

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2009/123494 A1

(43) Дата международной публикации
08 октября 2009 (08.10.2009)

РСТ

- (51) Международная патентная классификация:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки: РСТ/RU2008/000198
- (22) Дата международной подачи:
01 апреля 2008 (01.04.2008)
- (25) Язык подачи: Русский
- (26) Язык публикации: Русский
- (71) Заявители и
(72) Изобретатели: **ДРЫГИН, Юрий Федорович (DRYGIN, Yury Fedorovich)** [RU/RU]; Мичуринский проспект, д. 15, кв. 14, Москва, 119192, Moscow (RU). **АТАБЕКОВ, Иосиф Григорьевич (ATABEKOV, Iosif Grigorievich)** [RU/RU]; Ломоносовский пр-кт, д. 15, кв. 142, Москва, 119311, Moscow (RU).
- (72) Изобретатели; и
(75) Изобретатели/Заявители (только для US): **КОНДАКОВА, Ольга Александровна (KONDAKOVA, Olga Alexandrovna)** [RU/RU]; ул. Лукинская, д. 11, кв. 248, Москва, 119634, Moscow (RU). **ЧИРКОВ, Сергей Николаевич (CHIRKOV, Sergei Nikolaevich)** [RU/RU]; Конаковский проезд, д. 8, корп. 1, кв. 135, Москва, 125565, Moscow (RU). **ЗИНОВКИН, Роман Алексеевич (ZINOVKIN, Roman Alexeevich)** [RU/RU]; п -т Вернадского д. 97 кв. 267 Москва, 119526, Moscow (RU). **КИСЕЛЕВА, Валентина Ивановна (KISELEVA, Valentina Ivanovna)** [RU/RU]; ул. Гагарина, д. 36, кв. 258, Обнинск, Калужская область, 249034, Obninsk (RU).
- (74) Агент: **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СОЮЗПАТЕНТ" (OBSCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTJU "SOJUZPATENT")**; ул. Ильинка, 5/2, Москва, 103735, Moscow (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: METHOD FOR SIMULTANEOUSLY DETECTING A PLURALITY OF RNA SEQUENCES IN A BIOLOGICAL SAMPLE

(54) Название изобретения: СПОСОБ ОДНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ МНОЖЕСТВА РНК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБРАЗЦЕ

(57) Abstract: The invention relates to molecular biology, biotechnology, genetic engineering and to medicine and provides a multipurpose method for simultaneously detecting different RNAs in tested samples, including diagnosis purposes during mass analysis of viral and viroidal infections of organisms. The inventive method involves separating a total RNA from a sample, marking the RNA with a diene-platinum mark, crossbreeding the marked RNA with a microchip in the form a substrate with DNA-probes which are immobilised thereon and are specific to the above-mentioned RNA sequences and subsequently detecting the thus formed specific heteroduplexes with the aid of DNA diene-platinum antibodies. A microchip for simultaneously detecting seven viral and viroidal potato infections which are contained in the tested sample and are more economically damaging for potato growing in Russia is also disclosed. The inventive technics for molecular detection of multiple infections makes it possible to substantially accelerate the diagnostic analysis of combined viral infections of different organisms in the case of visually ambiguously identified epiphytotics and epyzootics, during a quarantine and for certification of agricultural plants and animals.

(57) Реферат: Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, генной инженерии и медицине и обеспечивает универсальный способ одновременного обнаружения различных РНК в анализируемых образцах, в том числе для диагностических целей при массовых анализах вирусных и виroidных инфекций организмов. Способ предусматривает выделение суммарной РНК из образца, мечение РНК диен-платиновой меткой, гибридизацию меченой РНК с микрочипом, представляющим собой подложку с иммобилизованными на ней ДНК-зондами, специфичными в отношении указанных РНК-последовательностей, и последующую детекцию образовавшихся специфических гетеродуплексов с помощью антител к ДНК-диен-платине. Предложен диагностический микрочип для одновременного определения семи вирусных и виroidной инфекций картофеля в анализируемом образце, наносящих наибольший экономический ущерб картофелеводству России. Разработанная технология молекулярной диагностики множественных инфекций позволяет резко ускорить диагностический анализ смешанных вирусных инфекций различных организмов в случае неоднозначно визуально диагностируемых эпифитотий и эпизоотии, при введении карантина, для сертификации сельскохозяйственных растений и животных и др.



WO 2009/123494 A1

ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)

СПОСОБ ОДНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ МНОЖЕСТВА РНК-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБРАЗЦЕ

Область техники

Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, генной инженерии и медицине и может быть использовано в качестве универсального способа одновременного обнаружения различных РНК в анализируемых образцах, в том числе для диагностических целей при массовых анализах вирусных и виroidных инфекций организмов.

Предшествующий уровень техники

Актуальной проблемой современной молекулярной диагностики является одновременное выявление множества РНК-последовательностей в образце. В частности, особый интерес представляет дифференциальный анализ экспрессии различных транскриптов, например, в клетках одного и того же типа в норме и при патологии, при воздействии различных факторов окружающей среды, а также в ходе естественного цикла развития организма. Еще одним важным аспектом является дифференциальный анализ транскриптов в клетках разного типа. Наконец, с практической точки зрения чрезвычайно актуальной представляется задача обнаружения патогенов вирусной и виroidной природы сельскохозяйственных растений и животных.

Наиболее эффективной технологией, способной анализировать одновременно (в одном анализе) множество нуклеотидных последовательностей, является сотовая технология или ДНК-чиповая (микрочиповая) технология (*gene array technology*, *array technology*, *DNA chip technology*). Эта технология была разработана для генотипирования, идентификации геномов и организмов, определения точечных мутаций, молекулярной диагностики инфекций, онкологических заболеваний путем сравнения экспрессии генов и т.п. Наиболее широко она используется в медицине.

В настоящее время развито несколько вариантов ДНК-чиповой технологии, различающихся природой (нуклеиновой, белковой и т.п.) чипов и мишени и способами детекции сигнала, начиная от обычной флуоресценции и кончая переносом энергии электронного возбуждения у флуорофоров (FRET). В общем виде достоинства ДНК-чиповой технологии состоят в автоматическом нанесении

множества олигонуклеотидов-зондов, автоматическом режиме анализа и определении соотношения сигнал/шум по флуоресценции.

Для фундаментальной и прикладной медицины технологии ДНК-микрочипов в настоящее время применяются несколькими крупными компаниями – разработчиками и производителями диагностических наборов и ДНК-чипов (Agilent, Eppendorf, TeleChem International, SuperArray Bioscience) и для коммерческих целей другими диагностическими компаниями, использующими наборы фирм-производителей.

ДНК-чип представляет собой плоский или объемный субстрат, на поверхности которого прочно закреплены в виде точек (как в сотах) множественные ДНК-зонды длиной от 8 до сотен нуклеотидов, полученные химическим синтезом или биохимическими (продукты ПЦР или геной инженерии) способами. Эти ДНК являются ДНК-зондами, которые определяют избирательность связывания тех молекул ДНК или РНК, которые находятся в анализируемом препарате. Специфичность связывания в свою очередь определяется комплементарностью гетероциклических оснований анализируемых нуклеиновых кислот и ДНК-чипа, которая выявляется путем гибридизации нуклеиновых кислот в анализируемом образце с ДНК-зондом.

В большинстве ДНК-чиповых технологий нуклеиновые кислоты в анализируемом препарате метят флуоресцентной меткой, которая помогает определить, с каким конкретно зондом связалась та(те) или иная(ые) нуклеиновая(ые) кислота(ы).

Очевидное достоинство ДНК-чиповой технологии в диагностическом анализе состоит в одновременном определении сразу нескольких целевых патогенов, первичная структура генома которых известна. Другое достоинство ДНК-чипов состоит в возможности детекции даже одиночных (в один нуклеотид) различий в полинуклеотидах. Таким образом, диагностическая специфичность комбинации олигонуклеотидов, перекрывающих последовательность детектируемого линейного полинуклеотида, выше, чем специфичность гибридизации этого полинуклеотида.

Настоящая заявка относится к применению ДНК-чиповой технологии и конкурирующих технологий для одновременного обнаружения множества специфических РНК-последовательностей в образце, в частности для диагностики различных вирусных и виroidных инфекций сельскохозяйственных пород животных

и культур растений, главным образом, для диагностики различных вирусных и виroidных инфекций картофеля.

Впервые ДНК-чип для смешанной инфекции картофеля вирусами А, Х, Y и S был использован Т. Boonham, К. Walsh, Р. Smith, К. Madagan, I. Graham and I. Barker «*Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis*» J. Virol. Meth. 108, № 2, 181-187 (2003). Авторы вначале подобрали необходимые праймеры для клонирования кДНК вышеуказанных вирусов *in vitro* с помощью технологии ОТ-ПЦР, затем амплифицированные ДНК, одна нить которых представляет собой кДНК целевого вируса, рекомбинировали с плазмидами-векторами методами генетической инженерии, рекомбинантные ДНК размножали *in vivo* в *E. coli*. Чтобы создать ДНК-чип, эти плазмиды с помощью робота наносили в ячейки (соты) на поверхность стекла, покрытого полилизинном. Для обнаружения вирусов в зараженном растении авторы экстрагировали суммарную РНК из листовой ткани опытных и контрольных растений. Затем с помощью случайной затравки и меченого флуоресцентным цианиновым красителем нуклеозидтрифосфата (Cy3-dCTP) получали меченую суммарную кДНК, которую гибридизовали с рекомбинантными ДНК, фиксированными на ДНК-чипе. Появление флуоресценции в ячейке, комплементарной вирусной кДНК, говорило об инфекции анализируемого образца картофеля.

ДНК-чип, в ячейках которого были фиксированы синтетические олигонуклеотиды (40-меры), комплементарные РНК вирусов картофеля PVA, PVS, PVM, PVX, PVY, PLRV, а также способные различить штаммы вируса Y картофеля - PVY^{NTN} и PVY^O, был разработан в работе D. Bystricka, O. Lenz, I. Mraz, L. Piherova, S. Kmoch, M. Sip «*Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses*» J. Virol. Meth. 128 (2005) 176–182. Для каждой вирусной РНК было синтезировано 4 независимых олигомера, всего 34 олигонуклеотида. Олигонуклеотиды затем наносили с помощью робота на предметное стекло микроскопа, покрытое полилизинном, и фиксировали их УФ-светом и прогреванием. Суммарную РНК из анализируемых образцов растений авторы выделяли, используя коммерческий набор. Меченые в две стадии флуоресцентной меткой кДНК вирусных РНК получали технологией ОТ-ПЦР суммарного препарата РНК с помощью вирус-специфических праймеров (отдельно

для каждого вируса) и меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Полученные препараты меченых ДНК гибридизовали с олигоДНК-чипом. Авторы успешно диагностировали как инфекции картофеля одним вирусом, так и двумя штаммами PVY^{NTN} и PVY^O одного и того же вируса.

Специфичность детекции мишени определяется сразу по нескольким олигодезоксирибонуклеотидам-зондам. Чувствительность определения целевой нуклеиновой кислоты в стандартной (изложенной выше) ДНК-чиповой технологии невысока (сотни-тысячи копий), но может быть увеличена до десятков копий с помощью специальной аппаратуры (мощный фотоумножитель) или биохимического усиления сигнала (с помощью ИФА). Более высокую чувствительность (Reiman M, Xie C. *Development and evaluation of a multiplex RT-PCR for detecting main viruses and a viroid of potato*. Acta Virol. 2006;50(2):129-33) и специфичность (Rigotti S, Gugerli P. *Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR*, J Virol Methods. 2007 Mar;140(1-2):90-4) можно получить с помощью мультиплексной ПЦР (или ОТ-ПЦР) технологии в растворе (Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH. *Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR*. J Virol Methods. 2007 Jun;142(1-2):1-9; Nie X, Singh RP. *A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers*. J Virol Methods. 2001 Jan;91(1):37-49), которая, однако, имеет значительно меньшую диагностическую емкость (меньшее число одновременно определяемых патогенов).

Раскрытие изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что диен-платина, применявшаяся ранее для мечения ДНК, способна в мягких условиях прочно и количественно связываться с РНК. Такая меченная диен-платиной РНК способна специфически гибридизоваться с иммобилизованными на чипе ДНК-зондами. Поскольку авторы обнаружили, что антитела к диен-платинированной ДНК узнают с примерно такой же чувствительностью любую диен-платинированную РНК, то образовавшиеся гетеродуплексы меченых РНК и соответствующих ДНК-зондов могут быть детектированы с помощью антител к диен-платинированной ДНК.

Таким образом, в своем первом аспекте настоящее изобретение относится к способу одновременного обнаружения множества РНК-последовательностей в

биологическом образце, включающему следующие стадии:

а) обеспечение ДНК-чипа, представляющего собой подложку с иммобилизованными на ней ДНК-зондами, специфичными в отношении указанных РНК-последовательностей;

б) выделение суммарной РНК из образца;

в) введение диен-платиновой метки в молекулы РНК;

г) гибридизацию меченной диен-платиновой меткой РНК с ДНК-чипом в условиях, обеспечивающих селективное образование специфических гетеродуплексов между указанными РНК-последовательностями и соответствующими ДНК-зондами;

д) детекцию образовавшихся специфических гетеродуплексов с помощью антител к ДНК-диен-платине,

причем образование специфического гетеродуплекса указывает на присутствие соответствующей РНК-последовательности в образце.

В одном из воплощений способ предусматривает, что в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов указанных РНК-последовательностей. В еще одном из воплощений способ предусматривает, что в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, специфичные в отношении указанных РНК-последовательностей.

В своем следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу одновременного обнаружения множества возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций в биологическом образце, включающему следующие стадии:

а) обеспечение ДНК-чипа, представляющего собой подложку с иммобилизованными на ней ДНК-зондами, специфичными в отношении РНК указанных возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций;

б) выделение суммарной РНК из указанного образца;

в) введение диен-платиновой метки в молекулы РНК;

г) гибридизацию меченной диен-платиновой меткой РНК с ДНК-чипом в условиях, обеспечивающих селективное образование специфических гетеродуплексов вирусных и/или виroidных РНК и соответствующих ДНК-зондов;

д) детекцию образовавшихся специфических гетеродуплексов с помощью антител к диен-платине,

причем образование специфического гетеродуплекса указывает на присутствие соответствующего возбудителя вирусной и/или виroidной инфекции в образце.

В одном из воплощений способ предусматривает, что в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов диагностируемых возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций. В другом воплощении способ предусматривает, что в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, специфичные в отношении диагностируемых возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций

В еще одном воплощении способа биологический образец представляет собой образец ткани картофеля, а возбудителями являются вирус мозаики люцерны, вирус Y картофеля, вирус M картофеля, вирус S картофеля, вирус A картофеля, вирус Y картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, виroid веретеновидности клубней картофеля, вирус X картофеля. В предпочтительном воплощении ДНК-зонды, иммобилизованные на ДНК-чипе, представляют собой рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов РНК указанных возбудителей вирусных и виroidных инфекций картофеля, полученные путем реакции обратной транскрипции и ПЦР с использованием набора праймеров SEQ ID NO: 1-16.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к ДНК-чипу для одновременного обнаружения множества возбудителей вирусных и виroidных инфекций картофеля, где возбудителями являются вирус мозаики люцерны, вирус Y картофеля, вирус M картофеля, вирус S картофеля, вирус A картофеля, вирус Y картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, виroid веретеновидности клубней картофеля, вирус X картофеля. ДНК-чип согласно настоящему изобретению представляет собой подложку с иммобилизованными на ней ДНК-зондами, представляющими собой рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов РНК указанных возбудителей вирусных и виroidных инфекций картофеля, полученные путем реакции обратной транскрипции и ПЦР с использованием набора праймеров SEQ ID NO: 1-16.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к набору праймеров

для получения кДНК-фрагментов РНК вируса мозаики люцерны, вируса Y картофеля, вируса M картофеля, вируса S картофеля, вируса A картофеля, вируса Y картофеля, вируса скручивания листьев картофеля, вириода веретеновидности клубней картофеля и вируса X картофеля, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 1-16, для изготовления ДНК-чипа согласно настоящему изобретению.

Поскольку производители сельскохозяйственной продукции специализированы по объектам производства и сбыта, экономически целесообразно готовить диагностический ДНК-чип на местные, районированные инфекции конкретной культуры растений или породы животных.

На практике для данной сельскохозяйственной культуры в конкретном районе/области/крае (или даже стране) опасность представляет небольшое число (10-20) патогенов вирусной, бактериальной или грибковой природы. В частности для культуры картофеля на территории РФ наибольшую опасность представляют всего 7 вирусных и одна вириодная инфекции. Очевидно, что в этом случае выгодно использовать достоинства ДНК-чиповой технологии молекулярной диагностики, когда в одном анализе можно получить практически полную информацию о зараженности опасными вирусами анализируемого образца.

В простейшем воплощении способ может быть представлен следующим образом: на полупроницаемую нитратцеллюлозную мембрану (прототип ДНК-чипа) в ячейки в виде точек наносят растворы клонированных рекомбинантных ДНК, содержащих отдельно вставки кДНК семи ранее упомянутых вирусов и вириода (см. Фиг. 1) и фиксируют ультрафиолетовым светом. Из анализируемых образцов, которые, как правило, представляли собой пробирочное растение или листовую ткань растения (с одинаковым успехом были использованы такие растения, как картофель, томаты, табак), выделяли суммарную клеточную РНК из незараженных (контроль) и зараженных фитопатогенами растений. Для выделения суммарной РНК подходит любой известный специалистам в данной области способ, например с использованием гуанидинтиоцианата в смеси с фенолом (в англоязычной литературе TRIZOL Reagent (U.S. Patent No. 5346994)), горячего водонасыщенного фенола, фенола с 0,5-4% додецилсульфатом натрия, хлороформа с хлористым натрием в концентрации 1М и выше (используется диагностической фирмой «Agdia», США). Предпочтительно для выделения РНК использовать разработанный авторами

настоящего изобретения простой, экономически выгодный и дружественный по отношению к окружающей среде способ с использованием трихлорацетата аммония, раскрытый в патентной заявке PCT/RU2007/000310).. Суммарную РНК метили диен-платиной. Ранее эту метку авторы настоящего изобретения (Кондакова О.А. , Дрыгин Ю.Ф. Диагностика вирусного заболевания картофеля зондами (диен)Pt-ДНК, Биотехнология, №4, с. 83-90 (1999); Дрыгин Ю.Ф., Кондакова О.А., Атабеков И. Г., Мусин С.М., Бойко В.В, Бабоша А.В. «Проблема вириода в семеноводстве картофеля: диагностика, формирование генобанка, производство исходного материала», Картофель и овощи (2000), 2, 38-40; Мусин С.М., Бойко В.В., Бабоша А.В., Кондакова О.А., Дрыгин Ю.Ф., Атабеков И.Г. «Диагностика и контроль вирусного заболевания картофеля в растениях», Защита и карантин растений, 10, 22-23 (2001); Yu. F. Drygin, S. N. Chirkov, O. A. Kondakova, R. A. Zinovkin, P. A. Ivanov, A.N. Blintsov, E. S. Gavryushina, A. V. Zherdev, N. A. Byzova, B. B. Dzantiev, J. G. Atabekov «High-sensitive technologies for molecular diagnostics of potato virus and viroid infections». "Potato Production and Innovative Technologies" (eds. A.J. Haverkort, B.V. Anisimov), Wageningen Acad.Publishers, 2007, pp.274-285) и наши предшественники (Киселева В.И., Турчинский М.Ф., Колесник Т.Б., Поверенный А.М. Биоорган. хим. (1994) т. 29. №1, с.14-20) использовали для мечения ДНК. Это ключевой момент в этой технологии, и авторами впервые было установлено, что диен-платина прочно и количественно связывается с РНК в мягких условиях (см. Фиг. 2,3). Далее меченые РНК гибридизуются с рекомбинантными ДНК, нанесенными на мембрану. Образовавшиеся специфические гетеродуплексы меченых вирусных РНК и соответствующих рекомбинантных ДНК определяются с помощью антител к диен-платинированной ДНК (см. Фиг. 4) - это второй ключевой момент технологии, поскольку антитела к диен-платинированной ДНК узнают с примерно такой же чувствительностью любую диен-платинированную РНК. В свою очередь для обнаружения связавшихся антител авторы использовали ранее применявшуюся (Кондакова О.А. , Дрыгин Ю.Ф. Диагностика вирусного заболевания картофеля зондами (диен)Pt-ДНК, Биотехнология, №4, с. 83-90 (1999); Yu. F. Drygin, S. N. Chirkov, O. A. Kondakova, R. A. Zinovkin, P. A. Ivanov, A.N. Blintsov, E. S. Gavryushina, A. V. Zherdev, N. A. Byzova, B. B. Dzantiev, J. G. Atabekov «High-sensitive technologies for molecular diagnostics of potato virus and viroid infections». "Potato Production and Innovative Technologies" (eds. A.J. Haverkort, B.V.

Anisimov), Wageningen Acad.Publishers, 2007, pp.274-285) в технологии МГА-ИФА систему детекции с хемилюминисцентным субстратом. На этой стадии происходит усиление диагностического сигнала за счет катализируемой ферментом реакции.

Как было установлено (D. Bystricka, O. Lenz, I. Mraz, L. Piherova, S. Kmoch, M. Sip “*Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses*” J. Virol. Meth. 128 (2005) 176–182), в случае одигонуклеотидного ДНК-чипа с длиной олигонуклеотидных зондов 40 дезоксинуклеотидов необходимо минимум 4 независимых, не перекрывающихся олигонуклеотида, узнающих свою мишень. При этом необходима предварительная тщательная компьютерная выборка олигонуклеотидов для чипа (гибридизация *in silico*). Для обнаружения шести вирусов картофеля авторы использовали чип из 34 ячеек. При гомологии вирусных РНК более 75% такой чип может давать перекрестные (ложноположительные) реакции. Очевидно, что в случае детекции ограниченного (10-20) числа фитопатогенов, вполне конкурентным будет подход, когда в ячейках ДНК-чипа фиксированы более протяженные ДНК. В этом случае специфичность при меньшем числе ячеек ДНК-чипа будет выше, а диагностика более точной.

Авторы провели сравнение чувствительности диагностического анализа с ДНК-зондами разной длины, фиксированными в ДНК-чипе (см. Фиг. 4). Оказалось, что и чувствительность определения патогенов была выше для более протяженных ДНК, фиксированных в ячейках ДНК-чипа.

Таким образом, настоящее изобретение позволяет проводить экспресс-анализ множественных инфекций картофеля в одном эксперименте, значительно ускоряя его в сравнении с традиционным методом молекулярной диагностики вирусной и вирусных инфекций ДНК-зондами.

Без намерения быть ограниченными какой-либо научной теорией или доктриной, авторы настоящего изобретения предполагают, что, как и в ДНК (N.P. Johnson, J.P. Macquet, J.L. Wiebers and B. Monsarrat, “Structures of the adducts formed between [Pt(dien)C1]C1 and DNA *in vitro*”, Nucl. Acids Res., 1982, Vol. 10, No. 17, 5255-5269), диен-платина реагирует, главным образом, с N⁷-атомом гуанина, и в значительно меньшей степени с атомом N⁷ аденина, и поэтому такая модификация практически не влияет на гибридационные свойства РНК.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Фрагменты (*затемнены*) геномов фитопатогенов картофеля: вируса мозаики люцерны (ВМЛ, AMV), вируса F картофеля (FBK), вируса A картофеля (ABK), вируса M картофеля (MBK) и вируса S картофеля (SBK), использованные для получения кДНК с помощью ОТ-ПЦР.

Фиг. 2. Модификация диен-платиной не изменяет электрофоретической подвижности РНК (электрофорез препарата РНК ВТМ, меченной диен-платиной, в 1% агарозном геле). В лунку геля наносили примерно 1 мкг вирусной РНК).

Образец 1 – контроль, неплатинированная РНК ВТМ. Образец 2 – платинированная РНК ВТМ. 1 мкг РНК в объеме 10 мкл денатурировали 3 мин при 70°C, добавляли 3 мкл тридистиллированной воды, 2 мкл 0,01 М NaClO₄ и 5 мкл 0,1 М диен-платины. Смесь инкубировали 2 часа при температуре 45°C. Образец 3 – то же самое, что и в образце 2, только смесь инкубировали при 0°C.

Фиг. 3. Антитела к диен-платинированным вирусным РНК узнают РНК, модифицированную диен-платиной, но не узнают не модифицированную РНК.

Столбцы – количество нанесенной РНК в пг: А- 500; Б- 50; В- 5; Г- 0,5. Ряды – вирусные РНК 1-4, модифицированные диен-платиной: 1,3 – в соотношении 1 атом платины на 10 нуклеотидов РНК (1 : 10); 2,4 – в соотношении 1 : 5. 1,2 – РНК ХВК. 3,4 – РНК ВТМ. 5А – немодифицированная РНК ХВК, нанесено 5 нг.

Фиг. 4. Определение РНК ХВК с помощью ДНК-микрочипа. Столбец 1 строки А, Б – рекомбинантная плазмида, содержащая вставку полноразмерной кДНК ХВК; Столбец 2 строки А, Б - двухцепочечный (ds) продукт ПЦР длиной 614 нуклеотидов; столбец 3 строки А, Б – ds продукт ПЦР длиной 470 нуклеотидов; столбец 4 строки А, Б – ds продукт ПЦР длиной 321 нуклеотид; столбец 5 строки А, Б – одноцепочечный (ss) продукт ПЦР длиной 614 нуклеотидов; столбец 6 строки А, Б – ss продукт ПЦР длиной 470 нуклеотидов; столбец 7 строки А, Б – ss продукт ПЦР длиной 321 нуклеотид; столбец 1 строка В, столбец 2 строка В – отрицательный контроль – рекомбинантная плазмида, содержащая кДНК вириона веретеновидности клубней картофеля (ВВКК). Количество нанесенных в ячейку продуктов – 500 нг (строка А и столбец 1 строка В) или 50 нг (строка Б и столбец 2 строка В).

Фиг. 5. Влияние количества рекомбинантной плазмиды, нанесенной на мембрану, на чувствительность определения вируса с помощью ДНК-микрочипа. Столбец 1 – 50 нг; столбец 2 – 100 нг; столбец 3 – 150 нг. Панель А – растение, зараженное вирусом X картофеля (ХВК); панель Б – растение, зараженное вирусом

М картофеля (МВК); панель В – растение, зараженное вирусом Y картофеля (YBK); панель Г – здоровое растение.

Фиг. 6. Повторное использования ДНК-микрочипа для определения вирусных РНК на примере кДНК ХВК различной длины. Вверху – первое использование микрочипа, внизу – повторное использование. Столбец 1 строки А, Б – рекомбинантная плазмида, содержащая вставку кДНК ХВК; столбец 2 строки А, Б – ds продукт ПЦР длиной 614 нуклеотидов; столбец 3 строки А, Б – ds продукт ПЦР длиной 470 нуклеотидов; столбец 4 строки А, Б – ds продукт ПЦР длиной 321 нуклеотид; столбец 5 строки А, Б – ss продукт ПЦР длиной 614 нуклеотидов; столбец 6 строки А, Б – ss продукт ПЦР длиной 470 нуклеотидов; столбец 7 строки А, Б – ss продукт ПЦР длиной 321 нуклеотид; столбец 1 строка В, столбец 2 строка В – отрицательный контроль – рекомбинантная плазмида, содержащая кДНК вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК). Количество нанесенных в ячейку продуктов – 500 нг (строка А и столбец 1 строка В) или 50 нг (строка Б и столбец 2 строка В).

Фиг. 7. Диагностика вирусных и виroidных инфекций картофеля с помощью ДНК-микрочипа. ВМЛ – вирус мозаики люцерны; YBK – вирус Y картофеля; МВК – вирус М картофеля; SBK – вирус S картофеля; АВК – вирус А картофеля; ВСЛК – вирус скручивания листьев картофеля; ВВКК – виroid веретеновидности клубней картофеля; ХВК – вирус X картофеля.

Варианты осуществления изобретения

В настоящее время в сельском хозяйстве и медицине используется несколько технологий молекулярной диагностики вирусных инфекций для практических целей. Широкое распространение получил высокочувствительный метод иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Метод высокопроизводителен, одновременно на одной иммунологической плашке можно детектировать несколько вирусов. В последнее время его вытесняет метод экспресс-диагностики иммунохроматографии на тест-полосках как более простой и быстрый, время анализа занимает 2-5 мин, и не уступающий ИФА в чувствительности и производительности. Метод настолько прост, что диагностический анализ на тест-полосках из набора доступен рядовому потребителю, он пригоден для применения его в полевых условиях. Однако для многих экономически важных вирусных инфекций применение

ИФА и иммунохроматографии ограничено недоступностью вирусных антигенов, получение которых дорого и связано подчас с непреодолимыми трудностями. В таких случаях часто помогают диагностические технологии, в основе которых лежит принцип комплементарности гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, используемый в процессе их молекулярной гибридизации. К ним относятся технологии ДНК(РНК)-зондов, ПЦР(ОТ-ПЦР, обратная транскрипция в комбинации с ПЦР) и технология ДНК-чипов.

Геномы виридов, вирусов и живых организмов представлены протяженными полинуклеотидами (от 246 до десятков миллиардов нуклеотидов). Технология ДНК-(микро)чипов является наиболее эффективной для разностороннего анализа геномов высших организмов, состоящих из миллиардов нуклеотидов и сотен тысяч генов, будь-то анализ мутаций, делеций или вставок нуклеотидов, или спектра экспрессии генов, сравнительный популяционный анализ или анализ генетических и инфекционных заболеваний. В настоящее время ДНК-микрочипы могут содержать десятки тысяч ДНК-зондов для одновременного анализа тысяч генов или целевых нуклеотидных последовательностей.

Настоящее изобретение предлагает новый способ одновременного обнаружения множества различных РНК-последовательностей в образце. В одном из предпочтительных воплощений настоящее изобретение обеспечивает способ одновременного обнаружения множества возбудителей различных виридных и вирусных заболеваний организмов с помощью ДНК-чипа. Диагностические возможности способа настоящего изобретения продемонстрированы на примере восьми экономически опасных для РФ вирусных и одной виридной инфекций важной сельскохозяйственной культуры – картофеля.

Получение ДНК-зондов

В зависимости от решаемой задачи размер ДНК в ДНК-зондах может значительно варьировать: для поиска точечной мутации достаточно ДНК-зондов длиной в 20 нуклеотидов, а для надежной диагностики инфекционного заболевания может оказаться недостаточным и длиной в 40 нуклеотидов. Более того, для достоверного диагноза одного инфекционного агента даже с самым простым геномом необходимо несколько зондов, перекрывающихся по последовательности нуклеотидов.

Выбор олигодезоксирибонуклеотидных зондов может быть осуществлен на

основании нуклеотидных последовательностей вирусов и вириодов, которые являются общедоступными, например, из базы данных GenBank. Доступ к последовательностям наиболее удобно осуществлять через систему поиска Entrez на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. При конструировании олигодезоксирибонуклеотидных зондов для иммобилизации на ДНК-чипе учитывают такие показатели, как специфичность, наличие вторичных структур типа шпилек, наличие неспецифических сайтов отжига на последовательности-мишени, отжиг праймеров на себя и друг друга.

Существуют разнообразные химические подходы к синтезу олигонуклеотидных праймеров, например, фосфодиэфирный, фосфотриэфирный метод, фосфитный метод и т.д., но наибольшее распространение в настоящее время имеет фосфитамиditный метод. Синтез праймеров осуществляют, используя автоматические ДНК/РНК синтезаторы, например производства фирмы Applied Biosystems (США). Необходимые мономеры-синтоны, активированные смолы, приборы выпускают фирмы Applied Biosystems, Glen Research, Invitrogen, Синтол и др.)

В соответствии с настоящим изобретением, однако, при создании ДНК-чипа предпочтительно использовать ДНК-зонды, представляющие собою рекомбинантные ДНК, содержащие вставки полноразмерных кДНК или протяженных фрагментов кДНК вириодов и/или вирусов – возбудителей заболевания сельскохозяйственных культур или пород животных, а не короткие синтетические олигодезоксирибонуклеотиды. Такой выбор оправдан в случае одновременной диагностики относительно небольшого количества патогенов и особенно в том случае, когда уже имеются необходимые клонированные рекомбинантные ДНК. Очевидно, что при небольшом количестве ДНК-зондов специфичность ДНК-чипа выше, если зонды представляют собой протяженные ДНК.

При молекулярной диагностике конкретной вирусной инфекции может быть достаточно и одного зонда (см., например: Кондакова О.А. , Дрыгин Ю.Ф. Диагностика вириодного заболевания картофеля зондами (диен)Pt-ДНК, *Биотехнология*, №4, с. 83-90 (1999)]. Оптимальным размером в этом случае является ДНК-зонд длиной не менее 300 нуклеотидов. Известно, что начиная с этой длины (B. D. Hames and S. J. Higgins (Editors), *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, Oxford-Washington DC, 1985, IRL Press) температуры плавления и образования

дуплексов не зависят (мало зависят) от длины полинуклеотидов.

При синтезе ДНК-зонда методами ПЦР (полимеразной цепной реакции) и генной инженерии для клонирования фрагмента ДНК, комплементарного нуклеиновой кислоте вируса, пробуют 2-3 пары праймеров при определении лучшей для амплификации фрагмента ДНК длиной 300 и более нуклеотидов. Как правило, фрагменты ДНК от 300 до 1500 нуклеотидов хорошо амплифицируются и вставляются в векторные плазмиды. Для выбора праймеров разработаны алгоритмы, которые доступны в Интернете на сайтах: <http://www.invitrogen.com/>, <http://www.clcbio.com/>.

Руководствуясь этими соображениями, авторы разработали набор праймеров для реакции обратной транскрипции вирусных РНК и полимеразной цепной реакции, которые являются оптимальными при осуществлении способа. Последовательности праймеров приведены в таблицах 1 и 2. Следует однако отметить, что данные последовательности не являются единственно возможными, и специалистом в данной области с учетом приведенных выше наставлений может быть сконструирован набор праймеров с иными последовательностями, пригодный для осуществления способа согласно настоящему изобретению.

Таблица 1. Специфические праймеры, использованные для реакции обратной транскрипции вирусных РНК и ПЦР.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Вирус	SEQ ID NO:	Позиции в вирусной РНК, соответствующие праймеру
PVA2472+	СТСГСААААГС ТГТГТАТСТС ТААА	АВК	SEQ ID NO: 1	2472-2499
PVA4673-	ССТСССААССС ТТСССААТСТС ТГА	АВК	SEQ ID NO: 2	4648-4673
PVM5861+	ААГГСТГТГ ААТАГААТГ ГАТГАГ	МВК	SEQ ID NO: 3	5861-5885
PVM8006-	СТГСТГАТГТ СТТТГТГСТГ АТТГТ	МВК	SEQ ID NO: 4	7982-8006
PVS60+	САСАГАГАА ААТГСССГСС ГААССС	СВК	SEQ ID NO: 5	60-84

PVS 1237-	CTCCAACCC CGAATGAAA GTC	SBK	SEQ ID NO: 6	1216-1237
PAMV5817+ (PVF)	TTAGAGCAA ATCACCAGC CACAAGTC	FBK	SEQ ID NO: 7	5817-5843
PAMV7040- (PVF)	TCAGGGGATTA GGGAGAAAGA AAC	FBK	SEQ ID NO: 8	7016-7040
AMV3-412+	GGAGCAGCG CCAGTAGTT TT	BMJI	SEQ ID NO: 9	412-431
AMV3-1911- (вирус мозаики люцерны)	CCCAGTGGA GGTCAGCAT CAA	BMJI	SEQ ID NO: 10	1889-1911
PVY-1279+	TCGATTGGG AGCGGATAA AGACC	YBK	SEQ ID NO: 11	1279-1303
PVY-2636-	ACCTCACCG CAAGTTCAA AAATCC	YBK	SEQ ID NO: 12	2613-2636
PLRV-3161+	GAATTCTGTT CACACATTT C	BCJK	SEQ ID NO: 13	3161-3182
PLRV-5167-	TCTGTACCGT CGACTGTAG CAT	BCJK	SEQ ID NO: 14	5155-5167
PSTVd	ATCCCCGGG GAAACCTGG AG	BBKK	SEQ ID NO: 15	
PSTVd- (rev)	CCCTGAAGC GTCCTCCG AG	BBKK	SEQ ID NO: 16	

Таблица 2. Праймеры для несимметричной ОТ-ПЦР для получения кДНК разной длины на матрице РНК ХВК.

Название праймера	Последовательность	Позиции в РНК ХВК, соответствующие праймеру	Размер ПЦР продукта, нукл.
PVX6076-	TGTTGTTAGTCAGCATCCAGTT CC	6076-6053	321
PVX6225-	GGCAGCATTCATTTAGCTTC	6225-6203	470
PVX6369-	CTGGGGTAGGCGTCGGTTATGT	6393-6369	614

	AGA		
--	-----	--	--

Все рекомбинантные ДНК были получены стандартными методами генетической инженерии, используемыми для реакций обратной транскрипции, ПЦР и клонирования ДНК (J. Sambrook, D. Russell "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3^d Edition, CSHL Press, 2001). Праймеры, необходимые для реакции обратной транскрипции вирусных РНК и клонирования кДНК *in vitro*, представлены в таблице 1. В качестве векторов использовали разные плазмиды: pGEM-3Z, BlueScript II SK+ и др. (Фиг. 1). Трансформацию клеток *E.coli*, получение биомассы бактерий с плазмидами, выделение и очистку плазмид выполняли как это описано (Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1989. Molecular cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Приготовление ДНК-микрочипа

В качестве подложки, материала ДНК-чипа могут быть использованы синтетические мембраны, гели, активированное стекло, золото при анализе методом плазмонного резонанса, поверхности зондов атомно-силовых микроскопов. Также для изготовления ДНК-чипов могут быть использованы активированные подложки, коммерчески доступные от различных производителей (см., например, Ramakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, Nguyen A, Domanus M, Prokhorova A, Gieser L, Touma E, Lockner R, Tata M, Zhu X, Patterson M, Shippy R, Sendera TJ, Mazumder A. 2002. An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Res.* **30**: e30).

В случае использования олигодезоксирибонуклеотидов в качестве зондов ДНК-чипы могут быть изготовлены путем создания на поверхности стеклянной подложки матрицы из ячеек полиакриламидного геля, активации ячеек и ковалентной иммобилизации в ячейках модифицированных олигонуклеотидов, несущих активные группы (Mirzabekov A. & Kolchinsky A. MAGICChip: Properties and applications in genomic studies. (2002) In *Genomic Technologies : Present and Future*. Eds. Galas D. J., S. J. McCormack. Caister Academic Press, pp.163-196). Также ДНК-чипы могут быть изготовлены методом химически индуцируемой или фотоиндуцируемой сополимеризации олигонуклеотида в акриламидном геле, как описано ранее (Vasiliskov, V., Timofeev E., Surzhikov S., Drobyshev, A., Shick, V. & Mirzabekov, A. 1999. Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by

copolymerization. *BioTechnique*, **27**, 592-606; Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В., Чернов Б.К Патент на изобретение N 2175972 «Способ иммобилизации олигонуклеотидов, содержащих непредельные группы, в полимерных гидрогелях при формировании микрочипа»). Также биочипы могут быть изготовлены любыми другими известными специалисту в данной области способами (Seliger H., Hinz M., Happ E. “Arrays of immobilized oligonucleotides – contributions to nucleic acids technology” *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2003, 4, 379-395), а в качестве подложки помимо стекла может быть использован другой материал (пластик, металл, гибкие мембраны и т.д.).

Выбор плоской основы для ДНК-чипа зависит от количества размещаемых на нем зондов: чем их больше, тем дороже чип, тем надежнее, прочнее должна быть основа.

Поскольку авторы в качестве примера осуществления изобретения сконструировали ДНК-чип для диагностики всего 7 вирусных и одной вироидной инфекции с высокоспецифичными ДНК-зондами, была использована не самая прочная, но широко используемая при гибридизации нуклеиновых кислот нитратцеллюлозная мембрана. Нитратцеллюлозную мембрану (Schleicher & Schuell, Protran BA-85 0,45 мкм или BA 83 – 0,22 мкм) вымачивали в 10 x SSC в течение 10 мин, подсушивали на фильтровальной бумаге.

Рекомбинантные плазмиды, содержащие вставку кДНК, денатурировали нагреванием на кипящей водяной бане в течение 3 мин, быстро охлаждали во льду и наносили на мембрану по 0,8 – 1,0 мкл ДНК-зонда. Нанесенную ДНК фиксировали на мембране облучением ультрафиолетовым светом (254 нм, 7 см, 45 Вт) в течение 3-4 мин. В таком виде ДНК-микрочипы могут продолжительно храниться при +4°C.

Выделение РНК и введение диен-платиновой метки в РНК.

Вирусные и суммарные РНК из инфицированных и неинфицированных клеток выделяли разработанным авторами способом с использованием нетоксичного водорастворимого хаотропного агента трихлорацетата аммония (см. патентную заявку PCT/RU2007/000310). Для мечения РНК, выделенной с помощью хаотропного агента, 1 мкг РНК в объеме 10 мкл денатурировали 3 мин при 70°C, добавляли 3 мкл тридистиллированной воды, 2 мкл 0,01 М NaClO₄ и 5 мкл 0,1 М диен-платины. Смесь инкубировали 2 ч при температуре 45°C.

Следует заметить, что эффективные условия мечения РНК существенно менее

жесткие, чем те, которые используются для мечения диен-платиной ДНК (60°C, 2 час) [В.И. Киселева, М.Ф. Турчинский, Т.Б. Колесник, А.М. Поверенный, Биоорг. химия, т. 20, с. 14-20 (1994); Дрыгин Ю.Ф., Мусин С.М., Кондакова О.А., Савенков Е.И., Соломатин С.В., Можаяева К.А., акад. РАСХН Атабеков И.Г. «Молекулярная диагностика зараженности оздоровленных сортообразцов картофеля Российской Федерации вириодом веретеновидности клубней», Доклады РАСХН, 6, 24-25 (1996); Кондакова О.А., Дрыгин Ю.Ф. Диагностика вириодного заболевания картофеля зондами (диен)Pt-ДНК, Биотехнология, №4, с. 83-90 (1999)]. Это важно, поскольку стабильность молекул РНК значительно меньше, чем молекул ДНК, при нагревании в водных растворах.

В определенных авторами условиях модификации вирусные РНК (на примере РНК ВТМ) не деградируют и сохраняют практически неизменной электрофоретическую подвижность (Фиг. 2).

Гибридизация НК на микрочипе и детекция мишени.

ДНК-микрочип инкубировали в предгибризационном растворе (5 x SSC, 2x раствор Денхардта, 0,1% додецилсульфат натрия) в течение 2 ч при температуре 65°C. Диен-платинированную РНК денатурировали 3 мин при 70°C и добавляли в предгибризационный раствор. Гибридизацию проводили в герметично запечатанных чашках Петри в течение 24 ч при температуре 65°C.

По окончании гибридизации мембраны промывали 1x SSC с 0,1% додецилсульфатом натрия и затем 0,2 x SSC с 0,1% додецилсульфатом натрия. Обе промывки осуществляли на качалке в течение 15 мин при температуре 65°C. Для удаления остатков додецилсульфата натрия мембраны промывали трижды буферным раствором 0,1 М трис-HCl, pH 9,0, содержащим 0,14 М NaCl (TBS), в течение 5 мин при комнатной температуре.

Для обнаружения платинированной РНК, связавшейся с ячейкой микрочипа, использовали непрямой метод иммуноферментного анализа (ИФА) на мембранах, в котором первичные антитела были против диен-платинированной ДНК, а в качестве вторичных использовали конъюгаты иммуноглобулинов с пероксидазой хрена.

Во избежание неспецифической сорбции на мембране компонентов реакции при выполнении ИФА мембрану блокировали в TBS, содержащим 1% Твин-20, на качалке в течение 1 ч при комнатной температуре. Избыток детергента удаляли, трижды споласкивая мембрану TBS.

Для обнаружения метки мембрану инкубировали с кроличьими аффинно очищенными антителами к (диен-Pt)ДНК. Реакцию проводили в TBS, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (фракция V), на качалке в течение 2 ч при комнатной температуре или ночь при +4°C. Несвязавшиеся антитела удаляли, трижды промывая мембрану TBS, содержащим 0,1% Твина-20, на качалке в течение 10 мин при комнатной температуре.

Кроличьи антитела, связавшиеся с мишенью, выявляли с помощью конъюгата ослиных антител к иммуноглобулинам кролика, меченных пероксидазой хрена (Amersham). Реакцию проводили в TBS, содержащим 0,5% бычьего сывороточного альбумина (фракция V) на качалке в течение 50 мин при комнатной температуре. Несвязавшийся конъюгат удаляли, трижды промывая мембрану TBS, содержащим 0,1% Твина-20, на качалке в течение 10 мин при комнатной температуре.

Мембрану споласкивали дважды TBS и инкубировали 1–3 мин с хемилуминесцентным субстратом пероксидазы (Star-Glo Chemiluminescent Substrate, ISN Biochemicals, Inc.) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Эмиссию регистрировали путем экспозиции мембраны с рентгеновской пленкой (Kodak MXB Film) в течение 1 – 20 мин в зависимости от интенсивности хемилуминесценции. Пленку обрабатывали в проявителе для рентгеновских пленок, промывали, высушивали и сканировали на сканере Epson Perfection 1650 (Фиг. 4-7).

Влияние нагрузки ДНК-микрочипа ДНК-зондами на чувствительность детекции мишени.

Экономически важно знать, какие количества ДНК-зонда должны быть фиксированы в ячейке микрочипа для максимально чувствительного определения РНК мишени. Были выполнены эксперименты, в которых в ячейках ДНК-микрочипа фиксировали различное количество рекомбинантных плазмид, содержащих кДНК-копию РНК нескольких вирусов картофеля и вириона веретеновидности клубней картофеля. Как показывают результаты, приведенные на Фиг. 5, чувствительность выявления платинированной РНК с помощью ДНК-микрочипа зависит от количества ДНК, фиксированной в ячейке. Максимальная чувствительность достигается при иммобилизации 150 нг рекомбинантной плазмиды в ячейке, однако в случае сильно зараженного картофеля 50 нг ДНК-зонда может быть достаточным для выявления вирусной инфекции. Далее во всех случаях в ячейках микрочипа иммобилизовали 150 нг ДНК-зондов.

Проверка эффективности ДНК-микрочипа для одновременной диагностики множественных инфекций картофеля.

В результате проведенных исследований удалось создать ДНК-микрочип для одновременного обнаружения множественных инфекций картофеля в анализируемом образце (Фиг. 7). Коллекционные растения картофеля, зараженные различными патогенами, выращивали в теплице. Их зараженность предварительно определяли непрямым методом (сэндвич-вариант) иммуноферментного анализа с помощью диагностических тест-систем фирмы «Agdia» (США) согласно инструкции фирмы-производителя.

Данные, приведенные на Фиг. 7, показывают полное соответствие результатов обнаружения вирусов методами ИФА и с помощью ДНК-микрочипа. Кроме того, ДНК-микрочип позволяет одновременно выявлять и вириод, обнаружить наличие которого методом иммуноферментного анализа было невозможно в силу природных особенностей этого патогена.

Примеры

Следующие далее примеры раскрывают наиболее предпочтительные воплощения данного изобретения и приведены исключительно с целью лучшего пояснения его сущности. Специалисту в данной области будет понятно, что можно осуществить множество модификаций как в отношении используемых средств и материалов, так и в отношении используемых способов без отступления за рамки изобретения.

Авторы настоящего изобретения задались целью показать пригодность разработанного диагностического микрочипа (прототипа ДНК-чипа) для определения вирусных и вириодных инфекций организмов.

Пример 1. Платинирование вирусной РНК и исследование ее способности к специфической гибридизации с ДНК зондом.

Для изучения гибридизационных свойств «платинированной» РНК была использована следующая методика. К препарату суммарной РНК, выделенной из листовой ткани здорового растения картофеля, подмешивали различное количество очищенной РНК ХВК. Смесь РНК платинировали по описанной выше методике и использовали в гибридизации с ДНК-микрочипом.

В ячейках ДНК-микрочипа иммобилизовывали рекомбинантную плазмиду,

содержащую вставку кДНК ХВК, а также одностранные (ss) и двустранные (ds) фрагменты кДНК ХВК различной длины, полученные полимеразной цепной реакцией. Для этого на матрице тотальной РНК ХВК проводили реакцию обратной транскрипции (AMV RT, Promega) с рассеянной затравкой (в присутствии случайных гептамеров). На матрице полученной кДНК проводили стандартную ПЦР с использованием сенс-праймера (PVX5755+ CCGGATGGGGATTCTTTAGTA, соответствующего нуклеотидам 5755-5776 РНК ХВК) и с одним из антисенс-праймеров (таблица 2). Для получения dsПЦР продуктов праймеры использовали в равной концентрации 0,4 мкМ (брали 1 мкл 20 нМ раствора праймера на 50 мкл ПЦР смеси). Для получения ssПЦР продуктов (с преимущественным содержанием ДНК, комплементарной вирусной РНК) в ПЦР смесь (50 мкл) добавляли 1 мкл 2 нМ раствора сенс-праймера и 1 мкл 20 нМ антисенс-праймера.

Гибридизацию платинированной РНК с ДНК зондами, специфичными для вируса Х картофеля, и выявление продуктов гибридизации проводили, как это описано выше (МГА-ИФА технология).

Результаты этого модельного эксперимента показывают, что РНК ХВК эффективно платинируется в указанных выше условиях и может быть с высокой специфичностью выявлена в гибридизации с ДНК-микрочипом в концентрации, по крайней мере, 10 пг/мкл. (Фиг. 4). Очевидно, что чувствительность выявления платинированной РНК зависит от концентрации и природы продукта, иммобилизованного в ячейке микрочипа. Наиболее эффективно платинированная РНК выявляется в гибридизации с рекомбинантной плазмидой (ряд 1А, Б): совершенно очевидно, что даже при количестве плазмиды 50 нг предел детекции находится значительно ниже достигнутого в данном эксперименте (10 пг/мкл).

Пример 2. Исследование влияния длины ДНК зондов на чувствительность диагностического анализа.

Как отмечалось ранее, сравнительное генотипирование организмов по множеству генов предполагает большой объем (число ячеек) ДНК-чипа. В случае определения инфекций число ячеек в чипе определяется необходимой чувствительностью и специфичностью диагностического анализа. Известно, что чувствительность анализа в этом случае определяется количеством и свойствами метки в мишени и системы усиления сигнала ее детекции, а специфичность гибридизации мишени с зондом резко увеличивается в интервале длин ДНК-зондов

от 6 до 300 и более нуклеотидов. Мы провели сравнение чувствительности диагностического анализа с ДНК-зондами разной длины, фиксированными в ДНК-чипе (Фиг. 4 и 6). Вставки или фрагменты кДНК вируса X картофеля разной длины получали клонированием *in vitro* симметричной (для двунитевых ДНК) или асимметричной (для одностранных ДНК) полимеразной цепной реакцией. Длину вирусной кДНК задавали положением праймеров на матрицах. Как и следовало ожидать (см. ряд Б на Фиг. 4 и 6), существенно большая чувствительность детекции РНК мишени получается с ДНК зондами, содержащими полноразмерную кДНК ХВК.

Вместе с тем, полученные результаты свидетельствуют, что в ячейках микрочипа могут быть фиксированы и продукты ПЦР; наилучшие результаты, как следует из Фиг. 4, были получены при использовании самого длинного фрагмента длиной 614 нуклеотидов, что, по-видимому, объясняется большей эффективностью гибридизации меченой РНК с более длинной кДНК, фиксированной на ДНК-микрочипе.

Пример 3. Исследование возможности повторного использования ДНК-микрочипа для определения вирусных РНК на примере кДНК ХВК различной длины.

Важным результатом наших исследований явилось установление возможности повторного использования ДНК-микрочипа (Фиг. 6). Мембрану «Protran BA-85» после проведения диагностического анализа отмывали от зонда 5 мин в 0,05 М NaOH при комнатной температуре, 2 раза по 1 мин 0,5 М трис-HCl, pH 7,5, 3 мин водой, высушивали и хранили при +4°C в течение 6 мес, после чего использовали для повторного анализа. Сравнение результатов диагностического анализа показало, что результаты диагностического анализа на однажды уже использованном и «отмытом» ДНК-микрочипе аналогичны результатам первичного анализа на этом же микрочипе.

Пример 4. Множественная экспресс-диагностика экономически опасных для РФ вирусных и виroidных инфекций картофеля с помощью ДНК-микрочипа.

На Фиг. 7 приведены результаты одновременной молекулярной диагностики семи наиболее экономически опасных для РФ вирусных и виroidных инфекций картофеля. Вирус мозаики люцерны распространен в природе по всему миру на широком круге видов растений, в том числе и на картофеле.

Предварительно все анализируемые пробирочные образцы картофеля были тестированы независимым методом иммуноферментного анализа (ИФА). По данным ИФА исследуемые образцы были заражены смешанно вирусами М и Х и отдельно вирусом М картофеля. Сравнение результатов диагностического анализа ДНК-чиповой и ИФА технологиями было явным в пользу ДНК-чипа. ДНК-чиповая технология не только подтвердила результаты иммуноферментного анализа, но и выявила виroidную инфекцию образцов, которая недоступна определению с помощью ИФА.

Заключение

Одна из главных целей настоящего изобретения состояла в разработке диагностического ДНК-микрочипа, позволяющего одновременно обнаруживать вирусы и виroid картофеля в одном образце. Эта технология диагностики вирусных и виroidных заболеваний растений основана на молекулярной гибридизации вирусной РНК, меченной диен-Rt, с комплементарной ДНК, иммобилизованной на нитратцеллюлозной мембране, с последующим выявлением гетеродуплексов с помощью ИФА. ДНК-микрочип позволяет определять вирусную РНК с чувствительностью 5 пг РНК вируса или виroidа и более в анализируемой пробе суммарного препарата РНК, полученного из 10-20 мг листовой ткани картофеля. Продолжительность анализа (одновременно до 5 образцов вручную) составляет не более 3 суток. Срок годности препаратов РНК, меченных диен-платиной, и ДНК-микрочипов составляет не менее 6 мес при -20°C .

ДНК-микрочип может быть использован для одновременной диагностики инфекций основных вирусов и виroidа картофеля в уникальных (например, коллекционных) сортообразцах для определения их фитосанитарного статуса, для контроля эффективности оздоровления от вирусов и виroidа и т.п. Следует подчеркнуть, что использование ДНК-микрочипа позволяет повысить эффективность диагностического анализа пропорционально количеству ячеек, содержащих соответствующую рекомбинантную ДНК со вставкой кДНК виroidа или вируса. Такая работа может представлять собой особую важность в связи с началом работ по созданию в РФ генобанка здоровых сортов картофеля.

Поскольку многие виroidы содержат консервативные нуклеотидные последовательности, применение разработанных авторами настоящего изобретения

ДНК-зондов и ДНК-микрочипа позволяет не только диагностировать известные вириды, но и с высокой вероятностью выявлять новые, еще неизвестные, которые обладают сходством нуклеотидных последовательностей, достаточным для специфической гибридизации. В частности, разработанные условия могут быть использованы при создании ДНК-микрочипов для детекции многих виридов в процессах получения, поддержания и сертификации здорового посадочного материала картофеля, хмеля, цитрусовых, винограда, косточковых (персик, слива, абрикос), семечковых (яблоня, груша), овощных и цветочно-декоративных культур.

Разработанный ДНК-микрочип для обнаружения возбудителей вирусных и виридных заболеваний картофеля может рассматриваться в качестве прототипа ДНК-микрочипа для диагностики виридных и вирусных заболеваний любого экономически важного сельскохозяйственного растения. Помимо этого, ДНК-микрочипы, подобные раскрытому выше микрочипу, могут быть использованы для диагностики вирусных инфекций животных.

Все патенты, публикации, научные статьи, и другие документы и материалы, цитируемые или упоминаемые здесь, включены в настоящее описание путем отсылки в такой степени, как если бы каждый из этих документов был включен путем отсылки индивидуально или приведен здесь в его полном виде.

Конкретные гены, векторы, вирусы и вириды, клетки, виды растений и животных, применения, используемые материалы и методы, описанные здесь, относятся к предпочтительным вариантам осуществления, приведены в качестве примеров и не предназначены для ограничения объема данного изобретения. При изучении этого описания другие объекты, аспекты и воплощения будут приходить в голову специалистам в данной области, и они охватываются рамками данного изобретения. Специалистам в данной области будет понятно, что различные замены и модификации могут быть произведены в отношении описанного здесь изобретения без отклонения от его объема и рамок, которые определяются прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ одновременного обнаружения множества РНК-последовательностей в биологическом образце, включающий следующие стадии:

а) обеспечение ДНК-чипа, представляющего собой подложку с иммобилизованными на ней ДНК-зондами, специфичными в отношении указанных РНК-последовательностей;

б) выделение суммарной РНК из образца;

в) введение диен-платиновой метки в молекулы РНК;

г) гибридизацию меченой диен-платиновой меткой РНК с ДНК-чипом в условиях, обеспечивающих селективное образование специфических гетеродуплексов между указанными РНК-последовательностями и соответствующими ДНК-зондами;

д) детекцию образовавшихся специфических гетеродуплексов с помощью антител к ДНК-диен-платине,

причем образование специфического гетеродуплекса указывает на присутствие соответствующей РНК-последовательности в образце.

2. Способ по п. 1, в котором в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов указанных РНК-последовательностей.

3. Способ по п. 1, в котором в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, специфичные в отношении указанных РНК-последовательностей.

4. Способ одновременного обнаружения множества возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций в биологическом образце, включающий следующие стадии:

а) обеспечение ДНК-чипа, представляющего собой подложку с иммобилизованными на ней ДНК-зондами, специфичными в отношении РНК указанных возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций;

б) выделение суммарной РНК из указанного образца;

в) введение диен-платиновой метки в молекулы РНК;

г) гибридизацию меченой диен-платиновой меткой РНК с ДНК-чипом в условиях, обеспечивающих селективное образование специфических гетеродуплексов вирусных и/или виroidных РНК и соответствующих ДНК-

зондов;

д) детекцию образовавшихся специфических гетеродуплексов с помощью антител к диен-платине,

причем образование специфического гетеродуплекса указывает на присутствие соответствующей РНК-последовательности в образце.

5. Способ по п. 4, в котором в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов диагностируемых возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций.

6. Способ по п. 4, в котором в качестве ДНК-зондов для иммобилизации на биочипе используют синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, специфичные в отношении диагностируемых возбудителей вирусных и/или виroidных инфекций

7. Способ по п. 4, в котором образец представляет собой образец ткани картофеля, а возбудителями являются вирус мозаики люцерны, вирус Y картофеля, вирус M картофеля, вирус S картофеля, вирус A картофеля, вирус Y картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, виroid веретеновидности клубней картофеля, вирус X картофеля.

8. Способ по п. 7, в котором ДНК-зонды, иммобилизованные на ДНК-чипе, представляют собой рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов РНК указанных возбудителей вирусных и виroidных инфекций картофеля, полученные путем реакции обратной транскрипции и ПЦР с использованием набора праймеров SEQ ID NO: 1-16.

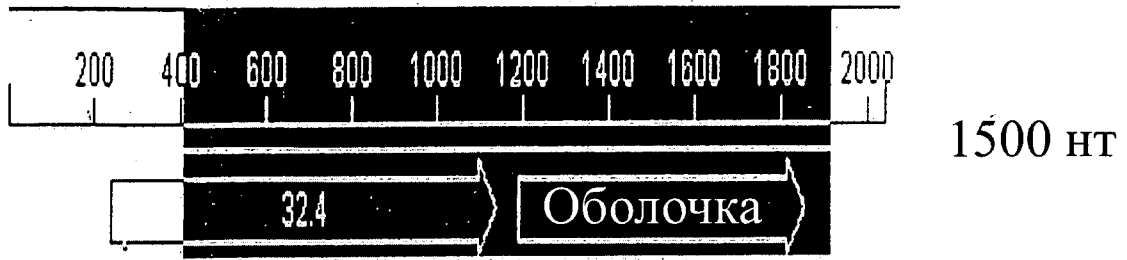
9. ДНК-чип для одновременной молекулярной диагностики множества возбудителей вирусных и виroidных инфекций картофеля, где возбудителями являются вирус мозаики люцерны, вирус Y картофеля, вирус M картофеля, вирус S картофеля, вирус A картофеля, вирус Y картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, виroid веретеновидности клубней картофеля, вирус X картофеля, представляющий собой подложку с иммобилизованными на ней ДНК-зондами, представляющими собой рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки кДНК-фрагментов РНК указанных возбудителей вирусных и виroidных инфекций картофеля, полученные путем реакции обратной транскрипции и ПЦР с использованием набора праймеров SEQ ID NO: 1-16.

10. Набор праймеров для получения кДНК-фрагментов РНК вируса мозаики люцерны, вируса Y картофеля, вируса M картофеля, вируса S картофеля, вируса A

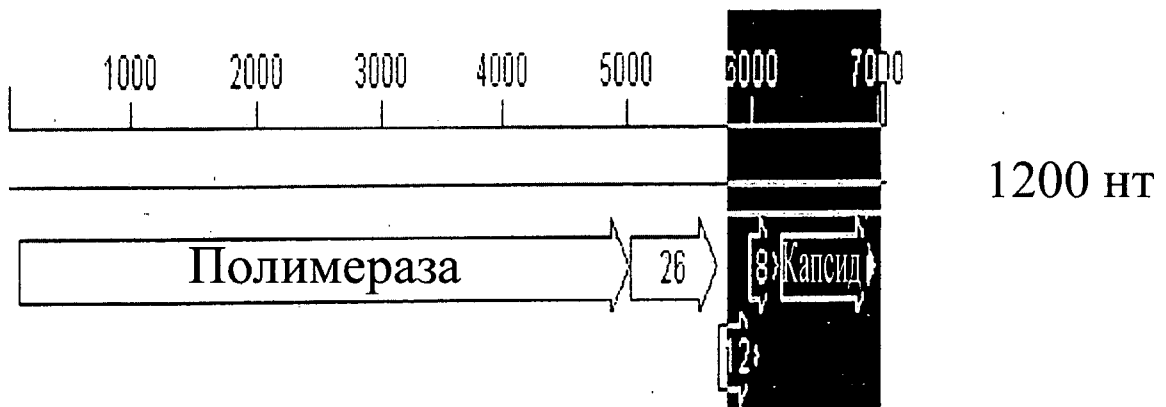
картофеля, вируса Y картофеля, вируса скручивания листьев картофеля, вириода веретеновидности клубней картофеля и вируса X картофеля, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 1-16 для изготовления ДНК-чипа по п. 9.

1/7

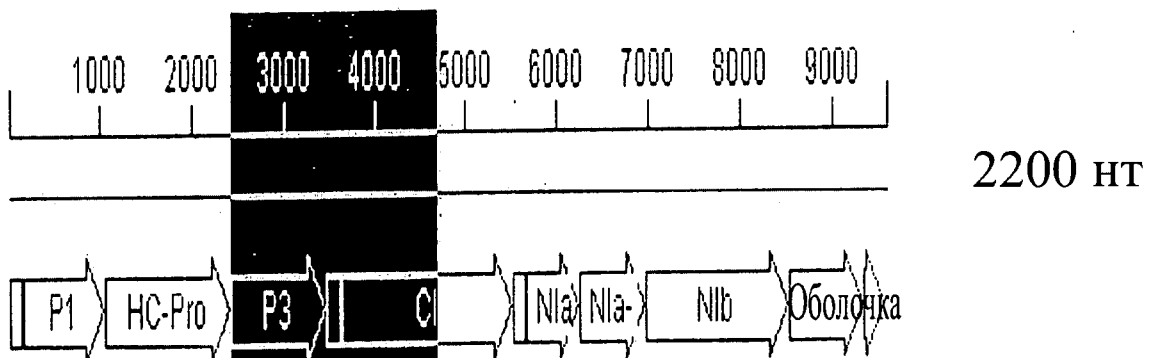
РНКЗ вируса мозаики люцерны (ВМЛ)



Вирус F картофеля (FBK)



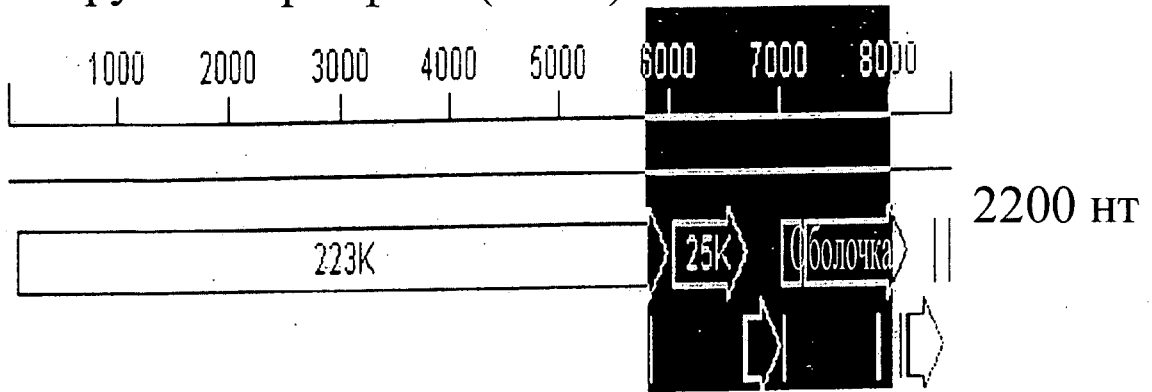
Вирус А картофеля (ABK)



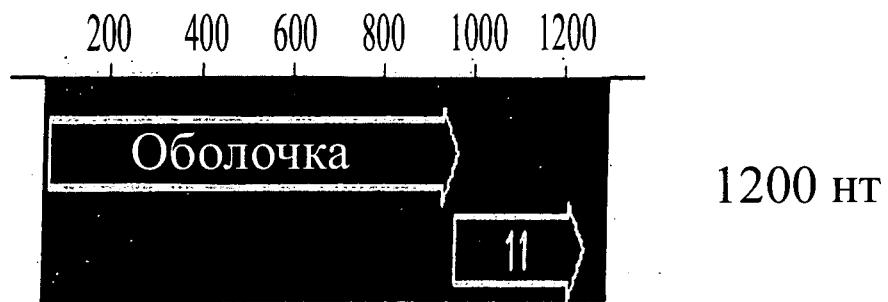
Фиг. 1

2/7

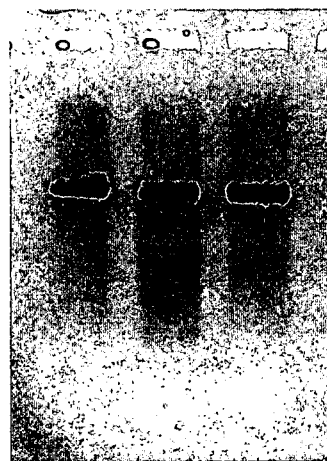
Вирус М картофеля (МВК)



3'нуклеотидная последовательность обычного штамма вируса S картофеля (SBK)



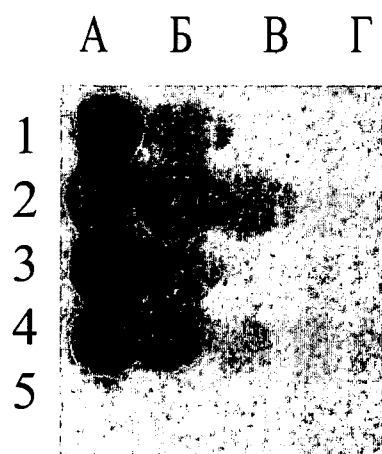
ФИГ. 1 (продолжение)



1 2 3

ФИГ. 2

3/7



Фиг. 3

4/7

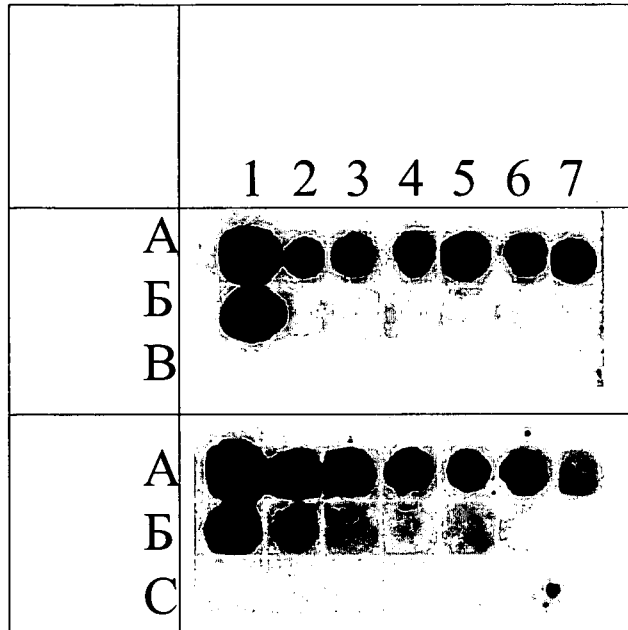
	1 2 3 4 5 6 7	Концентрация РНК ХВК во фракции нуклеиновых кислот выделенных из здорового растения картофеля, нг/мкл
А Б В		1.0
А Б В		0,1
А Б В		0,01
А Б В		0,0 (без РНК ХВЛ)

Фиг. 4

Название плазмиды	Концентрация плазмиды											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
УВК ХВК МВК ВВКК												
	А			Б			В			Г		

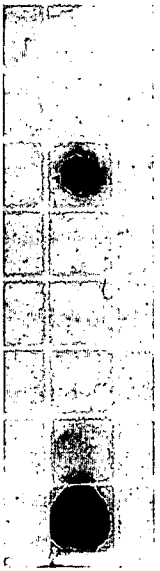
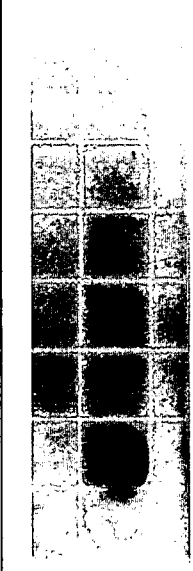
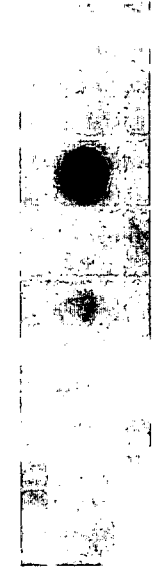
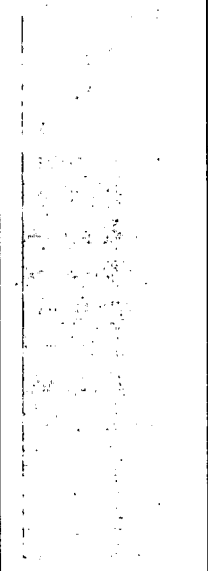
Фиг. 5

6/7



Фиг. 6

7/7

Название плазмиды	Растение картофеля, зараженное (по результатам ИФА):			
	ХВК+ МВК	Незараженное	МВК	Здоровое
ВМЛ УВК МВК СВК АВК ВСЛК ВВКК ХВК				

Фиг. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2008/000198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		<i>C12Q 1/68 (2006.01)</i> <i>G01N 33/48 (2006.01)</i> <i>G01N 33/58 (2006.01)</i>
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched C12Q 1/68, G01N 33/48, 33/53, 33/58		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 5994079 A (DIGENE CORPORATION) 30.11.1999, the claims	1-7 8-10
Y	WO 2005003318 A2 (PERKINELMER LAS, INC.) 13.01.2005, the claims	1-7
Y	RU 2265058 G2 (BAHr KCHAO BHFF H /Ap.) 27.11.2005, the claims, example	1-7
Y	Boonham N. et al. "Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis". J Virol Methods. 2003 March; 108 (2) : 181 - 7, (cited in the description), the abstract	2, 5, 7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 04 December 2008 (04.12.2008)		Date of mailing of the international search report 18 December 2008 (18.12.2008)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2008/000198

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Bystricka D. et al. "Oligonucleotide - based microarray: a new improvement in mikroarray detection of plant viruses". J Virol Methods. 2005 September; 128 (1 - 2) : 176 - 82, (cited in the description) the abstract	3, 6, 7 8-10
A	GenBank. Accession Xs EU 257478, 31.10.2007, [Found in Internet 04.12.2008] Found in Internet:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccor &id=161137770	8-10

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2008/000198

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: *C12Q 1/68 (2006.01)*
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации МПК

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации):

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

C12Q 1/68, G01N 33/48, 33/53, 33/58

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины): PubMed

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y A	US 5994079 A (DIGENE CORPORATION) 30.11.1999, формула	1-7 8-10
Y	WO 2005003318 A2 (PERKINELMER LAS, INC.) 13.01.2005, формула	1-7
Y	RU 2265058 C2 (ВАНГ КСИАО БИНГ и др.) 27.11.2005, формула, пример	1-7
Y	Boonham N. et al. "Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis". J Virol Methods. 2003 March; 108 (2) : 181 - 7,(цитируется в описании),реферат	2, 5, 7

последующие документы указаны в продолжении графы С. данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным

E более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее

L документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)

O документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

T более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности

Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска:

04 декабря 2008 (04.12.2008)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске:

18 декабря 2008 (18.12.2008)

Наименование и адрес ISA/RU

ФГУ ФИПС

РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1

Факс:(499) 243-3337

Уполномоченное лицо:

В. Орешкин

Телефон № (499) 240-25-91

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2008/000198

С. (продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
У А	Bystricka D. et al. "Oligonucleotide - based microarray: a new improvement in mikroarray detection of plant viruses". J Virol Methods. 2005 September; 128 (1 - 2) : 176 - 82,(цитируется в описании) реферат	3, 6, 7 8-10
А	GenBank. Accession № EU 257478, 31.10.2007, [Найдено в Интернет 04.12.2008] Найдено в Интернет:<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=161137770	8-10