого скорость изменения оптической характеристики различна в присутствии и в отсутствие гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты, объединяют так, чтобы получилась смесь. Скорость изменения оптической характеристики красителя в этой смеси сравнивают с эталонным значением скорости изменения оптической характеристики красителя в подобной смеси, содержащей известное количество гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты, чтобы определить относительную скорость изменения оптической характеристики. Относительную скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси коррелируют с присутствием или количеством определённого мишеневого полинуклеотида в образце.

В другом аспекте способ включает в себя следующие стадии: пептидная нуклеиновая кислота (PNA), которая связывается специфичным образом с мишеневой последовательностью нуклеиновой кислоты мишеневого полинуклеотида в одну последовательность, и краситель, у которого скорость изменения оптической характеристики различна в присутствии и в отсутствие гибрида мишеневый полинуклеотид/PNA, объединяют так, чтобы получилась смесь. Скорость изменения оптической характеристики красителя в этой смеси сравнивают с эталонным значением скорости изменения оптической характеристики красителя в подобной смеси, содержащей известное количество гибрида мишеневый полинуклеотид/PNA, чтобы определить относительную скорость изменения оптической характеристики. Относительную скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси коррелируют с присутствием или количеством определённого мишеневого полинуклеотида в образце.

В других аспектах аналог нуклеиновой кислоты может представлять собой замкнутую нуклеиновую кислоту (LNA), треозовую нуклеиновую кислоту (TNA) или сцепленную с металлом нуклеиновую кислоту.

Скорость изменения оптической характеристики красителя может быть различной в присутствии и в отсутствие гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты и когда на смесь воздействуют световым стимулом.

Образец может представлять собой ткань, совокупность клеток, клеточный лизат, очищенный полинуклеотид, или выделенный полинуклеотид, вирус, пробу окружающей среды, промышленную пробу, медицинскую пробу, пищевую пробу, агротехническую пробу, ветеринарную пробу, животноводческий образец, пробу воды, почвенную пробу, пробу воздуха, пробу, связанную со средством биологической борьбы, или пробу, связанную со средством сельскохозяйственной борьбы.

В одном аспекте мишеневый полинуклеотид может представлять собой ДНК. В некоторых случаях мишеневый полинуклеотид может быть получен из тотальной клеточной ДНК, ядерной ДНК, митохондриальной ДНК, рибосомной ДНК, хлоропластной ДНК, или вирусной ДНК, плазмидной ДНК, искусственной ДНК, эпигеномной ДНК, эпигенетической ДНК, *in vitro* амплифицированной ДНК или из химерной ДНК.

В другом аспекте мишеневый полинуклеотид может представлять собой РНК. В некоторых случаях РНК может быть получена из рибосомной РНК (rRNA), матричной РНК (mRNA), транспортной РНК (tRNA), защищенной РНК, вирусной РНК, микроРНК, siРНК, искусственной РНК или из химерной РНК.

Мишеневый полинуклеотид может быть получен из организма. В одном варианте осуществления организм может быть человек. В другом варианте осуществления организм может представлять собой патоген. В ещё одном варианте осуществления мишеневый полинуклеотид может происходить из пато-

гена, такого как вирус, бактерия или грибок. Неограничивающие примеры таких вирусов или бактерий включают в себя *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Brucellae*, *Vibrio cholera*, *Clostridium perfringens*, вирус Эбола, *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetii*, вирус оспы, вирус гепатита С, вирус гепатита В и вирус иммунодефицита человека.

Аналог нуклеиновой кислоты может быть частично комплементарным мишени последовательности нуклеиновой кислоты. Альтернативно, аналог нуклеиновой кислоты может быть полностью комплементарным мишени последовательности нуклеиновой кислоты.

Аналог нуклеиновой кислоты может иметь более чем примерно 4 нуклеотидных основания в длину и (или) менее чем примерно 24 нуклеотидных основания в длину. В следующем варианте аналог нуклеиновой кислоты может также иметь примерно 12 нуклеотидных оснований в длину.

Аналог нуклеиновой кислоты или мишени полинуклеотид могут быть иммобилизованными на твёрдом субстрате. Иммобилизация может осуществляться через нековалентное взаимодействие, такое как между биотином и стрептавидином. В следующем варианте аналог нуклеиновой кислоты может быть ковалентно связан с биотином. В ещё одном варианте нековалентное взаимодействие может представлять собой взаимодействие антиген-антитело. Аналог нуклеиновой кислоты или мишени полинуклеотид могут также быть ковалентно связаны с твёрдым субстратом.

В следующем аспекте краситель является цианиновым красителем. Примерами цианиновых красителей являются 3',3'-диэтилтиакарбоцианин йодид, 3',3'-диэтилтиадикарбоцианин йодид и 3',3'-диэтилтиатрикарбоцианин йодид.

Краситель может иметь более высокую скорость изменения оптической характеристики в присутствии гибрида аналог нуклеиновой кислоты/мишени полинуклеотид, чем в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/мишени полинуклеотид. Альтернативно, краситель может иметь меньшую скорость изменения оптической характеристики в присутствии гибрида аналог нуклеиновой кислоты/мишени полинуклеотид, чем в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/мишени полинуклеотид.

Скорость изменения оптической характеристики красителя может быть определена измерением оптической характеристики красителя. Примеры таких оптических характеристик включают в себя спектральную поглощающую способность, флуоресценцию, отражательную способность или хемилюминесценцию. Оптическая характеристика может определяться за один или за несколько раз.

В другом аспекте оптическую характеристику красителя измеряют множество раз. В следующем аспекте оптическая характеристика измеряется однократно.

В дальнейшем аспекте изобретение направлено на способ обнаружения организма в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество организма в образце.

В следующем аспекте изобретение направлено на способ обнаружения класса организмов в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество класса организмов.

В ещё одном аспекте изобретение направлено на способ обнаружения штамма организма в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество штамма.

В следующем аспекте изобретение направлено на способ обнаружения генетически модифицированного организма (GMO) в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество генетически модифицированного организма.

Настоящее изобретение также направлено на способ обнаружения наличия болезненного состояния у субъекта посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на болезненное состояние.

Настоящее изобретение также направлено на способ обнаружения наличия генетической вариации у субъекта посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на генетическую вариацию.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на обнаружение заражения хозяина патогеном посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида, причём мишенивая нуклеиновая кислота является рибонуклеиновой кислотой (RNA) и присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на заражение хозяина патогеном.

В другом аспекте изобретение направлено на способ обнаружения сингулярного нуклеотидного полиморфизма (SNP) в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество SNP.

В другом аспекте изобретение направлено на способ обнаружения генетической последовательно-

сти в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество генетической последовательности.

В другом аспекте изобретение направлено на способ обнаружения амплифицированной *in vitro* последовательности в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество амплифицированной *in vitro* последовательности.

В другом аспекте изобретение направлено на способ обнаружения изменений пар оснований в образце посредством обнаружения присутствия или количества мишеневого полинуклеотида в этом образце, причём присутствие или количество мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество изменений пар оснований.

Данное изобретение также направлено на способ обнаружения мишеневого полинуклеотида в двух или более образцах посредством обнаружения мишеневого полинуклеотида в первом образце в первом сайте мультисайтной конструкции с помощью первой молекулы аналога нуклеиновой кислоты и обнаружения мишеневого полинуклеотида во втором образце во втором сайте мультисайтной конструкции с помощью второй молекулы аналога нуклеиновой кислоты. В одном варианте молекулы аналога нуклеиновой кислоты иммобилизованы на твёрдом субстрате. Способ включает в себя обнаружение двух или более последовательностей мишеневого полинуклеотида в двух или более образцах. Альтернативно, образцы могут быть иммобилизованы на твёрдом субстрате.

Настоящее изобретение также направлено на наборы для обнаружения мишеневого полинуклеотида. Набор может включать в себя один или более образцов, которые включают в себя мишеневый полинуклеотид, один или более аналогов нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, частично комплементарных мишеневой последовательности нуклеиновой кислоты мишеневого полинуклеотида, и один или несколько красителей. Опционально, набор может включать в себя источник стимула. Набор может включать в себя инструкции по его использованию.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображена схематическая версия системы анализа с использованием PNA.

На фиг. 2 показано структурное различие между молекулой ДНК и молекулой PNA образца.

На фиг. 3 схематически представлена активируемая светом основанная на PNA система анализа.

На фиг. 4 показана активируемая светом анализируемая реакция.

Фиг. 5 изображает временной ход эмиссии 3',3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидного красителя после экспозиции PNA и световому стимулу для различных концентраций мишеневого полинуклеотида.

Фиг. 6 показывает процентное изменение эмиссии 3',3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидного красителя для различных концентраций ДНК.

На фиг. 7 сравнивается процентное изменение эмиссии 3',3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидного красителя в тестируемом образце, когда для стимуляции использовались световые стимулы с различной длиной волны.

На фиг. 8 сравнивается процентное изменение эмиссии красителя в образце ДНК из GMO сои и ДНК из не-GMO сои.

На фиг. 9 изображена чувствительность анализа при изменении концентрации тестируемой ДНК с использованием источника света со смешанными длинами волн. Каждая линия показывает процентное изменение эмиссии красителя после экспозиции световому стимулу при различных концентрациях ДНК. В качестве PNA использовалась последовательность N' CACTGCTGCCTCCCCGTAG-Lys (SEQ ID NO: 1). Полинуклеотидной последовательностью являлась 5' CTACGGGAGGCAGCAGTG 3' (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 10 показано время, за которое наступает 20%-ное изменение эмиссии 3',3'-диэтилтиакарбоцианин йодида при различных концентрациях мишеневого полинуклеотида.

Фиг. 11 показывает процентное изменение эмиссии красителя в образце ДНК и образцах с различными концентрациями РНК.

На фиг. 12 сравнивается процентное изменение эмиссии для 3',3'-диэтилтиакарбоцианин йодида в образце, содержащем PNA, и ДНК либо в отсутствие загрязнений в приготавливаемой среде, либо в присутствии загрязнений в приготавливаемой среде.

Фиг. 13 показывает дополнение PNA «клинья».

На фиг. 14A-D сравнивается эмиссия после применения волн различной длины для серий образцов.

Фиг. 15 изображает иммобилизованные реакции во времени с помощью универсального бактериального PNA-зонда.

На фиг. 16 показано обнаружение SRY человека.

На фиг. 17 схематически представлено обнаружение аналогов нуклеиновой кислоты с использованием иммобилизации на поверхности и активирования светом.

На фиг. 18A-D изображены различные схемы интродуцирования гибридов полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты.

На фиг. 19 показано действие светового стимула с различными длинами волн.

На фиг. 20 показано обнаружение различных концентраций ДНК сои.

На фиг. 21 показано процентное изменение оптической характеристики от числа геномов ГМО-положительной сои.

На фиг. 22 показано действие различных концентраций Tween-20.

На фиг. 23 показано процентное изменение эмиссии при различных концентрациях Tween-20.

На фиг. 24 сравниваются реакция с использованием PNA-зондов и реакция с использованием LNA-зондов в жидком формате с различными концентрациями Tween-20.

На фиг. 25 показано процентное изменение эмиссии с использованием PNAs в зависимости от эмиссии с использованием LNAs.

На фиг. 26 показано обнаружение вируса гепатита С при использовании различных количеств вирусной РНК.

Фиг. 27 показывает эмиссию различных копий плазмы через 1 мин после экспозиции световому стимулу.

На фиг. 28 показано процентное изменение эмиссии при использовании бактерий и аналогов нуклеиновой кислоты, которые являются специфичными либо к бактериям, либо к HCV.

На фиг. 29 показано процентное изменение эмиссии при использовании коротких аналогов нуклеиновой кислоты или соединённых вместе коротких аналогов нуклеиновой кислоты.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает способы, композиции и системы анализа для обнаружения полинуклеотида, имеющего мишеневую последовательность нуклеиновой кислоты, с помощью аналогов нуклеиновой кислоты.

I. Общие методы.

При реализации настоящего изобретения используются, если не указано иначе, традиционные методы молекулярной биологии (в том числе рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии, иммунологии, кинетики протеинов и масс-спектроскопии, которые хорошо знакомы специалистам. Такие методы во всей полноте описаны в литературных источниках, таких как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition (Sambrook et. al., 2000) Cold Spring Harbor Press; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook et. al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellus, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987 including supplements through May 1, 2004); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); и *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999), которые все включены здесь полностью посредством ссылки. Кроме того, процедуры, в которых используются коммерчески доступные наборы для анализа и реагенты, как правило, осуществляются в соответствии с протоколами, предписанными производителями, если не оговорено иначе.

II. Определения.

Термин «мишеневая последовательность нуклеиновой кислоты», как правило, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, обнаруживаемой с использованием способов, композиций и систем анализа согласно изобретению. Вся или часть этой мишеневой последовательности нуклеиновой кислоты может связываться с молекулой аналога нуклеиновой кислоты посредством аналогов специфичной гибридизации последовательности. Мишеневая последовательность нуклеиновой кислоты может иметь любую длину, но, как правило, она имеет длину менее 1 тыс. оснований, менее 500 оснований, менее 24 оснований или менее 12 оснований. В следующем варианте осуществления мишеневая последовательность нуклеиновой кислоты может быть длиной 10, 12, 14 или 18 оснований. В другом варианте осуществления мишеневая последовательность нуклеиновой кислоты может быть длиной по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 18, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 оснований. Мишеневая последовательность нуклеиновой кислоты согласно изобретению может включать в себя последовательность, кодирующую протеин, и (или) не кодирующую последовательность (например, регуляторные последовательности, интроны и т.д.).

Термин «полинуклеотид» относится к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидам, либо к рибонуклеотидам, либо к их аналогам. Следующие примеры являются неограничивающими примерами полинуклеотидов: ген или фрагмент гена, экзоны, интроны, мессенджерная РНК (mRNA), транспортная РНК, рибосомная РНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвлённые полинуклеотиды, плазмиды, векторы, нуклеиновые кислоты-зонды, праймеры и амплифицированная ДНК. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как мети-

лированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид также может быть модифицирован до или после полимеризации, например путём конъюгации с меченым компонентом. Полинуклеотид может представлять собой амплифицированную область в более длинном полинуклеотиде.

Термин «мишеневый полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, который включает в себя мишеневую последовательность нуклеиновой кислоты.

Термин «аналог нуклеиновой кислоты» включает в себя любой аналог нуклеиновой кислоты, имеющий одно или более оснований, которые отличны от гуанина, тимидина, аденозина, цитозина или урацила, и (или) имеющий одно или более отличий в фосфорибозе скелета РНК или фосфодезоксирибозе скелета ДНК. «Аналоги нуклеиновой кислоты» включают в себя - но не ограничиваются ими - пептидные нуклеиновые кислоты (PNAs), замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA), такие как раскрытые в *Trends in Biotechnology* 21:74-81, 2003, сцепленные с металлом нуклеиновые кислоты, модифицированные полинуклеотиды, такие как антрахинон-модифицированные (как раскрывается у Yamana et al., 2003), треозовые нуклеиновые кислоты (TNAs), такие как раскрытые у Chaput et al., *Journal of the American Chemical Society*, 125, 856-857, (2003), и химерные нуклеиновые кислоты.

Термин «пептидная нуклеиновая кислота», или «PNA», включает в себя любой аналог нуклеиновой кислоты, у которого дезоксирибозо-фосфатный скелет нуклеиновой кислоты замещён синтетическим пептидоподобным скелетом, включающим в себя, например, блоки *n*-(2-аминоэтил)глицина, такие, без ограничений, как показанный на фиг. 2 (Nielsen et al., 1991), и такие, как раскрытые в патентах США № 5786461; 6357163; 6107470; 5773571; 6441130; 6451968; 6228982; 5641625; 5766855; 5736336; 5719262; 5714331; 5719262 и 6414112. Пуриновые и пиримидиновые основания могут быть присоединены любой ковалентной связью, включая, например, метилен-карбонильные связи. В используемом здесь значении молекулы PNA могут иметь дополнительные атомы между PNA-скелетом и нуклеотидным основанием. Эти аналоги включают в себя, например, цепочки D-лизина, циклические структуры, такие как циклопентановые или пирролидиновые кольца, и (или) хиральные заместители, включая PNA-молекулы, описанные в патенте США № 6403763, в патентной заявке США 2003/0162699 и в патентной заявке США 2003/0157500. Скелет PNAs может включать в себя замещения или вставки в пептидном скелете. PNAs могут включать в себя основанные на пептиде мимики (PENAMS), такие как раскрытые, например, в патенте США № 5705333, атомы, имеющие необычные хиральные центры, такие как D-хиральные центры и квазихиральные центры, и замещения атомов в скелете PNA.

Термины «гибрид аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид» и «гибрид полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты» являются синонимами и относятся к аналогу нуклеиновой кислоты и полинуклеотиду, специфическим образом гибридинизованных в последовательность.

Термины «гибрид PNA/полинуклеотид» и «гибрид полинуклеотид/PNA» являются синонимами и относятся к PNA и полинуклеотиду, специфическим образом гибридинизованных в последовательность.

«Комплементарная» означает, что одонитевая молекула аналога нуклеиновой кислоты имеет способность связываться с полинуклеотидами специфическим образом основаниями. Молекула аналога нуклеиновой кислоты может быть синтезированной, чтобы связываться с мишеневым полинуклеотидом, таким как полинуклеотидная нить полной длины или её часть. Молекула аналога нуклеиновой кислоты, которая является «комплементарной», может иметь одну или несколько единичных ошибочных для спаривания пар оснований, вставок и (или) делеций, но всё ещё оставаться способной связываться с мишеневым полинуклеотидом при выбранных условиях гибридинизации. В одном варианте осуществления комплементарные последовательности могут гибридинизоваться посредством Уотсон-Криковского (Watson-Crick) взаимодействия (A-T или A-U и C-G). В следующем варианте осуществления комплементарные последовательности могут гибридинизоваться посредством Hoogsteen-спаривания оснований аналога нуклеиновой кислоты и нуклеотидными основаниями полинуклеотида.

Под «строгой комплементарностью» подразумевается, что одонитевая молекула аналога нуклеиновой кислоты имеет способность связываться с мишеневой последовательностью нуклеиновой кислоты и не содержит ошибочных для спаривания оснований. Молекула аналога нуклеиновой кислоты не является полностью комплементарной мишеневому полинуклеотиду, если будет иметься единственное несовпадение в спариваемых парах оснований между аналогом нуклеиновой кислоты и мишеневым полинуклеотидом.

Термин «скорость» относится к изменению (например, свойства композиции или соединения). Скорость может быть описана в терминах определённой размерности скорости. Скорость может быть определена проведением изменений в течение периода времени. Скорость может быть описана проведением измерений, определяемых в двух временных точках процесса (например, до и после определённого стимула, добавления компонента и т.д.), или проведением измерений по меньшей мере в трёх, по меньшей мере в четырёх или по меньшей мере в пяти временных точках. Скорость может быть выражена количественными или качественными оценками (например, изменение является «быстрым» или «медленным»). Скорость может быть определена путём сравнения характеристики или состава с эталонной скоростью или посредством других методов.

В используемом здесь значении термин «относительная скорость» относится к скорости одного

процесса по сравнению со скоростью другого процесса. «Относительная скорость» может быть приближительной (например, скорость одного процесса может быть «быстрее» или «медленнее», чем скорость другого процесса) или качественной (например, сравнивая измеренные скорости двух процессов).

В используемом здесь значении термин «краситель» относится к соединению, которое имеет измеряемую оптическую характеристику или которое может быть превращено в соединение с измеряемой оптической характеристикой. Измеряемые оптические характеристики включают в себя - но не ограничиваются ими - цвет, спектр поглощения, флуоресценцию, отражательную способность и хемилюминесценцию. Краситель может обнаруживать оптическое свойство в определённых условиях, таких как связывание с гибридом полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты или отсутствие связывания с гибридом полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты.

«Защищённая РНК» («Armored RNA™») относится к РНК, которая является устойчивой к рибонуклеазе благодаря капсидированию РНК в протеины бактериофагов. «Защищённая РНК» также описана, например, в патентах США № 6399307; 6214982; 5939262; 5919625 и 5677124.

«Неспецифический полинуклеотид-переносчик» в используемом здесь значении относится к немишеневым полинуклеотидным молекулам, которые увеличивают сродство к связыванию аналогов нуклеиновой кислоты с определёнными мишеневыми полинуклеотидами и (или) усиливают чувствительность системы анализа.

В используемом здесь значении термин «сайт связывания аналога нуклеиновой кислоты» относится к точке присоединения одной или более молекул аналога нуклеиновой кислоты к твёрдому субстрату.

В используемом здесь значении термин «сайт связывания PNA» относится к точке присоединения одной или более PNA молекул к твёрдому субстрату.

«Образец» относится к образцу жидкости любого типа (например, к крови, сыворотке, воде или моче) и (или) к твёрдому образцу любого типа (например, к клеткам, пищевому продукту, льду, воздуху, грунту или зерну) и (или) образцу воздушной взвеси любого типа.

Термин «субъект» относится к животному, такому как позвоночное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно человек. Термин «субъект» также относится к растению.

Термин «патоген» относится к любому агенту, вызывающему болезнь, нарушение и (или) к любому патологическому условию и (или) симптомам. К примеру, патоген может представлять собой организм (или ассоциированный с ним токсин), находящийся в природе или создаваемый в лаборатории, который вызывает болезнь в каком-либо другом организме или развитие патологического условия или симптома в нём или понижает его жизнеспособность, ослабляет и (или) умерщвляет его. Патогены включают в себя - без ограничения ими - вирусы, бактерии, грибки, эукариоты и (или) прокариоты, а также средства биологической борьбы, инфекционные болезни, находящиеся в воде патогены и пищевые патогены.

Термин «средство биологической борьбы» относится к любому организму (или ассоциированному с ним токсину), находящемуся в природе или создаваемому в лаборатории, главная цель использования которого состоит в том, чтобы вызвать болезнь в каком-либо другом живом организме, понизить его жизнеспособность или умертвить его. Примеры средств биологической борьбы включают в себя - но не ограничиваются ими - патогенные бактерии, грибки, простозоа, риккетсии и вирусы.

В используемом здесь значении термин «заражение» относится к присутствию патогена в хозяине. Заражение может быть в скрытой или острой форме. В одном варианте осуществления на присутствие патогена указывает изменение в экспрессии полинуклеотида и (или) полипептида в хозяине. Заражение может возникать такими путями - но не ограничиваясь ими - как воздушно-капельный, прямой контакт, перенос животными или насекомыми и заражённый пищевой продукт или напиток.

В используемом здесь значении термин «полинуклеотид, являющийся ответом хозяина» относится к полинуклеотиду, который изменён, или к полинуклеотиду, экспрессия которого в хозяине изменяется в ответ на стимул, такой как инфекция и (или) контакт с патогеном.

Термин «хозяин» в используемом здесь значении относится к животным и растениям. Животное может быть млекопитающим. Примеры млекопитающих включают людей, приматов, не являющихся людьми, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, мышей и крыс.

Примеры растений включают в себя - но не ограничиваются ими - сельскохозяйственные культуры.

III. Способы обнаружения полинуклеотидов.

Настоящее изобретение обеспечивает способы, композиции и системы анализа для обнаружения полинуклеотида, содержащего мишеневую последовательность нуклеиновой кислоты, с помощью аналогов нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления (i) образец, предположительно содержащий или предположительно не содержащий мишеневый полинуклеотид, (ii) аналог нуклеиновой кислоты, который связывается с мишеневой последовательностью нуклеиновой кислоты этого полинуклеотида в последовательность специфичным образом, и (iii) краситель, у которого скорость изменения оптической характеристики различна в присутствии и в отсутствие гибрида полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты, объединяются для получения смеси. Смесь может далее включать в себя неспецифический полинуклеотид-переносчик, такой как - но без ограничения - неспецифическая растительная ДНК, дрожжевая ДНК, ДНК спермы лосося или тРНК. Скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси сравнивается с эталонным значением скорости изменения оптической характеристики красителя в

подобной смеси, содержащей известное количество (включая нулевое количество) гибрида полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты, чтобы определить относительную скорость изменения оптической характеристики. Относительную скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси коррелируют с присутствием или количеством мишеневого полинуклеотида в образце, чтобы определить присутствие или количество мишеневого полинуклеотида в образце.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы, композиции и системы анализа для обнаружения полинуклеотида, содержащего мишеневую последовательность нуклеиновой кислоты, с помощью молекулы пептидной нуклеиновой кислоты (PNA). В одном варианте осуществления (i) образец, предположительно содержащий или предположительно не содержащий мишеневый полинуклеотид, (ii) пептидная нуклеиновая кислота (PNA), которая связывается с мишеневой последовательностью нуклеиновой кислоты этого полинуклеотида в последовательность специфичным образом, и (iii) краситель, у которого скорость изменения оптической характеристики различна в присутствии и в отсутствие гибрида полинуклеотид/PNA, объединяются для получения смеси. Смесь может далее включать в себя неспецифичный полинуклеотид-переносчик, такой как - но не ограничиваясь им - неспецифичная растительная ДНК, дрожжевая ДНК, ДНК спермы лосося или тРНК. Скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси сравнивается с эталонным значением скорости изменения оптической характеристики красителя в подобной смеси, содержащей известное количество (включая нулевое количество) гибрида полинуклеотид/PNA, чтобы определить относительную скорость изменения оптической характеристики. Относительную скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси коррелируют с присутствием или количеством определённого полинуклеотида в образце, чтобы определить присутствие или количество мишеневого полинуклеотида в образце.

Эталонное значение может представлять собой значение характеристики композиции или соединения, которое известно. Например, в различных выполнениях эталонное значение может быть определено, используя смесь, которая не содержит гибрида полинуклеотид/нуклеиновая кислота; содержит определённое количество (например, известное количество) гибрида полинуклеотид/нуклеиновая кислота; содержит нулевое количество гибрида полинуклеотид/нуклеиновая кислота; или реакционную смесь, в которой отсутствуют один или более компонентов (например, аналог нуклеиновой кислоты, мишеневый полинуклеотид или краситель). Следующие неограничивающие примеры эталонного значения включают в себя значение оптической характеристики смеси, которая не подвергалась световому стимулу или, в альтернативном выполнении, оптической характеристики смеси, которая подвергалась световому стимулу. Вышеупомянутые примеры приведены для иллюстрации и не направлены на ограничение изобретения, и другие примеры будут очевидными для специалиста-практика, руководствующегося приведённым здесь раскрытием. Должно быть понятным, что эталонное значение может быть, но необязательно должно быть, определено эмпирически (например, если известно, что оптические характеристики композиции, содержащей краситель, не изменяются или изменяются минимально в отсутствие гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты, эталонное значение может быть вычислено или логически выведено, а не измерено). Эталонное значение может быть константой. Хотя в некоторых случаях может оказаться удобным подвергать анализу «контрольный» образец параллельно с тестируемыми образцами, делать так необязательно. Эталонное значение может быть определено в одной временной точке, это значение записывается для сравнения со значениями в более поздних временных точках. Будет понятно, что вышеупомянутые примеры даны для иллюстрации, но не для ограничения изобретения. Множество эталонных значений приводится по всему дальнейшему описанию изобретения.

В одном аспекте эталонное значение представляет собой скорость изменения оптической характеристики красителя в подобной смеси, не содержащей гибрида полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления эталонное значение может быть охарактеризовано оптической характеристикой красителя до объединения всех компонентов в смесь. В другом варианте осуществления эталонное значение может быть стандартным значением. Для вариантов осуществления, в которых смесь подвергается световому стимулу, эталонное значение может являться оптической характеристикой красителя до применения светового стимула. Будет совершенно понятным, что эталонное значение необязательно определять одновременно с оптической характеристикой красителя в образце, аналоге нуклеиновой кислоты и окрашенной смеси. Кроме того, понятно, что эталонное значение может являться константой.

Ссылка на характерный пример поможет в понимании изобретения. Основанная на жидкости версия этого способа с использованием PNA иллюстрируется в примере 1 и на фиг. 4. 10 мкМ молекул PNA, комплементарной 35S промотору вируса мозаики цветной капусты (35S PNA), и 1 мкМ 35S ДНК промотора (35S ДНК) смешивались в трубчатой микроцентрифуге и добавлялось 150 мкМ красителя. Трубка подвергалась световому стимулу, и по истечении 1 мин наблюдалось изменение цвета (фиг. 4) - изменение оптической характеристики красителя. В контрольных трубках мишеневый полинуклеотид отсутствовал, и цвет оставался розовым даже спустя 24 ч (без светового стимула), указывая на очень медленную скорость изменения оптической характеристики. В трубках, где либо отсутствует 35S PNA (трубка 3), либо отсутствует специфическая мишень (трубка 1), наблюдается небольшое изменение характеристики (в данном случае изменение цвета).

Следующий пример, с использованием PNA-зонда, иллюстрируется на фиг. 1. А) Мембранную полосу с дискретно нанесёнными PNA-последовательностями, комплементарными одной или более последовательностям мишеневого полинуклеотида, помещают в лизис/гибридизационную трубку 1. В) К лизис/гибридизационному буферу добавляют образец, и смесь нагревают до 95°C в течение 3 мин, и С) охлаждают до комнатной температуры. D) Полоску помещают в свежую трубку (трубка 2), в которой содержится промывочный буфер для инкубации. Несвязавшиеся ДНК, РНК и другой клеточный дебрис удаляются. Е) Полоска помещается в свежую трубку (трубка 3), содержащую обнаруживаемый краситель, где она инкубируется примерно в течение 1 мин. F) Содержимое трубки быстро промывается в буфере для промывки (трубка 4) для удаления остатка несвязавшегося красителя. G) В этой мембранной системе только краситель связывается с комплексами PNA/мишеневый полинуклеотид. На основании рисунка гибридизации можно определить присутствие конкретных мишеневых полинуклеотидов. Сравнивая изображения известных рисунков можно определить присутствие и идентифицировать вещество.

Следующий пример иллюстрируется фиг. 22. 10 мкМ молекул PNA, комплементарной мишеневой последовательности нуклеиновой кислоты, и 1 мкМ мишеневого полинуклеотида смешивались в трубчатой микроцентрифуге. Затем добавлялось 2 мкМ красителя и различные количества Tween-20. Трубки подвергались воздействию светового стимула, и через 10 мин наблюдалось изменение оптических характеристик (фиг. 22). Когда добавлялось более 1,0% Tween-20, наблюдалось небольшое изменение оптической характеристики для образцов, содержащих краситель и не содержащих гибрида мишеневый полинуклеотид/нуклеиновая кислота. Когда воздействию светового стимула подвергался образец, содержащий гибрид мишеневый полинуклеотид/нуклеиновая кислота, изменялась флюоресценция (или другая оптическая характеристика) красителя. Присутствие или количество мишеневого полинуклеотида обнаруживается наблюдением за изменением флюоресценции (или другой оптической характеристики). Будет понятно, что присутствие или количество полинуклеотида может быть определено посредством единичного измерения.

В следующем варианте осуществления множество последовательностей аналога нуклеиновой кислоты может быть объединено в смесь для обнаружения множества мишеневых полинуклеотидов посредством одновременного множественного измерения. Описание мультиплексных реакций, включающих известные системы анализа нуклеиновых кислот, можно найти, например, в патенте США № 5582989.

Безотносительно к какому-либо конкретному механизму или теории, в одном аспекте изобретения гибрид аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид может катализировать химическую реакцию, в которую вовлечен краситель. Краситель связывается с малым желобком гибридов аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид, который действует как каталитический сайт. Применение светового стимула добавляет энергию в смесь и вызывает изменение оптической характеристики красителя у гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид с большей скоростью, чем в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. Например, 3',3'-диэтилтиакарбоцианин йодид становится светлым при применении светового стимула. Более высокая скорость изменения оптической характеристики красителя соответствует повышенному содержанию мишеневого полинуклеотида в образце.

В последующих разделах аспекты изобретения раскрываются более подробно.

А. Конструирование последовательностей аналога нуклеиновой кислоты.

Для использования согласно настоящему изобретению аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, чтобы быть комплементарными или строго комплементарными к последовательности нуклеиновой кислоты в мишеневом полинуклеотиде. В одном варианте осуществления аналог нуклеиновой кислоты имеет более примерно 4 нуклеотидов в длину, но менее примерно 24 оснований нуклеиновой кислоты в длину, исключая линкеры, аминокислоты и метки. В других вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты может иметь длину 5-100, 8-60 или 10-25 оснований нуклеиновой кислоты. В следующем варианте осуществления аналог нуклеиновой кислоты может быть длиной примерно 8, 10, 12, 14 или 18 оснований нуклеиновой кислоты, исключая линкеры, аминокислоты и метки. В другом варианте осуществления аналог нуклеиновой кислоты может быть длиной по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 18, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 50 оснований. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь часть, которая не является комплементарной мишеневому полинуклеотиду, такую как последовательность, которая «сшивается» от конца полинуклеотида.

Последовательность молекул аналога нуклеиновой кислоты может быть сконструирована множеством способов. К примеру - но не ограничиваясь им - молекулы аналога нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что они будут иметь последовательности, основанные на известных праймерах, используемых для PCR-амплификации и обнаружения специфических мишеневых последовательностей. Молекула аналога нуклеиновой кислоты также может быть сконструирована таким образом, что она будет комплементарной или строго комплементарной любой мишеневой последовательно-

сти нуклеиновой кислоты полинуклеотида. К примеру, последовательность молекулы аналога нуклеиновой кислоты может быть основана на последовательности PCR-праймеров, используемых для обнаружения полинуклеотидов, ассоциированных с патогенами, присутствия патогена в хозяине, гена болезни или генетического условия. Молекула аналога нуклеиновой кислоты также может быть комплементарной или строго комплементарной всей или части последовательности, кодирующей активные или функциональные домены протеина или интактного протеина, и (или) некодирующей последовательности (например, регуляторным последовательностям, интронам и т.д.).

В одном варианте осуществления аналог нуклеиновой кислоты могут быть использованы для различения полинуклеотидов, имеющих строго комплементарную последовательность, и полинуклеотидов с единичным некомплементарным основанием. К примеру - но не ограничиваясь им - аналог нуклеиновой кислоты для использования в данном изобретении могут быть сконструированы для обнаружения сингулярного нуклеотидного полиморфизма (SNPs). На гибридизацию аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид оказывает влияние некомплементарность оснований. В соответствии со способами по настоящему изобретению, при добавленном красителе некомплементарность одного основания между мишенивой последовательностью (например, SNP) и аналогом нуклеиновой кислоты приводит к различной скорости изменения оптической характеристики красителя по сравнению с аналогом нуклеиновой кислоты, в котором не имеется некомплементарностей. Идентификация SNPs для диагностики и других применений хорошо известна из уровня техники.

В другом варианте осуществления аналог нуклеиновой кислоты может быть сконструирован для обнаружения присутствия или количества классов организмов. Под классом организмов подразумевается, что все организмы имеют одну или более последовательностей, которые комплементарны или строго комплементарны к последовательности аналога нуклеиновой кислоты. Такие классы организмов могут быть отличены от других организмов на основании комплементарности последовательностей нуклеиновых кислот.

В другом варианте осуществления молекула аналога нуклеиновой кислоты имеет содержание пуринов, меньшее чем примерно 60%, и имеет максимум 4 пуриновых основания или три гуаниновых основания подряд. Обогащенные пуриновыми основаниями молекулы аналога нуклеиновой кислоты имеют тенденцию образовывать агрегаты и имеют низкую растворимость в водных растворах. Молекулы аналога нуклеиновой кислоты отбираются таким образом, чтобы минимизировать или избежать самокомплементарных последовательностей с инвертированными повторами, шпильками и палиндромами, так как эти типы зондов предрасположены к образованию агрегатов.

Молекулы аналога нуклеиновой кислоты могут гибридизоваться с полинуклеотидами в любой ориентации, но антипараллельная ориентация является предпочтительной. Антипараллельная ориентация является предпочтительной конфигурацией в бессмысленных применениях и применениях типа ДНК-зондов. Когда ориентация аналога нуклеиновой кислоты является антипараллельной, зонд N-терминального конца аналога нуклеиновой кислоты эквивалентен 5'-концу ДНК. В настоящем изобретении используются как N', так и 5' варианты.

Любой специалист в данной области техники, руководствуясь приведённым здесь раскрытием, признает, что кроме конкретно перечисленных здесь аналогов нуклеиновой кислоты в способах согласно изобретению могут использоваться другие аналоги нуклеиновой кислоты (в том числе аналоги нуклеиновой кислоты, открытые или разработанные в будущем). Аналоги нуклеиновой кислоты, которые образуют гибрид полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты при определённых, описанных здесь условиях анализа, пригодны для применения в настоящих способах и влияют на скорость изменения оптической характеристики.

Аналоги нуклеиновой кислоты, пригодные для применения в данных способах, могут быть идентифицированы при использовании любого из многих методов скрининга. В одном методе, к примеру - но не ограничиваясь им - образец, содержащий тестируемый аналог нуклеиновой кислоты, выборочно при различных концентрациях объединяется с полинуклеотидом, имеющим комплементарную последовательность, при условиях, в которых образуется гибрид аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. В одном варианте осуществления затем добавляют краситель. После этого определяют скорость изменения оптической характеристики красителя. Эту величину сравнивают с эталонным значением скорости изменения оптической характеристики красителя в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. В другом варианте осуществления эталонное значение является признаком отсутствия полинуклеотида. В ещё одном варианте осуществления эталонное значение является признаком присутствия мишеневого полинуклеотида (однонитевого или двунитевого). Следует признать, что порядок введения добавок не является категорическим, и компоненты могут добавляться в другом порядке.

В другом варианте осуществления эталонное значение является показателем ненулевой концентрации полинуклеотида. В этом выполнении для использования в заявленных способах отбираются гибриды аналоги нуклеиновой кислоты/полинуклеотид, проявляющие различную скорость изменения оптической характеристики во времени по сравнению с эталонным значением (например, присутствие двунитевого полинуклеотида, но отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид). Относительную скорость изменения оптической характеристики коррелируют с присутствием или количеством опреде-

лётного полинуклеотида.

В. Пептидные нуклеиновые кислоты (PNAs).

В одном аспекте аналогами нуклеиновой кислоты являются PNAs. PNA гибридизуется со всей или с частью мишени последовательности нуклеиновой кислоты в мишеневом полинуклеотиде путём специфичной последовательной гибридизации. Альтернативно, условия можно изменить таким образом, что можно выявить изменение в одной паре оснований.

PNA-молекулы могут быстро гибридизоваться с мишеневыми полинуклеотидами. Гибридизация PNA с полинуклеотидами является независимой от концентрации солей (Demidov et al., 1994). PNAs устойчивы к нуклеазной и протеазной атаке и связываются с полинуклеотидами более специфично, чем обычные ДНК-зонды. Короткие зонды можно использовать с большими последовательностями специфически (Ray and Norden, 2000). Кроме того, гибриды PNA/полинуклеотид имеют более высокую термальную стабильность, чем соответствующие гибриды ДНК/полинуклеотид, и точка плавления гибридов PNA/полинуклеотид относительно нечувствительна к ионной силе, показывая равную термальную стабильность при низких (<10 mM NaCl) и умеренных (500 mM NaCl) солевых концентрациях. Эта способность гибридов PNA/полинуклеотид образовываться при низких солевых концентрациях является существенной, поскольку внутренняя структура dsPHK и gPHK в значительной мере нестабильна при солевых концентрациях ниже 200 mM. Следовательно, можно выбирать условия, благоприятные для разрыва мишени нуклеиновой кислоты и, в то же время, способствующие сильной гибридизации PNA-молекул (Stefano and Hyldig-Nielsen, 1997). На PNA/полинуклеотид-гибридизацию очень сильно влияет некомплементарность оснований, и PNA-молекулы могут поддерживать различимость вплоть до уровня единичной некомплементарности.

PNA-молекулы можно приобрести, например, у Eurogentec (UK), Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA) и Applied Biosystems Inc. (ABI) или синтезировать методами, известными в данной области техники.

С. Условия гибридизации.

Обычно, метод и (или) выбор условий гибридизации регулируется параметрами, такими - без ограничения - как степень комплементарности молекулы аналога нуклеиновой кислоты мишеневому полинуклеотиду, длина используемой молекулы аналога нуклеиновой кислоты и самого мишени полинуклеотида. Предпочтительные условия гибридизации дают одну или более из следующих возможностей: эффективное связывание аналогов нуклеиновой кислоты с мишеневыми полинуклеотидами, минимизация вторичной структуры РНК или ДНК, минимизация деградации РНК и либо ограничение одного или более изменений пар оснований, либо включение одного или более изменений пар оснований.

Реакции гибридизации могут быть осуществлены при условиях различной «строгости». Условия, которые влияют на строгость реакции гибридизации, широко известны и опубликованы в уровне техники. См., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition (Sambrook et al., 2000) Cold Spring Harbor Press. Примеры соответствующих условий включают в себя - но не ограничены ими - солевые концентрации, pH (буферы) и температура. Гибридизационные условия с использованием более низких солевых концентраций обычно увеличивают нестабильность ДНК и стабильность гибрида PNA/полинуклеотид. Примеры буферов, которые могут быть использованы, включают в себя - но не ограничены ими - Na_3PO_4 , NaHSO_4 , K_2HPO_4 , K_2SO_4 или CaSO_4 . К примеру, молярность буферов может изменяться между примерно 10 mM и примерно 0,5 M, и они могут иметь pH между примерно 4 и примерно 10 или между примерно 7 и примерно 10, такой как примерно 7,0 или примерно 7,5. Например, Na_3PO_4 может использоваться между примерно 0,5 mM и примерно 0,5 M, например 2,5 мкМ, и при pH между примерно 4 до примерно 10 или между примерно 7 и примерно 10, таком как, например, примерно 7,0 или примерно 7,5.

Примеры образцов условий включают в себя - но не ограничиваются ими - (в порядке увеличения строгости): температуры инкубации 25, 37, 50 и 68°C; концентрации буфера 10 X SSC, 6 X SSC, 4 X SSC, 1 X SSC, 0,1 X SSC (где SSC составляет 0,15 M NaCl и мкМ любого буфера, которые здесь описываются) и их эквиваленты, использующие другие буферные системы; концентрации формамида 0, 25, 50 и 75%; время инкубации от 5 мин до 24 ч; 1, 2 или более стадий промывки; время промывочной инкубации 1, 2 или 15 мин; и растворы для промывки 6 X SSC, 1 X SSC, 0,1 X SSC или деионизированная вода. В предпочтительном варианте осуществления гибридизация и условия промывки осуществляются при высокой строгости. Например, гибридизация может быть проведена при 50%-ном формамиде и концентрации буфера 4 X SSC с последующими промывками в растворе 2 X SSC/формамид при 50°C и 1 x SSC.

Буферы могут содержать ионы или другие соединения, или другие буферные компоненты. Альтернативно, компонент в буфере может иметь стабилизационную способность; например, неомисин или другие аминогликозиды, которые стабилизируют триплексную ДНК (Arya et al., 2003) или нафтален диимиды, которые увеличивают стабильность триплекса (Gianolio and McLaughlin, 2001), или нафтилхинолиновые димеры (Keppler et al., 1999).

Д. Красители.

Присутствие или количество полинуклеотида можно определить, используя один или более красителей, у которых скорость изменения оптической характеристики различна в присутствии гибрида ана-

лог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид по сравнению с известной концентрацией гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. В одном аспекте изменение оптической характеристики может представлять собой изменение цвета, спектра поглощения, флуоресценции, отражательной способности или хемилюминесценции. Оптическая характеристика во время анализа может измеряться за один или за множество приёмов.

Скорость изменения оптической характеристики красителя можно сравнить с эталонным значением показателя скорости изменения оптической характеристики красителя в смеси, содержащей известное количество гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид или гибрида полинуклеотид/PNA, чтобы определить относительную скорость изменения оптической характеристики. Эталонное значение может быть качественной или приблизительной величиной (например, наличие или отсутствие цвета). Альтернативно, эталонное значение может быть численной величиной. В другом примере эталонное значение может быть измерено или определено до, во время или после определения скорости изменения оптической характеристики красителя в образце. В следующем примере эталонное значение может быть постоянной, такой как константная скорость. Эталонное значение может также представлять собой скорость изменения оптической характеристики красителя в отсутствие мишеневого полинуклеотида или гибридов полинуклеотид/нуклеиновая кислота (т.е. известное количество гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид равно нулю).

В некоторых случаях краситель имеет более высокую скорость изменения оптической характеристики красителя в присутствии гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид, чем эталонное значение показателя характеристики в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. Присутствие или количество полинуклеотида может, таким образом, быть обнаружено по увеличению относительной скорости изменения оптической характеристики сравнительно с эталонным значением. Примеры красителей, у которых оптическая характеристика изменяется более быстро в присутствии гибрида аналог нуклеиновой кислоты/ДНК, включают в себя карбоцианиновые красители, которые являются полициклическими ароматическими соединениями. Эти красители интенсивно поглощают видимый спектр и связываются предпочтительно с гибридами аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид в растворе, изменяя цвет при связывании. Примеры цианиновых красителей включают в себя - но не ограничиваются ими - 3',3'-диэтилтиацианин йодид, 3',3'-диэтилтиакарбоцианин йодид, 3',3'-диэтилтиадикарбоцианин йодид и 3',3'-диэтилтиатрикарбоцианин йодид.

В одном варианте осуществления при описываемых здесь условиях анализа 3',3'-диэтилтиакарбоцианин йодид изменяет свою окраску от ярко-розовой до бесцветной при световом стимуле в присутствии мишеневых нуклеиновых кислот и комплементарной PNA. В отсутствие мишеневых нуклеиновых кислот скорость изменения цвета красителя более медленная. Световой стимул также уменьшает флуоресцентное свечение красителя в присутствии мишеневых нуклеиновых кислот и комплементарной PNA. В отсутствие светового стимула краситель сразу же изменяет окраску с ярко-розовой на темно-розовую в присутствии мишеневых нуклеиновых кислот, а флуоресцентное свечение сразу же уменьшается в присутствии мишеневых нуклеиновых кислот.

При описываемых здесь условиях анализа 3',3'-диэтилтиадикарбоцианин йодид изменяет свою окраску с голубой на пурпурную в присутствии мишеневых нуклеиновых кислот.

При описываемых здесь условиях анализа 3',3'-диэтилтиатрикарбоцианин йодид сохраняет цвет морской воды в присутствии мишеневых нуклеиновых кислот и становится бесцветным в отсутствие мишеневых нуклеиновых кислот.

В других случаях краситель имеет более низкую скорость изменения оптической характеристики в присутствии гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид, чем в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. Присутствие или количество полинуклеотида может, таким образом, быть обнаружено по уменьшению относительной скорости изменения оптической характеристики сравнительно с эталонным значением показателя величины в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид.

Краситель может быть выбран из, например, молекул, которые соединяются с нуклеиновыми кислотами любым из множества способов. Полезные красители включают в себя такие, которые связываются с малыми желобками, с большими желобками, интеркаляторы и другие полинуклеотид-связывающие молекулы, их производные и конъюгаты с ними. Некоторые красители, полезные в способах согласно настоящему изобретению, связываются с малым желобком гибридов аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. Эти красители включают в себя карбоцианиновые красители, такие как 3',3'-диэтилтиакарбоцианин йодид, 3',3'-диэтилтиадикарбоцианин йодид и 3',3'-диэтилтиатрикарбоцианин йодид. Примеры включают в себя - но не ограничиваются ими - этидий бромид (Fiebig et al., 1999), флуоресцин, фенотиазиновые красители, такие как метиленовый синий (Wagner, 2002), DAPI (Kapuscinski, 1995), тиазоловый оранжевый (Boger and Tse, 2001, Carreon et al., 2004), Hoechst 33258 (Adhikary et al., 2003, Maiti et al., 2003, Morozkin et al., 2003, Tanious et al., 2004, Tawar et al., 2003), SYBR Green II (Morozkin et al., 2003), BEBO, BETO, BOXT, BO, BO-PRO, TO-PRO, YO-PRO (Karlsson et al., 2003, Eriksson et al., 2003), PicoGreen (Tolu and Myers, 2003), TO-PRO-3 (Sovenyazy et al., 2003), бисцианиновый краситель (Schaberle et al., 2003), метил-гринпиронин Y (Prento and Lyon, 2003), этидий бро-

мид и акридиновый оранжевый (Johnson et al., 2003, Lauretti et al., 2003, Luedtke et al., 2003), нейтральный красный (Wang et al., 2003), БО (Karlsson et al., 2003), моно- и бис-лекситропсин и пентамидин (Puckowska et al., 2004), 2-(метилтио)фенилсалицилальдимин Schiff-щелочной медистый (II) (Reddy et al., 2004), бифункциональный платиновый (II) комплекс (Ma and Che, 2003), бис(9-аминоакридин-4-карбоксамиды) (Wakelin et al., 2003), бис-имидазоакридоны (Tarasov et al., 2003), карбоксамид-связывающиеся параллельно или антипараллельно с малыми желобками (Boutorine et al., 2003), конъюгаты олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) со связывающимися с малыми желобками (Novopashina et al., 2003), пирролимидазол полиамины (Briehn et al., 2003, Dervan and Edelson, 2003, Reddy et al., 2003, Renneberg and Dervan, 2003), пиррол (Huang et al., 2000), бис-пиррол (Carrasco et al., 2003), рутениевый комплекс (Kuwabara et al., 2003), таллий (Ouameur et al., 2003), ароматический диамидин (Nguyen et al., 2002), шартрезин (Barcelo et al., 2002), платиновый комплекс (Silverman et al., 2002), S-3-нитро-2-пиридинсульфенил-N-ацетил-цистеин (Shim et al., 2004), эфиры метилсульфоната (Varadarajan et al., 2003), пептидный бис-интеркалятор (Guelev et al., 2001), металлоинтеркаляторы (Proudfoot et al., 2001), 2,2'-бинафтаден (Kondo et al., 2004), интеркалирующие нуклеиновые кислоты (Christensen and Pedersen, 2002, Nielsen et al., 2004), рутениевый (II) комплекс (Liu et al., 2004), комплекс неотриен/медистый (II) циклического полиамина (Biver et al., 2004), антрахинон 2,6-дисульфоновой кислоты (Wong and Gooding, 2003), ферроценил антрацен, ферроценил и другие производные нафтаденимида (Gianolio and McLaughlin, 2001, Takenaka et al., 2002, Tok and Fenker, 2001), доксорубин (Patolsky et al., 2002, Xiao et al., 2003), акридин-9-илтиомочевая кислота (Baurah and Bierbach, 2003), нафтаден димид (Nojima et al., 2001, Nunez et al., 2000), митоксантрон (Wang et al., 2003), криптолепин и неокриптолепин (Guittat et al., 2003), связанные с иминодиуксусной кислотой полиамиды (Woods et al., 2002), дендритовые полиаминовые конъюгаты (Brana et al., 2002), дельта-дельта бис-интеркалятор $[\mu\text{-C}_{49}\text{cpdppz}(2)\text{-(phen)}(4)\text{Ru}(2)]$ (Onfelt et al., 2001, Onfelt et al., 2002), дитеркалийный (Berge et al., 2002), 8-метоксипсорален (Arabzadeh et al., 2002), дауномицин и эллиптицин (Reha et al., 2002), 1,4,5,8-нафтаден тетракарбоксийный диимид (Guelev et al., 2002), криптолепин (Lisgarten et al., 2002), AMAC (Ferry et al., 2001), (-)-6-[[[аминоалкил]окси]метил]-4-деметокси-6,7-дидезоксидауномциноны(1) (Dienes and Vogel, 1996), NLCQ-1 (Papadopoulou et al., 2000), YOYO-1 (Wong et al., 2001), DACA (Hicks et al., 2001), циклометалатный Rh(III) (Kisko and Barton, 2000), CI-958 (Dees et al., 2000), пиразолоакридин (Pelley et al., 2000), цис-дихлороплатиновые (II) комплексы (Perrin et al., 2000), имидазоакридоны (Mazerski and Muchewicz, 2000), карбазол (Sajewicz and Dlugosz, 2000), 5,11-диметил-5H-индол[2,3-b]хинолин (Osiadacz et al., 2000), YOYO-3, нетропсин, SN6999, A3 and SN6113 (Kirschstein et al., 2000), оксазоловый оранжевый (Inoue et al., 1999), 5,6-кризенхинон дииминовые комплексы родия (III) (Jackson and Barton, 2000), синий Nile (Chen et al., 1999), узамбарензин (Dassonneville et al., 1999), 3-метозибензантрон (Yang et al., 1999), 1,8-дигидроксиантрахиноны (Mueller and Stopper, 1999), циклопропапирролоиндол (Dempcy et al., 1999), антрацен (Ostaszewski et al., 1998), пирролизины и имидазолы (Atwell et al., 1998), антрациклиновые комплексы (Milano et al., 1998), гетеродимеры, такие как атизоловый оранжевый - тиазоловый синий, тиазоловый оранжевый - этидий и флуоресцин - этидий (Benson et al., 1993a, Benson et al., 1993b). Кроме того, компании (например, Molecular Probes) многие виды препаратов нуклеиновых кислот, которые могут быть совместимы с данной системой анализа. Другие классы цианиновых красителей и стандартных красителей для реакций можно найти в Journal of the American Chemical Society 125:4132-4145 (2003) и в Bioconjugate Chemistry 13:387-391 (2002). Примеры других красителей включают в себя - но не ограничиваются ими - триадные комплексы меди (II) (Dhar et al., 2003), дистамицин А (Hiraku et al., 2002, Woods et al., 2002), индоло[2,3-b]хинолизин бромид (Viola, 2002), эктейнацидины (Anthoney and Twelves, 2001), металл амины (Bary et al., 2002) или 2-ферилхинолинкарбокиднатные гибриды (Toshima et al., 1999). В некоторых вариантах осуществления краситель не является соединением, вызывающим расщепление.

Красители также могут включать в себя малахитовый зелёный, красный двумышьяковистый и флуоресцин. В некоторых вариантах осуществления красители не являются малахитовым зелёным, красным двумышьяковистым и флуоресцином.

Специалист в данной области техники поймёт, что красители можно скринировать, чтобы идентифицировать те из них, которые могут быть использованы в рассматриваемых способах. Красители, которые связываются с гибридами аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид и обнаруживают изменение оптической характеристики во времени, опционально, после обработки стимулом, можно легко идентифицировать и отобрать.

Специалист в данной области техники, руководствуясь данным раскрытием, признает, что дополнительно к перечисленным здесь красителям в этих способах могут быть использованы другие красители (в том числе красители, открытые или разработанные в будущем). Красители, у которых скорость изменения оптической характеристики различна в присутствии и в отсутствие гибрида мишеневой полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты, при описанных здесь условиях анализа пригодны для рассматриваемых способов.

Подходящие красители могут быть идентифицированы с помощью любого из множества способов скрининга. Например - но не ограничиваясь этим - образец, содержащий аналог нуклеиновой кислоты, объединяют с полинуклеотидом, имеющим комплементарную последовательность, при условиях, в ко-

торых образуется гибрид аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. В одном варианте осуществления затем добавляют заданный краситель, в различных выбранных концентрациях. Порядок добавления компонентов не является категорическим, и они могут добавляться в другом порядке. Затем определяется скорость изменения оптической характеристики во времени. Эту величину сравнивают с эталонной величиной показателя изменения оптической характеристики в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид. В одном варианте осуществления эталонное значение является показателем отсутствия полинуклеотида. В другом варианте осуществления эталонное значение является показателем присутствия полинуклеотида (однонитевого или двунитевого). В другом варианте осуществления эталонное значение является показателем ненулевой концентрации полинуклеотида. Красители, которые обнаруживают разную скорость изменения оптической характеристики во времени по сравнению с эталонным значением, отбираются для использования в заявленных способах. Относительную скорость изменения оптической характеристики коррелируют с присутствием или количеством определённого полинуклеотида.

Е. Световой стимул.

Световой стимул может быть применён к образцу, аналогу нуклеиновой кислоты и окрашенной смеси либо одновременно с изготовлением смеси, либо в определённое время после изготовления смеси. Световой стимул вызывает изменение скорости изменения оптической характеристики красителя.

Световой стимул может относиться к видимой части спектра или к невидимой части спектра. Световой стимул может быть белым светом со множеством волн разной длины. Альтернативно, световой стимул может представлять собой свет определённой длины волны или диапазона длин волн. Световой стимул может также иметь определённую интенсивность.

Источники света известны в уровне техники. Различные источники света приводят к разным скоростям реакций из-за различия в интенсивности или длине волны источника света. Примеры источников света в порядке возрастания скорости реакции включают в себя Sylvania Cool White T-8CW, General Electric T8-C50 и Fritz Auroga 50/50. Другие источники света включают в себя Sylvania dulux S9W CF9DS/blue и Osram F9TT/50K, которые оба ведут к более быстрой стимуляции скоростей реакции, чем General Electric T8-C50.

Специалист в данной области техники поймёт, что оптимальный световой стимул может быть определён без чрезмерного экспериментирования для определённого красителя или для определённого аналога нуклеиновой кислоты, полинуклеотида и окрашенной смеси.

IV. Создание гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты.

Анализы для обнаружения мишеневых полинуклеотидов могут выполняться с использованием множества гибридизационных схем. В одном формате полинуклеотидная последовательность может быть идентифицирована по гибридизации мишеневого полинуклеотида непосредственно с аналогом нуклеиновой кислоты для создания гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты.

В одном формате аналогом нуклеиновой кислоты может быть PNA. PNA/PNA имеет расстояние, которое отличается от расстояний в ДНК/ДНК и от расстояний в PNA/ДНК. Детальная структура дуплексных гибридов PNA/PNA и PNA/ДНК различается с помощью ЯМР и рентгеновской кристаллографии. Дуплексные гибриды PNA/PNA имеют очень широкий и глубокий главный желобок и очень узкий и мелкий малый желобок, и дуплексы имеют очень большой шаг в 18 пар оснований на виток спирали и большую высоту шага (56,6). Каноническая спираль В-формы, видимая для дуплексного гибрида ДНК/ДНК, имеет шаг в 10 пар оснований на виток и высотой 34, в то время как гибридный дуплекс PNA/ДНК имеет шаг в 13 пар оснований на виток и высотой 42. Поскольку пары оснований в дуплексном гибриде PNA/ДНК обладают иной геометрией по сравнению с двойной спиралью ДНК, ожидается, что сила стэкинг-взаимодействия в дуплексных гибридах PNA/ДНК отличается от таковой в дуплексных гибридах ДНК/ДНК. Предполагается, что CD-спектры 10, 12 и 16 мер дуплексных гибридов PNA/ДНК отличаются и конфигурацией своих оснований.

В зависимости от красителя и сайта его связывания на гибриде аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид можно влиять на прохождение реакции. Например, красители, которые связываются с главным или малым желобком гибрида, могут требовать, чтобы гибрид содержал определённое количество пар оснований для эффективного связывания. Минимальное количество пар оснований может быть легко определено специалистом в области техники.

В одном аспекте молекула аналога мишеневой нуклеиновой кислоты комплементарна к частично комплементарному аналогу нуклеиновой кислоты. Аналог нуклеиновой кислоты гибридизуется как с молекулой аналога нуклеиновой кислоты, так и с мишеневым полинуклеотидом, как изображено на фиг. 18А. Это может быть осуществлено в одну стадию или в многостадийном процессе. В одностадийном процессе мишеневый полинуклеотид и аналоги нуклеиновой кислоты объединяются в одном шаге. В многостадийном процессе мишеневый полинуклеотид и аналоги нуклеиновой кислоты объединяются последовательно.

В следующем аспекте присутствие мишеневого полинуклеотида может быть обнаружено созданием разветвлённой крестообразно реакционной структуры, пример которой изображён на фиг. 18В. В этом формате мишеневый полинуклеотид гибридизуется с двумя промежуточными полинуклеотидами, кото-

рые частично комплементарны мишеневому полинуклеотиду. Промежуточные полинуклеотиды образуют разветвлённые структуры, которые гибридизуются с мишеневым полинуклеотидом и первичной молекулой аналога нуклеиновой кислоты. Гибридирующие с мишенью области промежуточных полинуклеотидов могут быть сконструированы таким образом, чтобы они были слишком короткими для того, чтобы краситель связывался с молекулой аналога нуклеиновой кислоты отдельно, но достаточно большими для того, чтобы связываться с молекулами аналога нуклеиновой кислоты при гибридизации. Затем может быть определена величина оптического изменения красителя. В одном варианте осуществления единичная молекула аналога нуклеиновой кислоты может являться универсальным аналогом нуклеиновой кислоты, который используется для всех анализов и оптимизирован для эффективных изменений оптической характеристики красителя. Универсальный аналог нуклеиновой кислоты можно было бы использовать для любой мишени нуклеиновой кислоты, а промежуточные последовательности могли бы меняться. Эта схема может быть адаптирована к формату с помощью иммобилизованного аналога нуклеиновой кислоты.

В другом формате множество молекул аналога нуклеиновой кислоты образуют гибридный аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид со смежными областями мишеневых полинуклеотидов. В этом формате каждая молекула аналога нуклеиновой кислоты является слишком короткой для того, чтобы краситель связывался и приводил к изменению величины оптической характеристики красителя, но множество молекул аналога нуклеиновой кислоты может обеспечить достаточно большую область, чтобы привести к изменению величины оптической характеристики. Как изображено на фиг. 18C, мишеневый полинуклеотид, как единичная молекула, может связываться с образованием дуплекса аналога нуклеиновой кислоты/полинуклеотид с помощью трёх отдельных молекул аналога нуклеиновой кислоты, которые гибридизуются смежными последовательностями. Однако если центральная молекула аналога нуклеиновой кислоты не может гибридизоваться как показано на фиг. 18D, тогда изменение оптической характеристики наблюдать нельзя. В этом формате одна из молекул аналога нуклеиновой кислоты может быть иммобилизованной.

V. Определение количества мишеневых полинуклеотидов.

Рассматриваемые способы, композиции и системы могут быть использованы для определения количества мишеневых полинуклеотидов в образце. В одном варианте осуществления количество мишеневых полинуклеотидов может быть обнаружено путём осуществления серийных разведений молекулы аналога нуклеиновой кислоты добавлением разных количеств образцов мишеневых полинуклеотидов и сравнения образцов с контрольными образцами известной концентрации. В другом варианте осуществления количество мишеневых полинуклеотидов может быть обнаружено осуществлением серийных разведений мишеневых полинуклеотидов добавлением разных количеств молекул аналога нуклеиновой кислоты и сравнением образцов с контрольными образцами известной концентрации.

Альтернативно, количество мишеневых полинуклеотидов может быть обнаружено измерением кинетики анализа, основанной на времени. Измерения красителя в объединённой смеси проводятся через периодические интервалы времени после приготовления смеси или после применения светового стимула. Краситель может быть обнаружен в разное время после приготовления смеси или после применения светового стимула. Время может быть временным периодом, например, общим временем для изменения оптической характеристики, или временем, необходимым для того, чтобы оптическая характеристика изменилась на определённый процент, такой как - но не ограничиваясь им - примерно 20%. Реакции могут быть заморожены (дальнейшее изменение прекращается), например, добавлением растворителей, таких как 20%-ный метанол, 15%-ный изопропанол, 15%-ный DMSO или 10%-ный бутанол.

Реакция может также включать в себя ряд буферов и растворителей. Эти буферы и растворители включают в себя фосфатные буферы, воду, 0,1%-ный SDS, 0,1%-ный Triton X, 0,1%-ный Tween-20, 3%-ный бутанол, 10%-ный метанол, 10%-ный изопропанол, 10%-ный DMSO, 1X кровяной лизисный буфер (0,15 M NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 , 0,1 mM EDTA pH 7,4) и сахарозный лизисный буфер (0,32 M сахарозы, 10 mM Tris, 1%-ный Triton X-100, 5 mM MgCl_2).

Количество полинуклеотида в образце может быть определено после его экспозиции световому стимулу. Изменение оптической характеристики красителя может быть измерено до начала экспозиции световому стимулу - для стартовой световой характеристики. Измерения могут быть проведены в другое время (например, через 30-секундные интервалы) после экспозиции световому стимулу. Реакции могут быть заморожены (дальнейшее изменение прекращается), как описано выше.

Изменения в образце благодаря экспозиции световому стимулу может наблюдаться несколькими способами. Изменение оптической характеристики может наблюдаться как изменение цвета, спектра поглощения, флуоресценции, отражательной способности, хемилюминесценции или их комбинации. Альтернативно, изменение оптической характеристики может быть считано с помощью считывающего устройства. Это изменение измеряется с использованием спектрофотометра, такого как Tecan Genios или Tecan Safire. Можно наблюдать определённую длину волны, например, с помощью фильтра. Положительный контроль показывает изменение спектра поглощения быстрее, чем негативный тест. Он может быть измерен как разность скоростей изменения или различия в изменении за определённое время. Если используется световой стимул и наблюдаются показатели флуоресценции, светового стимула, обеспечи-

ваемый образцу, будет более высоко энергетическим (низкая длина волны), чем наблюдаемая эмиссия. Возбуждение может быть, например, при 535 нм, а эмиссия может читаться при 590 нм. Флуоресценция может быть измерена как разница в скорости изменения или разница в изменении в установленное время.

Кроме того, смесь может иметь изменения, которые происходят до экспозиции световому стимулу. Эти различия могут наблюдаться либо в спектрофотометрической системе, либо в системе флуоресцентной эмиссии, либо в хемилюминесцентной системе.

VI. Форматы анализа.

A. Жидкостные системы анализа.

Как продемонстрировано в примерах 1-4, способы и системы анализа для обнаружения мишеневого полинуклеотида могут быть основаны на жидкости. Образец, аналог нуклеиновой кислоты, который связывается с мишеневой последовательностью нуклеиновой кислоты полинуклеотида в последовательность специфичным образом, и краситель, у которого скорость изменения оптической характеристики различна в присутствии и в отсутствие гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид, объединяются, чтобы приготовить смесь в жидком растворе. Скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси сравнивается с эталонным значением показателя изменения оптической характеристики красителя в подобной смеси, содержащей известное количество гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид, чтобы определить относительную скорость изменения оптической характеристики. Относительную скорость изменения оптической характеристики красителя в смеси коррелируют с присутствием или количеством определённого полинуклеотида в образце для определения присутствия или количества полинуклеотида в образце.

Способ и система анализа могут также быть осуществлены в любом сосуде, таком как микроцентрифужные трубки, тестовые пробирки и чипы, в которых жидкость удерживается поверхностным натяжением. Способы и система анализа могут также быть осуществлены в многолуночных микропланшетах. Планшеты могут содержать любое количество лунок. В одном формате используется 96-луночный планшет. В другом формате используется 384-луночный планшет. Когда формат анализа представляет собой микролуночный формат, жидкость содержится в каждой лунке титрационного микропланшета.

B. Системы анализа на твёрдом носителе.

Способы и система анализа могут быть осуществлены на твёрдой среде (например, один или более компонентов иммобилизованы на твёрдом носителе). Чаще всего аналог нуклеиновой кислоты или мишеневый полинуклеотид иммобилизуют. Существует много типов твёрдых носителей, к которым могут быть присоединены молекулы аналога нуклеиновой кислоты или мишеневого полинуклеотида, в том числе - но не ограничиваясь ими - проницаемые для жидкости мембраны (нитроцеллюлозные, нейлоновые), керамические носители, протравленные мембраны (ТЕМ), поливинилидендифторид, латекс, парамагнитные шарики, пластиковые носители всех типов, стекло, порошковый кремний или алюминий на подложечной матрице. Если используется сетчатый рисунок, молекула аналога нуклеиновой кислоты/твёрдый носитель образует микроанализ. В другом варианте осуществления молекулы аналога нуклеиновой кислоты или мишеневого полинуклеотида могут быть ковалентно модифицированы, чтобы включать в себя связывающее средство, такое как биотиновое или амидное звено, которые связываются с мембранами. В следующем варианте осуществления молекулы аналога нуклеиновой кислоты или мишеневого полинуклеотида могут быть иммобилизованы через последовательную специфическую гибридизацию с одной или более последовательностями.

На фиг. 17 схематически представлено обнаружение, с активированием световым стимулом и иммобилизацией на поверхности, аналогов нуклеиновой кислоты. А) Стрепавидиновая лунка. В) В лунку добавлены биотинилированные аналоги нуклеиновой кислоты и обеспечена возможность присоединения к носителю. С) Лунка промыта и избыток аналогов нуклеиновой кислоты удалён. D) Внесён полинуклеотидный образец, и специфическая мишеневая последовательность присоединяется к комплементарному аналогу нуклеиновой кислоты. E) Неспецифичный и избыточный полинуклеотид удален. F) Краситель добавлен и экспонирован световому стимулу.

Настоящее изобретение предполагает любые средства присоединения молекулы аналога нуклеиновой кислоты к носителю. В одном аспекте молекула аналога нуклеиновой кислоты может быть присоединена непосредственно к мембране. Аналогом нуклеиновой кислоты может являться PNA (например, A.Giger, Lester A., Kleiber J. And Orum H., 1998, PNA array technology in molecular diagnostics. Nucleotides and Nucleoside, 17(1717-1724)). Раствор молекул аналога нуклеиновой кислоты (в воде) просто прикладывается к заряженному или химически модифицированному фильтру и оставляется сушиться на воздухе. Фильтр затем используется для гибридизации.

В другом аспекте меченная биотином молекула аналога нуклеиновой кислоты может быть присоединена к покрытой стрепавидином поверхности, такой как шарик или лунка (см., например, Chandler, D.P., Stults, J.R., Anderson, K.K., Cebula, S., Schuck, B.L., and Brockman, F.J., 2000. Affinity Capture and Recovery of DNA at Femtomolar Concentrations with Peptide Nucleic Acid Probes. Analytical Biochem. 283:241-249). Меченные биотином молекулы аналога нуклеиновой кислоты смешиваются со стрепавидином, меченым латексом или шариками поликарбоната. Биотин прочно связывается со стрепавидином,

позволяя молекуле аналога нуклеиновой кислоты односторонне связываться с шариком. Затем шарики опускают на незаряженную мембрану с размером отверстий на 25-30% больше диаметра шарика. Шарики остаются в отверстиях, образуя локализованный участок «присоединённых молекул аналога нуклеиновой кислоты». Прямой синтез молекул аналога нуклеиновой кислоты на твёрдом носителе, таком как полипропиленовая мембрана, может быть выполнен с использованием стандартной химии синтеза 9-флуоренилметоксикарбоил (Fmoc) протеина (см., например, Matysiak S., Reuthner F. And Hoheisel J.D. Automating parallel peptide synthesis for production of nucleic acid analog library arrays, *BioTechniques* 31:896-904).

В другом аспекте молекулы аналога нуклеиновой кислоты могут быть присоединены к стеклу или другому твёрдому носителю приложением водного раствора молекул аналога нуклеиновой кислоты непосредственно к стеклу или другому носителю, позволяя ему высохнуть на воздухе.

В одном варианте молекула аналога нуклеиновой кислоты конструируется таким образом, чтобы она имела суммарный положительный заряд и могла связываться отрицательно заряженной мембраной. Например, положительно заряженный лизин или глицин на 5' и 3' концах молекулы аналога нуклеиновой кислоты может быть использован для присоединения этой молекулы аналога нуклеиновой кислоты к отрицательно заряженной нейлоновой мембране. Отрицательно заряженная мембрана отталкивает любую нуклеиновую кислоту, которая не является комплементарной и (или) частично комплементарной к аналогу нуклеиновой кислоты, таким образом минимизируя неспецифическое связывание.

Посредством системы, основанной на твёрдом носителе, можно обнаружить любой мишеневый полинуклеотид или группу мишеневых полинуклеотидов. В этом случае твёрдый носитель содержит множество молекул аналога нуклеиновой кислоты, иммобилизованных на твёрдом носителе. Контрольный аналог нуклеиновой кислоты, который не образует гибридных молекул аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид, не гибридизуется. Он также может быть включён в твёрдый носитель.

Система, основанная на твёрдом носителе, может быть использована для обнаружения по меньшей мере одного мишеневого полинуклеотида. В других вариантах система, основанная на твёрдом носителе, обнаруживает или измеряет экспрессию по меньшей мере примерно 8, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50 или по меньшей мере примерно 60 разных мишеневых полинуклеотидов. В другом варианте система, основанная на твёрдом носителе, обнаруживает или и распознает экспрессию по меньшей мере примерно 60 или более мишеневых полинуклеотидов.

В качестве примера - но не ограничиваясь им - на фиг. 3 изображена основанная на твёрдом носителе версия этого анализа, в которой в качестве твёрдого носителя используется мембрана. Анализ показывает присутствие мишеневого полинуклеотида. Эта система позволяет идентифицировать и (или) определять количественно малые количества определённого мишеневого полинуклеотида в пределах нескольких минут без необходимости использования большого количества оборудования и даёт визуальный сигнал (например, розовая окраска изменяется на бесцветную). После довольно быстрого лизиса образца, гибридизации и введения красителя применяется световой стимул, и наблюдается скорость изменения цветового рисунка на мембране. Скорость изменения в рисунке окрашенных полос на мембране даёт возможность пользователю легко обнаруживать и идентифицировать мишеневые полинуклеотиды. Опционально, этот способ или его вариант могут быть осуществлены на портативном устройстве, получающем питание от небольшой батареи. В автоматическом роботизированном варианте все стадии могут быть осуществлены машиной без вмешательства человека.

Система анализа, основанная на твёрдом носителе, может быть реализована в титрационном микропланшете. Может быть использован любой титрационный микропланшет. В такой системе анализа его компоненты могут оставаться жидкими. В одном формате используются 96-луночные микропланшеты. В другом формате используются 384-луночные планшеты. Когда анализ производят в микротитровальном формате, все компоненты, за исключением тех, которые связываются с твёрдым носителем, остаются в растворе в каждой лунке титрационного микропланшета.

VI. Мишеневые полинуклеотиды и источники мишеневых полинуклеотидов.

Мишеневый полинуклеотид может быть любым полинуклеотидом, в том числе встречающимся в природе, синтетическим и амплифицированным. Другие типы полинуклеотидов могут быть одонитевыми или двунитевыми. Не ограничивающие примеры мишеневых полинуклеотидов включают в себя ДНК, РНК, регуляторную РНК, мРНК, регуляторную микроРНК, siРНК, искусственную РНК и химерную РНК. Другие неограничивающие примеры мишеневых полинуклеотидов включают в себя эпигеномную ДНК, эпигенетическую ДНК, *in vitro* амплифицированную ДНК и химерную ДНК. Мишеневый полинуклеотид может содержать SNPs, который идентифицируют и определяют количественно раскрытыми здесь способами.

Описанные здесь способы, системы и анализы имеют множество применений. Неограничивающие примеры этих применений включают в себя обнаружение и количественное определение организмов, патогенов, таких как патогены в пище, патогены окружающей среды, патогены в воде или патогены, применяемые в агротерроризме. Другие неограничивающие примеры применений включают в себя диагностику заболеваний, такую как диагностика заболеваний, передаваемых половым путём, обнаружение

генов, придающих устойчивость к антибиотикам, обнаружение генов, придающих предрасположенность к ответу на лекарство, обнаружение генов, вовлечённых в эффективный ответ на лекарство, обнаружение генетически модифицированных организмов и обнаружение неместной флоры или фауны. Дополнительные неограничивающие применения включают в себя сельскохозяйственные применения и применения в ветеринарии.

Ниже описываются примеры для иллюстрации, а не ограничения.

А. Патогены.

В одном аспекте изобретение относится к способам, композициям и системам анализа для обнаружения присутствия патогена и (или) заражения хозяина патогеном. Как правило, присутствие патогена и (или) присутствие патогена в хозяине обнаруживается анализом мишеневых полинуклеотидов в образце. Более конкретно, изобретение относится к способам, композициям веществ и системам анализа для анализа мишеневых полинуклеотидов с помощью последовательной специфической гибридизации с молекулой аналога нуклеиновой кислоты и добавления красителя для образования смеси. Затем наблюдается скорость изменения оптической характеристики красителя, чтобы обнаружить присутствие или количество мишеневого полинуклеотида.

Примеры патогенов или присутствия патогена в хозяине, которые могут быть обнаружены настоящими способами и системами анализа, включают в себя - но не ограничиваются ими - *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, устойчивые к метициллину *Staphylococcus aureus* (MSRA), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus pneumoniae* и *Candida albicans*.

Дополнительные примеры включают в себя - но не ограничиваются ими - *Bacillus anthracis* (сибирская язва), *Clostridium botulinum* (ботулизм), *Brucellae* (бруцеллез), *Vibrio cholera* (холера), *Clostridium perfringens* (газовая гангрена, клостридийный мионекроз, некротический энтерит), вирус Эбола (геморрагическая лихорадка Эбола), *Yersinia pestis* (чума), *Coxiella burnetii* (Q-лихорадка) и вирус оспы (оспа). В предпочтительном варианте обнаруживают *Bacillus anthracis*.

Примеры полинуклеотидов ответа хозяина для *Bacillus anthracis* включают в себя - но не ограничиваются ими - те, которые раскрыты Mock M., Mignot T. Anthrax toxins and the host: a story of intimacy. Cell Microbiol. 2003 Jan; 5(1): 15-23 и Reed D.S., Smoll J., Gibbs P., Little S.F. Related Articles, Links Mapping of antibody responses to the protective antigen of *Bacillus anthracis* by flow cytometric analysis. Cytometry. 2002 Sep. 1; 49(1): 1-7, или легко получаемые методами, известными в данной области.

Патогены можно отличить от других патогенов на основании их мишеневых полинуклеотидов. Определённые патогены имеют специфические мишеневые полинуклеотиды, которые не обнаруживаются в других патогенах. Конструируются молекулы аналога нуклеиновой кислоты, комплементарные или строго комплементарные одному или более мишеневым полинуклеотидам, которые характерны для определённого патогена. Контактируя с мишеневыми полинуклеотидами патогена, молекула аналога нуклеиновой кислоты гибридизуется с полинуклеотидами, содержащими мишеневый полинуклеотид, но не с полинуклеотидами, которые не содержат мишеневого полинуклеотида. Таким образом, определённые патогены, которые содержат мишеневый полинуклеотид, могут быть отличены от патогенов, не содержащих мишеневого полинуклеотида.

Кроме того, можно различить разные штаммы одного и того же патогена. Разные штаммы одного и того же патогена имеют разные полинуклеотидные последовательности. Часто различия настолько малы, что сводятся к единичному нуклеотиду. Конструируются молекулы аналога нуклеиновой кислоты, комплементарные или строго комплементарные одному или более мишеневым полинуклеотидам, которые идентифицируют определённый штамм патогена. Контактируя с мишеневыми полинуклеотидами патогена, молекула аналога нуклеиновой кислоты гибридизуется с полинуклеотидами, содержащими мишеневый полинуклеотид, но не с полинуклеотидами, которые не содержат мишеневого полинуклеотида. Когда мишеневый полинуклеотид является специфичным для определённого патогенного штамма, молекулы аналога нуклеиновой кислоты гибридизуются с мишеневыми полинуклеотидами, содержащимися в патогенном штамме, но не гибридизуются с мишеневыми полинуклеотидами другого штамма.

Примеры клинически важных патогенов и данные по их обнаружению с использованием PCR перечислены ниже. Молекулы аналога нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательность PCR-праймера к последовательностям определённых патогенов, и могут быть использованы в комбинации во многих описанных здесь вариантах осуществления изобретения.

В одном варианте осуществления патоген может быть *Staphylococcus epidermidis*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймерам, используемым для идентификации *Staphylococcus epidermidis*. Примеры этих PCR-праймеров раскрыты в уровне техники (см., например, Francois, P., D. Pittet, M. Bento, B. Pepey, P. Vaudaux, D. Lew and J. Schrenzel. 2003. Rapid Detection of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. J Clin Microbiol 41(1):254-60, F. Fitzpatrick, H. Humphreys, E. Smith, C.A. Kennedy

and J.P. O'Gara. 2002. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* 52(3):212-8, J. Yugueros, A. Temprano, B. Berzal, M. Sanchez, C. Hernanz, J.M. Luengo and Naharro. 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-coding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 38(12):4351-5).

Патогеном может быть *Escherichia coli*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Escherichia coli*. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, L. C. Heller, C. R. Davis, K. K. Peak, D. Wingfield, A. C. Cannons, P. T. Amuso, and J. Cattani. 2003. Comparison of Methods for DNA Isolation from Food Samples for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 69(3): 1844-6, Rahman, H. 2002. Multiplex PCR for detection of six genes of *Escherichia coli*. *Indian J Med Res* 115:251-4, и E. Frahm, and U. Obst. 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods* 52(1):123-31).

Патогеном может являться устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MSRA). Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Staphylococcus aureus* (MSRA). Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, W. B. van Leeuwen, C. van Pelt, A. Luijendijk, H. A. Verbrugh, and W. H. Goessens. 1999. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 37(9):3029-30, P. Francois, D. Pittet, M. Bento, B. Pepey, P. Vaudaux, D. Lew, and J. Schrenzel. 2003. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. *J Clin Microbiol* 41(1):254-60, и M. Tsuruoka and I. Karube. 2003. Rapid hybridization at high salt concentration and detection of bacterial DNA using fluorescence polarization. *Comb Chem High Throughput Screen* 6(3):225-34).

Патогенами могут являться *Candida*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Candida*. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, S. Ahmad, Z. Khan, A. S. Mustafa, and Z. U. Khan. 2002. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 40(7):2483-9, and U. H. Tirodker, J. P. Nataro, S. Smith, L. LasCasas, and K. D. Fairchild. 2003. Detection of fungemia by polymerase chain reaction in critically ill neonates and children. *J Perinatol* 23(2): 117-22).

Патогеном может являться *Candida albicans*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Candida albicans*. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, P. L. White, A. Shetty, and R. A. Barnes. 2003. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J Med Microbiol* 52(Pt 3):229-38, M. Grijalva, R. Horvath, M. Dendis, J. Erny, and J. Benedik. 2003. Molecular diagnosis of culture negative infective endocarditis: clinical validation in a group of surgically treated patients. *Heart* 89(3):263-8, и B. Willinger, A. Obradovic, B. Selitsch, J. Beck-Mannagetta, W. Buzina, H. Braun, P. Apfalter, A. M. Hirschl, A. Makrathis, and M. Rotter. 2003. Detection and identification of fungi from fungus balls of the maxillary sinus by molecular techniques. *J Clin Microbiol* 41(2):581-5).

Патогеном может являться *Staphylococcus aureus*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Staphylococcus aureus*. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, P. Francois, D. Pittet, M. Bento, B. Pepey, P. Vaudaux, D. Lew, and J. Schrenzel. 2003. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. *J Clin Microbiol* 41(1):254-60, Palomares, C., M. J. Torres, A. Torres, J. Aznar, and J. C. Palomares. 2003. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45(3): 183-9, и J. Xu, B. C. Millar, J. E. Moore, K. Murphy, H. Webb, A. J. Fox, M. Cafferkey, and M. J. Crowe. 2003. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis-rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol* 94(2): 197-206).

Патогеном может являться *Staphylococcus hominis*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Staphylococcus hominis*. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, R. Marsou, M. Bes, Y. Brun, M. Boudouma, L. Idrissi, H. Meugnier, J. Freney, and J. Etienne. 2001. Molecular techniques open up new vistas for typing of coagulase- negative staphylococci. *Pathol Biol (Paris)* 49(3):205-15, J. Yugueros, A. Temprano, B. Berzal, M. Sanchez, C. Hernanz, J. M. Luengo, and G. Naharro. 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 38(12):4351-5, и M. Wieser, and H. J. Busse. 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 3: 1087-93).

Патогеном может являться *Enterococcus faecalis*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймамерам, используемым для идентификации *Enterococcus faecalis*. Примеры этих PCR-праймамеров раскрыты в уровне техники (см., например, C. R. Hudson, P. J. Fedorka-Cray, M. C. Jackson-Hall, and L. M. Hiott. 2003. Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system. *Lett Appl Microbiol* 36(4):245-50, S. M. Donabedian, L. A. Thal, E. Hershberger, M. B. Perri, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. Rossiter, K. Gay, J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and M. J. Zervos. 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 41(3):1109-13, and V. Gauduchon, L. Chalabreysse, J. Etienne, M. Celard, Y. Benito, H. Lepidi, F. Thivolet-Bejui, and F. Vandenesch. 2003. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 41(2):763-6).

Патогеном может являться *Pseudomonas aeruginosa*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймамерам, используемым для идентификации *Pseudomonas aeruginosa*. Примеры этих PCR-праймамеров раскрыты в уровне техники (см., например, M. E. Corbella, and A. Puyet. 2003. Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of Expression of Halobenzoate and Salicylate Catabolism-Associated Operons in Two Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 69(4):2269-75, G. Agarwal, A. Kapil, S. K. Kabra, R. Chandra, B. Das, and S. N. Diwedi. 2002. Phenotypic & genotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis in India. *Indian J Med Res* 116:73-81, and W. Dabrowski, U. Czekajlo-Kolodziej, D. Medrala, and S. Giedrys-Kalemba. 2003. Optimisation of AP-PCR fingerprinting discriminatory power for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 218(1):51-7).

Патогеном может являться *Staphylococcus capitis*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймамерам, используемым для идентификации *Staphylococcus capitis*. Примеры этих PCR-праймамеров раскрыты в уровне техники (см., например, M. Wieser, and H. J. Busse. 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 3:1087-93, и F. Martineau, F. J. Picard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron. 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 34(12):2888-93).

Патогеном может являться *Staphylococcus warneri*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймамерам, используемым для идентификации *Staphylococcus warneri*. Примеры этих PCR-праймамеров раскрыты в уровне техники (см., например, M. Wieser, and H. J. Busse. 2000. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 3:1087-93, и T. Sashihara, H. Kimura, T. Higuchi, A. Adachi, H. Matsusaki, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. 2000. A novel antibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(11):2420-8).

Патогеном может являться *Klebsiella pneumoniae*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймамерам, используемым для идентификации *Klebsiella pneumoniae*. Примеры этих PCR-праймамеров раскрыты в уровне техники (см., например, Perez-Perez, F. J., and N. D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40(6):2153-62, Steward, C.D., J.K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. Biddle, P. M. Raney, G. J. Anderson, P. P. Williams, K. L. Brittain, A. Oliver, J. E. McGowan, Jr., and F. C. Tenover. 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum betalactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 39(8):2864-72, and Carter, J. S., and D. J. Kemp. 2000. A colorimetric detection system for *Calymmatobacterium granulomatis*. *Sex Transm Infect* 76(2): 134-6).

Патогеном может являться *Haemophilus influenzae*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймамерам, используемым для идентификации *Haemophilus influenzae*. Примеры этих PCR-праймамеров раскрыты в уровне техники (см., например, S. Shoma, M. Rahman, and M. Yasrnin. 2001. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* type b in Bangladeshi children with pneumonia and meningitis by PCR and analysis of antimicrobial resistance. *J Health Popul Nutr* 19(4):268-74, C. E. Corless, M. Guiver, R. Bonow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox, and E. B. Kaczmarek. 2001. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39(4): 1553-8, и Carter, J. S., and D. J. Kemp. 2000. A colorimetric detection system for *Calymmatobacterium granulomatis*. *Sex Transm Infect* 76(2): 134-6).

Патогеном может являться *Staphylococcus simulans*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Staphylococcus simulans*. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, J. Yugueros, A. Temprano, B. Berzal, M. Sanchez, C. Hernanz, J. M. Luengo, and O. Naharro. 2000. Glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 38(12):4351-5, и P. Szweda, R. Pladzyk, R. Kotlowski, and J. Kur. 2001. Cloning, expression, and purification of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin using the intein-chitin-binding domain (CBD) system. *Protein Expr Purif* 22(3):467-71).

Патогеном может являться *Streptococcus pneumoniae*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации *Streptococcus pneumoniae*. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, J. Xu, B. C. Millar, J. E. Moore, K. Murphy, H. Webb, A. J. Fox, M. Cafferkey, and M. J. Crowe. 2003. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis- rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol* 94(2): 197-206, O. Greiner, P. J. Day, P. P. Bosshard, F. Imeri, M. Altwegg, and D. Nadal. 2001. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39(9):3129-34, и C. E. Corless, M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox, and E. B. Kaczmarski. 2001. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 39(4): 1553-8).

Патогеном может быть Coronavirus, РНК-вирус, для обнаружения SARS. Последовательность коронавируса можно найти, например, на вебсайте Центра по контролю за заболеваниями. Примеры этих мишеневых полинуклеотидов раскрыты в уровне техники (см., например, T. G. Ksiazek, D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J. A. Comer, W. Lim, P. E. Rollin, S. F. Dowell, A. E. Ling, C. D. Humphrey, W. J. Shieh, J. Guarner, C. D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. De-Risi, J. Y. Yang, N. Cox, J. M. Hughes, J. W. LeDuc, W. J. Bellini, and L. J. Anderson. 2003. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 16:16; C. Drosten, S. Gunther, W. Preiser, S. Van Der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. A. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J. C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. Osterhaus, H. Schmitz, and H. W. Doerr. 2003. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 10:10).

Патогеном может быть *Bordetella pertussis*, или судорожный кашель. Примеры этих мишеневых полинуклеотидов раскрыты в уровне техники (см., например, F. Doucet-Populaire, N. Bourgeois, O. Charara, M. Bellaiche, F. Richardin, J. L. Salomon, L. Berardi-Grassias, J. C. Ghnassia, and P. Foucaud. 2002. [Routine use of gene amplification for pertussis diagnosis in children]. *Arch Pediatr* 9(11): 1145-52; Lingappa, J. R., W. Lawrence, S. West-Keefe, R. Gautom, and B. T. Cookson. 2002. Diagnosis of community-acquired pertussis infection: comparison of both culture and fluorescent-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization. *J Clin Microbiol* 40(8):2908-12).

Патогеном может быть *Phytophthora ramorum* (причина внезапного омертвения дуба). Примеры этих мишеневых полинуклеотидов раскрыты в уровне техники (см., например, L. Levy, and V. Mavrodieva. 2003. Evaluation of the PCR Detection and DNA isolation methods for use in the *Phytophthora ramorum*. National Pilot Survey, vol. 2003, available at the Purdue University website; B. A. McPherson, D. M. Rizzo, M. Garbelotto, P. Svihra, D. L. Wood, A. J. Storer, N. M. Kelly, N. Palkovsky, S. A. Tjosvold, R. B. Standiford, and S. T. Koike. 2002. Sudden Oak Death in California, vol. 2003. Home & Landscape, available at the University of California at Davis website).

Патогеном может быть Norwalk-вирус. Примеры этих мишеневых полинуклеотидов раскрыты в уровне техники (см., например, A. S. Khan, C. L. Moe, R. I. Glass, S. S. Monroe, M. K. Estes, L. E. Chapman, X. Jiang, C. Humphrey, E. Pon, J. K. Iskander, and et al. 1994. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. *J Clin Microbiol* 32(2):318-22; B. L. Herwaldt, J. F. Lew, C. L. Moe, D. C. Lewis, C. D. Humphrey, S. S. Monroe, E. W. Pon, and R. I. Glass. 1994. Characterization of a variant strain of Norwalk virus from a food-borne outbreak of gastroenteritis on a cruise ship in Hawaii. *J Clin Microbiol* 32(4):861-6).

Патогеном может быть ВИЧ. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймам, используемым для идентификации HIV. Примеры этих PCR-праймов раскрыты в уровне техники (см., например, K. M. Smith, K. A. Crandall, M. L. Kneissl, and B. A. Navia. 2000. PCR detection of host and HIV-1 sequences from archival brain tissue. *J Neurovirol* 6(2): 164-71; Cuchacovich, R., S. Quinet, and A. M. Santos. 2003. Applications of polymerase chain reaction in rheumatology. *Rheum Dis Clin North Am* 29(1): 1-20, v; P. Cunningham, D. Marriott, C. Harris, S. Hancock, A. Carr, and D. Cooper. 2003. False negative HIV-1 proviral DNA polymerase chain reaction in a patient with primary infection acquired in Thailand. *J Clin Virol* 26(2): 163-9).

Патогеном может быть *Mycobacterium tuberculosis*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут содержать последовательности или фрагменты последовательностей, подобные или идентичные PCR-праймерам, используемым для идентификации туберкулеза. Примеры этих PCR-праймеров раскрыты в уровне техники (см., например, M. J. Torres, A. Criado, M. Ruiz, A. C. Llanos, J. C. Palomares, and J. Aznar. 2003. Improved real-time PCR for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45(3):207-12; B. Bhattacharya, K. Karak, A. G. Ghosal, A. Roy, S. Das, P. Dandapat, D. Khetawat, D. K. Mondal, S. Bhattacharya, and S. Chakrabarti. 2003. Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Trop Med Int Health* 8(2): 150-7; M. Kafwabulula, K. Ahmed, T. Nagatake, J. Gotoh, S. Mitarai, K. Oizumi, and A. Zumla. 2002. Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycobacterial DNA in urine samples. *Int J Tuberc Lung Dis* 6(8):732-7).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты сконструированы таким образом, что будут связываться с мишеневыми полинуклеотидами, общими для целой группы патогенов. Например, аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы так, чтобы обнаруживать бактерии (BP6), грамположительные бактерии (BP19), грамотрицательные бактерии (BP3) и грибки (FP8). Примеры последовательностей аналогов нуклеиновых кислот для BP6, BP19, BP3 и FP8 показаны ниже.

5'gaaSSMYcYaacacYtagcact	
BP6 oI2018	(SEQ ID No: 3)
	5'tacaMgagYYgcWagacSgYgaS
oI2019	(SEQ ID NO: 4)
	5'gcagYWaacgcattaagcact (SEQ
BP19 oI2021	ID NO: 5)
	5'acgacacgagctgacgacaa(SEQ
oI2022	ID NO: 6)
	5'tctagctggctgagaggatgac
BP3 oI2003	(SEQ ID NO: 7)
	5'gagttagccgggtgcttctct
oI2004	(SEQ ID NO: 8)
	5'cctgcggcttaattgactca
FP8 OI2055	(SEQ ID NO: 9)
	5'tagcgacggcggtgtgta
OI2057	(SEQ ID NO: 10)

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть использованы в клинических применениях для диагностики микробной причины сепсиса или в других применениях, где содержание микробов в продуктах важно при оценке их срока хранения и устойчивости или в других продуктах, для которых оценивается стерильность.

Мишеневые полинуклеотиды могут быть специфичными к последовательностям рибосомной РНК, такой как 16S РНК из *E. coli*. Рибосомная РНК содержит специфические последовательности, которые характерны для организма-хозяина. Используя последовательности аналога нуклеиновой кислоты, которые комплементарны или строго комплементарны к мишеневому полинуклеотиду, присущему последовательности рибосомной РНК, можно диагностировать патогены на основании последовательностей их рибосомной РНК. Последовательности рибосомной РНК, присущие различным патогенам или штаммам патогенов, можно найти, например, у Dinshaw J. Patel, Asif K. Suri, Feng Jiang, Licong Jiang, Pei FanR. Ajay Kumar and Sylvie Nonin, *Structure, Recognition and Adaptive Binding in RNA. Aptamer Complexes*. J. Mol. Biol. (1997) 272, 645-664).

В. Полинуклеотиды ответа хозяина.

Мишеневый полинуклеотид может также являться полинуклеотидом ответа хозяина. После того как хозяин инфицирован патогеном, его гены в ответ на патоген могут экспрессироваться по-разному, давая определённый рисунок мРНК (профиль генной экспрессии). Гены хозяина, чей рисунок экспрессии коррелирует с инфицированием определённым патогеном, называют «диагностическими маркерными генами» для данного агента. мРНК, как правило, происходит из белых кровяных телец образца. Способы идентификации ответа хозяина и изменённые профили экспрессии можно найти, например, у: 1) Das, R.,

Mendis, C., Yan, Z., Neill, R., Boyle, T., and Jett, M. (1998) Alterations in gene expression show unique patterns in response to agents. In Proceedings of the 21st Army Science Conference, F-P9, и 2) Mendis, C., Das, R., Yang, D., and Jett, M. (1998) Identification of alterations in gene expression in response to Staphylococcal enterotoxin B (SEB) using differential display (DD). In the ASCB 38th Annual Meeting, San Francisco, CA.

Методы профилирования генной экспрессии разработаны для различных медицинских состояний, как описано, например, в патентных документах США № 5723290 (Eberwine et al.), США № 6218122 (Friend et al.), WO 99/10536 (Yarramilli et al.) и WO 99/57130 (Prashar et al.). Вкратце, такой способ включает в себя получение уровня экспрессии мРНК в клетках, отобранных в связи с выбранным условием, и сравнение полученных относительных уровней с установленными контрольными. Затем на основании сравнения уровней экспрессии мРНК ставится диагноз. мРНК выделяется из клеток с помощью какого-либо из множества методов, хорошо известных из уровня техники, но в общем, лизируя клетки и обогащая их мРНК или выделяя из них мРНК. Затем любыми известными в данной области средствами получают профили генной экспрессии, включая - но не ограничиваясь ими - способы, раскрытые: Prashar et al. в WO 97/05286; Liang et al. в Science 257:967-971 (1992); Ivanova et al. в Nucleic Acids Res. 23:2954-2959 (1995); и Prashar et al. в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:659-663 (1996). С помощью этих методов обычно получают профили генной экспрессии, используя Northern-анализ, FRET-детекцию, гибридизацию с анализом олигонуклеотидов, гибридизацию с анализом кДНК, с кДНК-последовательностями, кДНК-фингерпринтингом и т.п. Часто профилями генной экспрессии называют представление экспрессии образцов мРНК в том виде, как их можно обнаружить на ауторадиограмме меченых фрагментов кДНК, полученных из тотальной клеточной мРНК, выделенной на основании размера путём слоевого гель-электрофореза, капиллярного гель-электрофореза, HPLC и другими методами выделения. Системы анализа и способы согласно настоящему изобретению обеспечивают альтернативный путь оценки экспрессии мРНК. Как описано ниже, уровни экспрессии мРНК (т.е. профили генной экспрессии) сравнивают, или, напротив, изменения в экспрессии мРНК от диагностических маркерных генов обнаруживают, анализируя гибридизацию ответа мРНК хозяина по их комплементарности или строгой комплементарности аналогам нуклеиновой кислоты.

С. Пищевые патогены и патогены окружающей среды.

Согласно настоящему изобретению могут быть обнаружены любые пищевые патогены или патогены окружающей среды. Пищевые патогены включают в себя - не ограничиваясь ими - *Listeria*, *Campylobacter*, *E. coli* и *Salmonella*. Раскрываемые здесь способы с использованием аналогов нуклеиновой кислоты легко позволяют обнаруживать конкретные пищевые патогены. Например, *Listeria* можно легко отличить от *Salmonella*. Кроме того, можно обнаруживать конкретные штаммы пищевых патогенов, таких как конкретные штаммы *L. monocytogenes*.

Любой мишеневый полинуклеотид, ассоциированный с пищевыми патогенами, может быть идентифицирован способами согласно настоящему изобретению. Мишеневые полинуклеотиды, которые характеризуют конкретные патогены и штаммы патогенов, могут быть идентифицированы, как обсуждается выше. Данный способ может быть использован для обнаружения мишеневых полинуклеотидов, ассоциированных с *Listeria*, *Campylobacter*, *E. coli* и *Salmonella*. Например, специфичные для *Listeria* гены, которые могут быть идентифицированы раскрытыми здесь способами, включают гены *hly* (листериолизина О) и *iap* (протеина, ассоциированного с инвазией) и мРНК (HLYPNA и IAPPNA, соответственно).

Мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Salmonella* spp., могут быть обнаружены согласно настоящему изобретению. Последовательности, специфичные для *Salmonella* spp., известны в уровне техники (см., например, Perez-Perez, P. J., and N. D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC betalactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 40(6):2153-62, S. D. Oliveira, C. R. Rodenbusch, M. C. Ce, S. L. Rocha, and C. W. Canal. 2003. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. Lett Appl Microbiol 36(4):217-21, и C. M. Strapp, A. E. Shearer, and R. D. Joerger. 2003. Survey of retail alfalfa sprouts and mushrooms for the presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria* with BAX, and evaluation of this polymerase chain reaction-based system with experimentally contaminated samples. J Food Prot 66(2): 182-7).

В другом варианте осуществления могут быть определены мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Escherichia coli*. Последовательности, специфичные для *Escherichia coli*, известны в уровне техники (см., например, L. C. Heller, C. R. Davis, K. K. Peak, D. Wingfield, A. C. Cannons, P. T. Amuso, and J. Cattani. 2003. Comparison of Methods for DNA Isolation from Food Samples for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by Real-Time PCR. Appl Environ Microbiol 69(3): 1844-6, Rahman, H. 2002. Multiplex PCR for detection of *stx* genes of *Escherichia coli*. Indian J Med Res 115:251-4, и E. Frahm, and U. Obst. 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. J Microbiol Methods 52(1): 123-31.

В другом варианте осуществления могут быть определены мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Campylobacter* spp. Последовательности, специфичные для *Campylobacter* spp., известны в уровне техники (см., например, J. S. Carter and D. J. Kemp.

2000. A colorimetric detection system for *Calymmatobacterium granulomatis*. *Sex Transm Infect* 76(2): 134-6, Y. Moreno, S. Botella, J. L. Alonso, M. A. Ferrus, M. Hernandez, and J. Hernandez. 2003. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69(2): 1181-6, и D. D. Bang, A. Wedderkopp, K. Pedersen, and M. Madsen. 2002. Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (hip O) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Mol Cell* в другом варианте осуществления могут быть определены мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Bacillus* spp. Последовательности, специфичные для *Bacillus* spp., известны в уровне техники (см., например, V. Mantynen, and K. Lindstrom. 1998. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxigenic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 64(5): 1634-9, H. Schraft and M. W. Griffiths. 1995. Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* 61(1):98-102, и B. E. Ley, C. J. Linton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. Millar. 1998. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(4):247-53).

Мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Pseudomonas* spp., также могут быть обнаружены. Последовательности, специфичные для *Pseudomonas* spp., известны в уровне техники (см., например, J. Xu, B. C. Millar, J. E. Moore, K. Murphy, H. Webb, A. J. Fox, M. Cafferkey, and M. J. Crowe. 2003. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis- rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol* 94(2): 197-206, B. E. Ley, C. J. Linton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. Millar. 1998. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(4):247-53, and K. Johnsen, O. Enger, C. S. Jacobsen, L. Thirup, and V. Torsvik. 1999. Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. *Appl Environ Microbiol* 65(4): 1786-8).

Мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Enterococcus* spp., также могут быть обнаружены. Последовательности, специфичные для *Enterococcus* spp., известны в уровне техники (см., например, C. R. Hudson, P. J. Fedorka-Cray, M. C. Jackson-Hall, and L. M. Hiott. 2003. Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system. *Lett Appl Microbiol* 36(4):245-50, S. M. Donabedian, L. A. Thai, E. Hershberger, M. B. Perri, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. Rossiter, K. Gay, J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and M. J. Zervos. 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 41(3): 1109-13, и S. B. Vakulenko, S. M. Donabedian, A. M. Voskresenskiy, M. J. Zervos, S. A. Lerner, and J. W. Chow. 2003. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1423-6).

Мишеневые полинуклеотиды могут также иметь полинуклеотидные последовательности, соответствующие *E. coli* O157. Последовательности, специфичные для *E. coli* O157, известны в уровне техники (см., например, Pan T. M., Chen L. M., Su Y. C. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR with primers specific to the hlyA, eaeA, stx1, stx2, fliC and rfb genes, *J Formos Med Assoc*. 2002 Sep; 101(9):661-4; Bopp D.J., Sauders B.D., Waring A.L. Ackelsberg J., Dumas N., Braun-Howland E., Dziewulski D., Wallace B.J., Kelly M., Halse T., Musser K.A., Smith P.F., Morse D.L., Limberger R.J. Detection, Isolation, and Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* Associated with a Large Waterborne Outbreak, *J Clin Microbiol*. 2003 Jan;41 (1): 174-80; Ibekwe A.M., Grieve C.M. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR, *J Appl Microbiol*. 2003; 94(3):421-31).

Мишеневые полинуклеотиды могут также иметь полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Listeria* spp. и *L. monocytogenes*. Последовательности, специфичные для *Listeria* spp. и *L. monocytogenes*, известны в уровне техники (см., например, Volokhov D., Rasooly A. Chumakov K., Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec; 40(12):4720-8; Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C., Comi G. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Dec; 68(12):6273-82; Shearer A.E., Strapp C.M., Joerger R.D. Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. *J Food Prot*. 2001 Jun; 64(6):788-95; Bubert A., Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W., Wagner M. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Oct; 65(10):4688-92; Jung Y.S., Frank J.F., Brackett R.E., Chen J. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB. *J Food Prot*. 2003 Feb; 66(2):237-41; и Pangallo D., Kaclikova E., Kuchta T., Drahovska H. Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction oriented to inlB gene. *New Microbiol*. 2001 Oct; 24(4):333-9).

Мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие

формам *Escherichia*, также могут быть обнаружены. Последовательности, специфичные для форм *Escherichia*, известны в уровне техники (см., например, Casas N., Sunen E. Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay. *Microbiol Res.* 2002; 157(3): 169-7; Schvoerer E., Ventura M., Dubos O., Cazaux G., Serceau R., Gournier N., Dubois Y., Caminade P., Fleury H.J., Lafon M.E. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant; *Res Microbiol.* 2001 Mar; 152(2): 179-86. Bernhard A.E., Field K.G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Apr; 66(4): 1587-94).

В ещё одном варианте осуществления могут быть обнаружены мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Vibrio cholerae* и *V. parahaemolyticus*. Последовательности, специфичные для *Vibrio cholerae* и *V. parahaemolyticus*, известны в уровне техники (см., например, Myers M.L., Panicker G., Bej A.K. PCR Detection of a Newly Emerged Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 Pathogen in Pure Cultures and Seeded Waters from the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Apr; 69(4):2194-200; Blackstone G.M., Nord-Strom J.L., Vickery M.C., Bowen M.D., Meyer R.F., DePaola A. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *J Microbiol Methods.* 2003 May; 53(2): 149-155; и Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Oct; 67(10):4685-93).

В следующем варианте осуществления могут быть обнаружены мишеневые полинуклеотиды, имеющие полинуклеотидные последовательности, соответствующие плесневым грибкам. Последовательности, специфичные для плесневых грибов, известны в уровне техники (см., например, Zur G., Shimon E., Hallerman E., Kashi Y. Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *J Food Prot.* 2002 sep; 65(9): 1433-40; Jimenez L., Smalls B., Ignar R. Use of PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples. *J Microbiol Methods.* 2000 Aug; 41(3):259-65; и Vanittanakom N., Vanittanakom P., Hay R.J. Rapid identification of *Penicillium marneffei* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene, *J Clin Microbiol.* 2002 May; 40(5): 1739-42).

Мишеневые полинуклеотиды могут иметь полинуклеотидные последовательности, соответствующие *Legionella*. Последовательности, специфичные для *Legionella*, известны в уровне техники (см., например, Aoki S., Hirakata Y., Miyazaki Y., Izumikawa K., Yanagihara K., Tomono K., Yamada Y., Tashiro T., Kohno S., Kamihira S. Detection of *Legionella* DNA by PCR of whole-blood samples in a mouse model. *J Med Microbiol.* 2003 Apr; 52(Pt 4):325-9; Raggam R.B., Leitner E., Muhlbauer G., Berg J., Stocher M., Grisold A.J., Marth E., Kessler H.H. Qualitative detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavages and induced sputa by automated DNA extraction and real-time polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2002 Oct; 191(2): 119-25; и Alexiou-Daniel S., Stylianakis A., Papoutsis A., Zorbas I., Papa A., Lambropoulos A.F., Antoniadis A. Application of polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in serum samples. *Clin Microbiol Infect.* 1998 Mar; 4(3):144-148).

мРНК ответа хозяина может быть также обнаружена при ответе на инфицирование пищевыми патогенами.

Д. Патогены водного происхождения.

Раскрытые здесь способы обеспечивают также быстрые и чувствительные диагностические тесты на присутствие и определение патогенов водного происхождения. Патогены водного происхождения включают в себя бактерии, вирусы и простейших. Примеры патогенов водного происхождения включают в себя *Enterococci*, *E. coli*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Cryptosporidium* и *Giardia*. Патогены водного происхождения могут быть получены из образцов воды, в том числе - но не ограничиваясь ими - из плавательных бассейнов, аквапарков, колодцев, бытовой питьевой воды, резервуаров, с берегов водоемов, из озер, океанов, ферм по разведению рыбы и моллюсков, сельскохозяйственной воды, воды для растворов, обработанной восстановлением воды, воды очистных сооружений, на круизных судах, на действующих космических кораблях и кипячёной воды.

Раскрытые здесь способы позволяют легко обнаруживать патогены, происходящие из воды. Могут быть, в частности, обнаружены конкретные штаммы. Например, среди прочих могут быть обнаружены конкретные штаммы *Enterococci*, включая *Enterococci avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudovium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, and *E. sulfurous*.

Любые полинуклеотиды, связанные с патогенами водного происхождения, могут быть обнаружены способами согласно настоящему изобретению. Данный способ может быть использован для обнаружения генов, связанных с *Enterococcus* spp., *E. coli*, *Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp., которые уже описаны (см., например, *Escherichia coli*: L. C. Heller, C. R. Davis, K. K. Peak, O. Wingfield, A. C. Cannons, P. T. Amuso, and J. Cattani. 2003, Comparison of Methods for DNA Isolation from Food Samples for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 69(3): 1844-6; Rahman, H. 2002. Multiplex PCR for detection of stx genes of *Escherichia coli*. *Indian J Med Res* 115:251-4, и E. Frahm and U.

Obst. 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods* 52(1): 123-31. *Bacillus* spp.: V. Mantynen and K. Lindstrom. 1998. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxigenic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 64(5): 1634-9. H. Schraft and M. W. Griffiths. 1995. Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* 61(1):98-102, и B. E. Ley, C. J. Linton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. Millar. 1998. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(4):247-53. *Pseudomonas* spp.: J. Xu, B. C. Millar, J. E. Moore, K. Murphy, H. Webb, A. J. Fox, M. Cafferkey, and M. J. Crowe. 2003. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis - rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol* 94(2): 197-206, B. E. Ley, C. J. Linton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. Millar. 1998. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(4):247-53, and K. Johnsen, O. Enger, C. S. Jacobsen, L. Thirup, and V. Torsvik. 1999. Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. *Appl Environ Microbiol* 65(4): 1786-8. *Enterococcus* spp.: C. R. Hudson, P. J. Fedorka-Cray, M. C. Jackson-Hall, and L. M. Hiott. 2003. Anomalies in species identification of enterococci from veterinary sources using a commercial biochemical identification system. *Lett Appl Microbiol* 36(4):245-50, S. M. Donabedian, L. A. Thal, E. Hersherberger, M. B. Perri, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. Rossiter, K. Gay, J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, P. Angulo, and M. J. Zervos. 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 41(3):1109-13, и S. B. Vakulenko, S. M. Donabedian, A. M. Voskresenskiy, M. J. Zervos, S. A. Lerner, and J. W. Chow. 2003. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1423-6. Например, конкретные гены *Enterococci*, которые могут быть идентифицированы раскрытыми здесь способами, включают в себя последовательности 16S рибосомной РНК, которые являются консервативными в *Enterococci*.

мРНК ответа хозяина может быть также обнаружена при ответе на инфицирование патогенами, имеющими водное происхождение.

Е. Агротерроризм.

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения конкретных патогенов, вовлечённых в агротерроризм. Примеры патогенов, имеющих клиническое значение, и ссыльные документы по основанному на PCR обнаружению перечислены ниже. Аналогии нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности специфичных PCR-праймерных последовательностей и могут быть использованы в комбинации во многих выполнениях настоящего изобретения, описанных ниже.

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы, например, таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* имеет очень низкую хозяйскую специфичность и, вероятно, инфицирует любое млекопитающее. Она также передаётся от птиц и обнаруживается фактически в каждой стране мира. Подобно большинству представителей *Apicomplexa*, *Toxoplasma* является облигатным интрацеллюлярным паразитом. У большинства людей, инфицированных *Toxoplasma*, заболевание бессимптомно. Однако при некоторых условиях, токсоплазмоз может вызвать серьёзную патологию, включая гепатит, пневмонию, слепоту и серьёзные неврологические нарушения. Праймеры, используемые в основанном на PCR обнаружении *Toxoplasma gondii*, в уровне техники известны (см., например, T. V. Aspinall, O. Marlee, J. E. Hyde, and P. P. Sims. 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction-food for thought? *Int J Parasitol* 32(9): 1193-9, T. V. Aspinall, E. C. Guy, K. E. Roberts, D. H. Joynton, J. E. Hyde, and P. F. Sims. 2003. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int J Parasitol* 33(1):97-103, I. Fuentes, J. M. Rubio, C. Ramirez, and J. Alvar. 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* 39(4): 1566-70, и M. R. Warnekulasuriya, J. D. Johnson, and R. E. Holliman. 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int J Food Microbiol* 45(3):211-5).

В другом варианте осуществления аналогии нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения *Shingella* spp., грамотрицательной бактерии. Праймеры, используемые в основанном на PCR обнаружении *Shingella* spp., в уровне техники известны (A. B. Hartman, Essiet, II, D. W. Isenbarger, and L. E. Lindler. 2003. Epidemiology of Tetracycline Resistance Determinants in *Shigella* spp. and Enteroinvasive *Escherichia coli*: Characterization and Dissemination of tet(A)-I. *J Clin Microbiol* 41(3): 1023-32, K. A. Lampel, and P. A. Orlandi. 2002. Polymerase chain reaction detection of invasive *Shigella* and *Salmonella enterica* in food. *Methods Mol Biol* 179:235-44, R. F. Wang, W. W. Cao, and C. E. Cerniglia. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol*

83(6):727-36, и K. A. Lampel, J. A. Jagow, M. Trucksess, and W. E. Hill. 1990. Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Appl Environ Microbiol* 56(6): 1536-40).

В следующем варианте осуществления аналогии нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения *Cyclospora cayetanensis*. *Cyclospora cayetanensis* является одноклеточным паразитом, слишком маленьким, чтобы его можно было видеть в микроскоп. О первых известных случаях заболевания человека, вызванного инфекцией *Cyclospora* (т.е. циклоспориоз), сообщалось в 1979 г. Более часто о подобных случаях стали сообщать в середине 1980-х. В последние несколько лет о вспышках циклоспориоза сообщалось в Соединённых Штатах и Канаде. *Cyclospora* распространяется через употребление воды или пищи, заражённой испражнениями. Вспышки циклоспориоза связывают с различными типами сырых продуктов. *Cyclospora* требуется время (дни или недели) после прохождения в пищеварительный тракт, чтобы стать инфекционной. Поэтому маловероятно, чтобы *Cyclospora* передавалась прямо от одного человека другому.

Праймеры, используемые в основанном на PCR обнаружении *Cyclospora cayetanensis*, известны в уровне техники (см., например, M. L. Eberhard, N. J. Pieniazek, and M. J. Arrowood. 1997. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. *Arch Pathol Lab Med* 121(8):792-7, N. J. Pieniazek, S. B. Slemenda, A. J. da Silva, E. M. Alfano, and M. J. Arrowood. 1996. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg Infect Dis* 2(4):357-9, W. Quintero-Betancourt, E. R. Peele, and J. B. Rose. 2002. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J Microbiol Methods* 49(3):209-24, и M. Varma, J. D. Hester, F. W. Schaefer, 3rd, M. W. Ware, and H. D. Lindquist. 2003. Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 53(1):27-36)

Ф. Диагностика болезней.

Раскрытые здесь способы обеспечивают также быстрый и чувствительный тест на присутствие генов (например, аллелей, связанных с болезнями) или изменённой экспрессии генов. Обнаруживаемые генные последовательности могут быть вовлечены в генетические болезни, нарушения и предрасположенности. Один пример мишеневых полинуклеотидов включает в себя специфические геномные последовательности, в том числе мутации, полиморфизмы, вставки и делеции. Другим примером мишеневых полинуклеотидов являются полинуклеотидные последовательности, которые изменяют генную экспрессию (например, экспрессию, регулируемую против или по ходу транскрипции) при конкретном заболевании или нарушении. Примеры генов, связанных с заболеваниями и нарушениями включают в себя - но не ограничиваются ими - гены, вовлечённые в рак, фиброз мочевого пузыря и синдром Дауна и в заболевания, связанные с полиморфизмами и мутациями. Могут быть также идентифицированы унаследованный гемахроматоз, фактор 11, фактор V и HLA-генотипы тканевых трансплантантов.

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемых для основанного на PCR обнаружения мишеневых полинуклеотидов, вовлечённых в рак или изменённую клеточную пролиферацию. Мишеневые полинуклеотиды, соответствующие генам, вовлечённым в рак или изменённую клеточную пролиферацию, могут быть обнаружены. Многочисленные гены, вовлечённые в рак, известны в уровне техники.

В одном варианте осуществления аналогии нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения рака поджелудочной железы. Праймеры, используемые в основанном на PCR обнаружении рака поджелудочной железы, такие как DPC4, известны в уровне техники (см., например, V. M. Barbera, M. Martin, L. Marinosa, A. Murine, A. Carrato, F. X. Real, and M. Fabre. 2000. The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of DCC and DPC4 expression. *Biochim Biophys Acta* 1502(2):283-96, D. Bartsell, P. Barth, D. Bastian, A. Ramaswamy, B. Gerdes, B. Chaloupka, Y. Deiss, B. Simon, and A. Schudy. 1999. Higher frequency of DPC4/Smad4 alterations in pancreatic cancer cell lines than in primary pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Lett* 139(1):43-9, и D. Bartsch, S. A. Hahn, K. D. Danichevski, A. Ramaswamy, D. Bastian, H. Galehdari, P. Barth, W. Schmiegel, B. Simon, and M. Rothmund. 1999. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors. *Oncogene* 18(14):2367-71).

В другом варианте осуществления аналогии нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения рака шейки матки. Мишеневые полинуклеотиды, соответствующие всем или части генов, связанных с раком шейки матки, также могут быть идентифицированы (см., например, H. X. Si, S. W. Tsao, C. S. Poon, L. D. Wang, Y. C. Wong, and A. L. Cheung. 2003. Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 103(4):496-500, и P. E. Castle, M. Schiffman, P. E. Gravitt, H. Kendall, S. Fishman, H. Dong, A. Hildesheim, R. Herrero, M. C. Bratti, M. E. Sherman, A. Lorincz, J. E. Schusler, and R. D. Burk. 2002. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol* 68(3):417-23).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемых для основанного на PCR обнаружения рака молочной железы. Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, имеющие последовательности

сти, соответствующие всем или части генов, связанных с раком молочной железы (см., например, C. J. Min, L. Tafra, and K. M. Verbanac. 1998. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Res* 58(20):4581-4, M. R. Abbaszadegan, J. P. Struwing, K. M. Brown, J. V. Snider, F. Goodsaid, R. Gore-Langton, and M. R. Hughes. 1997. Automated detection of prevalent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes, using a fluorogenic PCR allelic discrimination assay. *Genet Test* 1(3): 171-80, and G. Tamura, C. Maesawa, Y. Suzuki, M. Kashiwaba, M. Ishida, K. Saito, and R. Satodate. 1994. Improved detection of loss of heterozygosity at retinoblastoma gene locus in human breast carcinoma. *Pathol Int* 44(1):34-8).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения меланомы. Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, имеющие последовательности, соответствующие всем или части генов, связанных с меланомой (см., например, M. L. Gonzalgo, C. M. Bender, E. H. Hou, J. M. Glendening, J. F. Flores, G. J. Walker, N. K. Hayward, P. A. Jones, and J. W. Fountain. 1997. Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res* 57(23):5336-47, J. Chen, E. S. Robinson, J. Atencio, Z. Wang, S. Kazianis, L. D. Coletta, R. S. Nairn, and J. R. McCarrey. 2001. Characterization of the CDKN2A and ARF genes in UV-induced melanocytic hyperplasias and melanomas of an opossum (*Monodelphis domestica*). *Mol Carcinog* 31(1): 16-26, и P. M. Pollock, J. Welch, and N. K. Hayward. 2001. Evidence for three tumor suppressor loci on chromosome 9p involved in melanoma development. *Cancer Res* 61(3): 1154-61).

Кроме того, аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения рака прямой кишки. Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, имеющие последовательности, соответствующие всем или части генов, связанных с раком прямой кишки (см., например, S. Aoki, Y. Takagi, M. Hayakawa, K. Yamaguchi, M. Futamura, K. Kunieda, and S. Saji. 2002. Detection of peritoneal micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction targeting carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 21(4):555-62, R. Shtoyerman-Chen, E. Friedman, A. Figer, M. Carmel, Y. Patael, P. Rath, H. H. Fidder, S. Bar-Meir, and L. Theodor. 2001. The I1307K APC polymorphism: prevalence in non-Ashkenazi Jews and evidence for a founder effect. *Genet Test* 5(2): 141-6, и W. M. Smith, N. J. Van Orsouw, E. A. Fox, R. D. Kolodner, J. Vijg, and C. Eng. 1998. Accurate, high-throughput "snapshot" detection of hMLH1 mutations by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genet Test* 2(1):43-53).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения ретинобластомы. Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, имеющие последовательности, соответствующие всем или части генов, связанных с ретинобластомой (см., например, I. Acikbas, I. Keser, S. Kilic, H. Bagci, G. Karpuzoglu, and G. Luleci. 2002. Detection of LOH of the RB1 gene in bladder cancers by PCR-RFLP. *Urol Int* 68(3): 189-92, G. Tamura, C. Maesawa, Y. Suzuki, M. Kashiwaba, M. Ishida, K. Saito, and R. Satodate. 1994. Improved detection of loss of heterozygosity at retinoblastoma gene locus in human breast carcinoma. *Pathol Int* 44(1):34-8, и D. Lohmann, B. Horsthemke, G. Gillessen-Kaesbach, F. H. Stefani, and H. Hotler. 1992. Detection of small RB1 gene deletions in retinoblastoma by multiplex PCR and high-resolution gel electrophoresis. *Hum Genet* 89(1):49-53).

В следующем варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров или их фрагментов, используемые для основанного на PCR обнаружения гемофилии. Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, имеющие последовательности, соответствующие всем или части генов, связанных с гемофилией (см., например, Mannucci, P. M. 2002. Hamwasserman lecture: hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 1-9, и Citron, M., L. Godmilow, T. Ganguly, and A. Ganguly. 2002. High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 20(4):267-74).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с фенилкетилурией (ПКУ) (см., например, N. Pronina, S. Giannattasio, P. Latanzio, R. Lugovska, P. Vevere, and A. Kornejeva. 2003. The molecular basis of phenylketonuria in Latvia. *Hum Mutat* 21(4):398-9, H. Sueoka, M. Nagao, and 8. Chiba. 2000. Rapid mutation screening of phenylketonuria by polymerase chain reaction-linked restriction enzyme assay and direct sequence of the phenylalanine hydroxylase gene: clinical application in northern Japan and northern China. *Genet Test* 4(3):249-56, и R. C. Eisensmith, A. A. Goltsov, and S. L. Woo. 1994. A simple, rapid, and highly informative PCR-based procedure for prenatal diagnosis and carrier screening of phenylketonuria. *Prenat Diagn* 14(12): 1113-8). Alford, R. L., T. Ashizawa, J. Jankovic, C. T. Caskey, and C. S. Richards. 1996. Molecular detection of new mutations, resolution of ambiguous results and complex genetic counseling issues in Huntington disease. *Am J Med Genet* 66(3):281-6, Vnenchak-Jones, C. L. 2003. Fluorescence PCR and GeneScan analysis for the detection of CAG repeat expansions associated with Huntington's disease. *Methods Mol Biol* 217:101-8, and I. Panagopoulos, C. Lassen, U. Kristoffersson, and P. Aman. 1999. A novel PCR-based approach for the detection of the Huntington disease associated

trinucleotide repeat expansion. *Hum Mutat* 13(3):232-6).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с болезнью Хантингтона, например, вследствие увеличенного числа CAG-повторов (см., например, R. L. Alford, T. Ashizawa, J. Jankovic, C. T. Caskey, and C. S. Richards. 1996. Molecular detection of new mutations, resolution of ambiguous results and complex genetic counseling issues in Huntington disease. *Am J Med Genet* 66(3):281-6, C. L. Vnencak-Jones, 2003. Fluorescence PCR and GeneScan analysis for the detection of CAG repeat expansions associated with Huntington's disease. *Methods Mol Biol* 217:101-8, and I. Panagopoulos, C. Lassen, U. Kristoffersson, and P. Aman. 1999. A novel PCR-based approach for the detection of the Huntington disease associated trinucleotide repeat expansion. *Hum Mutat* 13(3):232-6).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с гемофилией (см., например, P. M. Mannucci, 2002. Hamwasserman lecture: hemophilia and related bleeding disorders: a story of dismay and success. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 1-9, и M. Citron, L. Godmilow, T. Ganguly, and A. Ganguly. 2002. High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 20(4):267-74).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с болезнью Тей-Сакса (см., например, J. E. Rice, J. A. Sanchez, K. E. Pierce, and L. J. Wangh. 2002. Real-time PCR with molecular beacons provides a highly accurate assay for detection of Tay-Sachs alleles in single cells. *Prenat Diagn* 22(12): 1130-4, S. Tamasu, H. Nishio, H. Ayaki, M. J. Lee, M. Mizutori, Y. Takeshima, H. Nakamura, M. Matsuo, T. Maruo, and K. Sumino. 1999. Prenatal diagnosis of a Japanese family at risk for Tay-Sachs disease. Application of a fluorescent competitive allele-specific polymerase chain reaction (PCR) method. *Kobe J Med Sci* 45(6):259-70, и Sermon, K. W. Lissens, Z. P. Nagy, A. Van Steirteghem, and I. Liebaers. 1995. Simultaneous amplification of the two most frequent mutations of infantile Tay-Sachs disease in single blastomeres. *Hum Reprod* 10(8):2214-7).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с множественным склерозом (МС) (см., например, S. Lauwers, H. Vander Heyden, and B. Rombaut. 2002. Screening and optimisation of an ELISA method for the quantitative detection of enterovirus specific RT-PCR products by means of a two-level experimental design. *J Pharm Biomed Anal* 29(4):659-68, H. Perron, J. A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P. W. Tuke, C. Voisset, J. L. Blond, B. Lalande, J. M. Seigneurin, and B. Mandrand. 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(14):7583-8, и B. S. Kuhne and P. Oschmann. 2002. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* 33(5): 1078, 1080-2, 1084 passim).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с лимфомой Буркитта (см., например, Y. Wu, Y. Chen, J. Xu, and L. Lu. 2002. Anticancer activities of curcumin on Human Burkitt's lymphoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 24(4):348-52, K. Basso, E. Frascella, L. Zanesco, and A. Rosolen. 1999. Improved long-distance polymerase chain reaction for the detection of t(8;14)(q24;q32) in Burkitt's lymphomas. *Am J Pathol* 155(5):1479-85, и M. Asada, T. Miyashita, F. Bessho, N. Kobayashi, and S. Mizutani. 1991. Malignant cell detection in Burkitt's lymphoma using third- complementarity-determining region (CDRIII), clone-specific probe developed by sequencing DNA from stored slides. *Jpn J Cancer Res* 82(7):848-53).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с фиброзом мочевого пузыря (см., например, Tomaiuolo, R., M. Spina, and G. Castaldo. 2003. Molecular diagnosis of cystic fibrosis: comparison of four analytical procedures. *Clin Chem Lab Med* 41(1):26-32, M. C. Gonzalez-Gonzalez, M. Garcia-Hoyos, M. J. Trujillo, M. Rodriguez de Alba, I. Lorda-Sanchez, J. Diaz-Recasens, E. Gallardo, C. Ayuso, and C. Ramos. 2002. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 22(10):946-8, и C. Corbetta, M. Seia, A. Bassotti, A. Ambrosioni, A. Giunta, and R. Padoan. 2002. Screening for cystic fibrosis in newborn infants: results of a pilot programme based on a two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the Italian population. *J Med Screen* 9(2):60-3).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с начинающимся в детстве диабетом (см., например, T. Knerl, R. Repp, J. Dotsch, N. Gratzki, J. Hanze, T. Kapellen, and W. Rascher. 1999. Quantitation of gene expression by real-time PCR disproves a "retroviral hypothesis" for childhood-onset diabetes mellitus. *Pediatr Res* 46(1):57-60, S. Lauwers, Y. Vander Heyden, and B. Rombaut. 2002. Screening and optimisation of an ELISA method for the quantitative detection of enterovirus specific RT-PCR products by means of a two-level experimental design. *J Pharm Biomed Anal* 29(4):659-68, и K. Salminen, K. Sadeharju, M. Lormrot, P. Vahasalo, A. Kupila, S. Korhonen, J. Ilonen, O. Simell, M. Knip, and H. Hyoty. 2003. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol* 69(1):91-8).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с болезнью Паркинсона (см., например, J. Hoenicka, L. Vidal, B. Morales, I. Ampuero, F. J. Jimenez-Jimenez, J. Berciano, T. del Ser, A. Jimenez, P. G. Ruiz, and J. G. de Yebenes. 2002.

Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol* 59(6):966-70; C. B. Lucking and A. Brice. 2003. Semiquantitative PCR for the detection of exon rearrangements in the Parkin gene. *Methods Mol Biol* 217:13-26; W. D. Le, P. Xu, J. Jankovic, H. Jiang, S. H. Appel, R. G. Smith, and D. K. Vassilatis. 2003. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 33(1):85-9; и Foroud, T., S. K. Uniacke, L. Liu, N. Pankratz, A. Rudolph, C. Halter, C. Shults, K. Marder, P. M. Conneally, and W. C. Nichols. 2003. Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* 60(5):796-801).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с болезнью Альцгеймера (см., например, Maresh, G. A., D. Ezezyilmaz, C. E. Murry, D. Nochlin, and A. D. Snow. 1996. Detection and quantitation of perlecan mRNA levels in Alzheimer's disease and normal aged hippocampus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Neurochem* 67(3): 1132-44; и M. J. Smith, R. J. Gardner, M. A. Knight, S. M. Forrest, K. Beyreuther, E. Storey, C. A. McLean, R. G. Cotton, R. Cappal, and C. L. Masters. 1999. Early-onset Alzheimer's disease caused by a novel mutation at codon 219 of the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 10(3):503-7).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с тромбозом (см., например, Sanders Sevall, J. 2000. Factor V Leiden genotyping using real time fluorescent polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 14(4):249-53; Ferreira-Gonzalez, A., L. M. Fisher, C. M. Lehman, M. H. Langley, D. H. Lofland, Q. Xia, N. X. Nguyen, D. Modesto, J. B. Willoughby, D. S. Wilkinson, and C. T. Garrett. 1997. Detection of a common mutation in factor V gene responsible for resistance to activate protein C causing predisposition to thrombosis. *J Clin Lab Anal* 11(6):328-35; Warshawsky, I., C. Hren, L. Sercia, B. Shadrach, S. R. Deitcher, E. Newton, and K. Kottke-Marchant. 2002. Detection of a novel point mutation of the prothrombin gene at position 20209. *Diagn Mol Pathol* 11(3):152-6).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с подверженностью туберкулезу (см., например, Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun.*, 2003 Jan; 4(1):4-11; Awomoyi A.A., Marchant A., Howson J.M., McAdam K.P., Blackwell J.M., Newport M.J. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis.* 2002 Dec 15;186(12):1808-14. Bellamy R. NRAMP1 and susceptibility to tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002 Sep;6(9):747).

Могут быть отобраны мишеневые полинуклеотиды, которые имеют последовательности, соответствующие генам, связанным с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) (HIV) (см., например, Ifergan I., Bernard N.F., Bruneau J., Alary M., Tsoukas C.M., Roger M. Allele frequency of three functionally active polymorphisms of the MDR-1 Gene in high-risk HIV-negative and HIV-positive Caucasians. *AIDS.* 2002 Nov 22; 16(17):2340-2; и Farzan M., Mirzabekov T., Kolchinsky P., Wyatt R., Cayabyab M., Gerard N.P., Gerard C., Sodroski J., Choe H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 1999 Mar 5; 96(5):667-76).

Раскрытые здесь способы обеспечивают также быстрые и чувствительные диагностические тесты на присутствие генов или изменённой экспрессии генов в генетических анализах другого рода. Например, они могут быть использованы для определения идентичности образцов человека, например, в тестах по установлению отцовства, судебной медицине или при сравнении подходящих или неподходящих донорских органов. Диагностика может также проводиться не на образцах от человека, а, например, для установления родословной скота.

G. Болезни, передаваемые половым путём.

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности или фрагменты последовательностей праймеров, используемые для основанного на PCR обнаружения патогенов, которые вызывают болезни, передаваемые половым путём (STDs). Примеры STDs, имеющих клиническое значение, и ссылочные документы по обнаружению болезней на основе PCR перечислены ниже. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности специфических последовательностей PCR-праймеров и могут быть использованы в комбинации во многих вариантах осуществления раскрытого здесь изобретения.

В одном варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются таким образом, что имеют последовательности праймеров, используемые для основанного на PCR обнаружения хламидий. Многие такие праймеры известны в уровне техники (см., например, E. H. Koumans, C. M. Black, L. E. Markowitz, E. Unger, A. Pierce, M. K. Sawyer, and J. R. Papp. 2003. Comparison of methods for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* using commercially available nucleic acid amplification tests and a liquid pap smear medium. *J Clin Microbiol* 41(4): 1507-11; M. Puolakkainen, E. Hiltunen-Back, T. Reunala, S. Suhonen, P. Lahtenmaki, M. Lehtinen, and J. Paavonen. 1998. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain reaction test, in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol* 36(6): 1489-93; Betsou F., Beaumont K., Sueur J.M., Orfila J. Construction and evaluation of internal control DNA for PCR amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA from urine samples. *J Clin Microbiol.* 2003 Mar; 41(3):1274-6; Knox J., Tabrizi S.N., Miller P., Petoumenos K., Law M., Chen S., Garland S.M. Evaluation of self-collected samples in contrast to practitioner-collected samples for detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* by polymerase chain reac-

tion among women living in remote areas. *Sex Transm Dis*. 2002 Nov; 29(11):647-54; Mygind T., Birkelund S., Birkebaek N., Oestergaard L., Jensen J., Christiansen G. Determination of PCR efficiency in chelex-100 purified clinical samples and comparison of real-time quantitative PCR and conventional PCR for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 2002 Jul 9; 2(1): 17).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются таким образом, что имеют последовательности праймеров, используемые для основанного на PCR обнаружения *Treponema pallidum*. Примеры праймеров, используемых для идентификации *Treponema pallidum* с использованием основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, A. Centurion-Lara, C. Castro, J. M. Shaffer, W. C. Van Voorhis, C. M. Marra, and S. A. Lukehart. 1997. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 35(6): 1348-52; A. A. Marfin, H. Liu, M. Y. Sutton, B. Steiner, A. Pillay, and L. E. Markowitz. 2001. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 40(4): 163-6; S. L. Orton, H. Liu, R. Y. Dodd, and A. E. Williams. 2002. Prevalence of circulating *Treponema pallidum* DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis tests. *Transfusion* 42(1):94-9).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются таким образом, что имеют последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения ВИЧ. Примеры праймеров, используемых для идентификации ВИЧ с использованием основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, L. Gibney, M. Macaluso, K. Kirk, M. S. Hassan, J. Schwelbke, S. H. Vermund, and P. Choudhury. 2001. Prevalence of infectious diseases in Bangladeshi women living adjacent to a truck stand: HIV/STD/hepatitis/genital tract infections. *Sex Transm Infect* 77(5):344-50; Spinillo, A., M. Debiaggi, F. Zara, R. Maserati, F. Polatti, and A. De Santolo. 2001. Factors associated with nucleic acids related to human immunodeficiency virus type 1 in cervico-vaginal secretions. *Bjog* 108(6):634-41).

В ещё одном варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются таким образом, что имеют последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения папиллом авируса человека (HPV). Примеры праймеров, используемых для идентификации HPV с использованием основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, R. L. Winer, S. K. Lee, J. P. Hughes, D. E. Adam, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 157(3):218-26; J. E. Levi, B. Kleter, W. G. Quint, M. C. Fink, C. L. Canto, R. Matsubara, I. Linhares, A. Segurado, B. Vanderborght, J. E. Neto, and L. J. Van Dorn. 2002. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus- infected women in Brazil. *J Clin Microbiol* 40(9):3341-5; M. Skerlev, M. Grce, M. Sirotkoviae-Skerlev, K. Husnjak, and J. Lipozencic. 2002. Human papillomavirus male genital infections: clinical variations and the significance of DNA typing. *Clin Dermatol* 20(2): 173-8).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются таким образом, что имеют последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения *Neisseria gonorrhoeae*. Примеры праймеров, используемых для идентификации *Neisseria gonorrhoeae* с использованием основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, C. S. Mgone, T. Lupiwa, and W. Yeka. 2002. High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and multiple sexually transmitted diseases among rural women in the Eastern Highlands Province of Papua New Guinea, detected by polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis* 29(12):775-9; J. P. Gomes, L. Tavira, F. Expoto, E. Prieto, and M. A. Catry. 2001. *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in patients attending STD and family planning clinics in Bissau, Guinea-Bissau. *Acta Trop* 80(3):261-4; D. J. Diemert, M. D. Libman, and P. Lebel. 2002. Confirmation by 16S rRNA PCR of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 40(11):4056-9).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются таким образом, что имеют последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения генитального герпеса. Примеры праймеров, используемых для идентификации генитального герпеса с использованием основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, M. H. Wolff, J. Schmitt, M. Rahaus, H. Dudda, and W. Hatzmann. 2002. Clinical and subclinical reactivation of genital herpes vims. *Intervirology* 45(1):20-3; Wald, A. 2002. Testing for genital herpes: how, who, and why. *Curr Clin Top Infect Dis* 22:166-80; Scoular, A. 2002. Using the evidence base on genital herpes: optimising the use of diagnostic tests and information provision. *Sex Transm Infect* 78(3): 160-5).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения *Trichomonas vaginalis*. Примеры праймеров, используемых для идентификации *Trichomonas vaginalis* с использованием основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, Wendel, K. A., E. J. Erbeling, C. A. Gaydos, and A. M. Rompalo. 2002. *Trichomonas vaginalis* polymerase chain reaction compared with standard diagnostic and therapeutic protocols for detection and treatment of vaginal trichomoniasis. *Clin Infect Dis* 35(5):576-80; K. A. Wendel, E. J. Erbeling, C. A. Gaydos, and A. M. Rompalo. 2003. Use of urine polymerase chain reaction to define the prevalence and clinical presentation of *Trichomonas vaginalis* in men attending an STD clinic. *Sex Transm Infect* 79(2): 151-153).

Наконец, аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для обнаружения общих STDs. Примеры праймеров, используемых для идентификации STDs с использованием основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, S. Mitrani-Rosenbaum, R. Tsvieli, O. Lavie, R. Boldes, E. Anteby, S. Shimonovitch, T. Lazarovitch, and A. Friedmann. 1994. Simultaneous detection of three common sexually transmitted agents by polymerase chain reaction. *Am J Obstet: Gynecol* 171(3):784-90).

Н. Устойчивость к антибиотикам.

Способы, композиции и системы анализа могут быть использованы для обнаружения присутствия или изменения экспрессии генов, придающих устойчивость к антибиотикам. Мишеневый полинуклеотид может соответствовать генам, которые придают антибиотическую устойчивость к патогену. Альтернативно, мишеневый полинуклеотид может соответствовать гену хозяина, имеющему изменённый метаболизм, который может влиять на действенность антибиотика.

Примеры генов, экспрессирующих устойчивость к антибиотикам, можно найти в следующих ссылочных документах. Приводимые примеры не ограничиваются перечисленными примерами. Гены, такие как кодирующие бета-лактамазы, передают устойчивость к антибиотикам, в том числе - но не ограничиваясь ими - пенициллин, эритромицин, цефотаксим, ампициллин, пиперациллин, цефоперазон, цефазидим, цефепим, моксолактam, имипенем (см., например, Livermore, D.M. 1995. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin. Microbiol. Reviews*. 8:557-584, Hsueh, P., Teng, L., Lee, L., Yang, P., Ho, S., and Luh, K., 1999. Dissemination of High-Level Penicillin-, Extended-Spectrum Cephalosporin-, and Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Clones in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 37:221-224, Setchanova, L., and Tomasz, A. 1999. Molecular Characterization of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Bulgaria. *J. Clin. Microbiol.* 37:638-648, Wichelhaus, T.A., Kern, S., Schafer, V., Brade, V. 1999. Rapid Detection of Epidemic Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 37:690-693, и Jacoby G.A. 1994. Genetics of Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:suppl.1:2-11).

Другие неограничивающие примеры генов, придающих устойчивость к антибиотикам, включают в себя хинолоновые гены устойчивости, которые придают устойчивость к таким антибиотикам, как цефпрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, энноксацин, спарфлоксацин (см., например, Margerrison, E. E. C, Hopewell, R., and Fisher, L.M. 1992. Nucleotide Sequence of the *Staphylococcus aureus* *gyrB-gyrA* Locus Encoding the DNA Gyrase A and B Proteins. *J. Bacteriol.* 174:1596-1603, McWhinney, P.H.M., Patel, S., Whiley, R.A., Hardie, J.M., Gillespie, S.H., and Kibbler, C.C. 1993. Activities of Potential Therapeutic and Prophylactic Antibiotics against Blood Culture Isolates of Viridans Group *Streptococci* from Neutropenic Patients Receiving Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37:2493-2495, и Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., and Konno, M. 1990. Nucleotide Sequence and Characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* Gene, Which Confers Resistance to Quinolones. *J. Bacteriol.* 172:6942-6949).

Дополнительные примеры генов устойчивости к антибиотикам включают гликопептидные гены устойчивости, которые передают устойчивость к таким антибиотикам, как вакомицин и тейкопланин (см., например, Tremlett, C.H., Brown, D.F.J., and Woodford, N. 1999. Variation in Structure and Location of VanA Glycopeptide Resistance Elements among *Enterococci* from a Single Patient. *J. Clin. Microbiol.* 37:818-820, and Arthur, M., Depardieu, P., Molinas, C., Reynolds, P., and Courvalin, P. 1995. The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*, 154 (1995) 87-92), аминогликозидные гены устойчивости, которые передают устойчивость к таким антибиотикам, как тобрамицин, гентамицин, стрептомицин, канамицин, амикацин (Galimand M., Lambert, T., Gerbaud, G., and Courvalin, P. 1993. Characterization of the *aac(6')-Ib* gene Encoding an Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase in *Pseudomonas aeruginosa* BM2656. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37:1456-1462, Lambert, T., Gerbaud, G., and Courvalin, P. 1994. Characterization of Transposon Tn1528, Which Confers Amikacin Resistance by Synthesis of Aminoglycoside 3'-O-Phosphotransferase Type VI. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38:702-706, и Shaw, K.J., Munayyer, H., Rather, P.N., Hare, R.S., and Miller, G.H. 1993. Nucleotide Sequence Analysis and DNA Hybridization Studies of the *ant(4')-IIa* Gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 37:708-714).

В некоторых случаях имеются особые типы устойчивости, представляющие большой интерес. Они включают в себя метициллин-устойчивые *Staphylococcus aureus* (см., например, Ito, T., K. Okuma, X. X. Ma, H. Yuzawa, and K. Hiramatsu. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Update* 6(1):41-52, Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Mamyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357(9264): 1225-40, и R. A. Skurray, and N. Firth. 1997. Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci. *Ciba Found Symp* 207:167-83).

Другие гены, придающие устойчивость к антибиотикам, которые могут быть обнаружены, включают в себя туберкулезные гены устойчивости к антибиотикам (см., например, I. Mokrousov, T. Otten, M. Filipenko, A. Vyazovaya, E. Chrapov, E. Limeschenko, L. Steklova, B. Vyshnevskiy, and O. Narvskaya. 2002.

Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting *katG* codon 315 variation. *J Clin Microbiol* 40(7):2509-12; G. Gong, H. Lee, G. H. Kang, Y. H. Shim, J. Huh, and S. K. Khang. 2002. Nested PCR for diagnosis of tuberculous lymphadenitis and PCR-SSCP for identification of rifampicin resistance in fine-needle aspirates. *Diagn Cytopathol* 26(4):228-31; D. Garcia de Viedma, M. del Sol Diaz Infantes, F. Lasala, F. Chaves, L. Alcala, and E. Bouza. 2002. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 40(3):988-95).

I. Генетический скрининг на предрасположенность к реакциям на лекарства.

Способы, композиции и системы анализа могут быть использованы для обнаружения генов, придающих предрасположенность к реакциям на лекарства. Мишеневый полинуклеотид может соответствовать любой полинуклеотидной последовательности, которая придаёт предрасположенность к реакциям на лекарства. Мишеневый полинуклеотид может соответствовать последовательностям, включённым в предрасположенность к лекарствам, которые влияют на кардиоваскулярную систему (см., например, C. Dudley, B. Keavney, B. Casadei, J. Conway, R. Bird, and P. Ratcliffe. 1996. Prediction of patient responses to antihypertensive drugs using genetic polymorphisms: investigation of renin-angiotensin system genes. *J Hypertens* 14(2):259-62; P. R. Lima, J. A. Gontijo, J. B. Lopes de Faria, F. F. Costa, and S. T. Saad. 1997. Band 3 Campinas: a novel splicing mutation in the band 3 gene (AE1) associated with hereditary spherocytosis, hyperactivity of Na⁺/Li⁺ countertransport and an abnormal renal bicarbonate handling. *Blood* 90(7):2810-8; T. Sakaeda, T. Nakamura, M. Horinouchi, M. Kakumoto, N. Ohmoto, T. Sakai, Y. Morita, T. Tamura, N. Aoyama, M. Hirai, M. Kasuga, and K. Okumura. 2001. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 18(10): 1400-4).

Мишеневый полинуклеотид может также соответствовать генам и другим полинуклеотидным последовательностям, вовлечённым в предрасположенность к психиатрическим лекарствам (см., например, D. Nikoloff, J. C. Shim, M. Fairchild, N. Patten, B. A. Fijal, W. H. Koch, A. MacPherson, D. Flockhart, Y. R. Yoon, J. S. Yoon, Y. H. Kin, and J. G. Shin. 2002. Association between CYP2D6 genotype and tardive dyskinesia in Korean schizophrenics. *Pharmacogenomics J* 2(6):400-7; L. Bertilsson, M. L. Dahl, and G. Tybring. 1997. Pharmacogenetics of antidepressants: clinical aspects. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 391: 14-21; S. Chen, W. H. Chou, R. A. Blouin, Z. Mao, L. L. Humphries, Q. C. Meek, J. R. Neill, W. L. Martin, L. R. Hays, and P. J. Wedlund. 1996. The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharmacol Ther* 60(5): 522-34).

Мишеневый полинуклеотид может также соответствовать последовательностям генов или другим полинуклеотидным последовательностям, соответствующим предрасположенности к обезболивающим препаратам (см., например, M. J. Torres-Galvan, N. Ortega, F. Sanchez-Garcia, C. Blanco, T. Carrillo, and J. Quiralte. 2001. LTC₄-synthase A-444C polymorphism: lack of association with NSAID-induced isolated periorbital angioedema in a Spanish population. *Ann Allergy Asthma Immunol* 87(6):506-10).

J. Гены, вовлечённые в эффективную реакцию на лекарства.

Способы, композиции и системы анализа согласно настоящему изобретению могут быть использованы для генетического тестирования как потенциального указания реакции на лекарственное средство. Способы, композиции и анализы могут быть использованы для определения того, работает ли применяемое лечение, или развивается устойчивость (толерантность). Тестирование генной экспрессии могло бы быть использовано для определения того, становится ли или станет опухоль устойчивой к лечению. Основанное на генах диагностическое тестирование может также включать в себя предварительный скрининг вероятности развития болезни или нарушения в будущем, предварительный скрининг на генетическую предрасположенность к определённым типам рака и идентификацию генетического полиморфизма.

Могут быть сконструированы аналоги нуклеиновой кислоты для обнаружения присутствия и экспрессии конкретных генов. В одном аспекте, настоящие способы могут быть использованы для определения уровня экспрессии ферментов, которые могут метаболизировать связанное лекарство. Полиморфные ферменты изменяют действие лекарств и, таким образом, изменяют их способность использоваться в лечении. Можно обнаружить генетический полиморфизм в генах, который влияет на реакцию связанного лекарства и, таким образом, влияет на способность лекарства использоваться как лекарственное средство.

В одном варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих цитохром CYP2D6. Цитохром CYP2D6 может метаболизировать дебризокин, который используется для лечения антигипертензии. Увеличенная экспрессия цитохрома CYP2D6 указывает на устойчивость к дебризокину (см., например, A. Mahgoub, J. R. Idle, L. G. Dring, R. Lancaster, and R. L. Smith. 1977. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2 (8038): 584-6; and A. Wennerholm, I. Johansson, A. Y. Massele, M. Lande, C. Alm, Y. Aden-Abdi, M. L. Dahl, M. Ingelman-Sundberg, L. Bertilsson, and L. L. Gustafsson. 1999. Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 9 (6): 707-14).

Наличие экспрессии цитохрома CYP2D6 может быть использовано для определения устойчивости к спартеину, который используется для лечения послеоперационных болей (см., например, M. Eichelbaum, N. Spannbrucker, B. Steincke, and H. J. Dengler. 1979. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new phar-

macogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 16 (3): 183-7; F. Broly, D. Marez, N. Sabbagh, M. Legrand, S. Millecamps, J. M. Lo Guidice, P. Boone, and U. A. Meyer. 1995. An efficient strategy for detection of known and new mutations of the CYP2D6 gene using single strand conformation polymorphism analysis. *Pharmacogenetics* 5 (6): 373-84).

Наличие экспрессии цитохрома CYP2D6 может быть использовано для определения устойчивости к нортриптилину, который используется для лечения депрессии и сердечно-сосудистой болезни (см., например, P. Dalen, M. L. Dahl, M. L. Ruiz, J. Nordin, and L. Bertilsson. 1998. 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther* 63 (4): 444-52; Q. Y. Yue, Z. H. Zhong, G. Tybring, P. Dalen, M. L. Dahl, L. Bertilsson, and F. Sjoqvist. 1998. Pharmacokinetics of nortriptyline and its 10-hydroxy metabolite in Chinese subjects of different CYP2D6 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 64 (4): 384-90).

Наличие экспрессии цитохрома CYP2D6 может быть использовано для определения изменённого метаболизма кодеина (см., например, S. H. Sindrup and K. Brosen. 1995. The pharmacogenetics of codeine hypoalgesia. *Pharmacogenetics* 5 (6): 335-46; O. Mortimer, K. Persson, M. G. Ladona, D. Spalding, U. M. Zanger, U. A. Meyer, and A. Rane. 1990. Polymorphic formation of morphine from codeine in poor and extensive metabolizers of dextromethorphan: relationship to the presence of immunoidentified cytochrome P-450IID1. *Clin Pharmacol Ther* 47(1): 27-35).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих цитохром CYP2C9. Цитохром CYP2C9 может метаболизировать варфарин, который используется в качестве антикоагулянта (см., например, G. P. Aithal, C. P. Day, P. J. Kesteven, and A. K. Daly. 1999. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 353 (9154): 717-9; R. Loebstein, H. Yonath, D. Peleg, S. Almog, M. Rotenberg, A. Lubetsky, J. Roitelman, D. Harats, H. Halkin, and D. Ezra. 2001. Interindividual variability in sensitivity to warfarin-Nature or nurture? *Clin Pharmacol Ther* 70 (2): 159-64).

Цитохром CYP2C9 может также метаболизировать фенитюан, который используется для лечения мозговых нарушений (см., например, J. van der Weide, L. S. Steijns, M. J. van Weelden, and K. de Haan. 2001. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics* 11 (4): 287-91; R. Brandolese, M. G. Scordo, E. Spina, M. Gusella, and R. Padriani. 2001. Severe phenytoin intoxication in a subject homozygous for CYP2C9*3. *Clin Pharmacol Ther* 70 (4): 391-4).

Кроме того, цитохром CYP2C9 может метаболизировать омепразол, который используется для лечения кислотнорефлюксной болезни (см., например, J. D. Balian, N. Sukhova, J. W. Harris, J. Hewett, L. Pickle, J. A. Goldstein, R. L. Woosley, and D. A. Flockhart. 1995. The hydroxylation of omeprazole correlates with S-mephenytoin metabolism: a population study. *Clin Pharmacol Ther* 57 (6): 662-9; G. Tybring, Y. Bottiger, J. Widen, and L. Bertilsson. 1997. Enantioselective hydroxylation of omeprazole catalyzed by CYP2C19 in Swedish white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 62 (2): 129-37).

В следующем варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты конструируются для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих дигидропиримидин дегидрогеназу. Дигидропиримидин дегидрогеназа может метаболизировать флуороурацил, который используется для лечения неопластических заболеваний (лечение различных видов рака) (см. M. Tuchman, J. S. Stoeckeler, D. T. Kiang, R. F. O'Dea, M. L. Ramnaraine, and B. L. Mirkin. 1985. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *N Engl J Med* 313(4): 245-9; R. B. Diasio, T. L. Beavers, and J. T. Carpenter. 1988. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest* 81(1):47-51).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих бутирилхолинэстеразу.

Бутирилхолинэстераза может метаболизировать сукцинилхолин, который используется в качестве мышечного релаксанта (см., например, Lockridge, O. 1990. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther* 47(1): 35-60; and F. Ceppa, S. Gidenne, A. Benois, E. Fontan, and P. Burnat. 2002. Rapid identification of atypical variant of plasma butyrylcholinesterase by PCR. *Clin Chem Lab Med* 40 (8): 799-801).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих N-ацетилтрансферазу 2. N-Ацетилтрансфераза 2 может метаболизировать изониазид, который используется для лечения туберкулеза (см., например, Y. Furet, Y. Bechtel, C. Le Guellec, P. R. Bechtel, E. Autret-Leca, and G. Paintaud. 2002. Clinical relevance of N-acetyltransferase type 2 (NAT2) genetic polymorphism, *Therapie* 57 (5):427-31; T. Kita, Y. Tanigawara, S. Chikazawa, H. Hatanaka, T. Sakaeda, F. Komada, S. Iwakawa, and K. Okumura. 2001. N-Acetyltransferase 2 genotype correlated with isoniazid acetylation in Japanese tuberculous patients. *Biol Pharm Bull* 24 (5): 544-9; and Hiratsuka, M. 2002. Development of simplified and rapid detection assay for genetic polymorphisms influencing drug response and its clinical applications. *Yakugaku Zasshi* 122 (7): 451-63).

N-Ацетилтрансфераза 2 может также метаболизировать гидралазин, который используется для лечения антигипертензии (см., например, J. A. Timbrell, S. J. Harland, and V. Facchini. 1980. Polymorphic

acetylation of hydralazine. *Clin Pharmacol Ther* 28 (3):350-5; и P. Zscheschang, F. Hiepe, E. Gromnica-Ihle, I. Roots, and I. Cascorbi. 2002. Lack of association between arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Pharmacogenetics* 12 (7): 559-63).

N-Ацетилтрансфераза 2 может метаболизировать прокаинамид, который используется для лечения аритмии (см., например, M. M. Reidenberg, D. E. Drayer, M. Levy, and H. Warner. 1975. Polymorphic acetylation pro-cainamide in man. *Clin Pharmacol Ther* 17 (6): 722-30; and D. Hickman, J. R. Palamanda, J. D. *Unadkat, and E. Sim. 1995. Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine N-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Pharmacol* 50(5):697-703).

В другом аспекте аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих уридин дифосфат-глюкуронозилтрансферазу 1A1. Уридин дифосфат-глюкуронозилтрансфераза 1A1 может также метаболизировать иринотекан, который используется для лечения рака прямой кишки (см., например, L. Iyer, D. Hall, S. Das, M. A. Mortell, J. Ramirez, S. Kim, A. Di Rienzo, and M. J. Ratain. 1999. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 65 (5): 576-82; Y. Ando, H. Saka, G. Asai, S. Sugiura, K. Shimokata, and T. Kamataki. 1998. UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. *Ann Oncol* 9 (8):845-7).

Уридин дифосфат-глюкуронозилтрансфераза 1A1 может также метаболизировать билирубин, который используется для лечения синдрома Гилберта, мягкого нарушения печени (см., например, P. J. Bosma, J. R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. de Boer, B. A. Oostra, D. Lindhout, G. N. Tytgat, P. L. Jansen, R. P. Oude Elferink, and et al. 1995. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 333 (18): 1171-5; Y. H. Kim, J. E. Yeon, G. M. Jung, H. J. Kim, J. S. Kim, K. S. Byun, Y. T. Bak, and C. H. Lee. 2002. A study of polymorphism in UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT-1A1) promoter gene in Korean patients with Gilbert's syndrome. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 8 (2): 132-8).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих тиопурин S-метилтрансферазу. Тиопурин S-метилтрансфераза может метаболизировать меркаптопурин, который используется для лечения болезни Крона (см., например, Weinshilboum, R. M. 1992. Methylation pharmacogenetics: thiopurine methyltransferase as a model system. *Xenobiotica* 22 (9-10): 1055-71; and A. Wennerholm, I. Johansson, A. Y. Massele, M. Lande, C. Alm, Y. Aden-Abdi, M. L. Dahl, M. Ingelman-Sundberg, L. Bertilsson, and L. L. Gustafsson. 1999. Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 9 (6): 707-14).

Тиопурин S-метилтрансфераза может также метаболизировать азатиоприн, который также используется для лечения болезни Крона (см., например, B. A. Kaskas, E. Louis, U. Hindorf, E. Schaeffeler, J. Deflandre, F. Graepler, K. Schmiegelow, M. Gregor, U. M. Zanger, M. Eichelbaum, and M. Schwab. 2003. Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* 52 (1): 140-2; and C. A. Marra, J. M. Esdaile, and A. H. Anis. 2002. Practical Pharmacogenetics: The Cost Effectiveness of Screening for Thiopurine s-Methyltransferase Polymorphisms in Patients with Rheumatological Conditions Treated with Azathioprine. *J Rheumatol* 29 (12): 2507-12).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения последовательностей или фрагментов последовательностей, кодирующих катехол О-метилтрансферазу. Катехол О-метилтрансфераза может метаболизировать леводопу, которая используется для лечения болезни Паркинсона (см., например, D. K. Reilly, L. Rivera-Calimlim, and D. Van Dyke. 1980. Catechol-O-methyltransferase activity: a determinant of levodopa response. *Clin Pharmacol Ther* 28 (2): 278-86; and A. Wennerholm, I. Johansson, A. Y. Massele, M. Lande, C. Alm, Y. Aden-Abdi, M. L. Dahl, M. Ingelman-Sundberg, L. Bertilsson, and L. L. Gustafsson. 1999. Decreased capacity for debrisoquine metabolism among black Tanzanians: analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 9 (6): 707-14).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения генетического полиморфизма, связанного с устойчивостью к лекарствам. В одном варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для обнаружения АСЕ-полиморфизма, который может влиять на ответ АСЕ-ингибиторного антигипертензива, используемого для лечения сердечной недостаточности (см., например, P. Jacobsen, K. Rossing, P. Rossing, L. Tarnow, C. Mallet, O. Poirier, F. Cambien, and H. H. Parving. 1998. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 53 (4): 1002-6; M. Kohno, K. Yokokawa, M. Minami, H. Kano, K. Yasunari, T. Hanehira, and J. Yoshikawa. 1999. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and regression of left ventricular hypertrophy in patients treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Med* 106 (5): 544-9).

АСЕ-полиморфизм может также влиять на ответ флувастатину, используемому для лечения коронарного атеросклероза (см., например, A. J. Marian, F. Safavi, L. Ferlic, J. K. Dunn, A. M. Gotto, and C. M. Ballantyne. 2000. Interactions between angiotensin-I converting enzyme insertion/deletion polymorphism and response of plasma lipids and coronary atherosclerosis to treatment with fluvastatin: the lipoprotein and coronary

atherosclerosis study. *J Am Coll Cardiol* 35(1): 89-95; Y. Bosse, M. C. Vohl, M. Dumont, M. Brochu, J. Bergeron, J. P. Despres, and D. Prud'homme. 2002. Influence of the angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism on lipoprotein/lipid response to gemfibrozil. *Clin Genet* 62(1): 45-52).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для обнаружения полиморфизма арахидонат 5-липоксигеназы, который может влиять на ответ лейкотриеновых ингибиторов, используемых в качестве противовоспалительного средства (см., например, S. J. Fowler, I. P. Hall, A. M. Wilson, A. P. Wheatley, and B. J. Lipworth. 2002. 5-Lipoxygenase polymorphism and in vivo response to leukotriene receptor antagonists. *Eur J Clin Pharmacol* 58 (3): 187-90; and T. Koshino, S. Takano, S. Kitani, N. Ohshima, Y. Sano, T. Takaishi, K. Hirai, K. Yamamoto, and Y. Morita. 1999. Novel polymorphism of the 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) promoter gene associated with asthma. *Mol Cell Biol Res Commun* 2(1): 32-5).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для обнаружения полиморфизма β 2-адренергического рецептора, который может влиять на ответ β 2-агонистов, используемых для лечения астмы и лёгочных заболеваний (см., например, Liggett, S. B. 2000. beta(2)-adrenergic receptor pharmacogenetics. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (3 Pt 2): S197-201; V. Dishy, G. G. Sofowora, H. G. Xie, R. B. Kim, D. W. Byrne, C. M. Stein, and A. J. Wood. 2001. The effect of common polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *N Engl J Med* 345 (14): 1030-5).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма B2 рецептора брадикинина, который может влиять на ответ ACE-рецептора, используемого для лечения сердечной недостаточности (см., например, S. Mukae, S. Aoki, S. Itoh, T. Iwata, H. Ueda, and T. Katagiri. 2000. Bradykinin B (2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough. *Hypertension* 36 (1): 127-31; S. Mukae, S. Itoh, S. Aoki, T. Iwata, K. Nishio, R. Sato, and T. Katagiri. 2002. Association of polymorphisms of the renin-angiotensin system and bradykinin B2 receptor with ACE-inhibitor-related cough. *J Hum Hypertens* 16 (12): 857-63).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для обнаружения полиморфизма дофаминовых рецепторов (D2, D3, D4), которые могут влиять на ответ нейролептикам (см., например, M. J. Arranz, J. Munro, J. Birkett, A. Bolonna, D. Mancama, M. Sodhi, K. P. Lesch, J. F. Meyer, P. Sham, D. A. Collier, R. M. Murray, and R. W. Kerwin. 2000. Pharmacogenetic prediction of clozapine response. *Lancet* 355 (9215): 1615-6; V. S. Basile, M. Masellis, F. Badri, A. D. Paterson, H. Y. Meltzer, J. A. Lieberman, S. G. Pokin, F. Macciardi, and J. L. Kennedy. 1999. Association of the MscI polymorphism of the dopamine D3 receptor gene with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 21(1): 17-27).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма эстрогенового рецептора- α , который может влиять на ответ конъюгированным эстрогенам и используется в гормонзамещающей терапии во время менопаузы, остеопороза (см., например, D. M. Herrington, T. D. Howard, G. A. Hawkins, D. M. Reboussin, J. Xu, S. L. Zheng, K. B. Brosnihan, D. A. Meyers, and E. R. Bleecker. 2002. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med* 346 (13): 967-74; B. Ongphiphadhanakul, S. Chanprasertyothin, P. Payatikul, S. S. Tung, N. Piaseu, L. Chailurkit, S. Chansirikarn, G. Puavilai, and R. Rajatanavin. 2000. Oestrogen-receptor-alpha gene polymorphism affects response in bone mineral density to oestrogen in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52 (5): 581-5).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма гликопротеиновой субъединицы IIIa гликопротеина IIb/IIIa, который может влиять на ответ аспирину или ингибиторам гликопротеина IIb/IIIa, используемым для лечения инфаркта миокарда (см., например, A. D. Michelson, M. I. Furman, P. Goldschmidt-Clermont, M. A. Mascelli, C. Hendrix, L. Coleman, J. Hamlington, M. R. Barnard, T. Kickler, D. J. Christie, S. Kundu, and P. F. Bray. 2000. Platelet GPII-Ia/Pl (A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 101 (9): 1013-8; G. Andrioli, P. Minuz, P. Solero, S. Pincelli, R. Ortolani, S. Lussignoli, and P. Bellavite. 2000. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A (2) in subjects with Pl (A2) polymorphism of beta (3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol* 110 (4): 911-8).

В следующем варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма транспортера серотонина (5-гидрокситриптамина), который может влиять на ответ антидепрессантам, используемым при лечении болезни Альцгеймера и депрессии (см., например, D. K. Kim, S. W. Lim, S. Lee, S. E. Sohn, S. Kim, C. G. Hahn, and B. J. Carroll. 2000. Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response. *Neuroreport* 11(1): 215-9; and E. Smeraldi, R. Zanardi, F. Benedetti, D. Di Bella, J. Perez, and M. Catalano. 1998. Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. *Mol Psychiatry* 3 (6): 508-11).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма аддуцина, который может влиять на ответ диуретикам, используемым для лечения инфаркта миокарда и гипертонии (см., например, M. T. Sciarrone, P. Stella, C. Barlassina, P. Manunta, C. Lanzani, G. Bianchi, and D. Cusi. 2003. ACE and alpha-adducin polymorphism as markers of individual response to diuretic therapy. *Hypertension* 41 (3): 398-403; B. M. Psaty, N. L. Smith, S. R. Heckbert, H. L. Vos, R. N. Lemaitre, A. P. Reiner,

D. S. Siscovick, J. Bis, T. Lumley, W. T. Longstreth, Jr., and F. R. Rosendaal. 2002. Diuretic therapy, the alpha-adducin gene variant, and the risk of myocardial infarction or stroke in persons with treated hypertension. *Jama* 287 (13): 1680-9).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма аполипопротеина E (АПОЕ), который может влиять на ответ статинам, используемым для лечения коронарной артериальной болезни, холестерина, атеросклероза (см., например, J. M. Ordovas, J. Lopez-Miranda, F. Perez-Jimenez, C. Rodriguez, J. S. Park, T. Cole, and E. J. Schaefer. 1995. Effect of apolipoprotein E and A-IV phenotypes on the low density lipoprotein response to HMG CoA reductase inhibitor therapy. *Atherosclerosis* 113 (2): 157-66; L. U. Gerdes, C. Gerdes, K. Kervinen, M. Savolainen, I. C. Klausen, P. S. Hansen, Y. A. Kesaniemi, and O. Faergeman. 2000. The apolipoprotein epsilon 4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: a substudy of the Scandinavian simvastatin survival study. *Circulation* 101 (12): 1366-71).

АПОЕ-полиморфизм может влиять также на ответ такрину, используемому для лечения болезни Альцгеймера (см., например, J. Poirier, M. C. Delisle, R. Quirion, I. Aubert, M. Farlow, D. Lahiri, S. Hui, P. Bertrand, J. Nalbantoglu, B. M. Gilfix, and et al. 1995. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26): 12260-4). Poirier, J. 1999. Apolipoprotein E: a pharmacogenetic target for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol Diagn* 4 (4): 335-41; H. Soininen, O. Kosunen, S. Helisalmi, A. Mannermaa, L. Paljarvi, S. Talasniemi, M. Ryyanen, and P. Riekkinen, Sr. 1995. A severe loss of cholineacetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci Lett* 187 (2): 79-82).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма HLA, который может влиять на ответ абакавиру, используемому в качестве противовирусного средства и при лечении ВИЧ (см., например, S. Mallal, D. Nolan, C. Witt, G. Masel, A. M. Martin, C. Moore, D. Sayer, A. Castley, C. Mamotte, D. Maxwell, I. James, and F. T. Christiansen. 2002. Association between presence of HLA- B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HTV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 359 (9308): 727-32; and S. Hetherington, A. R. Hughes, M. Mosteller, D. Shortino, K. L. Baker, W. Spreen, E. Lai, K. Davies, A. Handley, D. J. Dow, M. E. Fling, M. Stocum, C. Bowman, L. M. Thurmond, and A. D. Roses. 2002. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. *Lancet* 359 (9312): 1121-2).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма холестерол-эфир транспортирующего протеина (СЕТР), который может влиять на ответ статинам, используемым для лечения коронарной артериальной болезни, холестерина, атеросклероза (см., например, J. A. Kuivenhoven, J. W. Jukema, A. H. Zwinderman, P. deKrijff, R. McPherson, A. V. Bruschke, K. I. Lie, and J. J. Kastelein. 1998. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. *N Engl J Med* 338 (2): 86-93; P. Rump, R. P. Mensink, and G. Hornstra. 2002. Interaction between a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene and the apolipoprotein E polymorphism: effects on plasma lipids and lipoproteins in a cohort of 7-year-old children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 12 (6): 317-24; and F. V. van Venrooij, R. P. Stolk, J. D. Banga, T. P. Sijmonsma, A. van Tol, D. W. Erkelens, and G. M. Dallinga-Thie. 2003. Common cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms and the effect of atorvastatin therapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26(4): 1216-23).

В другом варианте осуществления аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма, связанного с ионным каналом, который может влиять на ответ эритромицину, антибиотику, используемому для лечения бактериальных инфекций (см., например, F. Sesti, G. W. Abbott, J. Wei, K. T. Murray, S. Saksena, P. J. Schwartz, S. G. Priori, D. M. Roden, A. L. George, Jr., and S. A. Goldstein. 2000. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19): 10613-8; G. W. Abbott, F. Sesti, I. Splawski, M. E. Buck, M. H. Lehmann, K. W. Timothy, M. T. Keating, and S. A. Goldstein. 1999. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97 (2): 175-87).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма метилгуанин метилтрансферазы, который может влиять на ответ кармустину, используемому для лечения глиомы (см., например, M. Esteller, J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S. N. Goodman, O. F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S. B. Baylin, and J. G. Herman. 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343 (19): 1350-4; Gerson, S. L. 2002. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 20 (9): 2388-99).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма Паркина, который может влиять на ответ леводопе, используемой для лечения паркинсоновской болезни (см., например, C. B. Lucking, A. Durr, V. Bonifati, J. Vaughan, G. De Michele, T. Gasser, B. S. Harhangi, G. Meco, P. Deneffe, N. W. Wood, Y. Agid, and A. Brice. 2000. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 342 (21): 1560-7; V. Bonifati, G. De Michele, C. B. Lucking, A. Durr, E. Fabrizio, G. Ambrosio, N. Vanacore, M. De Mari, R. Marconi, L. Capus, M. M. Breteler, T. Gasser, B. Oostra, N. Wood, Y. Agid, A. Filla, G. Meco, and

A. Brice. 2001. The parkin gene and its phenotype. Italian PD Genetics Study Group, French PD Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Neurol Sci* 22(1): 51-2).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для обнаружения полиморфизма протромбина и фактора V, который может влиять на ответ оральным контрацептивам и указывать на потенциальный риск развития тромбоза (см., например, J. Tassin, A. Durr, A. M. Bonnet, R. Gil, M. Vidailhet, C. B. Lucking, J. Y. Goas, F. Durif, M. Abada, B. Echenne, J. Motte, A. Lagueny, L. Lacomblez, P. Jedynak, B. Bartholome, Y. Agid, and A. Brice. 2000. Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? *Brain* 123 (Pt 6):1112-21; I. Martinelli, E. Sacchi, G. Landi, E. Taioli, F. Duca, and P. M. Mannucci. 1998. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 338 (25): 1793-7; and I. Martinelli, E. Taioli, P. Bucciarelli, S. Akhavan, and P. M. Mannucci. 1999. Interaction between the G20210A mutation of the prothrombin gene and oral contraceptive use in deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 19 (3): 700-3).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть также сконструированы для обнаружения полиморфизма стромелизина-1, который может влиять на ответ статину, используемому для лечения атеросклероза (см., например, C. Legnani, G. Palareti, G. Guazzaloca, B. Cosmi, B. Lunghi, F. Bernard, and S. Coccheri. 2002. Venous thromboembolism in young women; role of thrombophilic mutations and oral contraceptive use. *Eur Heart J* 23 (12): 984-90; Liggett, S. B. 2000. beta (2)-adrenergic receptor pharmacogenetics. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (3 Pt 2):S197-201; S. E. Humphries, L. A. Luong, P. J. Talmud, M. H. Frick, Y. A. Kesaniemi, A. Pasternack, M. R. Taskinen, and M. Syvanne. 1998. The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study. *Lipid Coronary Angiography Trial. Atherosclerosis* 139(1): 49-56). S. Humphries, C. Bauters, A. Meirhaeghe, L. Luong, M. Bertrand, and P. Amouyel. 2002. The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur Heart J* 23 (9): 721-5; and M. P. de Maat, J. W. Jukema, S. Ye, A. H. Zwinderman, P. H. Moghaddam, M. Beekman, J. J. Kastelein, A. J. van Boven, A. V. Bruschke, S. E. Humphries, C. Kluft, and A. M. Henney. 1999. Effect of the stromelysin-1 promoter on efficacy of pravastatin in coronary atherosclerosis and restenosis. *Am J Cardiol* 83 (6): 852-6).

К. Генетически модифицированные организмы.

Раскрытые здесь методы обеспечивают также быстрые и чувствительные диагностические тесты на присутствие генетически модифицированных организмов (GMOs). Примеры генетически модифицированных организмов включают в себя - но не ограничиваются ими - организмы, в которых модифицированы, добавлены или делетированы один или более генов. GMOs могут характеризоваться присутствием одного или более определённых генов, отсутствием одного или более определённых генов, определённым изменением или изменённой экспрессией одного или более конкретных генов. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для комплементирования мишеневых полинуклеотидов GMOs. Присутствие и количество GMOs может быть измерено, используя методы реакции.

Л. Неместная флора и фауна.

Раскрытые здесь методы обеспечивают также быстрые и чувствительные диагностические тесты на присутствие и оценку неместной флоры и фауны. Организмы, которые не присущи определённому региону, присутствуют в окружающей среде и являются биологически случайными по отношению к местной флоре и фауне. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для комплементирования мишеневых полинуклеотидов неместной флоры и фауны. Присутствие и количество неместной флоры и фауны может быть измерено, используя методы реакции.

М. Применения в сельском хозяйстве.

Раскрытые здесь методы обеспечивают также быстрые и чувствительные диагностические тесты на присутствие и оценку конкретных растений и сортов растений. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для комплементирования мишеневых полинуклеотидов конкретных растений и сортов растений. Присутствие и количество растений и сортов растений может быть измерено, используя методы реакции.

Н. Применения в ветеринарии.

Раскрытые здесь способы, композиции и анализы могут также обеспечить быстрые и чувствительные диагностические тесты для применений в ветеринарии. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы для комплементирования мишеневых полинуклеотидов, которые соответствуют животным и характерны для инфекций или генетических болезней или нарушений.

В одном варианте осуществления способы, композиции и анализы могут быть использованы для обнаружения присутствия или инфицирования вирусом бешенства. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения бешенства. Примеры праймеров, используемых для идентификации вируса бешенства с применением основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, Ito M., Itou T., Shoji Y., Sakai T., Ito F.H., Arai Y.T., Takasaki T., Kurane I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol.* 2003 Apr; 26 (3): 317-30; Black E.M., Lowings J.P., Smith J., Heaton P.R., McElhinney L.M. A rapid RT-PCR method to differentiate six

established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J Virol Methods*. 2002 Aug; 105(1): 25-35; David D., Yakobson B., Rotenberg D., Dveres N., Davidson I., Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet Microbiol*. 2002 Jun 20; 87 (2): 111-8; Ito M., Itou T., Sakai T., Santos M.F., Arai Y.T., Takasaki T., Kurane I., Ito F.H. Detection of rabies vims RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR, *J Vet Med Sci*. 2001 Dec; 63 (12): 1309-13).

В другом варианте осуществления способы, композиции и анализы могут быть использованы для обнаружения синдрома стресса свиней. Синдром стресса свиней вызывается гомозиготной или гетерозиготной мутацией (RYR-1)-гена рианодиневого рецептора. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения синдрома стресса свиней. Примеры праймеров, используемых для идентификации синдрома стресса свиней с применением основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, Lee S.H., Cho K.K., Kang S.K., Kim C.W., Park H.C., Choy Y.H., Choi Y.J. Detection of pigs resistant to post-weaning diarrhoea, oedema disease and porcine stress syndrome by allele-specific polymerase chain reaction. *Anim Genet*. 2002 Jun; 33 (3): 237-9, Bu H., Liu J., Li S.F. The RYR1 genotype of Chinese inbred pigs. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2000 Sep; 14(5):311-4).

Способы, композиции и анализы могут быть использованы для обнаружения заболевания гиперкалиемическим периодическим параличом (HyPP). HyPP является генетической болезнью лошадей на американских ранчо или их гибридов. По имеющимся сведениям, HyPP наследуется как кодоминантное генетическое нарушение, поскольку гомозиготы показали более тяжёлые клинические проявления болезни, чем гетерозиготы. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для обнаружения HyPP, основанного на PCR.

В другом варианте осуществления способы, композиции и анализы могут быть использованы для обнаружения FeCV (коронавируса кошек).

Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения коронавируса кошек. Примеры праймеров, используемых для идентификации коронавируса кошек с применением основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, Kennedy M., Citino S., McNabb A.H., Moffatt A.S., Gertz K., Kania S. Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA. *J Vet Diagn Invest*. 2002 Nov; 14 (6): 520-2; Addie D.D., Jarrett O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec*. 2001 May 26; 148 (21): 649- 53; Herrewegh A.A., Mahler M., Hedrich H.J., Haagmans B.L., Egberink H.F., Horzinek M.C., Rottier P.J., de Groot R.J. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*. 1997 Aug 4; 234 (2): 349-63).

В другом варианте осуществления способы, композиции и анализы могут быть использованы для обнаружения присутствия или инфицирования FIP-вирусом, мутантом повсеместно распространенного кишечного коронавируса кошек (FECV). Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения FIP-вируса. Примеры праймеров, используемых для идентификации FIP-вируса с применением основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, Gunn-Moore D.A., Gruffydd-Jones T.J., Harbour D.A. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*. 1998 Jul; 62 (3): 193-205; Kennedy M., Boedeker N., Gibbs P., Kania S. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*. 2001 Aug 8; 81 (3): 227-34).

Способы, композиции и анализы могут быть также использованы для обнаружения присутствия или инфицирования вирусом инфекционной анемии лошадей (EIAV). Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения EIAV. Примеры праймеров, используемых для идентификации EIAV с применением основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, Cook R.F., Cook S.J., Li F.L., Montelaro R.C., Issel C.J. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J Virol Methods*. 2002 Aug; 105 (1): 171-9; Langemeier J.L., Cook S.J., Cook R.F., Rushlow K.E., Montelaro R.C., Issel C.J. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *J Clin Microbiol*. 1996 Jun; 34 (6): 1481-7; Nagarajan M.M., Simard C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2001 May; 94 (1-2): 97-109).

Способы, композиции и анализы могут быть также использованы для обнаружения присутствия или инфицирования *Brucella ovis*. Аналоги нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы таким образом, что будут иметь последовательности праймеров, используемых для основанного на PCR обнаружения *Brucella ovis*. Примеры праймеров, используемых для идентификации *Brucella ovis* с применением основанных на PCR анализов, в уровне техники известны (см., например, Manterola L., Tejedo-Garcés A., Ficapal A., Shopayeva G., Blasco J.M., Marin C.M., Lopez-Goni I. Evaluation of a PCR test for the

diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams., *Vet Microbiol.* 2003 Mar 20; 92 (1-2): 65-72; Hamdy M.E., Amin A.S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet J.* 2002 May; 163 (3): 299-305; Bricker B.J., Hailing S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994 Nov; 32(11): 2660-6).

Предшествующие примеры являются лишь образцами. Мишеневые полинуклеотиды могут включать в себя полинуклеотиды, соответствующие другим придающим устойчивость к антибиотикам генам, известным в уровне техники.

VIII. Наборы.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает набор для обнаружения мишеневых полинуклеотидов. Набор может включать в себя один или несколько реагентов, полезных для настоящего изобретения, например, красителей, аналогов нуклеиновых кислот, источников светового стимула, буферов, стандартов, используемых для контроля, реагентов-ключей, показывающих положительную и отрицательную реакцию контрольных образцов для интерпретации результатов реакции. Опционально, используется один или более буферов. Наборы могут также включать в себя подходящую упаковку соответствующих композиций, инструкции и (или) другие выборочные компоненты, как раскрыто ниже.

A. Красители.

Обеспечиваемые здесь наборы включают в себя один или несколько красителей.

Красители могут быть обеспечены в расфасованном виде или в одном тюбике, из которого могут отбираться аликвоты.

Красители также могут быть упакованы в любую подходящую упаковку, позволяющую отделить их от других компонентов набора и облегчить расходование композиции.

B. Аналоги нуклеиновых кислот.

Наборы могут также включать в себя один или более аналогов нуклеиновых кислот.

Аналог нуклеиновой кислоты может быть любым аналогом, как описано ниже. В одном варианте осуществления аналог нуклеиновой кислоты представляет собой LNA. В другом варианте осуществления аналогом нуклеиновой кислоты является PNA.

Аналог нуклеиновой кислоты может иметь любую последовательность, которая комплементарна или полностью комплементарна мишеневой последовательности нуклеиновой кислоты. Последовательность может быть любой последовательностью, известной в уровне техники. В одном варианте осуществления аналог нуклеиновой кислоты имеет раскрываемую здесь последовательность.

Аналог нуклеиновой кислоты может быть обеспечен в любом подходящем контейнере и может быть расфасован на аликвоты в подходящих количествах или в одном тюбике, из которого потом берутся порции. Контейнер также может быть упакован в любую подходящую упаковку для отделения от других компонентов набора и облегчения расходования композиции для отмывки. В другом варианте осуществления в одной упаковке могут содержаться последовательности двух или более аналогов нуклеиновых кислот.

Наборы могут также включать в себя средство для облегчения эффективной гибридизации аналога нуклеиновой кислоты с мишеневым полинуклеотидом, таким как ДНК спермы лосося.

C. Источник светового стимула.

Набор может также, опционально, включать в себя источник светового стимула. Неограничивающие примеры источников света включают в себя Sylvania Cool White T8-CW, General Electric T8-C50 и Fritz Aurora 50/50, Sylvania dulux S9W CF9DS/blue и OsramF9TT/50K.

D. Компоненты для манипуляций с полинуклеотидами.

Наборы могут также включать в себя компоненты, используемые для манипуляций с полинуклеотидами, такие как буферы, ферменты, колонки и другие материалы.

Буферы, ферменты, колонки и другие материалы могут включать в себя такие, которые используются для лизиса клеток или экстрагирования из клеток ДНК и РНК. Буферы, ферменты, колонки и другие материалы могут также включать в себя компоненты, используемые для манипуляций с полинуклеотидами, включая ДНК и РНК. Такие компоненты включают в себя, например, такие, которые раскрыты в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition (Sambrook et al., 2000) Cold Spring Harbor Press, или в других раскрытых здесь ссылочных документах.

E. Инструкции.

Наборы могут также включать в себя инструкции для осуществления описываемых здесь способов. Инструкции могут быть включены в виде отдельного вложения и (или) как часть упаковки или контейнера, например, в виде этикетки, прикреплённой к контейнеру или как надпись или иное сообщение, включённое как часть контейнера. Инструкции могут информировать того, кто использует рассматриваемые способы, о применении и (или) удалении содержимого набора, предосторожностях и методах обращения с материалами, ожидаемыми результатами, предупреждениями, касающимися неправильного использования, и т. п.

F. Дополнительные выборочные компоненты наборов.

Наборы могут также включать в себя компоненты, полезные при осуществлении раскрытых здесь

способов. Примеры дополнительных компонентов включают в себя химически устойчивые мешки для отходов, трубки, растворители, перчатки, ножницы, маркеры и защитные очки.

Примеры

Следующие неограничивающие примеры служат для более полного описания способа использования описанного выше изобретения. Понятно, что эти примеры ни в коей мере не ограничивают объем этого изобретения, а представлены скорее для его иллюстрации.

Все растворы аналогов нуклеиновых кислот и готовых ДНК в нижеследующих примерах были приготовлены в 5 мМ фосфатном буфере, pH 7,5, если иначе не оговорено. Готовый краситель был приготовлен в метаноле или DMSO.

Пример 1.

Системы анализа на основе жидкости для обнаружения связывания PNA/полинуклеотида.

Образование комплекса PNA/полинуклеотид приводило к изменению окраски индикаторного красителя. В качестве конкретного мишеневого полинуклеотида использовалась ДНК 35S-просмотра вируса мозаики цветной капусты. Красителем являлся 3,3'-диэтилтиакарбоцианин.

В тестовую пробирку помещалось 15 мкМ молекул PNA, комплементарных промотору 35S вируса мозаики цветной капусты (35SPNA) добавлялось к 5 мкМ ДНК 35S-просмотра (35SDNA). PNA имела последовательность CCCACCCACGAGG-LYS (SEQ ID NO: 11), добавлялось 150 мкМ красителя в 5 мМ фосфатном буфере, pH 7,5. 35SPNA и краситель присутствовали в системе в избытке.

Изменение окраски указало на присутствие полинуклеотида.

Системы анализа на основе жидкости тестировались с использованием 1 мкл 2,5 мМ красителя, разведённого в 50 мкл общего объема 5 мМ PO_4 реакционного буфера. Системы и способы были успешно протестированы при pH в интервале 4-10, однако система лучше тестировалась при pH 5. По времени нулевые реакции в интервале 4-10 pH выглядели почти идентичными одна другой, но колебания были меньше, чем для контролей, в которых отсутствовал гибрид PNA/мишеневый полинуклеотид. После экспозиции световому стимулу реакции начинали осветляться. При дальнейшей экспозиции световому стимулу реакции с гибридом PNA/мишеневый полинуклеотид стали совершенно прозрачными при том же самом показателе pH 6-10. В реакциях с гибридом PNA/мишеневый полинуклеотид при pH 4-5 краситель оставался окрашенным в различные оттенки розового цвета.

Использовался ряд буферов при концентрации 10 мМ. Некоторые буферы тестировались при различных pH. Буферы NaPO_4 тестировались при концентрациях до 0,5 мМ. Буферы и соли, которые приготавливались выборочно, включали в себя NaPO_4 , NaHSO_4 , K_2HPO_4 и CaSO_4 . Буферы и соли, которые оказались неуспешными для осуществления способов, включали в себя цитрат Na, NaCl, CaH_2PO_4 , FeSO_4 и MgSO_4 . В способах может также использоваться чистая вода, 0,1% SDS, 0,1% Triton X, 0,1% Tween-20, 3% бутанол, 10% метанол, 10% изопропанол или 10% DMSO, 1X буфер лизиса клеток крови (0,15 M NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 , 1 mM EDTA) pH 7,4 или буфер лизиса сахарозы (0,32M sucrose, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl_2).

Натрий-фосфатный буфер тестировался при pH 4, 5, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10. Все другие буферы тестировались при pH 7,5. При pH 7 натрий-фосфатный буфер давал самую быструю реакцию.

Обнаруживалось 300 мишеневых полинуклеотидов на микролитр реакции. Концентрации составляли $1,5 \times 10^{14}$ мишеневых полинуклеотидов на реакцию (3×10^{12} мишеневого полинуклеотида на 1 μl реакции); обнаруживалось также 10^8 амплифицированных мишеневых полинуклеотидов на реакцию (2×10^6 ампликонов мишеневого полинуклеотида на 1 μl реакции).

Пример 2.

Определение влияния молекул PNA на реакции PCR.

Примеры показывают влияние различных молекул PNA на реакции PCR. Компонентами PCR являлись следующие:

Компонент	Объём	Конечная концентрация
Вода	38 мкл	N/A
Праймер против хода транскрипции, 50 мкМ	0,5 мкл	25 мкМ
Праймер по ходу транскрипции, 50 мкМ	0,5 мкл	25 мкМ
MgCl ₂ , 25 Мм	3 мкл	1,5 мМ
10X реакционный буфер (Promega)	5 мкл	1 X
PCR-смесь нуклеотидов (Promega), 10мМ		
каждого dNTP	1 мкл	800 мкМ
Тaq-ДНК-полимераза в буфере для хранения		
B (Promega), 5 у/мкл	0,5 мкл	5 ед/ мкл
BSA	0,5 мкл	10 мг/мл

Состав 10X реакционного буфера:

Tris-HCl	100 мМ
KCl	500 мМ
Triton X-100	1 %

Праймерные последовательности были следующими:

Праймер	Праймерная последовательность
OI 17	5' GCTCCTACAAATGCCATCA (SEQ ID NO: 12)
OI 18	5' GATAGTGGGATGTGCGTCA (SEQ ID NO: 13)
PNA	5' CCCACCCACGAGGAACATC (SEQ ID NO: 14)

Программа термальных циклов (MJ Research PTC-200)

95° в течение 1 мин

42 цикла из:

94° в течение 10 с

53° в течение 10 с

72° в течение 20 с

Хранение при 4°

Следующие образцы анализировались с помощью PCR для определения, ингибируют ли молекулы PNA реакции PCR:

- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы (Bt/RR-кукуруза была генетически модифицированной)
- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы, 1 мкл PNA (100 мМ)
- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы, 5 мкл PNA (100 мМ)
- 1 мкл воды

Результаты PCR были визуализированы с использованием электрофореза на 2% TBEE агарозном геле.

Следующие образцы анализировались для определения, ингибирует ли присутствие PNA PCR.

- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы
- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы, 1 мкл PNA (100 мМ)
- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы, 5 мкл PNA (100 мМ)
- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы, 1 мкл метанола
- 1 мкл Bt/RR ДНК кукурузы, 5 мкл метанола
- 1 мкл воды

Результаты PCR были визуализированы с использованием электрофореза на 2% TBEE агарозном геле.

Результаты указывают, что PNA не ингибировала PCR, когда к реакции добавлялся 1 мкл PNA (пробирка 2). PNA не ингибировала PCR, когда к реакции добавлялось 5 мкл PNA (пробирка 3). Метанол

не ингибировал PCR, когда к реакции добавлялся 1 мкл PNA (пробирка 4). Метанол не ингибировал PCR, когда к реакции добавлялось 5 мкл PNA (пробирка 5).

Пример 3.

Стимулированное в течение воздействия света изменение оптической характеристики 3'-диэтилтиакарбоцианина при различных концентрациях молекул ДНК определялось для конкретной последовательности мишеневого полинуклеотида и для последовательности PNA.

Мишеневый полинуклеотид имел последовательность 5' CTACGGGAGGCAGCAGTG 3' (SEQ ID NO: 2), а комплементарная молекула PNA - последовательность N' CACTGCTGCCTCCCCGTAG-Lys (SEQ ID NO: 1). Концентрации мишеневого полинуклеотида были такими, которые перечислены в подписи к фиг. 5. Концентрация PNA составляла 14,4 пмоль на реакцию. Концентрация красителя - 6 пмоль на реакцию.

Фиг. 5 показывает эмиссию 3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидного красителя во времени после экспозиции световому стимулу при различных концентрациях ДНК; чувствительность анализа с помощью различной контрольной концентрации ДНК, используя источник света со смешанными длинами волн для стимуляции изменения. Различные концентрации полинуклеотида (в данном случае - ДНК) показаны на подписи к этому чертежу. Концентрация в подписи представляет конечную концентрацию ДНК в каждой реакции, (□) представляет образцы, содержащие только зонд и краситель; (Δ) представляет образцы, содержащие только краситель; (x) представляет образцы, содержащие только буфер.

На фиг. 6 изображено изменение эмиссии в процентах при различных концентрациях ДНК. Краситель имел более высокую скорость изменения эмиссии при более высоких концентрациях ДНК. Путём сравнения скорости изменения оптической характеристики красителя при более высоких концентрациях PNA со скоростью изменения оптической характеристики при более низких концентрациях PNA (или в отсутствие PNA) было обнаружено присутствие мишеневого полинуклеотида и могло быть измерено количественно, как показано на фиг. 10. Концентрации полинуклеотидов те же самые, что показаны в подписи к фиг. 5.

Пример 4.

Данный пример иллюстрирует, что скорости изменения оптических характеристик красителя могут различаться для разных длин волн светового стимула.

Мишеневый полинуклеотид, имеющий последовательность 5' CTACGGGAGGCAGCAGTG 3' (SEQ ID NO: 2), в количестве 20 пмоль на реакцию и молекула PNA, имеющая последовательность N' CACTGCTGCCTCCCCGTAG-Lys (SEQ ID NO: 1), в количестве 14,4 пмоль на реакцию объединялись с 3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидным красителем с образованием смеси. Эта смесь затем подвергалась воздействию светового стимула, создаваемого различным световым спектром в течение 10 мин, и в течение этого времени измерялось процентное изменение эмиссии красителя.

На фиг. 7 показаны результаты этого эксперимента. Белый световой стимул генерировался при помощи Fritz Augora 50/50 видимого спектра, и генерировались длины волн от 400 до 700 нм. Голубой световой стимул генерировался с использованием голубого фильтра. Производимый голубой свет имел длину волны от 450 до 480 нм. Зелёный световой стимул генерировался с использованием зелёного фильтра. Производимый зелёный свет имел длину волны от 450 до 480 нм. Красный световой стимул генерировался с использованием красного фильтра. Производимый красный свет имел длину волны от 630 до 720 нм.

Белый световой стимул приводил к наибольшему процентному изменению эмиссии. Стимул с красными длинами волн показывал очень медленное изменение в эмиссии.

Пример 5.

Данный пример показывает, что способы могут быть также использованы для обнаружения различий в последовательности нуклеиновых кислот.

Подготавливались два образца. Первый образец содержал смесь PNA, комплементарной GMO-последовательности, обнаруженной в полинуклеотиде GMO сои, полинуклеотида GMO сои и 3'-диэтилтиакарбоцианин йодида. Второй образец содержал смесь PNA, комплементарной GMO-последовательности, обнаруженной в полинуклеотиде GMO сои, полинуклеотида не-GMO сои и 3'-диэтилтиакарбоцианин йодида. Для обоих образцов наблюдалась скорость изменения эмиссии во времени после экспозиции световому стимулу. Для обеих смесей соевые полинуклеотиды были получены из листьев сои. В обеих смесях использовался 1 мкл выделенной ДНК на 100 мкл реакционного объёма при концентрации ДНК 25 нг/мкл.

Полученная скорость изменения эмиссии во времени показана на фиг. 8. Процентное изменение эмиссии 3'-диэтилтиакарбоцианин йодида измерялось во времени для образца, содержащего 3'-диэтилтиакарбоцианин йодид, молекулу PNA, комплементарную к области соевого 35S-полинуклеотида генетически модифицированного организма (GMO), и либо соевого полинуклеотида генетически модифицированного организма (GMO), либо соевого полинуклеотида не-GMO. Изменение эмиссии красителя происходило при гибридизации PNA с GMO соей и не происходило при гибридизации с не-GMO соей. Способ выявил GMO сою и не выявил не-GMO сои. Данные способы обеспечивают средства для обна-

ружения различий в полинуклеотидных последовательностях, присутствующих в ДНК.

Пример 6.

Этот пример показывает, что количество полинуклеотида в образце может быть определено изменением скорости изменения оптической характеристики красителя в образце, имеющем неизвестную концентрацию полинуклеотида, и корреляцией скорости изменения оптической характеристики с кривой известных скоростей изменения оптической характеристики. Время может быть фиксированным, и изменение может быть измерено в определённый момент реакции. Определение величины может также включать в себя одноразовое определение изменения оптической характеристики и корреляцию изменения оптической характеристики с концентрацией одного или более образцов, имеющих известную концентрацию.

Было подсчитано время, необходимое для 20%-ного изменения эмиссии в сериях концентраций полинуклеотида. Мишеневый полинуклеотид имел последовательность 5' CTACGGGAGGCAGCAGTG 3', (SEQ ID NO: 2), а молекула PNA - последовательность N' CACTGCTGCCTCCCCGTAG-Lys. (SEQ ID NO: 1). Время, требуемое для 20%-ного уменьшения, как функция концентрации мишеневого полинуклеотида, показано на фиг. 10. Эти данные соответствуют данным процентного изменения на фиг. 6. По одному варианту анализа точка, при которой имеется 20%-ное изменение эмиссии, измеряется для образца, имеющего неизвестную концентрацию. Количество полинуклеотида в данном образце может быть определено экстраполяцией со стандартной кривой.

Пример 7.

Этот пример показывает, что мишеневым полинуклеотидом может быть РНК.

Объединялись PNA, РНК и 3'3-диэтилтиакарбоцианин-йодидный краситель. Мишеневой последовательностью РНК была 5' CUACGGGAGGCAGCAGUG 3', (SEQ ID NO: 15), а PNA-последовательность представляла собой универсальный бактериальный PNA-зонд, имеющий последовательность, комплементарную последовательности РНК. Смеси подвергались воздействию светового стимула, и измерялось процентное изменение эмиссии красителя во времени и сравнивалось с образцом, включающим в себя ДНК-последовательность полинуклеотида вместо РНК-последовательности полинуклеотида.

Результирующее процентное изменение оптической характеристики во времени изображено на фиг. 11. Сравнивается 20 пмоль мишеневой ДНК на реакцию (■) и мишеневая РНК (●) при концентрациях РНК 20 пмоль на реакцию, 10 пмоль на реакцию и 2 пмоль на реакцию. По оси Y представлено процентное изменение флуоресценции со временем по сравнению с только зондом и красителем. РНК-полинуклеотиды производили изменение эмиссии красителя во времени. Присутствие РНК обнаруживалось на основании показателя изменения оптической характеристики красителя.

Пример 8.

Данный пример демонстрирует, что настоящий способ работает в загрязнённой среде.

Определялось процентное изменение эмиссии 3'3-диэтилтиакарбоцианин йодида во времени в образце мясного сока. Подготавливались 3'3-диэтилтиакарбоцианин-йодидный краситель и молекула PNA. Мишеневый полинуклеотид имел последовательность 5' CTACGGGAGGCAGCAGTG 3' (SEQ ID NO: 2), а PNA - последовательность N' CACTGCTGCCTCCCCGTAG-Lys (SEQ ID NO: 1).

Результаты изображены на фиг. 12. Показано процентное изменение в (■) незагрязнённой, чистой системе и в образцах с загрязнённым субстратом с 1 □1, 2 □1 и 4 □1 концентрациями мясного сока (незатемнённые символы). Этот пример показывает, что присутствие полинуклеотида было обнаружено в загрязнённой среде.

Пример 9.

Фиг. 13 показывает добавление PNA «клиньев» в системе. Биотинилированная PNA (5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt) (SEQ ID NO: 16) присоединена к стрептавидиновой лунке и затем реагировала с полинуклеотидом. После гибридизации добавлялся краситель, система подвергалась воздействию светового стимула, и определялось процентное изменение во времени. Полинуклеотид мог быть синтезированным или ампликоновым мишеневым полинуклеотидом. «Тест/а» показывает 35S PNA 5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16) и 195bp ампликоновый мишеневый полинуклеотид. «Тест/а+1» включает в себя как 35S PNA 5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16) с 195bp ампликоновым мишеневым полинуклеотидом, так и PNA 5'tcttcttttccacg-LYS (SEQ ID NO: 17). «Тест/а+2» включает в себя 35S PNA 5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16) с 195bp ампликоновым мишеневым полинуклеотидом и PNA 5'tcttcttttccacg-LYS (SEQ ID NO: 17). «Тест/а+b» включает в себя 35S PNA 5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16) с 195bp ампликоновым мишеневым полинуклеотидом, 5'tcttcttttccacg-LYS (SEQ ID NO: 17) и 5'tcatcatcaatccact-LYS (SEQ ID NO: 18). «Тест/а+b pre» включает в себя 35S PNA 5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16) с 195bp ампликоновым мишеневым полинуклеотидом, 5'tcttcttttccacg-LYS (SEQ ID NO: 17) и 5'tcatcatcaatccact-LYS (SEQ ID NO: 18), где 5'tcttcttttccacg-LYS (SEQ ID NO: 17) и 5'tcatcatcaatccact-LYS (SEQ ID NO: 18) инкубировались с ампликоновым мишеневым полинуклеотидом до гибридизации с присоединённой PNA. «Тест/о» показывает 35S PNA 5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16) с комплементарным полинуклеотидом. Линкер -oo- представлял собой 8-амино-3,6-диоксаоктановую кислоту. В этом и других выполнениях линкерами могут быть любые химические свя-

зываются группы, известные в данной области. Добавление аналогов нуклеиновой кислоты к различным сайтам в мишеневом полинуклеотиде может менять скорость изменения.

Пример 10.

Этот пример показывает скорость изменения оптической характеристики красителя при разных длинах волн.

На фиг. 14 показано сравнение экспозиции световому стимулу различной длины волны для серии образцов. Готовилась смесь мишеневого полинуклеотида, PNA и 3'3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидного красителя и наблюдалось изменение оптической характеристики красителя. Мишеневый полинуклеотид имел последовательность 5' CTACGGGAGGCAGCAGTG 3', (SEQ ID NO: 2), а молекула PNA - последовательность N'CACTGCTGCCTCCCCGTAG-Lys (SEQ ID NO: 1).

На фиг. 14 а)-d) показано протекание эмиссии красителя во времени для следующих серий длин волн: а) смешанный свет; б) источник голубого света, 450 нм; с) источник зелёного света, 510 нм; d) источник красного света, 645 нм. Для каждого из а)-d) (■) показывает позитивный контроль или тестовый образец; (□) показывает только PNA-зонд; (▲) показывает только 3'3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидный краситель; (х) показывает буферный субстрат. Эмиссия соответствует процентному изменению, показанному на фиг. 7.

Пример 11.

Этот пример показывает, что данные способы могут быть использованы в формате твёрдой системы посредством приготовления гибрида PNA-полинуклеотид либо до, либо после связывания с твёрдым носителем.

В этих экспериментах использовались универсальный бактериальный PNA-зонд и комплементарный ему полинуклеотид. Мишеневый полинуклеотид имел последовательность 5' CTACGGGAGGCAGCAGTG 3', (SEQ ID NO: 2), а молекула PNA - последовательность 5' bio - CACTGCTGCCTCCCCGTAG 3' (SEQ ID NO: 1). В первом образце биотинилированный PNA-зонд был иммобилизован на лунке посредством стрептавидин-биотинового связывания. Затем были добавлены полинуклеотид и 3'3'-диэтилтиакарбоцианин-йодидный краситель. Образец был подвергнут световому стимулу, и было измерено процентное изменение флуоресцентной эмиссии.

Во втором образце биотинилированный зонд и мишеневый полинуклеотид гибридизовались с образованием гибрида PNA/полинуклеотид. Затем гибрид PNA/полинуклеотид был внесён в лунку, покрытую стрептавидином, и гибриду была дана возможность связаться с поверхностью лунки.

Фиг. 15 показывает процентное изменение эмиссии во времени, наблюдавшееся в первом и втором образцах. В тесте 1 (■) биозонд иммобилизовался на лунке посредством стрептавидин-биотинового связывания до реакции с мишеневой ДНК и красителем. В тесте 2 (●) молекула PNA и мишень гибридизовались в растворе до внесения в лунку. Ось Y показывает процентное изменение флуоресценции во времени по сравнению с одним только зондом.

Пример 12.

Этот пример демонстрирует, что данные способы могут быть использованы для идентификации и (или) определения количества мишеневого полинуклеотида, полученного из образца крови.

Человеческая кровь отбиралась из вены в EDTA-пробирки. 10 мкл мужской крови и 10 мкл женской крови вносились в центрифужную пробирку, содержащую 180 мкл буфера для лизиса, которым являлся 6М-гуанидин тиоцианат; 20 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 6,5); 40 г/л Triton X; 10 г/л дитиотреитола. Перед добавлением к крови буфер нагревался до 60°C до растворения. 10 мкл женской крови добавлялось в центрифужную пробирку, содержащую 190 мкл того же самого буфера. Реакции инкубировались при комнатной температуре в течение 10 мин.

Реакции центрифугировались в течение 5 мин при 4000 rpm. Супернатант удалялся и осадок промывался 500 мкл буфера для лизиса. Осадок снова центрифугировался в течение 2 мин при максимальной скорости. Супернатант удалялся и промывался 500 мкл буфера для промывки (25% этанол; 25% изопропанол; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)). Реакции центрифугировались в течение 2 мин при максимальной скорости, и супернатант удалялся. Реакции дважды промывались 5 mM фосфатного буфера, используемого в реакции гибридизации PNA. После заключительной промывки реакции суспендировались 200 мкл 5 mM фосфатного буфера.

Следующая таблица показывает условия тестов для реакции в микролунках. Было использовано 2,5 мкл цельной крови в 50 мкл реакционного объёма. Это равно 300 мишеней на 1 мкл реакции и 1 нг ДНК. Последовательность PNA - 5' Bio-OO-TGAGTGTGTGGCTTTTCG 3' (SEQ ID NO: 19).

	Тест	Отриц. контроль	Отсутствие PNA контр.
Образец	48 мкл теста	48 мкл отрицательн.	48 мкл отрицательн.
PNA	1 мкл	1 мкл	0
Краситель	1 мкл	1 мкл	1 мкл

Данные по эмиссии собирались с помощью спектрофотометра Genios, при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны эмиссии 590 нм. После первоначальной нулевой минуты чтения образцы были подвергнуты световому стимулу от Аутога 50/50 в течение 30 с. Флуоресценция измерялась каждые 30 с в течение 10 мин.

Фиг. 16 показывает, что образец мишени мужской крови, обозначенный (■), был обнаружен анализом, а женской крови, обозначенной (□), как негативный контроль, обнаружен не был.

Пример 14.

Ряд последовательностей нуклеиновых кислот был или мог быть использован для обнаружения мишеневых полинуклеотидов. Эти последовательности приведены ниже.

Наименование PNA Последовательность

PPI2101bio	5'bio-oo-tgagtgtgtggctttcg (SEQ ID NO:19)	huSRY
PPI2024	5'cactgctgcctcccgtag-LYS (SEQ ID NO:1)	16S
PPI2024bio	5'bio-OO-actgtgcctcccgtag (SEQ ID NO: 20)	
PPI2025bio4	5'bio-OOOO-tgcctcccgtag (SEQ ID NO: 21)	
PPI2025bio6	5'bio-OOOOOO-tgcctcccgtag (SEQ ID NO: 22)	
PPI2025bio8	5'bio-OOOOOOOO-tgcctcccgtag (SEQ ID NO: 22)	
PPI2025bio10	5'bio-OOOOOOOOOO-tgcctcccgtag (SEQ ID NO: 21)	
PPI2025 UL	5'tgcctcccgtag (SEQ ID NO: 21)	
PPI18bio	5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16)	35S
PPI359	5'cccaccacgagg-LYS (SEQ ID NO: 11)	
PPI485	5'tctctttttccacg-LYS (SEQ ID NO: 17)	
PPI486	5'tcacatcaatccact-LYS (SEQ ID NO: 18)	
PPI2202	bio-(O) ₁₀ -ctcattgatggt (SEQ ID NO: 23)	HIV
PPI911	bio-(O) ₁₀ -cgcagaccacta (SEQ ID NO: 24)	HCV

Пример 15.

Фиг. 19 показывает эффект экспозиции световому стимулу различных длин волн.

Смесь, включающая в себя 16S PNA (5'cactgctgcctcccgtag-LYS) (SEQ ID NO: 1), полинуклеотид (5'ctacgggaggcagcagt) (SEQ ID NO: 2) и 3'3 диэтилтиакарбоцианин-йодидный краситель, подвергалась сти-

муду белого света, содержащего все длины волн видимого диапазона, источника голубого света (450 нм), источника зелёного света (510 нм), источника красного света (645 нм) и не подвергалась никакому световому стимулу. Источником смешанного света служил Аулога 50/50 от FITZ. Для создания голубого, зелёного и красного света на Аулога 50/50 помещались фильтры. Считывание осуществлялось по многолуночному планшетному считывателю Safire (производимому Tecan).

Смеси, на которые воздействовали световым стимулом, показали скорость изменения оптической характеристики красителя, отличающуюся от эталонной величины. Смеси, на которые не воздействовали световым стимулом, не показали никакого значительного изменения в течение всего времени измерений. Различные длины волн приводили к разным скоростям изменения оптических характеристик. Этот пример показывает, что световое излучение может быть использовано для вызывания различных скоростей изменения оптической характеристики красителя.

Пример 16.

PNA была иммобилизована на твёрдом субстрате, и количество ДНК обнаруживалось на основании изменения величины флуоресценции красителя.

В этом примере использовались следующие реактанты: а) 10 мкМ зонд-БИО (из примера 14); б) 2 мМ красителя диэтилтиакарбоцианин йодида (100 мМ хранившегося в DMSO; 2 мМ рабочей концентрации в 5мМ буфере); в) 5 мМ буфер (pH 5,5) (1 мл 100 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 24 мл 100 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 475 мл H_2O pH до 5,5); д) 1XPBS + 0,05% Tween-20 (PBST) (1X PBS = 0,137M NaCl + 2,68 мМ KCl + 4,3 мМ NaH_2PO_4 + 1,47 мМ KH_2PO_4); е) стрептавидиновые микротитровальные планшеты (NUNC) и ф) тестовые образцы, содержащие или не содержащие мишеньный полинуклеотид.

Подсчитывалось количество лунок. Каждая лунка подготавливалась предварительной промывкой 3X 200 мкл 1XPBST. 1 мкл PNA-зонда использовалось в 50 мкл общей реакции. 3 мкл зонда добавлялось к 147 мкл PBST.

PNA-зонды присоединялись к твёрдой поверхности микротитровальных лунок. Смесь инкубировалась в течение 1 ч при комнатной температуре с легким встряхиванием.

+ контроль	Тестовый образец	Только зонд	Только буфер
50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл буфер

Лунки затем промывались с использованием 3X 100 мкл PBST. Затем лунки промывались с помощью 3X 5 мМ фосфатного буфера. Для позитивного контроля 1 мкл реакции добавлялось к 49 мкл фосфатного буфера, после этого вносилось в лунку позитивного контроля. 1 мкл образца разводился в 49 мкл фосфатного буфера, затем вносился в лунку тестового образца. К лункам с зондом и только буфером добавлялось 50 мкл фосфатного буфера. Все лунки инкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре с лёгким встряхиванием. Лунки промывались 5X 100 мкл фосфатного буфера, как описано выше.

Раствор красителя приготавливался с использованием 1 мкл 2 мМ красителя к 49 мкл фосфатного буфера на лунку. Раствор красителя вносился во все лунки за исключением одной лунки для буфера негативного контроля. В единственную лунку для буфера вносилось 50 мкл фосфатного буфера.

Наблюдалась флуоресценция красителя. Первоначальное чтение флуоресценции было обнаружено до экспозиции световому стимулу от источника света Аулога 50/50. Возбуждение происходило при 535 нм, а эмиссия при 590 нм наблюдалась каждые 2 мин с использованием многолуночного планшетного считывателя Genios.

Пример 17.

А. Использование жидких образцов PNA осуществлялось в соответствии со следующим протоколом.

Было подготовлено достаточное количество лунок для числа тестируемых образцов плюс три контрольных. Были выделены ДНК или РНК.

Каждая тестовая реакция содержала: 1 мкл PNA-зонда, 47 мкл буфера (5 мМ 2 мл 100 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 48 мл $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{L}$ (pH 5,5)), и 1 мкл тестового образца. Образцы были загружены в 96-луночные полосовые планшеты Greiner (#705070).

Зонд, краситель и буфер объединялись для образования смеси, и лунки подготавливались следующим образом:

+ контроль	Тестовый образец	Только PNA	Только буфер
1 мкл + контроль	1 мкл образца	1 мкл буфера	50 мкл буфера

49 мкл смеси вносилось во все лунки кроме лунок, содержащих только буфер. Раствор слегка помешивался.

Поглощение спектра или флуоресценция без экспозиции световому стимулу наблюдались при следующих длинах волн: поглощение: 562 нм; флуоресцентная эмиссия: 535 нм; флуоресцентное возбуждение: 590 нм.

Образцы подвергались воздействию светового стимула с использованием Аулога 50/50, и поглоще-

ние или флуоресценция определялись спустя каждые 30 с экспозиции световому стимулу.

В. Следующий протокол осуществлялся при использовании молекул PNA, которые были иммобилизованы на твёрдой поверхности.

В протоколе использовались следующие реактанты: а) 10 мкМ PNA (ABI); б) 2 мМ 3'-диэтилтиакарбодиаин-йодидного красителя (Sigma-Aldrich, катал. #173738); в) 5 мМ 1XPBS (0,137M NaCl + 2,68 мМ KCl + 4,3 мМ NaH₂PO₄ + 1,47 мМ KH₂PO₄) + 0,05% Tween-20; д) (0,137M NaCl + 2,68 мМ KCl + 4,3 мМ NaH₂PO₄ + 1,47 мМ KH₂PO₄) + 0,05% Tween-20; е) тестовые образцы, содержащие мишень-ый полинуклеотид; и ф) покрытые стрептавидином планшеты (Nuncbrand Immobilizer™ (Катал. № 436014)).

В одном варианте PNA была иммобилизована до введения полинуклеотидного образца. Для тестируемых образцов (п) было подготовлено достаточное количество лунок плюс три лунки для контроля промыванием 3X 300 мкл 1X PBST. Были выделены ДНК или РНК, которые должны были тестироваться. Биотинилированная PNA была иммобилизована на покрытых стрептавидином лунках добавлением 1 мкл 10 мкМ исходной PNA в 49 мкл PBST.

Была приготовлена основная масса PNA, которая включала (п+2)X 1 мкл 10 мкМ исходной PNA и (п+2)X 49 мкл PBST. 50 мкл смеси PNA вносилось во все лунки кроме лунок, содержащих только буфер.

Смесь закрывалась и инкубировалась в течение 1 ч при комнатной температуре с лёгким встряхиванием.

Каждая лунка промывалась 3X 200 мкл PBST, а затем - 3X 5 мМ фосфатного буфера, и образцы нуклеиновой кислоты добавлялись к иммобилизационному зонду. 1 мкл образца добавлялся к 49 мкл 5 мМ фосфатного буфера.

Контрольные лунки были подготовлены как показано ниже:

	Тест	+ контроль	Только PNA	Только буфер
Тестовый образец	1 мкл	1 мкл	0	0
5mM фосфатный буфер	49 мкл	49 мкл	50 мкл	50 мкл

Лунки накрывались при комнатной температуре на 30 мин и инкубировались при лёгком встряхивании. Затем каждая лунка промывалась 100 мкл 5 мМ фосфатного буфера 6X. Раствор красителя был приготовлен добавлением 1 мкл 2 мМ раствора красителя к 49 мкл 5 мМ фосфатного буфера на образец. 50 мкл 5 мМ фосфатного буфера было внесено в лунку, содержащую только буфер.

Первоначальные показания поглощения или флуоресценции были обнаружены до экспозиции световому стимулу при следующих длинах волн: поглощение - 562 нм; флуоресцентная эмиссия - 535 нм; флуоресцентное возбуждение - 590 нм.

Образцы подвергались воздействию светового стимула с использованием Аутога 50/50. Аутога 50/50 может также использоваться с различным цветофильтрами (голубым, зелёным, красным) для выбора желаемой длины волны каждые 20 мин экспозиции световому стимулу.

В другом варианте PNA иммобилизовалась и мишеневые полинуклеотиды гибридизовались в одно и то же время. Для тестируемых образцов (п) было подготовлено достаточное количество лунок, а также три лунки для контроля промыванием 3X 300 мкл 1X PBST. Были выделены ДНК или РНК.

Смесь PNA-зонда и образца готовилась как показано ниже:

	Тест	+ контроль	Только PNA	Только буфер
PNA	1 мкл	1 мкл	1 мкл	0
Тестовый образец	1 мкл	1 мкл	0	0
5mM фосфатный буфер	48 мкл	48 мкл	49 мкл	50 мкл

Смесь инкубировалась закрытой в течение 10-120 мин при комнатной температуре с лёгким встряхиванием. Затем смесь промывалась 6X 100 мкл 5 мМ фосфатного буфера. Краситель подготавливался как описано выше. 50 мкл раствора было внесено в лунку, содержащую только буфер.

Пример 18.

Следующий протокол осуществлялся при использовании растительной ДНК.

Использовалась линия RR 2701 сои. Использованная ДНК была из очищенного экстракта ДНК, содержавшего 62 нг/мкл. Образцы получались серийным разведением из 62 до 0,062 нг/мкл. 1 мкл этого раствора использовалась в 50 мкл реакции.

Стрептавидиновый планшет промывался 3X 400 мкл подсоленого фосфатного буфера (PBS) (+ 0,5% Tween (PBST)) при комнатной температуре (RT). Вся промывка, загрузка и выгрузка осуществлялись с использованием пипетки. Для промывки в каждую лунку вносилось 400 мкл раствора. Затем раствор отсасывался с использованием той же самой пипетки и наконечника.

PNA bio-18 (35S) разводилась 1/10 в воде. (1 мкл исходной PNA к 9 мкл воды). (BIO-OOGATAGTGGGATTGTGCGT (SEQ ID NO: 16), где OO являются двумя линкерами). 1 мкл разведённой PNA вносилось на 49 мкл PBST. Основная смесь приготовлялась так, чтобы все лунки были заполнены,

плюс был запас ещё для одной. То есть если бы нужно было охватить 10 лунок, достаточная основная смесь приготавливалась для 11 лунок (11 мкл разведённой PNA + 539 мкл PBST). 50 мкл этой смеси вносились в каждую лунку. Планшет инкубировался 1 ч при RT с лёгким встряхиванием на орбитальном шейкере. В назначенное время была приготовлена ДНК посредством получения серийных разведений (1/10, 1/100, 1/1000) каждого образца ДНК в микро-PCR пробирках. Пробирки помещались в термальный циклер (95°C в течение 5 мин). После этого трубки помещались на лёд на необходимое время. После инкубации планшеты промывались 3X PBST как описано выше. Затем планшеты промывались 3X 5 mM буфера PO4 (pH 5,7) как описано выше. 1 мкл ДНК или разведённой ДНК образца вносилось в каждую лунку (GM или не-GM ДНК, один образец на лунку). Добавлялось 49 мкл PO4-буфера. Планшеты слегка помешивались и инкубировались в течение 30 мин при RT с лёгким встряхиванием на орбитальном шейкере. После инкубирования планшеты промывались 5X PO4-буфером как описано выше. 1 мкл 3'3'-диэтилтиакарбодиамина (3 mM) добавлялось к 49 мкл PO4-буфера (основная смесь была приготовлена, чтобы хватило на все лунки, плюс ещё на одну). 50 мкл смеси краситель/буфер вносилось в каждую лунку с помощью пипетки. Затем планшет помещался в сканер Теспа для наблюдения спектральной эмиссии реакции при 535 нм для возбуждения и 590 нм для эмиссии. Первоначальное считывание производилось при нулевом времени. Затем планшет подвергался световому стимулу, и считывание производилось в интервале 1 мин. Данные проанализированы в Excel и вычислялись на основании процентного изменения от времени с использованием выравнивания 100-(только образец/PNA окрашивание) X 100.

На фиг. 20 показано обнаружение различных концентраций соевой ДНК. Они обозначены +. Соевая ДНК, которая не содержала GMO-последовательность, была близка к фоновым уровням. Они обозначены -. Данный способ позволяет обнаружить 0,0625 нг ДНК GMO-сои, что соответствует приблизительно 21 геному. Фиг. 21 показывает процентное изменение оптической характеристики от числа геномов GMO-положительной сои и сои дикого типа, которая не содержит PNA-последовательности мишени.

Пример 19.

Следующая реакция показывает обнаружение мишеневого полинуклеотида в одном лишь фосфатном буфере с различными концентрациями Tween-20. Подобные же эксперименты были проделаны и с другими неионными детергентами, включая NP-40 и triton X-100.

В протоколе использовались следующие реагенты: а) 10 мкМ PNA (ABI); б) 2 mM 3,3'-диэтилтиакарбодиамина-йодидного красителя (Sigma-Aldrich, катал. #173738); в) 5 mM буфер (pH 5,5) (2 мл 100 mM Na₂HPO₄·7H₂O + 48 мл NaH₂PO₄·H₂O/L); д) тестовые образцы.

Было подготовлено достаточное количество лунок по числу образцов, плюс 3 для контроля. Были выделены ДНК или РНК. В каждой тестовой реакции содержалось 1 мкл зонда, 47 мкл буфера и 1 мкл образца для приготовления смеси.

+ контроль	Тестовый образец	Только PNA	Только буфер
1 мкл + control	1 мкл образца	1 мкл буфера	50 мкл буфера

Во все лунки, исключая лунки только с буфером, добавлялось 49 мкл смеси, и раствор слегка размешивался.

Первоначальное измерение флуоресценции производилось без экспозиции световому стимулу при эмиссии, установленной на 535 нм, и возбуждении, установленном на 590 нм. Образцы подвергались световому стимулу с использованием Аугога 50/50, и измерялось поглощение и (или) флуоресценция спустя каждые 60 с экспозиции световому стимулу. Использовался стандартный 5 mM буфер (pH 5,5) и производилось сравнение с реакциями в фосфатном буфере, содержащем 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, и 2% Tween-20.

Фиг. 22 показывает эмиссию с использованием различных концентраций Tween.

(■) показывает реакцию с мишеневой ДНК, (□) показывает только зонд, (Δ) показывает краситель с буфером и (*) показывает только буфер.

Фиг. 23 показывает процентное изменение в эмиссии для различных концентраций Tween.

Пример 20.

Этот пример демонстрирует, что в реакции могут быть использованы аналоги нуклеиновой кислоты иные, чем PNAs. В данной реакции используются замкнутые нуклеиновые кислоты (LNAs). Также тестировались различные концентрации Tween-20 в фосфатном буфере.

Использовались следующие последовательности LNA:

LNA-A Tg^mc^mCt^mc^mCGTAG (SEQ ID NO: 25)

LNA-B TGc^mCt^mCc^mCGTAG (SEQ ID NO: 26)

LNA-C TGCCTCc^mCGTAG (SEQ ID NO: 27)

Строчная буква со значком «^m» представляет модифицированные последовательности.

Реакции проводились в жидкой форме в соответствии с методами, раскрытыми выше в примере 19.

На фиг. 24 сравниваются необработанные данные с зондами PNA и с зондами LNA в жидкой реак-

ции. Стандартная реакция в фосфатном буфере сравнивалась для различных концентраций Tween-20, добавляемого к фосфатному буферу. Затемнённые значки представляют тестовую реакцию, а светлые - соответствующие только зондам.

(■, □) PNA; (♦, ◇) LNA-A; (▲, △) LNA-B; (●, ○) LNA-C.

Фиг. 25 показывает процентное изменение в эмиссии при использовании PNAs против LNAs.

(■) представляет процентное изменение в реакции по сравнению с одним только зондом PNA; (♦) представляет процентное изменение в тестовой реакции LNA-A по сравнению с одним только LNA-A-зондом и красителем; (▲) представляет процентное изменение в тестовой реакции LNA-B по сравнению с одним только LNA-B-зондом; (●) представляет процентное изменение в тестовой реакции LNA-C по сравнению с одним только LNA-C-зондом.

Пример 21.

Данный способ может быть также использован для обнаружения вируса гепатита С. С помощью стандартных методов из плазмы была выделена РНК вируса гепатита С, в которой присутствовало известное количество вируса гепатита С. Используя эту выделенную РНК реакции проводились в жидкой форме в соответствии с методами, раскрытыми выше в примере 19.

На фиг. 26 показано обнаружение зонда вируса гепатита С с использованием различных количеств плазмы. Скорость изменения оптической характеристики различна для вирусов, даже когда они присутствуют в очень малом числе копий.

Число копий вируса гепатита С также может быть подсчитано. Фиг. 27 показывает эмиссию красителя, полученную при введении в анализ разного количества РНК вируса гепатита С.

Пример 22.

Данный пример демонстрирует, что настоящие способы могут быть использованы для идентификации и (или) определения количества мишеневого полинуклеотида в бактериях.

500 мкл бактериальной (либо *E. coli*, либо *Bacillus cereus*) культуры, выращенной в течение ночи в TSB (триптический соевый отвар), осаждалось центрифугированием в течение 5 мин при 6000 об/мин, затем ресуспендировалось в 500 мкл фосфатного буфера, затем отстаивалось в течение 5 мин при комнатной температуре. После этого к системе добавлялись PNA (либо 5'-bio-oo-gatagtgggattgtgcgt (SEQ ID NO: 16) для 16S-последовательности, либо 5'-Bio-OO-TGAGTGTGTGGCTTTCG 3' (SEQ ID NO: 19) для не-специфической последовательности отрицательного контроля HCV) и краситель, следовала экспозиция световому стимулу и считывались данные.

В следующей таблице показаны тестовые условия реакции в микролунках с реакционным объёмом 50 мкл.

	P/O-тест	Только зонд	Только краситель	Бактерия тест	Бактерия краситель
PNA	5 мкл	5 мкл		5 мкл	
Олиго	5 мкл				
Бактериальная культура				43 мкл	43 мкл
краситель	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Фосфатный буфер	38 мкл	43 мкл	48 мкл		5 мкл

Данные по эмиссии собирались с помощью спектрометра Genios при длине волны возбуждения 535 нм и длине волны излучения 590 нм. После начальной нулевой минуты считывания образцы подвергались световому стимулу от света Аутога 50/50 в течение 60 с. Флуоресценция измерялась каждые 60 с в течение 10 мин.

Фиг. 28 показывает скорость изменения флуоресценции по сравнению с отсутствием гибрида аналог нуклеиновой кислоты/полинуклеотид для каждого образца. Образец мишеневой *E. coli* или *B. cereus* (обозначенных, соответственно, «х» и «+»), был обнаружен в анализе с помощью 16S PNA-зонда, но мишеневая *E. coli* или *B. cereus* (обозначенных, соответственно, «◇» и «▲») не была обнаружена в анализе с помощью вирусного HCV PNA-зонда. Чёрный квадратик показывает положительный контроль с олигонуклеотидом к 16S-последовательности, как мишеневому полинуклеотиду.

Пример 23.

Олигонуклеотиды (5' 'tgtgaacgca 3' и 5' 'tgcgttcaca 3') смешивались в гибридизационном буфере (10 mM Tris, pH 7,5 - 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) до 10 mM и нагревались при 95°C в течение 10 мин в термальном циклере. На реакцию использовался 1 мкл этой смеси.

PNAs N'Bio-OO-gatagtgggattgtgcgt, C(1)' и N' tcatcatcaatccact-lys, C'(2) использовались смешанными по отдельности по 10 mM в реакционном буфере (5 mM PO₄ + 0,05 % Tween). На реакцию использовался 1 мкл каждой смеси.

10 мМ исходного 3-3'-диэтилтиакарбоцианинового красителя разводилось до 4 мМ в реакционном буфере. На реакцию использовался 1 мкл этой смеси.

Список литературы

1. D.P. Chandler, J.R. Stults., K.K. Anderson, S. Cebula, B.L. Schuck, and F.J. Brockman. 2000. Affinity capture and recovery of DNA at femtomolar concentrations with peptide nucleic acid probes. *Anal. Biochem.* 283:241-249.
2. Das, R., Cummings, C., Mendis, C., Neill, R., Ludwig, G., Hoover, D., Paravitana, C., Yang, D.H.C., Lindler, L., Huang, X., Henchal, E., and Jett, M. (2001). Global Gene Analysis of Various Biological Threat and Infectious Agents Using PBMC: Implications for Therapy and Rapid Diagnostics. In: Dianne McQuestion (ed) *Proceedings, Chemical and Biological Defense Symposium.*
3. Demidov, V.V., Potaman, V.N., Frank-Kamenetskii, M.D., Egholm, M., Buchard, O., Sonnichsen, S.H., and Nielsen, P.E. (1994). Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol* 48, 1310-3.
4. Haaima, G., Lohse, A., Buchardt, O. and Nielsen, P.E. (1996). Peptide Nucleic Acids (PNA) containing thymine monomers derived from chiral amino acids. Hybridization and solubility properties of lysine PNA. *Ang Chem* 35, 1939-1941.
5. Jett, M., Das, R., Cummings, C., Mendis, C., Neill, R., Hoover, D., Lindler, L., Paravitana, C., Huang, X., Ludwig, G., Henchal, E., and Yang, D.H.C. (2001). Identification Of Changes In Gene Expression Induced By Toxic Agents: Implications for Therapy And Rapid Diagnosis. In: *Proceedings of NATO Conference: Operational Issues in Chemical and Biological Defense Human Factors in Medicine Panel.* Wade (ed).
6. Mikheikin, A.L., Zhuze, A.L., and Zasedatelev, A.S. (2000). Binding of symmetrical cyanine dyes into the DNA minor groove. *J Biomol Struct Dyn* 18, 59-72.
7. Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-500.
8. Nielsen, P.E. (2001). Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr Opin Biotechnol* 12, 16-20.
9. Ray, A., and Norden, B. (2000). Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future, *Faseb J* 14, 1041-60.
10. Srefano, K. and Hyldig-Nielsen, J.J. (1997). Diagnostic Applications of PNA oligomers. In: *Diagnostic Gene Detection and Quantification Technologies* Minder, (ed). pp. 19-39.
11. Wang, J., Palecek, E., Nielsen, P.E., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., and Fanas, P.A.M. (1996). Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors. *J Am Chem Soc* 118, 7667-70.
12. Wilhelmsson, L.M., Norden, B., Mukhejee, K., Dulay, M.T., and Zare, R.N. (2002). Genetic screening using the color change of aPNA-DNA hybrid-binding cyanine dye. *Nucleic Acids Res* 30, E3.
13. Institute of Food Technologists (2002). *Emerging Microbiological Food Safety Issues: Implications for Control in the 21st Century.*
14. Wagner, S.J. 2002. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. *Trans-nis. Med. Rev.* 16:61-6.
15. Kapuscinski, J., 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* 70:220-33.
16. Caneon, J.R., Mahon, K.P. jr., Kelley, S.O. 2004. Thiazole orange-peptide conjugates: sensitivity of DNA binding to chemical structure. *Org. Lett.* 6:517-9.
17. Morozkm, E.S., Lalaonov, P.P., Rykova, E.Y., Vlassov, V.V., 2003. Fluorometric quantification of RNA and DNA in solutions containing both nucleic acids. *Anal. Biochem.* 322:48-50.
18. Eriksson, M., Karlson, H.J., Westman, G., Akerman, B. 2003. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: dissociation rates in free solution and electrophoresis gels. *Nucleic Acids Res.* 31:6235-42.
19. Karlsson, H.J., Eriksson, M., Perzon, E., Akerman, B., Lincoln, P., Westman, G. 2003. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* 31:6227-34.
20. Schaberie, F.A., Kuz'min, V.A., Bonsevitch, I.E. 2003. Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta.* 1621:183-91.
21. Main, S., Chaudhury, N.K., Chowdhury, S. 2003. Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human c-myc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310:505-12.
22. Tolun, G., Myers, R.S. 2003. A real-time Dnase assay (ReDA) based on PicoGreen fluorescence. *Nucleic Acids Res.* 31:e11.
23. Sovenyazy, K.M., Bordelon, J.A., Petty, J.T. 2003. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of a trimethine-bridged cyanine dye with DNA. *Nucleic Acids Res.* 31:2561-9.
24. Preto, P., Lyon, H.O. 2003. Methyl green-pyronin Y staining of nucleic acids: studies on the effects of staining time, dye composition and diffusion rates. *Biotech. Histochem.* 78:27-33.
25. Adhikary, A., Buschmann, V., Muller, C., Sauer, M. 2003. Ensemble and single-molecule fluorescence Spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA. *Nu-*

cleic Acids Res. 31:2178-86.

26. Johnson, I.M., Kumar, S.G., Malathi, R. 2003. De-intercalation of ethidium bromide and acridine orange by xanthine derivatives and their modulatory effect on anticancer agents: a study of DNA-directed toxicity enlightened by time correlated single photon counting. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20:677-86.

27. Wang, Z., Zhang, Z., Liu, D., Dong, S. 2003. A temperature-dependent interaction of neutral red with calfthymus DNA. *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 59:949-56.

28. Karlsson, H.J., Lincoln, P., Westman, G. 2003. Synthesis and DNA binding studies of a new asymmetric cyanine dye binding in the minor groove of [poly(dA-dT)]₂. *Bioorg. Med. Chem.* 11:1035-40.

29. Puckowska, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Midura-Nowaczek, K. 2004. Aromatic analogs of DNA minor groove binders-synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 39:99-105.

30. Ready, P.A., Santra, B.K., Nethaji, M., Chakravarty, A.R. 2004. Metal-assisted light-induced DNA cleavage activity of 2-(methylthio)phenylsalicylaldehyde Schiffbase copper(II) complexes having planar heterocyclic bases. *J. Inorg. Biochem.* 98:377-86.

31. Tanious, F.A., Hamelberg, D., Bailly, C., Czamy, A., Boykin, D.W., Wilson, W.D. 2004. DNA sequence dependent monomer-dimer binding modulation of asymmetric benzimidazole derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 126:143-53.

32. Ma, D.L., Che, C.M. 2003. A bifunctional platinum(n) complex capable of intercalation and hydrogen-bonding interactions with DNA: binding studies and cytotoxicity. *Chemistry.* 9:6133-44.

33. Wakelin, L.P., Bu, X., Elefthenou, A., Parmar, A., Hayek, C., Stewart, B.W. 2003. Bisinterealating threading diacridines: relationships between DNA binding, cytotoxicity, and cell cycle arrest. *J. Med. Chem.* 46:5790-802.

34. Tarasov, S.G., Casas-Finet, J.R., Cholody, W.N., Kosakovska-Cholody, T., Gryczynski, Z.K., Michejda, C.J. 2003. Bisimidazoacridones: 2. Steady-state and time-resolved fluorescence studies of their diverse interactions with DNA. *Photochem. Photobiol.* 78:313-22.

35. Tawar, U., Jain, A.K., Chandra, R., Smgh, Y., Dwarakanath, B.S., Chaudhury, N.K., Good, L., Tandon, V. 2003. Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorescent properties, *Biochemistry.* 18:13339-46.

36. Boutonne, A.S., Ryabinin, V.A., Novopashima, D.S., Venyaminova, A.G., Helene, C., Sinyakov, A.S. 2003. Stabilization of DNA double and triple helices by conjugation of minor groove binders to oligonucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 22:1267-72.

37. Novopashima, D., Sinyakov, A., Ryabinin, V., Venyaminova, A., Boutonne, A. 2003. Conjugates of 2'-O-methylribonucleotides with minor groove binders as new sequence-specific agents recognizing both grooves of double-stranded DNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 22:1179-82.

38. Dhar, S., Senapati, D., Das, P.K., Chattopadhyay, P., Nethaji, M., Chakravarty, A.R. 2003. Ternary copper complexes for photocleavage of DNA by red light: direct evidence for sulfur-to-copper charge transfer and d-d band involvement. *J. Am. Chem. Soc.* 125:12118-24.

39. Hiraku, Y., Oikawa, S., Kawanishi, S. 2002. Distamycin A, a minor groove binder, changes enediyne-induced DNA cleavage sites and enhances apoptosis. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 2002:95-6.

40. Dervan, P.B., Edelson, B.S. 2003. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:284-99.

41. Reddy, P.M., Jindra, P.T., Satz, A.L., Bruce, T.C. 2003. Sequence selective recognition in the minor groove of dsDNA by pyrrole, imidazole-substituted bis-benzimidazole conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* 125:7843-8.

42. Bnehn, C.A., Weyermann, P., Dervan, P.B. 2003. Alternative heterocycles for DNA recognition: the benzimidazole/imidazole pair. *Chemistry.* 9:2110-22.

43. Renneberg, D., Dervan, P.B., 2003. Imidazopyridine/Pyrrole and hydroxybenzimidazole/pyrrole pairs for DNA minor groove recognition. *J. Am. Chem. Soc.* 125:5707-16.

44. Kuwabara, T., Noda, T., Ohtake, H., Ohtake, T., Toyama, S., Ikariyama, Y. Classification of DNA-binding mode of anti tumor and antiviral agents by the electrochemiluminescence of ruthenium complex. *Anal. Biochem.* 314:30-7.

45. Ouameur, A.A., Nafisi, Sh., Mohajerani, N., Tajmir-Riahi, H.A. 2003. Thallium-DNA complexes in aqueous solution. Major or minor groove binding. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20:561-5.

46. Carrasco, C., Hehssey, P., Haroun, M., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Colson, P., Houssier, C., Giorgi-Renault, S., Bailly, C. 2003. Design of a composite ethidium-netropsin-anilinoacndine molecule for DNA recognition. *Chembiochem.* 3:50-61.

47. Nguyen, B., Lee, M.P., Hamelberg, D., Joubert, A., Bailly, C., Brun, R., Neidle, S., Wilson, W.D.J. *Am. Chem. Soc.* 124:13680-1.

hh) Barcelo, F., Capo, D., Portugal, J. 2002. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA. *Nucleic Acids Res.* 30:4567-73.

48. Silverman, A.P., Bu, W., Cohen, S.M., Lippard, S.J., 2002. 2.4-A costal structure 01 me asymmetric platinum complex [Pt(amine)(cyclohexylamme)]₂⁺ bound to a dodecamer DNA duplex. *J. Biol. Chem.* 277:49743-9.

49. Viola, G., Dall'Acqua, F., Gabellmi, N., Moro, S., Vedaldi, D., Ihmels, H. 2002. Indolo[2.3-b]-quinolizinium bromide: an efficient intercalator with DNA-photodamaging properties. *Chembiochem.* 3:550-8.
50. Anthoney, D.A., Twelves, C.J. 2001. DNA: still a target won't aiming at? A review of new DNA-interactive agents. *Am. J. Pharmacogenomics.* 1:67-81.
51. Shim, Y.H., Arimondo, P.B., Laigle, A., Garbesi, A., Lavielle, S. 2004. Relative DNA binding affinity of helix 3 homeodomain analogs, major groove binders, can be rapidly screened by displacement of ethidium bromide. A comparative study. *Org. Biomol. Chem.* 2:915-21.
52. Varadarajan, S., Shah, D., Dande, P., Settles, S., Chen, F.X., Fronza, G., Gold, B. 2003. DNA damage and cytotoxicity induced by minor groove binding methyl sulfonate esters. *Biochemistry.* 42:14318-27.
53. Guelev, V., Lee, J., Ward, J., Sorey, S., Hoffman, D.W., Iverson, B.L. 2001. Peptide bis-intercalator binds DNA via threading mode with sequence specific contacts in the major groove. *Chem. Biol.* 8:415-25.
54. Huang, X., Suleman, A., Skibo, E.B. 2000. Rational design of pyrrolo. *Bioorg. Chem.* 28:324-37.
55. Proudfoot, E.M., Mackay, J.P., Karuso, P. 2001. Probing site specificity of DNA binding metallointercalators by NMR spectroscopy and molecular modeling. *Biochemistry.* 40:4867-78.
56. Kondo, S., Kinjo, T., Yano, Y. 2004. Synthesis of a novel intercalator based on 2,2'-binaphthalene bearing dimethylammonium groups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:1641-3.
57. Nielsen, C.B., Petersen, M., Pedersen, E.B., Harsen, P.E., Chnstensen, U.B. 2004. NMR structure determination of a modified DNA oligonucleotide containing a new intercalating nucleic Acid. *Bioconjug. Chem.* 15:260-9.
58. Liu, F., Wang, K., Bai, G., Zhang, Y., Gao, L. 2004. The pH-Induced Emission Switching and Interesting DNA-Binding Properties of a Novel Dinuclear Ruthenium(II) Complex. *Inorg. Chem.* 43:1799-806.
59. Biver, T., Secco, F., Tine, M.R., Venturim, M. 2004. Kinetics and equilibria for the formation of a new DNA metal-intercalator: the cyclic polyamine Neotrieny/copper(II) complex. *J. Inorg. Biochem.* 98:33-10.
60. Lauretti, F., Lucas de Melo, F., Benati, F.J., de Melto Volotao, fc., cantos, N., Linnares, R.E., Nozawa, C. 2003. Use of acridine orange staining for the detection of HIV-1 RNA in poly acryl amide gels. *J. Virol. Methods.* 114:29-35.
61. Wong, E.L., Gooding, J.J. 2003. Electronic detection of target nucleic acids by a 2,6-disulfonic acid anthraquinone intercalator. *Anal. Chem.* 75:3845-52.
62. Luedtke, N.W., Liu, Q., Tor, Y. 2003. RNA-ligand interactions: affinity and specificity of ammonoglycoside dimers and acridine conjugates to the HIV-1 Rev response element. *Biochemistry.* 42:11391-403.
63. Yamana, K., Kawakami, N., Ohtsuka, T., Sugie, Y., Nakano, H., Sano, I. 2003. Electrochemical detection of single-base mismatches in DNA by a redox-active intercalator conjugated oligonucleotide. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 2003:89-90.
64. Takanaka, S., Ohtuka, K., Miyahara, H., Nojima, T., Takagi, M. 2002. An anthracene derivative carrying ferrocenyl moieties at its 9 and 10 positions as a new electrochemically active threading intercalator. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 2002:291-2.
65. Xiao, Y., Khantonov, A.B., Patolsky, F., Weizmann, Y., Willner, I. 2003. Electrocatalytic intercalator-induced winding of double-stranded DNA with polyaniline. *Chem. Commun. (Camb).* 7:1540-1.
66. Baruah, H., Bierbach, U. 2003. Unusual intercalation of acridine-9-ylthiourea into the 5' GA/TC DNA base step from the minor groove: implications for the covalent DNA adduct profile of a novel platinum-intercalator conjugate. *Nucleic Acids Res.* 31:4138-46.
67. Nojima, T., Kondoh, Y., Takenaka, S., Ichihara, T., Takagi, M., Tashiro, H., Matsumoto, K. 2001. Detection of DNA hybridization by use of a lanthanide fluorescent intercalator that specifically binds to double stranded DNA. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 2001:105-6.
68. Wang, S., Peng, T., Yang, C.F., 2003. Electrochemical determination of interaction parameters for DNA and mitoxantrone in an irreversible redox process. *Biophys. Chem.* 104:239-48.
69. Guittat, L., Alberti, P., Rosu, F., Van Miert, S., Thetiot, E., Pieters, L., Gabelica, V., De Pauw, E., Ottaviani, A., Riou, J.F., Mergny, J.L., 2003. Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures. *Biochimie.* 85:535-47.
70. Barry, C.G., Tumey, E.C., Day, C.S., Saluta, G., Kucera, G.L., Bierbach, U., 2002. Thermally inert metal amines as light-inducible DNA-targeted agents. Synthesis, photochemistry, and photobiology of a prototypical rhodium(I)-intercalator conjugate. *Inorg. Chem.* 41:7159-69.
71. Chnstensen, U.B., Pedersen, E.B. 2002. Intercalating nucleic acids containing insertions of 1-(1-pyrenylmethyl)glycerol: stabilization of dsDNA and discrimination of DNA over RNA. *Nucleic Acids Res.* 30:4918-25.
72. Patolsky, P., Katz, E., Willner, I. 2002. Amplified DNA detection by electrogenerated biochemiluminescence and by the catalyzed precipitation of an insoluble product on electrodes in the presence of the doxorubicin intercalator. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41:3398-402.
73. Woods, C.R., Ishii, T., Boger, D.L. 2002. Synthesis and DNA binding properties of immodiacetic acid-linked polyamides: characterization of cooperative extended 2:1 side-by-side parallel binding. *J. Am. Chem. Soc.* 124:10676-82.
74. Woods, C.R., Faucher, N., Eschgfäller, B., Bair, K.W., Boger, D.L. 2002. Synthesis and DNA binding

properties of saturated distamycin analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:2647-50.

75. Brana, M.F., Dominguez, G., Saez, B., Romerdahl, C., Robinson, S., Barlozzari, T. 2002. Synthesis and antitumor activity of new dendritic poly-amines-(imide-DNA-intercalator) conjugates: potent Lck inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 37:541-51.

76. Onfelt, B., Gostnng, L., Lincoln, P., Norden, B., Onfelt, A. 2002. Cell studies of the DNA bis-intercalator Delta-Delta [μ -C4 (cpdppz)(2)-(phen)Ru(2)](4+): toxic effects and properties as a light emitting DNA probe in V79 Chinese hamster cells. *Mutagenesis*. 17:317-20.

77. Berge, T., Jenlens, N.S., Hopkirk, R.B., Waring, M.L., Edwardson, J.M., Henderson, R.M. 2002. Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercahnium visualized by atomic force microscopy, *Nucleic Acids Res.* 30:2980-6.

78. Arabzadeh, A., Bathaie, S.Z., Farsam, H., Amanlou, M., Saboury, A.A., Shockravi, A., Moosavi-Movahedi, A.A. 2002. Studies on mechanism of 8-methoxypsoralen-DNA interaction in the dark. *Int. J. Pharm.* 237:47-55.

79. Reha, D., Kabekac, M., Ryjacek, F., Sponer, J., Sponer, J.E., Elstner, M., Suhai, S., Hobza, P. 2002. Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators (ethidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6'-diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potential study. *J. Am. Chem. Soc.* 124:3366-76.

80. Guelev, V., Sorey, S., Hoffman, D., Iverson, B.L. 2002. Changing DNA grooves-a 1,4,5,8-naphthalene tetracarboxylic diimide bis-intercalator with the linker (beta-Ala)(3)-Lys in the minor groove. *J. Am. Chem. Soc.* 124:2864-5.

81. Lisgarten, I.N., Coil, M., Portugal, J., Wright, C.W., Aymami, J. 2002. The antimalarial and cytotoxic drug cryptolepine intercalates into DNA at cytosine-cytosine sites. *Nat. Struct. Biol.* 9:57-60.

82. Ferry, D.M., Van Ziji, P.L., Wilson, W.R. 2001. Sensitive liquid chromatographic assay for the basic DNA intercalator (N,N-dimethylaminoethyl)-9-amino-5-methylacridine-4-.

83. Carboxamide and its nitroarylmethyl quaternary prodrugs in biological samples. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 763:149-56.

84. Tok, J.B., Fenker, J., 2001. Novel synthesis and RNA-binding properties of aminoglycoside dimers conjugated via a naphthalene diimide-based intercalator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2987-91.

85. Dienes, Z., Vogel, P. 1996. Asymmetric Synthesis and DNA Intercalation of (-)-6-[[[(Aminoalkyl)oxy]methyl]-4-demethoxy-6,7-dideoxydaunomycinones(I). *J. Org. Chem.* 61:6958-6970.

86. Papadopoulou, M.V., Ji, M., Rao, M.K., Bloomer, W.D. 2000. 4-[3-(2-Nitro-1-imidazolyl)propylamino]-7-chloroquinoline hydrochloride (NLCQ-1), a novel bioreductive agent as radiosensitizer in vitro and in vivo: comparison with tirapazamine, *Oncol. Res.* 12:325-33.

87. Boger, D.L., Tse, W.C. 2001. Thiazole orange as the fluorescent intercalator in a high resolution assay for determining DNA binding affinity and sequence selectivity of small molecules. *Bioorg. Med. Chem.* 9:2511-8.

88. Gianolio, D.A., McLaughlin, L.W. 2001. Tethered naphthalene diimide intercalators enhance DNA duplex stability. *Bioorg. Med. Chem.* 9:2329-34.

89. Onfelt, B., Lincoln, P., Norden, B. 2001. Enantioselective DNA threading dynamics by phenazine-linked. *J. Am. Chem. Soc.* 123:3630-7.

90. Wong, M., Kong, S., Dragowska, W.H., Bally, M.B. 2001. Oxazole yellow homodimer YOYO-1-labeled DNA: a fluorescent complex that can be used to assess structural changes in DNA following formation and cellular delivery of cationic lipid DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1527:61-72.

91. Hicks, K.O., Pruijn, F.B., Baguley, B.C., Wilson, W.R. 2001. Extravascular transport of the DNA intercalator and topoisomerase poison N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA): diffusion and metabolism in multicellular layers of tumor cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297:1088-98.

92. Kisko, J.L., Barton, J.K. 2000. Recognition of DNA base pair mismatches by a cyclometalated Rh(Iir) intercalator. *Inorg. Chem.* 39:4942-9.

93. Dees, E.C., Whitfield, L.R., Grove, W.R., Rummel, S., Grochow, L.B., Donehower, R.C. 2000. A phase I and pharmacologic evaluation of the DNA intercalator CI-958 in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 6:3885-94.

94. Pelley, R., Ganapathi, R., Wood, L., Rybicki, L., McLam, D., Budd, G.T., Peereboom, D., Olencki, T., Bukowski, R.M. 2000. A phase II pharmacodynamic study of pyrazoloacridine in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46:251-4.

95. Penn, L.C., Prenzler, P.D., Cullinane, C., Phillips, D.R., Denny, W.A., McFadyen, W.D. 2000. DNA targeted platinum complexes: synthesis, cytotoxicity and DNA interactions of cis-dichloroplatinum(II) complexes tethered to phenazine-1-carboxamides. *J. Inorg. Biochem.* 81:111-7.

96. Mazerski, J., Muchewicz, K. 2000. The intercalation of imidazoacridinones into DNA induces conformational changes in their side chain. *Acta. Biochim. Pol.* 47:65-78.

97. Sajewicz, W., Diugosz, A. 2000. Cytotoxicity of some potential DNA intercalators (carbazole, acridine and anthracene derivatives) evaluated through neutrophil chemiluminescence. *J. Appl. Toxicol.* 20:305-12.

98. Osiadacz, J., Majka, J., Czameski, K., Pecynska-Czoch, W., Zakrzewska-Czerwinska, J., Kaczmarek,

L., Sokalski, W.A. 2000. Sequence-selectivity of 5,11-dimethyl-5H-indolo[2,3-b]quinoline binding to DNA. Foot-printing and molecular modeling studies. *Bioorg. Med. Chem.* 8:937-43.

99. Kirschstein, O., Sip, M., Kitten L. 2000. Quantitative and sequence-specific analysis of DNA-ligand interaction by means of fluorescent intercalator probes. *J. Mol. Recognit.* 13:157-63.

100. Numez, M.E., Noyes, K.T., Gianoho, D.A., McLaughlin, L.W., Barton, J.K. 2000. Long-range guanine oxidation in DNA restriction fragments by a triplex-directed naphthalene diimide intercalator. *Biochemistry.* 39:6190-9.

101. Jackson, B.A., Barton, J.K. 2000. Recognition of base mismatches in DNA by 5,6-chrysenequinone diimine complexes of rhodium(III): a proposed mechanism for preferential binding in destabilized regions of the double helix. *Biochemistry.* 39:6176-82.

102. Chen, Q.Y., Li, D.L.L., Zhao, Y., Yang, H.H., Zhu, Q.Z., Xu, J.G. 1999. Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile blue, with DNA and its application to nucleic acids assay. *Analyst.* 124:901-6.

103. Dassonneville, L., Wattez, N., Mahieu, C., Colson, P., Houssier, C., Fredenich, M., Tits, M., Angenot, L., Bailly, C. 1999. The plant alkaloid usambarensine intercalates into DNA and induces apoptosis in human HL60 leukemia cells. *Anticancer Res.* 19:5245-50.

104. Toshima, K., Takano, R., Maeda, Y., Suzuki, M., Asai, A., Matsumura, S. 1999. 2-Phenylquinoline-Carbohydrate Hybrids: Molecular Design, Chemical Synthesis, and Evaluation of a New Family of Light-Activatable DNA-Cleaving Agents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38:3733-3735.

105. Yang, X., Liu, V.H., Jin, W.J., Shen, G.L., Yu, R.Q. 1999. DNA binding studies of a solvatochromic fluorescence probe 3-methoxybenzanthrone. *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 55A:2719-27.

106. Mueller, S.O., Stopper, H. 1999. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428:406-14.

107. Inoue, T., Sugiura, Y., Saitoh, J., Ishiguro, T., Otsuka, M., 1999. Fluorescence property of oxazole yellow-linked oligonucleotide. Triple helix formation and photocleavage of double-stranded DNA in the presence of spermine. *Bioorg. Med. Chem.* 7:1207-11.

108. Dempcy, R.O., Kutayavin, I.V., Mills, A.G., Lukhtanov, E.A., Meyer, R.B. 1999. Linkers designed to intercalate the double helix greatly facilitate DNA alkylation by triplex-forming oligonucleotides carrying a cyclopropapyrroloindole reactive moiety. *Nucleic Acids Res.* 27:2931-7.

109. Keppler, M., Zegrocka, O., Strekowski, L., Fox, K.R. 1999. DNA triple helix stabilization by a naphthylquinoline dimer. *FEBS Lett.* 447:223-6.

110. Ostaszewski, R., Wilczynska, E., Wolszczak, M. 1998. The synthesis of a new type of anthracene DNA intercalator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:2995-6.

111. Atwell, G.J., Fan, J.Y., Tan, K., Denny, W.A. 1998. DNA-Directed alkylating agents. 7. Synthesis, DNA interaction, and antitumor activity of -bis(hydroxymethyl)- and bis(carbamate)-substituted pyrrolizines and imidazoles. *J. Med. Chem.* 41:4744-54.

112. Milano, M.T., Hu, G.G., Williams L.D., Bemhard, W.A. 1998. Migration of electrons and holes in crystalline d(CGATCG)-anthracycline complexes X-irradiated at 4K. *Radiat. Re.* 150:101-14.

113. Benson, S.C., Mathies, R.A., Glazer, A.N. 1993. Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: stability and applications of the DNA complexes. *Nucleic Acids Research.* 21:5720-5726.

114. Benson, S.C., Singh, P., Glazer, A.N. 1993. Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: synthesis and spectroscopic properties. *Nucleic Acids Research.* 21:5727-5735.

115. Smith, J.O., Olson, D.A., Armitage, B.A. 1999. Molecular recognition of PNA-containing hybrids: Spontaneous assembly of helical cyanine dye aggregates on PNA templates. *J. Am. Chem. Soc.* 121:2686-2695.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитированные здесь, включены в описание посредством ссылки во всей их полноте для всех целей в такой же степени, как если было бы конкретно указано, что каждая индивидуальная публикация, патент или патентная заявка включены здесь посредством ссылки. Хотя представленное изобретение было описано в некоторых деталях посредством иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, в свете раскрытия этого изобретения для специалистов в данной области техники совершенно очевидно, что определённые изменения и модификации могут быть сделаны без отхода от сущности и объёма раскрытия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ качественного или количественного обнаружения мишеневого полинуклеотида в образце, содержащий следующие шаги:

а) изготавливают первую смесь, содержащую образец, аналог нуклеиновой кислоты, который комплементарен мишеневой последовательности нуклеиновой кислоты, и краситель;

б) воздействуют на первую смесь стимулирующим средством для изменения скорости изменения его оптической характеристики, при этом оптическая характеристика первой смеси до и после воздействия стимулирующего средства отличается по меньшей мере на 15% в течение примерно 30 мин после этого воздействия;

в) коррелируют качественно или количественно обнаружение определённого мишеневого полинук-

леотида в образце с разностью в оптической характеристике первой смеси до и после шага воздействия.

2. Способ по п.1, содержащий далее шаги, в которых определяют относительную скорость изменения оптической характеристики первой смеси, сравнивают скорость изменения в оптической характеристике первой смеси с эталонным значением, которое представляет собой характеристику скорости изменения оптической характеристики второй смеси, которая содержит известное количество гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты и краситель, после того, как вторую смесь подвергают воздействию стимулирующего средства для изменения скорости изменения оптической характеристики второй смеси, при этом известное количество гибрида мишеневый полинуклеотид/аналог нуклеиновой кислоты равно нулю или более; и коррелируют качественно или количественно обнаружение мишеневого полинуклеотида в образце с относительной скоростью изменения оптической характеристики первой смеси.

3. Способ по п.1, в котором подвергают краситель химической реакции в ответ на стимулирующее средство.

4. Способ по п.3, в котором аналогом нуклеиновой кислоты является пептидная нуклеиновая кислота (PNA).

5. Способ по п.3, в котором аналогом нуклеиновой кислоты является замкнутая нуклеиновая кислота (LNA).

6. Способ по п.3, в котором мишеневым полинуклеотидом является ДНК.

7. Способ по п.3, в котором краситель является цианиновым красителем.

8. Способ по п.7, в котором цианиновый краситель выбирают из группы, состоящей из 3,3'-диэтилтиаанин йодида, 3,3'-диэтилтиакарбоцианин йодида, 3,3'-диэтилтиадикарбоцианин йодида и 3,3'-диэтилтиатрикарбоцианин йодида.

9. Способ по п.1, в котором оптическая характеристика представляет собой цвет, поглощение или флуоресценцию.

10. Способ по п.1, в котором мишеневым полинуклеотидом является ДНК.

11. Способ по п.3, в котором мишеневым полинуклеотидом является РНК.

12. Способ по п.1, в котором аналог нуклеиновой кислоты включает в себя комплементарную область, которая имеет длину, большую, чем примерно 4 нуклеотидных основания, и меньшую, чем примерно 24 нуклеотидных основания.

13. Способ по п.1, в котором аналог нуклеиновой кислоты или мишеневый полинуклеотид иммобилизован на твердом субстрате.

14. Способ по п.1, в котором стимулирующее средство вызывает более высокую скорость изменения оптической характеристики первой смеси по сравнению с изменением оптической характеристики второй смеси.

15. Способ по п.1, в котором стимулирующее средство вызывает более низкую скорость изменения оптической характеристики первой смеси по сравнению с изменением оптической характеристики второй смеси.

16. Способ по п.1, в котором краситель является цианиновым красителем.

17. Способ по п.16, в котором цианиновый краситель выбирают из группы, состоящей из 3,3'-диэтилтиаанин йодида, 3,3'-диэтилтиакарбоцианин йодида, 3,3'-диэтилтиадикарбоцианин йодида и 3,3'-диэтилтиатрикарбоцианин йодида.

18. Способ по п.1, в котором оптическая характеристика представляет собой цвет, поглощение или флуоресценцию.

19. Способ обнаружения сингулярного нуклеотидного полиморфизма (SNP), содержащий качественное или количественное обнаружение мишеневого полинуклеотида в образце согласно способу по п.1, в котором мишеневая последовательность нуклеиновой кислоты является последовательностью, специфичной для SNP, и в котором качественное или количественное обнаружение мишеневого полинуклеотида указывает на упомянутый SNP.

20. Способ обнаружения организма в образце, содержащий качественное или количественное обнаружение мишеневого полинуклеотида в образце согласно способу по п.1, в котором мишеневая последовательность нуклеиновой кислоты является последовательностью, специфичной для организма, и в котором качественное или количественное обнаружение мишеневого полинуклеотида указывает на присутствие или количество упомянутого организма.

21. Набор для выполнения способа по п.1, содержащий:

а) один или более аналогов нуклеиновой кислоты;

б) по меньшей мере один краситель;

в) источник стимулирующего средства.

22. Способ качественного или количественного обнаружения мишеневого полинуклеотида в образце, содержащий следующие шаги:

а) изготавливают первую смесь, содержащую образец, первое средство для воздействия на оптическую характеристику первой смеси, второе средство для катализа химической реакции, которая воздействует на первое средство, и третье средство для стимуляции этой химической реакции, при этом второе

средство включает в себя мишеневый полинуклеотид и аналог нуклеиновой кислоты, который комплементарен мишени последовательности нуклеиновой кислоты мишеневого полинуклеотида;

б) воздействуют на первую смесь стимулирующим средством для изменения скорости изменения его оптической характеристики, при этом оптическая характеристика первой смеси до и после воздействия стимулирующего средства отличается по меньшей мере на 15% в течение примерно 30 мин после этого воздействия;

в) коррелируют качественно или количественно обнаружение определённого мишеневого полинуклеотида в образце с разностью в оптической характеристике первой смеси до и после шага воздействия.

23. Способ по п.22, в котором первое средство представляет собой краситель, а третье средство является светом.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

```

<110> Investigen, Inc.
      Koshinsky, Heather
      Zwick, Michael S.
      Choi, K. Yeon

<120> СИСТЕМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

<130> 429572033740

<150> 60/471,327
<151> 2003-05-20

<160> 27

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> bacteria

<220>
<221> misc_feature
<222> 19
<223> Lysine is attached to g

<400> 1
sactgctgcc tccccgtag                                     19

<210> 2
<211> 18
<212> DNA
<213> bacteria

<400> 2
ctacgggagg cagcagtg                                     18

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> bacteria

<400> 3
gaassaiysya acacytagca ct                               22

<210> 4
<211> 24
<212> DNA

```

<213> bacteria

 <400> 4
 tacaamgagy ygcwagacsg ygas 24

 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> gram positive bacteria

 <400> 5
 gcagywaacg cattaagcac t 21

 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> gram positive bacceria

 <400> 6
 acgacacgag ctgacgacaa 20

 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> gram negative bacteria

 <400> 7
 tctagctggt ctgagaggat gas 23

 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> gram negative bacteria

 <400> 8
 gagttagccg gtgcttcttc t 21

 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> fungi

 <400> 9
 cctgcggctt aatttgactc a 21

 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> fungi

 <400> 10

tagcgacggg cggtgtgta	19
<210> 11	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> cauliflower mosaic virus	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 13	
<223> Lysine is attached to g	
<400> 11	
cccacccacg agg	13
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> cauliflower mosaic virus	
<400> 12	
gctcctacaa atgccatca	19
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> cauliflower mosaic virus	
<400> 13	
gatagtggga ttgtgcgtca	20
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> cauliflower mosaic virus	
<400> 14	
cccacccacg aggaacatc	19
<210> 15	
<211> 18	
<212> RNA	
<213> bacteria	
<400> 15	
cuacgggagg cagcagug	18
<210> 16	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> cauliflower mosaic virus	

<400> 16
 gatagtggga ttgtgcgt 18

 <210> 17
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> cauliflower mosaic virus

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 15
 <223> Lysine is attached to g

 <400> 17
 ttttcttttt ccacg 15

 <210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> cauliflower mosaic virus

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 15
 <223> Lysine is attached to g

 <400> 18
 tcacatcaat ccact 15

 <210> 19
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

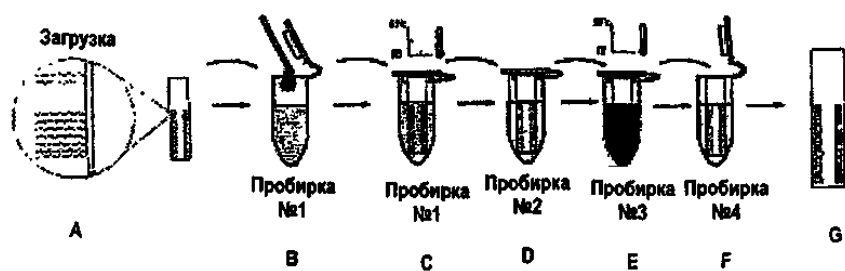
 <400> 19
 tgagtgigtg gctttcg 17

 <210> 20
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> bacteria

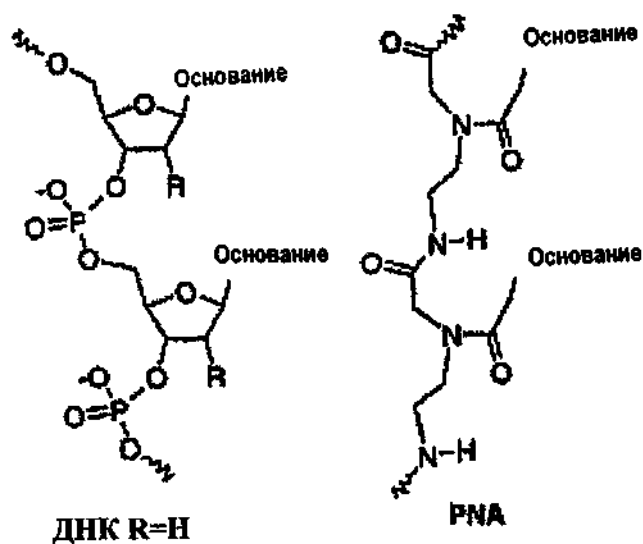
 <400> 20
 actgctgccci cccgtag 17

 <210> 21
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> bacteria

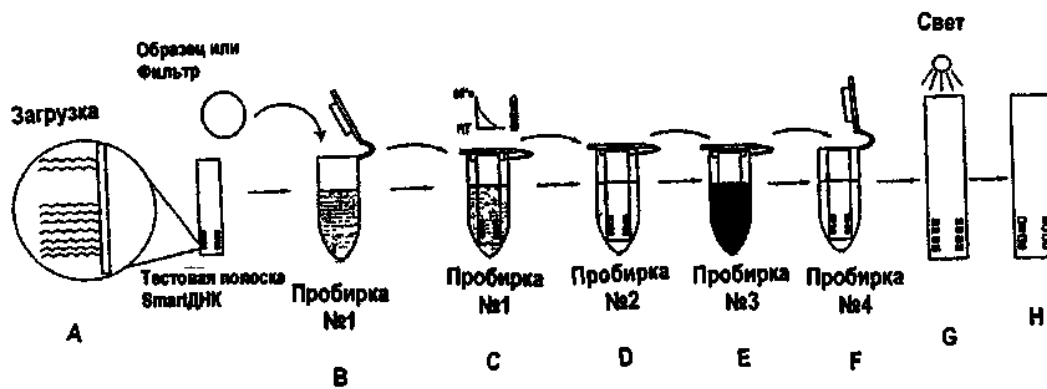
<400> 21 tgccfccccgt ag	12
<210> 22 <211> 11 <212> DNA <213> bacteria	
<400> 22 tgcctcccg i a	11
<210> 23 <211> 12 <212> DNA <213> human immunodeficiency virus	
<400> 23 ctcattgatg gt	12
<210> 24 <211> 12 <212> DNA <213> hepatitis C virus	
<400> 24 cgcagaccac ta	12
<210> 25 <211> 12 <212> DNA <213> bacteria	
<220> <221> misc_feature <222> 2,3,5,6,7 <223> Modified	
<400> 25 tgcctcccg t ag	12
<210> 26 <211> 12 <212> DNA <213> bacteria	
<220> <221> misc_feature <222> 3,5,7 <223> Modified	
<400> 26 tgcctcccg t ag	12
<213> 27 <211> 12 <212> DNA <213> bacteria	
<220> <221> misc_feature <222> 7 <223> Modified	
<400> 27 tgcctcccg t ag	12



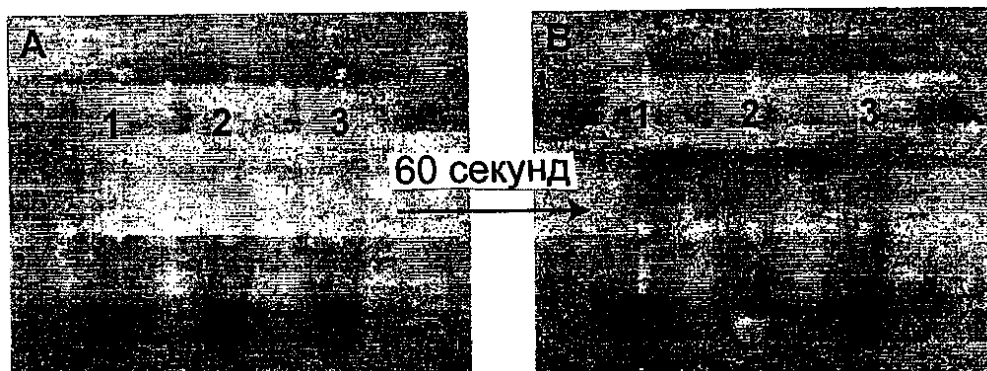
Фиг. 1



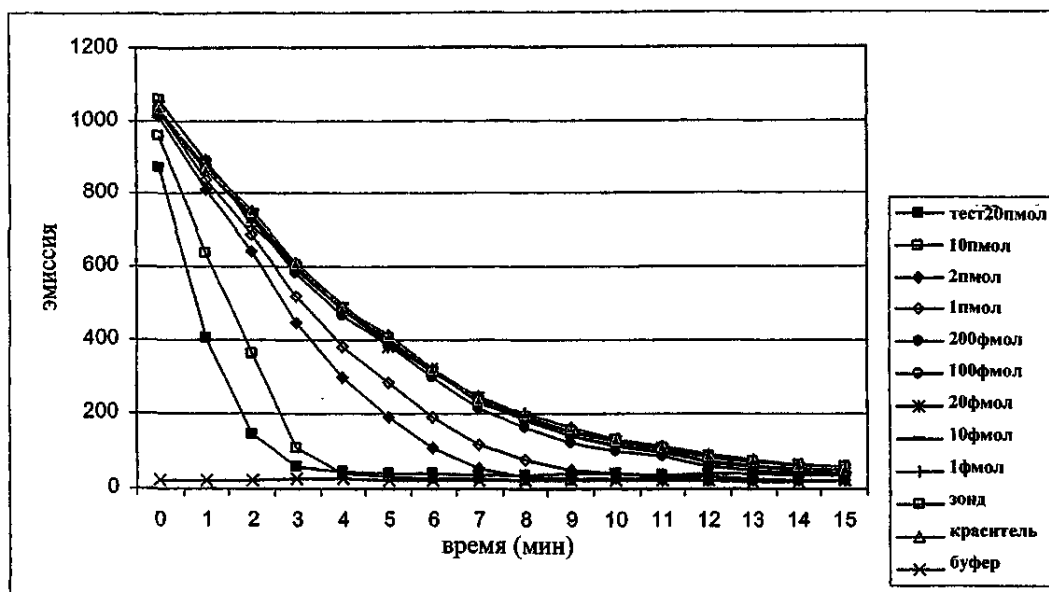
Фиг. 2



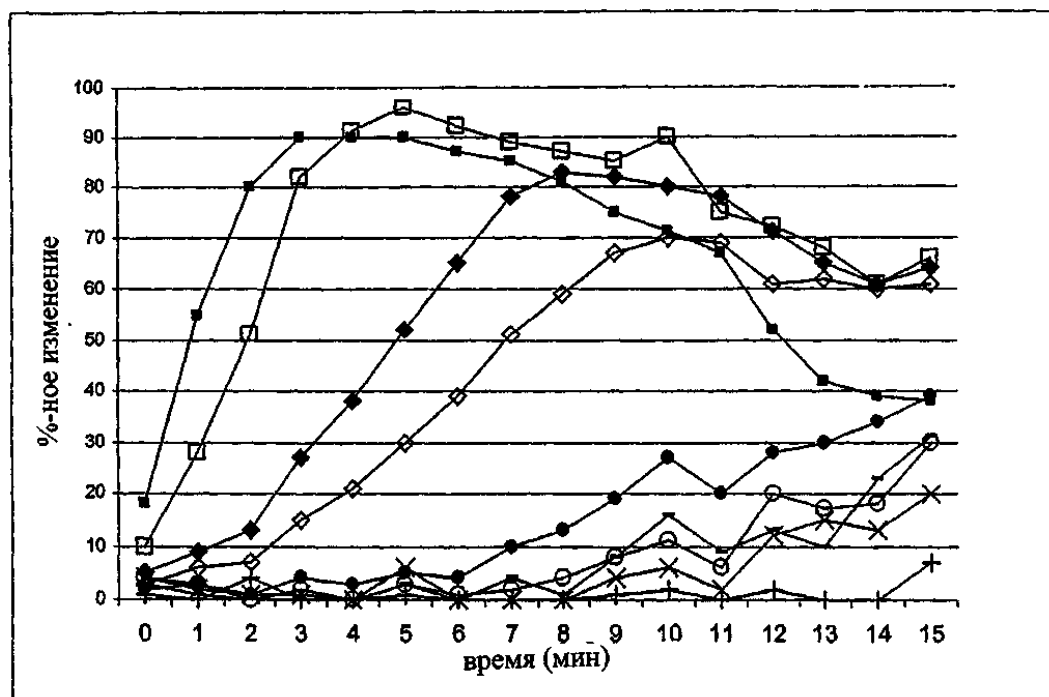
Фиг. 3



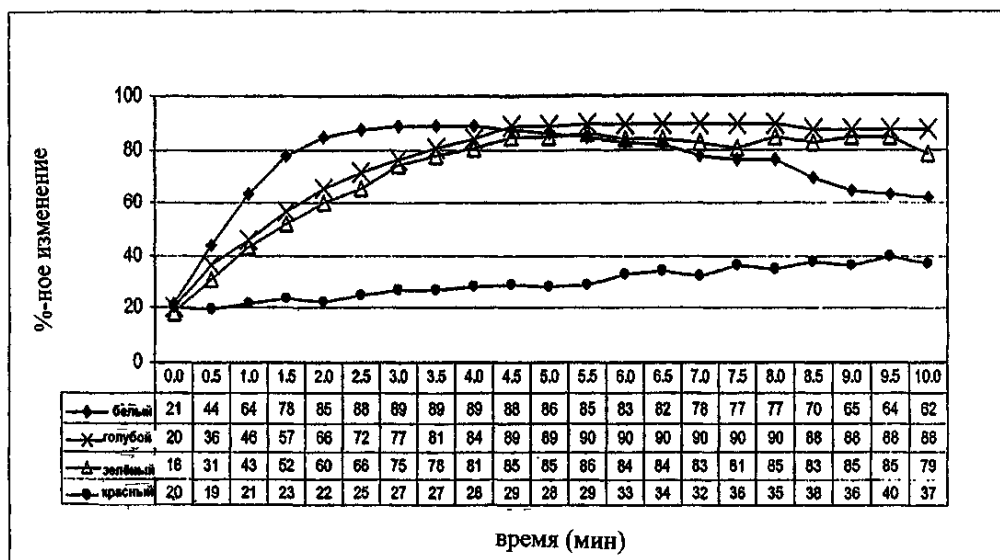
Фиг. 4



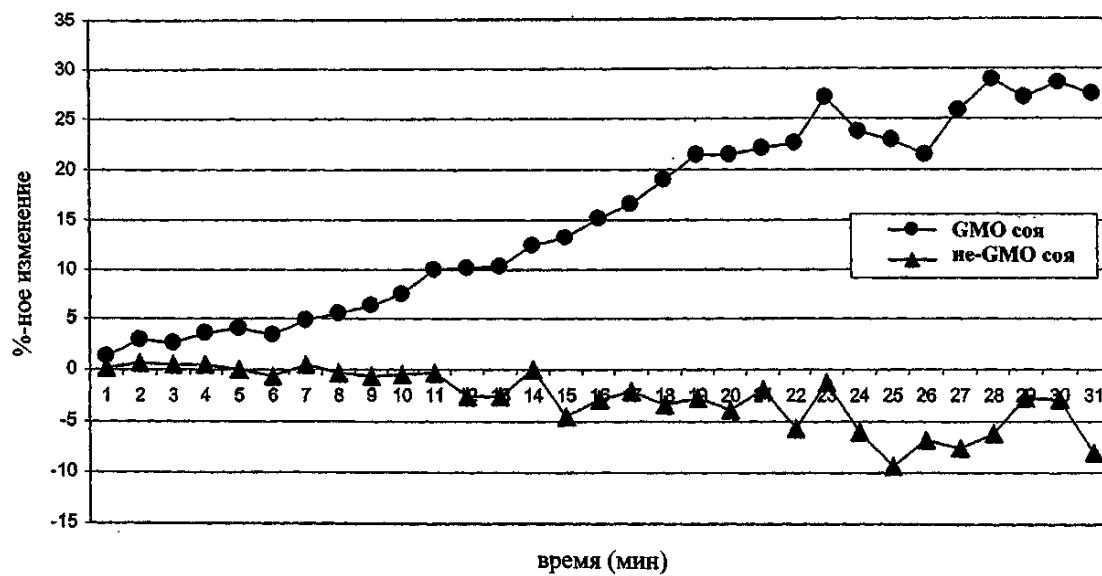
Фиг. 5



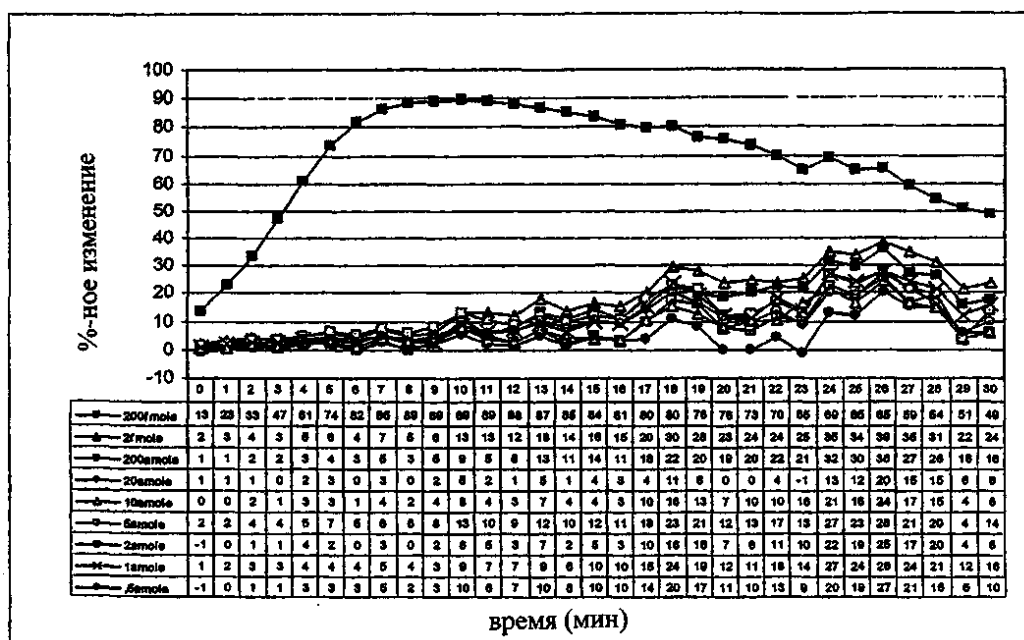
Фиг. 6



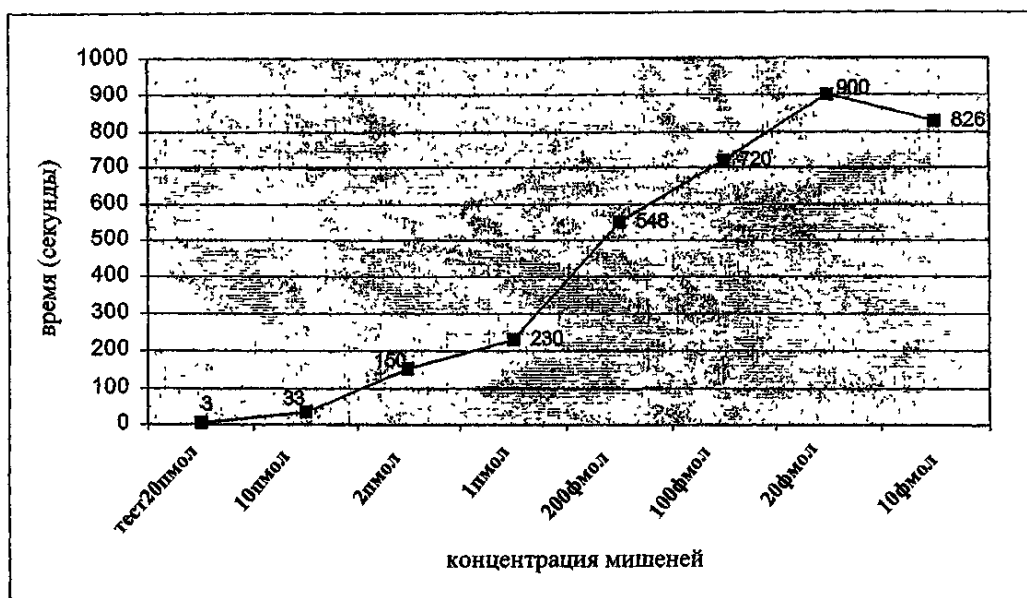
Фиг. 7



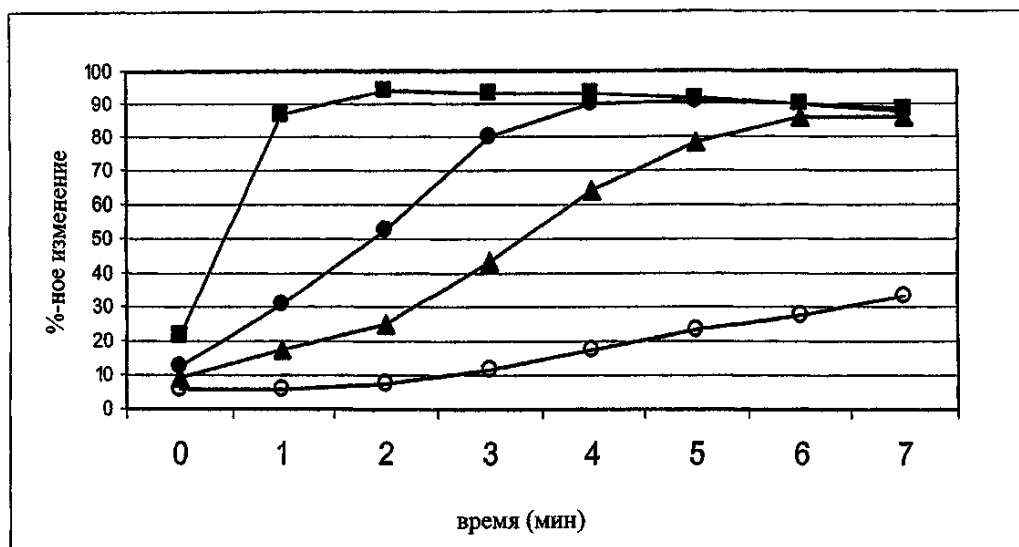
Фиг. 8



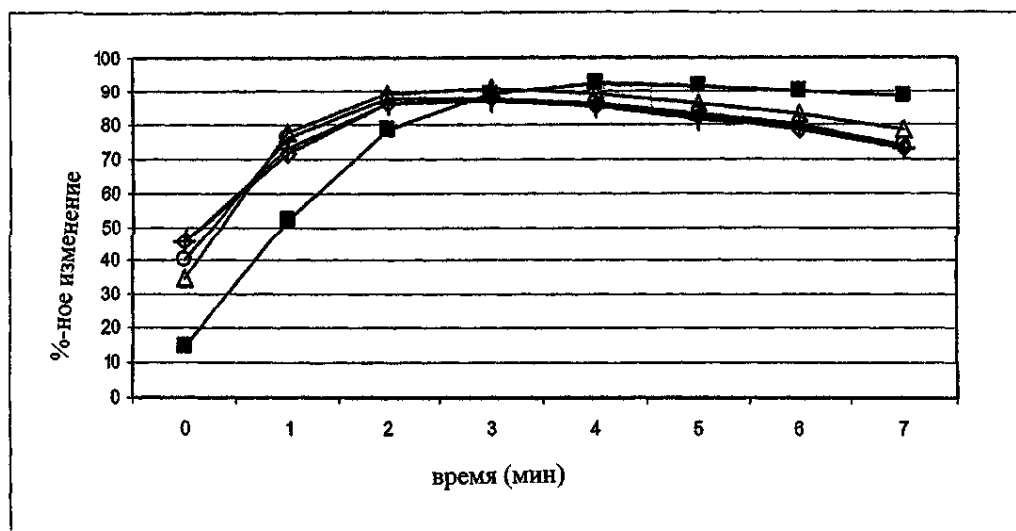
Фиг. 9



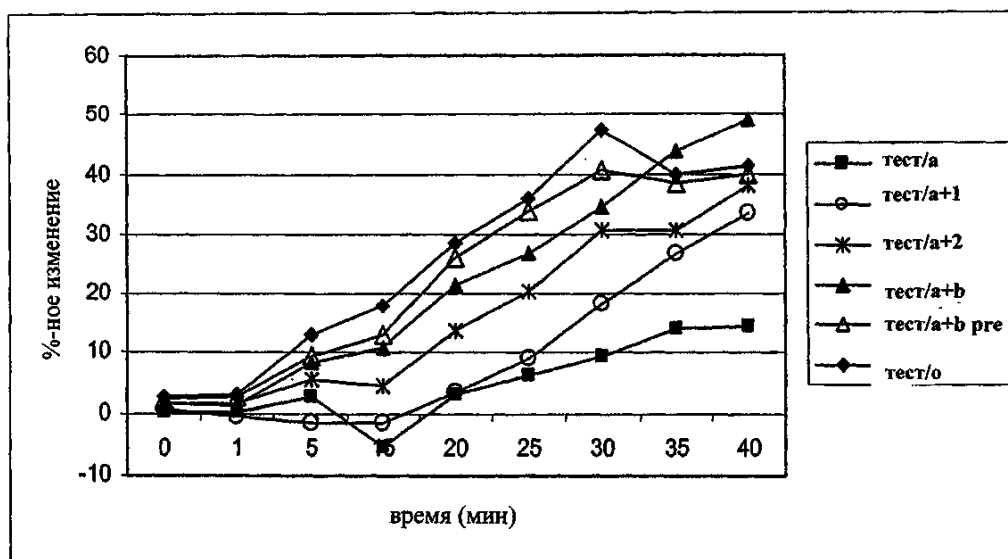
Фиг. 10



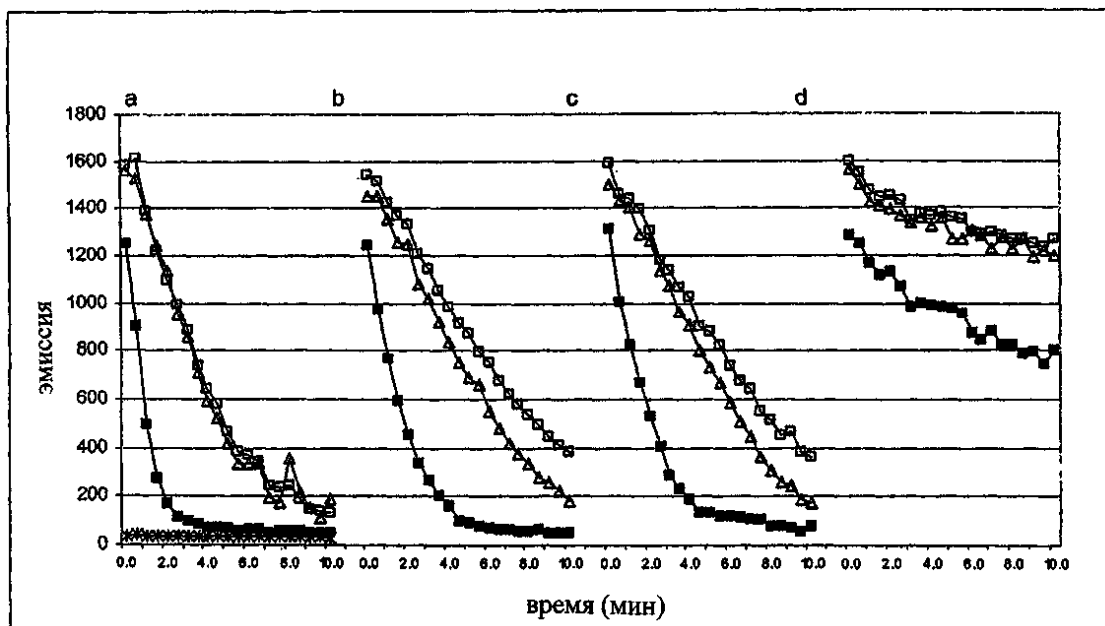
Фиг. 11



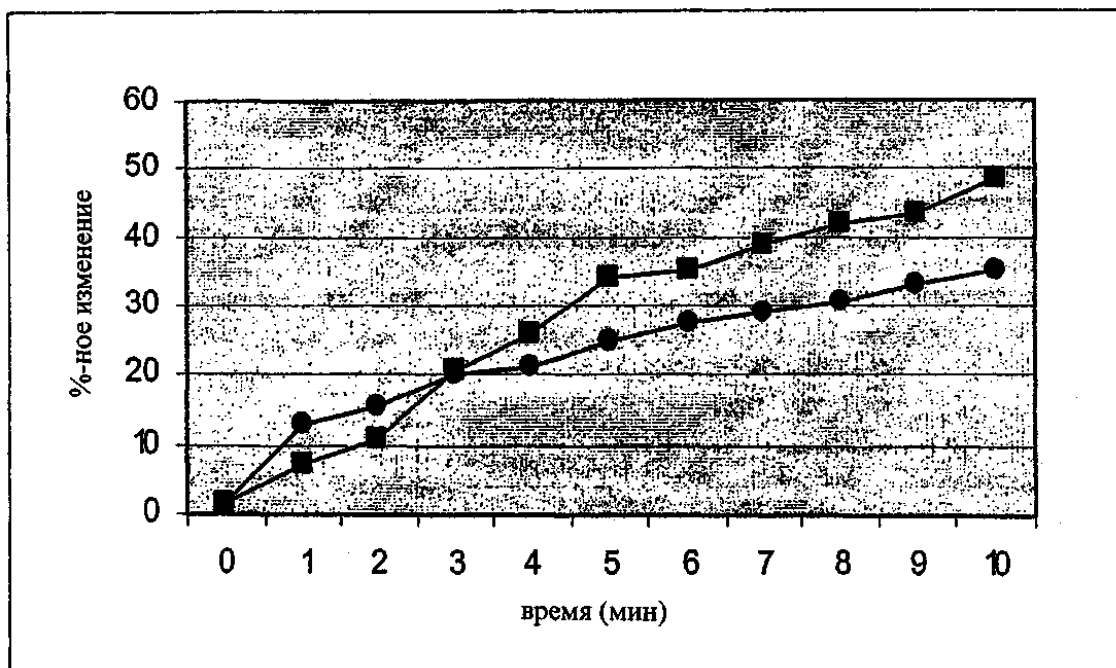
Фиг. 12



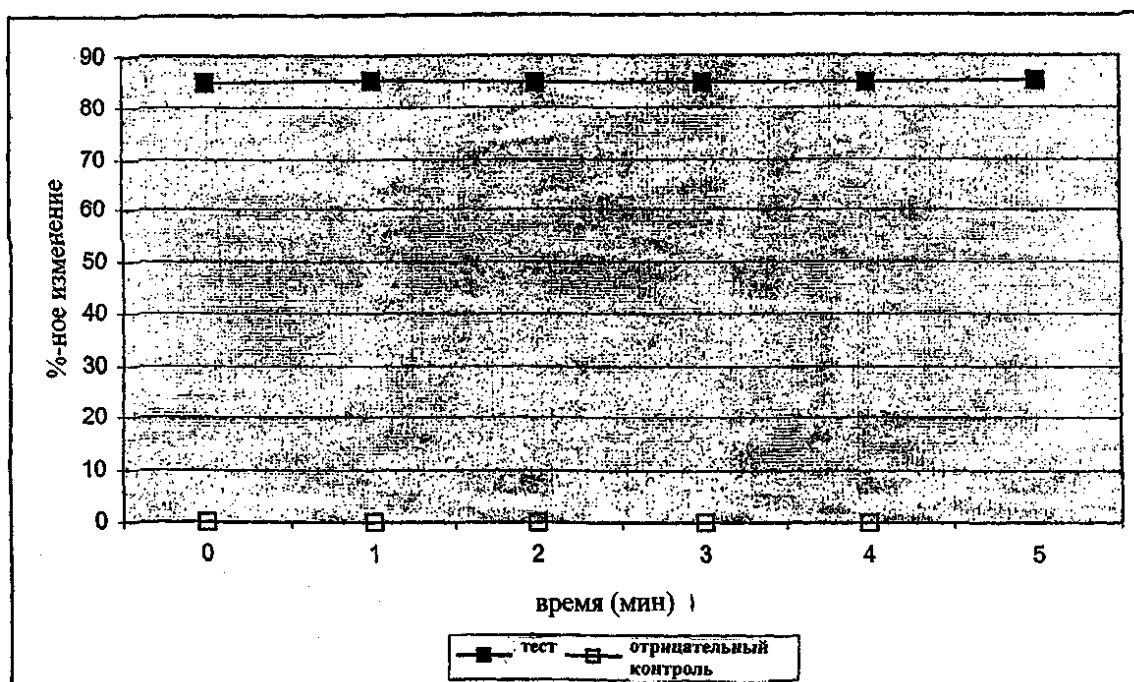
Фиг. 13



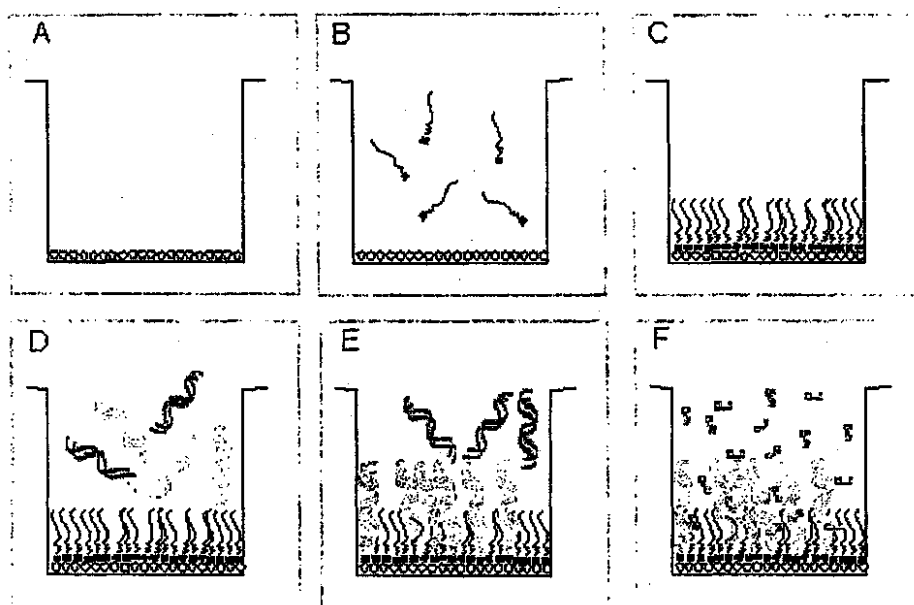
Фиг. 14



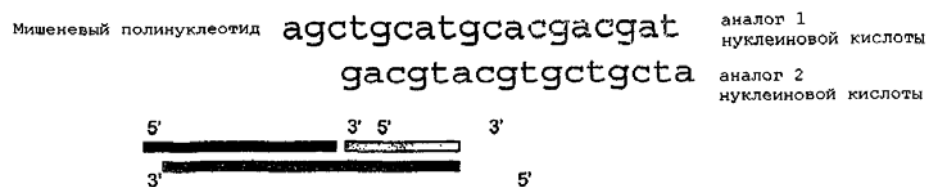
Фиг. 15



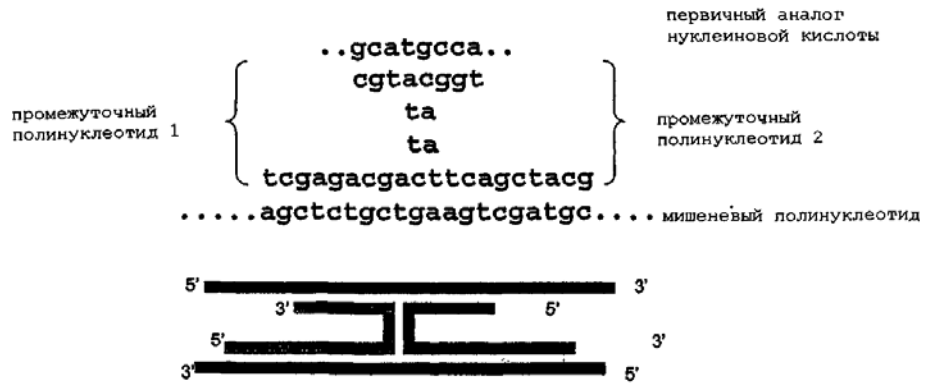
Фиг. 16



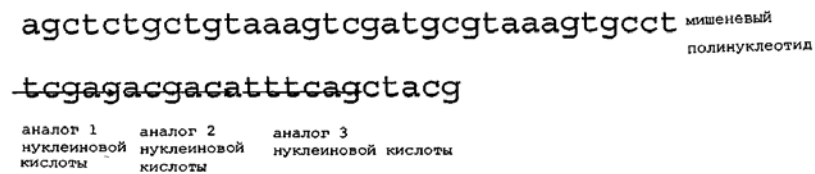
Фиг. 17



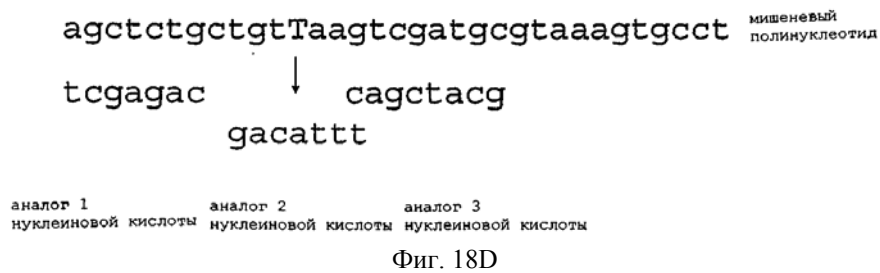
Фиг. 18A



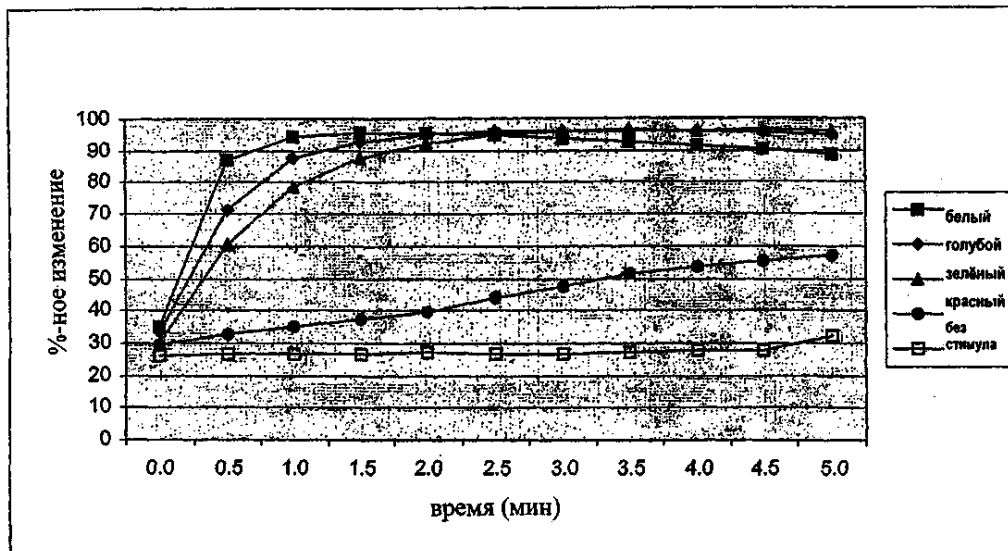
Фиг. 18B



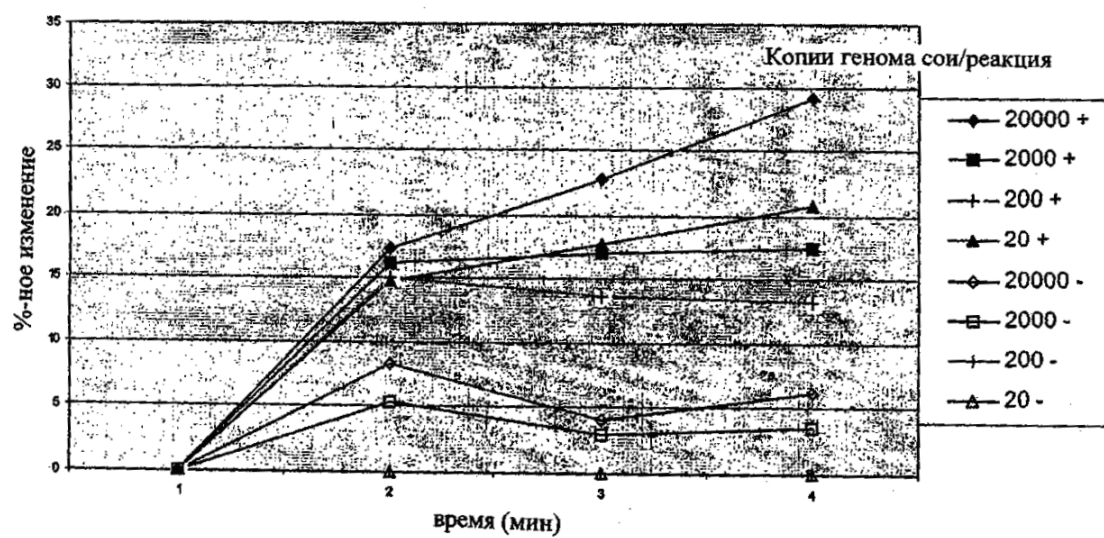
Фиг. 18C



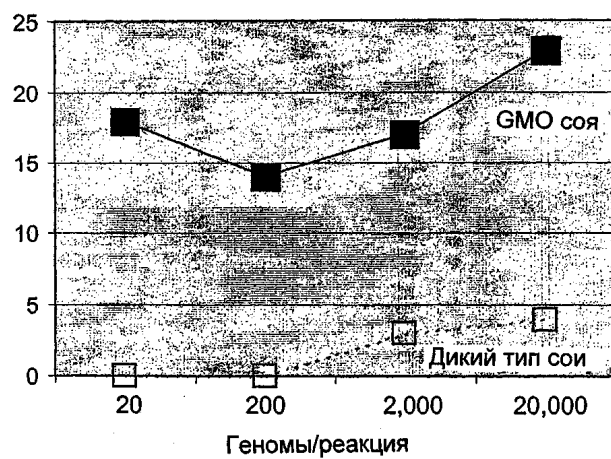
Фиг. 18D



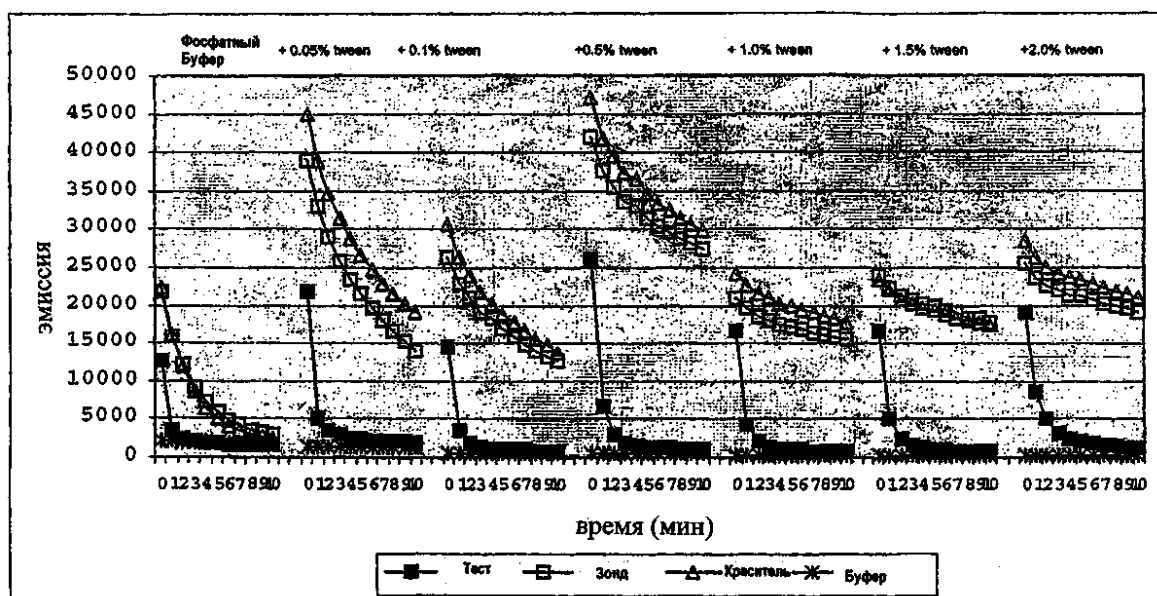
Фиг. 19



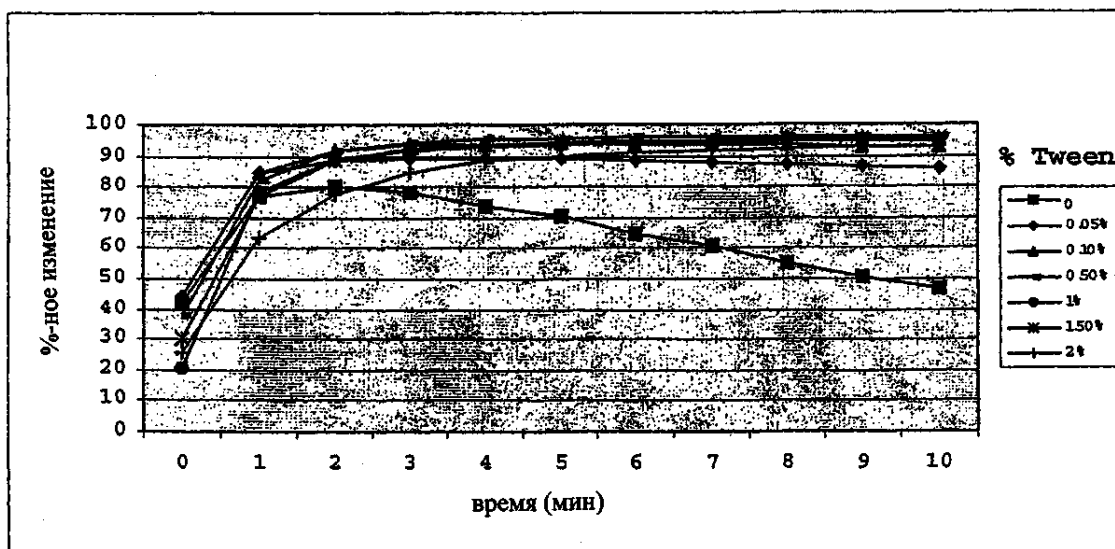
Фиг. 20



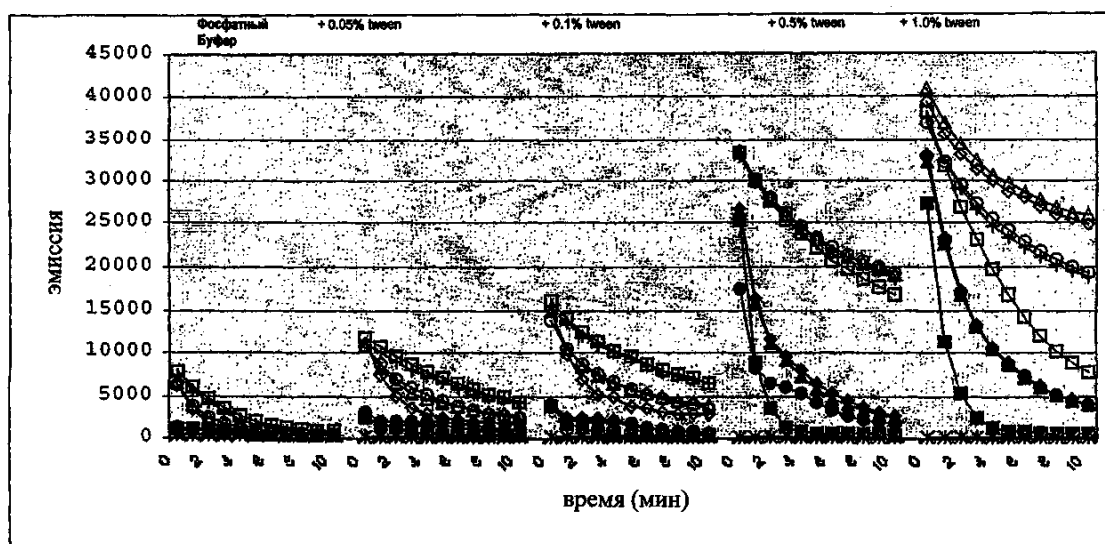
Фиг. 21



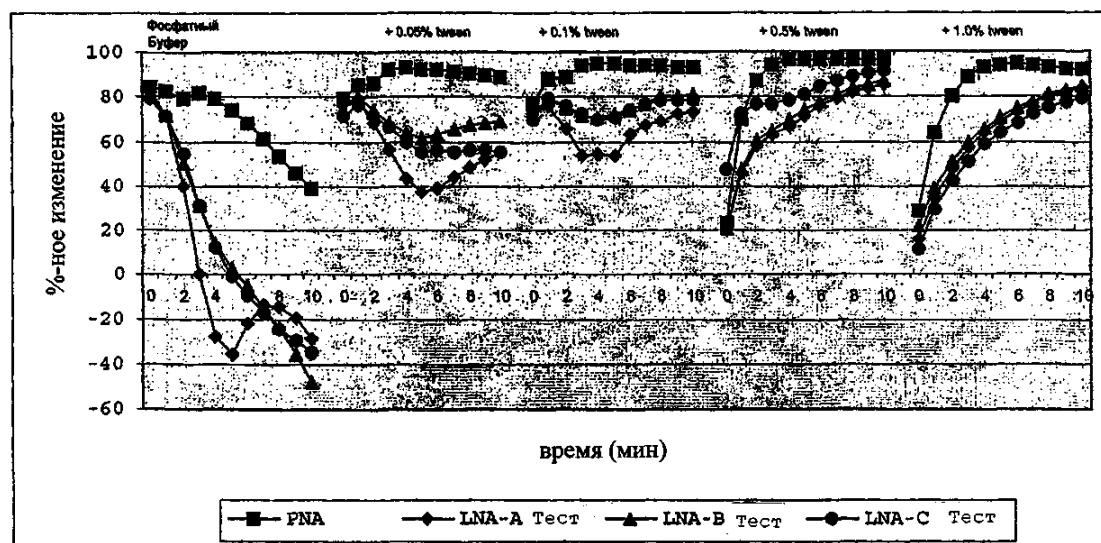
Фиг. 22



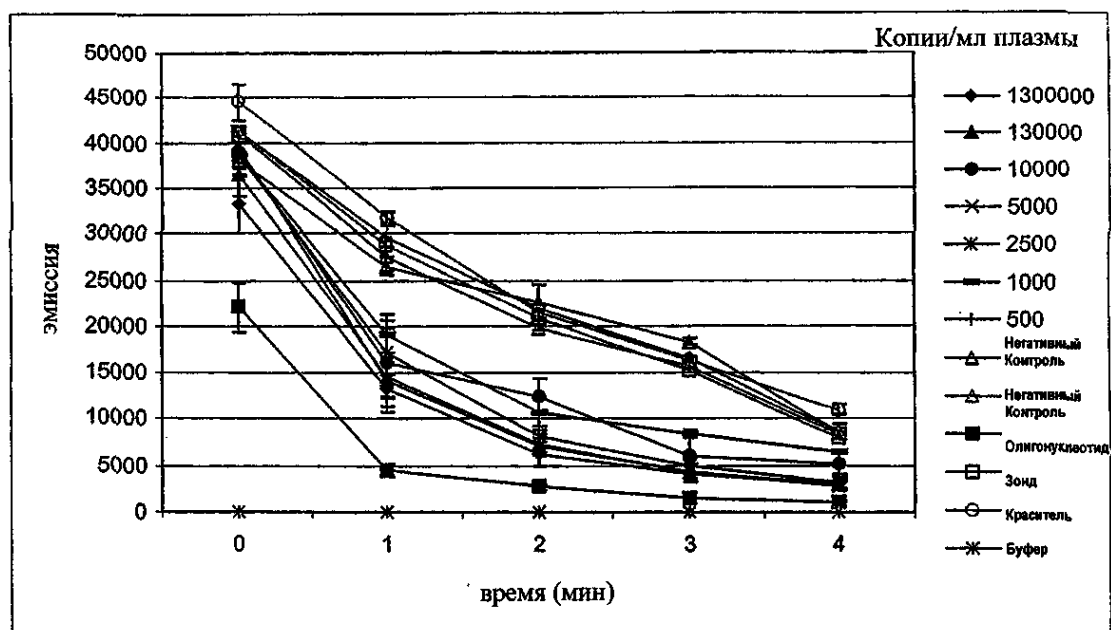
Фиг. 23



Фиг. 24

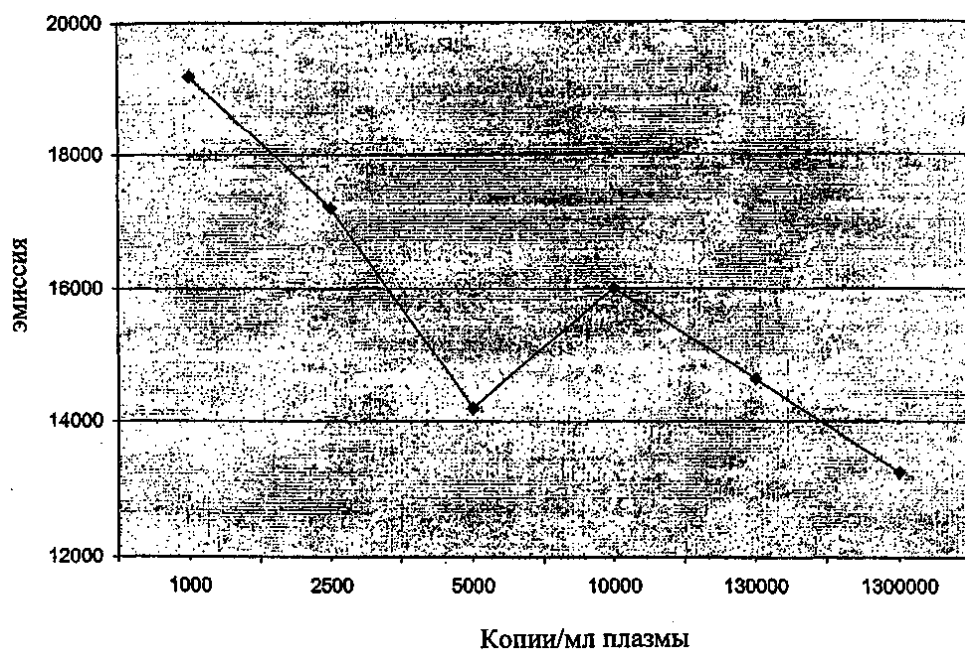


Фиг. 25

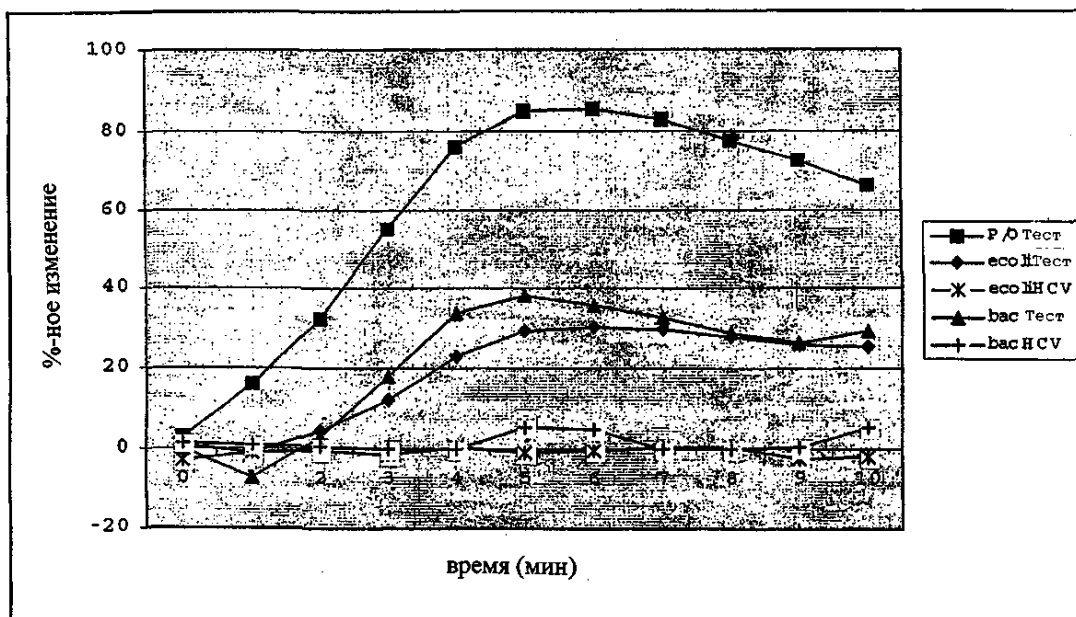


Анализ обнаруживает 1000 копий/мл плазмы, равное 1 копия/реакцию

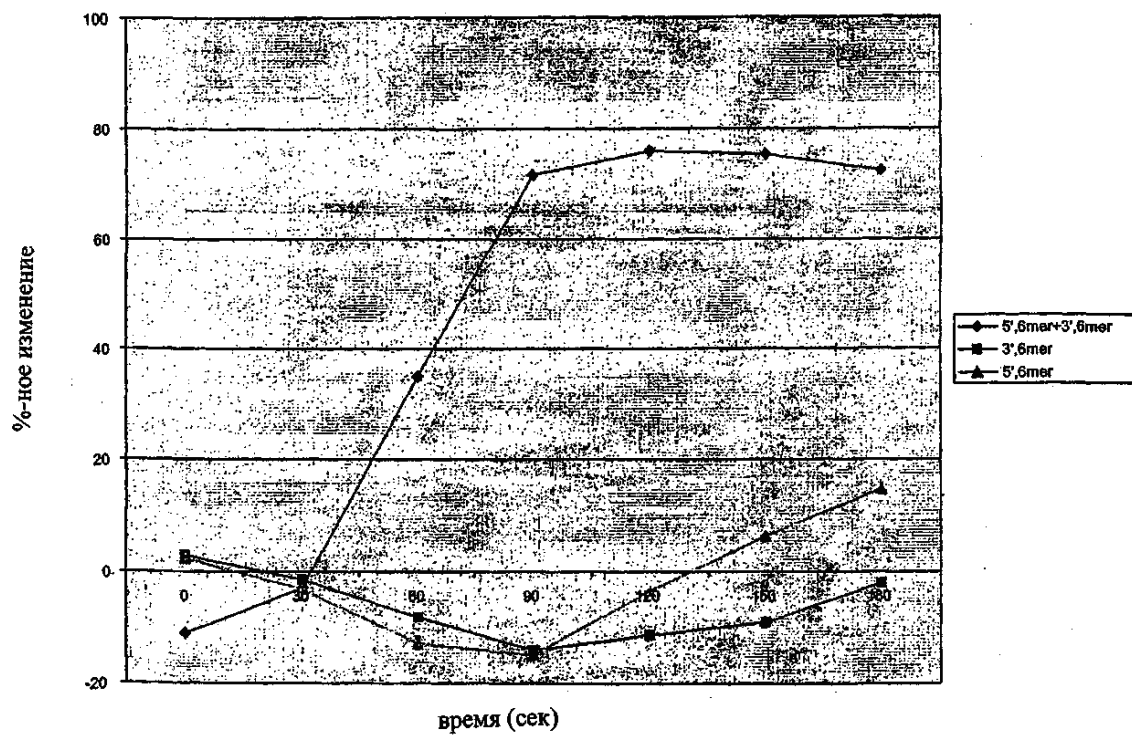
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6