



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2013153505, 18.05.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.05.2012

Дата регистрации:
30.05.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.05.2011 US 61/487,709

(43) Дата публикации заявки: 27.06.2015 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 30.05.2017 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.12.2013

(86) Заявка РСТ:
US 2012/038649 (18.05.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/159060 (22.11.2012)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

**ЦЕН Чин-Пин (TW),
ЧАН Шай-Шинь (TW)**

(73) Патентообладатель(и):

**ДАЙНОКЬЮБ ИНВЕСТМЕНТС, ЭлЭлСи
(US),
ЦЕН Чин-Пин (TW)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2182176 C2, 10.05.2002. WO
2006076650 A2, 20.07.2006.

(54) СПОСОБЫ, СИСТЕМЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНОЙ ДНК ПРИ ПОМОЩИ ПЦР

(57) Формула изобретения

1. Способ селективной амплификации одной или нескольких целевых бактериальных ДНК в образце, включающий:

гибридизацию множества гибридизационных зондов, выбранных из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 6, с указанной целевой микробной ДНК, где каждый из указанных гибридизационных зондов содержит 5'-концевой участок, имеющий последовательность небактериальной ДНК, выбранную из вирусной последовательности или искусственно сконструированной последовательности, и 3'-концевой участок, имеющий последовательность, комплементарную участку последовательности гена бактериальной 16S rRNA;

удаление негибридизованных гибридизационных зондов и любого несвязанного 3'-концевого участка целевой бактериальной ДНК;

удлинение 3'-концов гибридизационных зондов и целевой бактериальной ДНК с образованием двухцепочечных удлиненных с помощью праймера матриц и

проведение способа ПЦР для селективного амплифицирования удлиненных с

помощью праймера матриц при помощи набора праймеров, который включает по меньшей мере один праймер, имеющий небактериальную последовательность, комплементарную небактериальной последовательности гибридизационных зондов.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап удаления и этап удлинения включают добавление смеси экзонуклеазы I и ДНК-полимеразы Кленова.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что последовательность указанного 3'-концевого участка гибридизационных зондов комплементарна консервативному участку последовательности гена 16S рРНК.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ ПЦР выбирают из стандартной ПЦР или ПЦР в режиме реального времени.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный образец не обрабатывают от контаминирования бактериальной ДНК.

6. Способ детекции бактериальной инфекции у субъекта, включающий:
добавление множества гибридизационных зондов, выбранных из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 6, в образец субъекта, где каждый из указанных гибридизационных зондов содержит 5'-концевой участок, имеющий последовательность небактериальной ДНК, выбранную из вирусной последовательности или искусственно сконструированной последовательности, 3'-концевой участок, имеющий последовательность, комплементарную участку последовательности гена бактериальной 16S rRNA;
гибридизацию гибридизационных зондов с бактериальной ДНК в образце;
удаление негибридизованных гибридизационных зондов и любого несвязанного 3'-концевого участка бактериальной ДНК;
удлинение 3'-концов гибридизационных зондов и бактериальной ДНК с образованием двухцепочечных удлиненных с помощью праймера матриц;

амплифицирование удлиненных с помощью праймера матриц путем проведения способа ПЦР при помощи набора праймеров, который включает по меньшей мере один прямой праймер, имеющий небактериальную последовательность, комплементарную небактериальной последовательности гибридизационного зонда; и
анализирование амплифицированных ПЦР-продуктов для определения присутствия или отсутствия бактерии.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный образец не обрабатывают от контаминации бактериальной ДНК.

8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что последовательность указанного 3'-концевого участка гибридизационных зондов комплементарна консервативному участку последовательности гена 16S рРНК.

9. Гибридизационный зонд для создания удлиненной с помощью праймера ДНК-матрицы из целевой бактериальной ДНК в образце для селективной амплификации с помощью способа ПЦР, при этом указанный гибридизационный зонд содержит:

5'-концевой участок, имеющий небактериальную последовательность, выбранную из вирусной последовательности и искусственно сконструированной последовательности; и

3'-концевой участок, имеющий последовательность, комплементарную участку последовательности гена бактериальной 16S rRNA,

где указанный гибридизационный зонд выбран из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 6.

10. Гибридизационный зонд по п. 9, отличающийся тем, что указанная небактериальная последовательность представляет собой последовательность прямого праймера M13.

11. Гибридизационный зонд по п. 9, отличающийся тем, что последовательность указанного 3'-концевого участка гибридизационного зонда комплементарна консервативной последовательности гена 16S рРНК.

12. Набор для создания удлиненной с помощью праймера ДНК-матрицы из целевой микробной ДНК для селективной ПЦР-амплификации и детекции, включающий: множество гибридизационных зондов по п. 9.

13. Набор по п. 12, дополнительно включающий смесь 3'-5'-экзонуклеазы и ДНК-полимеразы Кленова.

R U 2 6 2 0 9 5 3 C 2

R U 2 6 2 0 9 5 3 C 2