



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/6841 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015102447, 26.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.06.2013

Дата регистрации:
06.11.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
27.06.2012 US 61/665,231;
14.03.2013 US 61/784,802

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2016 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 06.11.2018 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.01.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2013/047774 (26.06.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/004609 (03.01.2014)

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

(72) Автор(ы):

БУШКИН Юрий (US),
ДЖЕННАРО Мария Лаура (US),
ТИЯГИ Санджай (US),
ПАЙН Ричард (US)

(73) Патентообладатель(и):

РУТГЕРС, ДЗЕ СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ
ОФ НЬЮ-ДЖЕРСИ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2009/081688 A1, 26.03.2009. EP
2186827 A1, 19.05.2010. EA 13466 B1,
30.04.2010. RU 2258710 C2, 20.08.2005.

(54) ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗЫ АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК, ОСНОВАННЫЕ НА ИЗМЕРЕНИИ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан способ анализа активации Т-клеток путем детекции копий по меньшей мере одной молекулы РНК, экспрессируемой в отдельных Т-клетках, включающий предоставление образца, содержащего популяцию клеток, содержащую Т-клетки; индукцию экспрессии генов в Т-клетках ex vivo, либо сразу, либо после культивирования, при инкубировании клеток по меньшей мере с

одним соединением, которое связывается специфическими рецепторами и инициирует экспрессию генов; фиксацию и пермеабиллизацию клеток; мечение копий по меньшей мере одной молекулы РНК, экспрессируемой Т-клетками, с помощью набора флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов гибридизации, которые имеют комплементарные последовательности к молекулам РНК, и удаление

не связавшихся зондов при промывке; и детекцию клеток с событиями экспрессии с помощью проточной цитометрии (FC), где событие экспрессии является одним или более измерениями флуоресценции, которые группируют с помощью

гейтирования интенсивности флуоресценции. Изобретение позволяет быстро обнаружить копии по меньшей мере одной молекулы РНК, экспрессируемой в отдельных клетках. 24 з.п. ф-лы, 8 ил., 3 табл., 12 пр.

RU 2 671 707 C 2

RU 2 671 707 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12Q 1/6841 (2006.01)

(21)(22) Application: **2015102447, 26.06.2013**

(24) Effective date for property rights:
26.06.2013

Registration date:
06.11.2018

Priority:

(30) Convention priority:
27.06.2012 US 61/665,231;
14.03.2013 US 61/784,802

(43) Application published: **20.08.2016** Bull. № 23

(45) Date of publication: **06.11.2018** Bull. № 31

(85) Commencement of national phase: **27.01.2015**

(86) PCT application:
US 2013/047774 (26.06.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/004609 (03.01.2014)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

BUSHKIN Yuriy (US),
DZHENNARO Mariya Laura (US),
TIYAGI Sandzhaj (US),
PAJN Richard (US)

(73) Proprietor(s):

RUTGERS, DZE STEJT YUNIVERSITI OF
NYU-DZHERSI (US)

(54) **RAPID ASSAYS FOR T-CELL ACTIVATION BY RNA MEASUREMENTS USING FLOW CYTOMETRY**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Described is a method for T-cell activation assay by detecting copies of at least one RNA molecule expressed in individual T-cells, comprising providing a sample containing a population of cells, containing T-cells; inducing gene expression in T-cells ex vivo, either immediately or after culturing, by incubating cells with at least one compound that binds to specific receptors and initiates gene expression; fixation and permeabilization of cells; labelling copies of at least one RNA molecule expressed by T-cells using a set of

fluorescently labelled oligonucleotide hybridisation probes that have complementary sequences to RNA molecules and removal of unbound probes by washing; and detection of cells with expression events by flow cytometry (FC), where the expression event is one or more fluorescence measurements that are grouped by gating fluorescence intensity.

EFFECT: invention makes it possible to quickly detect copies of at least one RNA molecule expressed in individual cells.

25 cl, 8 dwg, 3 tbl, 12 ex

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США 61/665231, поданной 27 июня 2012 года, и предварительной заявки на патент США 61/784802, поданной 14 марта 2013 года. Содержание заявок включено в настоящее

5 описание в качестве ссылки в полном объеме.

Интересы правительства

Изобретение, раскрытое в настоящей заявке, было осуществлено по меньшей мере частично при поддержке правительства грантами Национальных институтов здравоохранения под номерами AI045761, AI106036, MH079197 и HL106788.

10 Правительство США имеет определенные права на настоящее изобретение.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам быстрой идентификации экспрессии генов в отдельных клетках.

Уровень техники

15 Многие патологические состояния провоцируют опосредованные Т-клетками иммунные ответы. К таким состояниям относятся злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания, реакции при трансплантации и инфекционные заболевания, включающие, например, туберкулез (ТВ). При всех этих состояниях активация Т-клеток включает взаимодействие Т-клеточного рецептора (TCR) со специфичным антигеном

20 (Ag), выступающим в качестве общего фактора, тогда как функциональные последствия такого взаимодействия различны. В той или иной Т-клетке сигнальный каскад TCR может стимулировать экспрессию различных наборов генов в зависимости от физической природы Ag, его презентации, репертуара TCR и силы Ag-индуцированной активации. Эти индуцированные различия профилей экспрессии генов в процессе активации,

25 пролиферации и дифференцировки клеток могут, в конечном счете, способствовать проявлению функциональной гетерогенности клонально размноженных эффекторных клеток. Дополнительный элемент клеточного разнообразия возникает в процессе гомеостаза Т-клеток. Если Ag установлен, то наиболее размноженные эффекторные клетки погибают вследствие апоптоза, тогда как небольшая фракция клеток выживает

30 в качестве долгоживущих клеток памяти. Ответы, которые возникают при повторном контакте с Ag, регулируются вышеперечисленными факторами, причем они также находятся под влиянием предыдущего процесса дифференцировки. В результате на каждый Ag, с которым встречается организм, иммунный ответ производит функционально различные субпопуляции Т-клеток (например, эффекторные клетки -

35 центральные клетки памяти - эффекторные клетки памяти), обладающие общей специфичностью к Ag. В тот или иной момент развития иммунопатологического состояния изменяется относительная репрезентация этих различных субпопуляций; они могут определять или отражать патологический процесс. Субпопуляции Т-клеток коррелируют с Ag и патогенной нагрузкой *in vivo* и, как было показано в исследованиях

40 хронических вирусных инфекций и ТВ, количественный анализ этих ключевых субпопуляций перспективен для диагностики и оценок защитного иммунитета. Контрольные изменения в субпопуляциях Т-клеток также следует отмечать в ходе лечения, поскольку результат лечения связан со специфическим развитием иммунопатологического состояния. Такие характерные показатели прогрессирующих

45 состояний (природных или вызванных лечением) не поддаются измерению в совокупности и могут быть обнаружены только на уровне одиночных Т-клеток. Свойства Т-клеток человека полностью проявляются только при их ответе на стимуляцию Ag.

Современные клинические иммунологические анализы крови обычно позволяют распознавать присутствие неинфекционной и инфекционной патологии, но могут не обнаруживать прогрессию патологии. С другой стороны, на уровне одиночных клеток функциональный анализ Ag-специфичных иммунных клеток в периферической крови должен раскрывать множественные, пересекающиеся иммунопатологические состояния, связанные с развитием инфекции и болезни. Такой анализ может повысить прогностическую значимость и способствовать эффективному вмешательству. Убедительным примером является инфекция, вызываемая *Mycobacterium tuberculosis*. Современные методы позволяют обычно диагностировать ТВ после того, как больной уже передал инфекцию контактировавшим с ним лицам. По существу диагноз бессимптомной инфекции не требует медицинского вмешательства. Возможность отличать стабильную латентную инфекцию (LTBI) от ранней активной болезни (до того как она становится контагиозной) крайне необходима. Существующие иммунодиагностические анализы не способны удовлетворить эту потребность, поскольку они не позволяют различать Ag-специфичные субпопуляции функциональных Т-клеток, которые, как известно, отличаются в зависимости от состояния инфекции. Кроме того, такие анализы не позволяют оценить ответы, которые могут отражать стадийноспецифическую экспрессию микобактериальных Ag.

Характерной особенностью инфекции, вызываемой *M.tuberculosis*, является огромное количество людей, бессимптомно инфицированных этим патогеном (2 миллиарда). В отсутствие иммунной недостаточности, у 90-95% латентно инфицированных лиц активная форма ТВ не будет развиваться. Однако, учитывая объем резервуара инфекции, *M.tuberculosis* все еще вызывает 9,4 миллиона новых случаев активного ТВ и 1,7 миллиона смертельных случаев ежегодно. Перенос инфекции можно было бы значительно снизить, если бы было возможно выявлять и лечить инфицированных лиц по мере прогрессирования у них болезни с ее переходом в активную форму, до проявления у них симптомов и до того, как они становятся заразными. Обнаружение туберкулезной палочки или бациллярных продуктов чрезвычайно затруднено на ранней стадии болезни из-за крайне низкого числа бацилл. Стандартный микробиологический диагноз активного ТВ выявляет лиц, которые уже являются носителями туберкулезной палочки в секрете дыхательных органов и поэтому являются заразными.

Методы, основанные на множественном измерении, не подходят для выявления сложного клеточно-опосредованного иммунного ответа и не могут обнаруживать редкие или переходные состояния клеток, связанные со стадией и развитием заболевания. Наиболее распространенными форматами иммунологических тестов для анализа одиночных Т-клеток являются метод иммуноферментного спот-анализа (ELISPOT) и количественный проточный цитометрический (FC) анализ. В коммерческом тесте ELISPOT производства Oxford Immunotech (United Kingdom) моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) сначала выделяют из пробы крови, промывают и подсчитывают. Затем в лунки планшета, предварительно покрытые антителами к интерферону-гамма (IFN γ), добавляют установленное количество (например, 250000) PBMC и *M.tuberculosis*-специфичных Ag и оставляют для инкубирования на ночь (16-20 часов). IFN γ , высвобождаемый из активированных Т-клеток, захватывается в лунках. После этого следует инкубирование со вторым антителом (Ab), которое конъюгировано с цветообразующим ферментом, после чего лунки промывают и добавляют цветообразующий субстрат. Окрашивание проявляется в тех лунках, где IFN γ секретировали Т-клетки, что приводит к появлению характерного цветного кольца (спота или пятна), окружающего цитокин-секретирующую клетку. Наконец пятна

подсчитывают либо невооруженным глазом, либо используют сканирующий спектрофотометр для планшетов. ELISPOT очень чувствителен (предел его чувствительности составляет $10/10^6$ в PBMC). Однако он не способен обеспечить желаемое определение различия в субпопуляции функциональных Т-клеток по нескольким причинам. Во-первых, он обычно не позволяет вести одновременную детекцию нескольких мишеней. Во-вторых, формат ограничивает число клеток для анализа (например, 250000 клеток в лунке в коммерческом тесте T-SPOT.TB, указанном выше). Стандартная FC обладает многопараметрической функциональностью. Клетки в цельной крови или PBMC стимулируют путем инкубирования в течение 6 часов или больше с определенными Ag, например, *M.tuberculosis*-специфическими пептидами или белками, и ингибитором внеклеточной секреции, таким как брефелдин или монензин. Пермеабелизованные Т-клетки затем окрашивают, используя меченное флуорофором Ab к цитокину (например, FITC-конъюгированное антитело против IFN γ), и анализируют с помощью FC. Окрашивание белков антителом уменьшает универсальность обычной FC, особенно в случае внутриклеточных белков. Кроме того, анализы ограничены методиками, которые требуют длительной стимуляции Т-клеток эндогенными антигенпрезентирующими клетками (APC), что увеличивает длительность цикла и уменьшает клиническую полезность.

Существующие способы анализа цитокинов отдельных клеток не позволяют быстро идентифицировать редко встречающиеся популяции Т-клеток, присутствующие в малых образцах периферической крови. Коммерческий тест ELISPOT не различает TB и LTBI. Кроме того, положительный результат у бессимптомного лица (в отсутствие микробиологического подтверждения активного TB) неинформативен в отношении риска повторной активации. Таким образом, несмотря на точное отражение присутствия инфекции *M.tuberculosis*, положительный результат не считается показанием для терапевтического вмешательства. Это уменьшает пригодность теста, особенно в бедных странах с высоким уровнем распространения туберкулеза, где заражено большинство населения (до 80% в областях Южной Африки). Кроме того, даже в странах с низким уровнем распространения и высокими доходами, таких как США, побочные эффекты лечения LTBI часто приводят к отрицательному результату, когда лечение рекомендуют без указания риска повторной активации. Несомненно, ограничения существующих иммунодиагностических методов имеют огромные последствия для здравоохранения в мировом масштабе.

Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в способах, которые позволяют быстро детектировать экспрессию генов в отдельных клетках.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым быстрым способам детекции различных молекул РНК в отдельных клетках.

Таким образом, в одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу детекции копий по меньшей мере одной молекулы РНК, экспрессируемой в отдельных клетках. Способ включает: (а) предоставление образца, содержащего популяцию клеток (например, по меньшей мере 100 или по меньшей мере 10000 клеток), которые экспрессируют специфические рецепторы, способные инициировать сигнальные каскады, вызывающие экспрессию генов, при связывании с ними лигандов или стимулирующих молекул; (b) индукцию экспрессии генов в клетках *ex vivo* либо сразу, либо после культивирования при инкубировании клеток по меньшей мере с одним соединением, например, пептидом или смесью пептидов, полученных из микроорганизма (такого как *M.tuberculosis*), которое связывается со специфическими рецепторами или иным

образом инициирует сигнализацию и инициирует экспрессию генов; (с) фиксацию и пермеабиллизацию клеток; (d) мечение копий по меньшей мере одной молекулы РНК, экспрессируемой клетками, с помощью набора флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов гибридизации и удаление не связавшихся зондов при промывке; и (е) детекцию клеток с событиями экспрессии, с помощью проточной цитометрии (FC), где событие экспрессии является одним или более измерениями флуоресценции, классифицируемыми путем установки диапазона (гейтирования) интенсивности флуоресценции.

Вышеуказанный способ может использоваться для обнаружения различных молекул РНК в отдельных клетках. В частности, он может использоваться для обнаружения молекул РНК, кодируемых генами цитокинов, таких как IL-2, TNF α или IFN γ .

В способе стадия индуцирования может включать стимуляцию сигнализации Т-клеточных рецепторов (TCR) и последующую экспрессию генов антигенпрезентирующими клетками (APC), которые присутствуют в популяции клеток, или искусственными APC (aAPC). Индукцию можно проводить в течение периода от 30 минут до 6 часов. В любом случае, этап индуцирования также может включать костимуляцию по меньшей мере с одним моноклональным антителом (mAb).

Моноклональное антитело может быть связано с или добавлено к aAPC или APC.

В одном из вариантов осуществления способа популяция клеток может быть популяцией Т-клеток, полученных из РВМС человека. В этом случае по меньшей мере одна молекула РНК может быть молекулой РНК, кодируемой геном цитокина. При этом клетки в популяции клеток могут быть индуцированы APC или aAPC с одной или более нагруженными пептидами молекулами МНС, которые взаимодействуют с TCR.

В способе соединения или стимулирующие молекулы могут быть получены из микроорганизма, например, полученными из *M.tuberculosis* иммуногенными пептидами. В одном из примеров соединения может содержать пептид или смесь пептидов, например, таких, которые связаны с молекулами МНС класса I или МНС класса II. Эти пептиды или смесь пептидов может быть добавлена к APC или aAPC, указанным выше, в различных концентрациях, например, в пределах от 1 до 20 мкг/мл.

В вышеописанном способе стадия индуцирования может включать стимуляцию сигнализации toll-подобных рецепторов и последующей экспрессии генов в клетке, содержащей такие рецепторы, при воздействии стимула, примеры которого включают цитокины, микробные продукты или синтетические соединения. Примеры микробного продукта включают липид, гликан, гликолипид, сульфолипид, гликопротеин, белок, пептид или нуклеиновую кислоту (например, РНК или ДНК). Стимуляцию можно проводить в течение периода от 30 минут до 72 часов (например, от 30 минут до 6 часов, от 6 часов до 24 часов, от 24 часов до 72 часов). Стимул может присутствовать в концентрации в пределах от 1 до 20 мкг/мл (например, от 1 до 100 нг/мл или от 100 до 1000 нг/мл). Соединение или стимул может являться цитокином, таким как IFN γ , IL-2, IL-15, TNF α или другим цитокином кроме IFN γ , IL-2, IL-15 или TNF α . В способе более одного соединения или стимула можно предоставить в одно и то же время или в разное время.

На стадии (d) способа набор зондов может включать от 20 до 60 зондов, каждый из которых отдельно помечен одной и той же флуоресцентной молекулой.

В другом варианте осуществления детектированные клетки, имеющие события экспрессии, могут быть отделены (например, путем сортировки клетки с активированной флуоресценцией) от клеток, не имеющих события экспрессии. Отделенные клетки могут включать только одну клетку или больше одной клетки (например, 10, 100, 1000, 10000

или 100000 клеток). Экспрессию генов в отделенных клетках можно затем измерять, например, с помощью ОТ-ПЦР или транскриптомного анализа РНК в клетках.

Подробное описание одного или более вариантов осуществления изобретения представлены в описании ниже. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения
5 будут очевидны из описания и из формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - график интенсивности флуоресценции против канала прямого рассеяния A (FSC-A) для показаний FC, описанных в примере 2.

Фиг. 2 - набор из четырех частотных графиков, полученных при FC детекции образцов,
10 описанных в пример 7.

Фиг. 3 - набор из четырех частотных графиков, полученных при FC детекции образцов, описанных в примере 8.

Фиг. 4 - набор из трех частотных графиков, полученных при FC детекции образцов, описанных в примере 9.

Фиг. 5 - набор из двенадцати частотных графиков, полученных при FC детекции образцов, описанных в примере 10.

Фиг. 6A и 6B - (A) набор из двадцати восьми частотных графиков, полученных в результате FC детекции образцов, исследованных с использованием наборов мРНК зондов, как описано в примере 11, и (B) набор из шестнадцати частотных графиков,
20 полученных при FC детекции образцов, исследованных с использованием mAb, как описано в примере 11.

Фиг. 7A и 7B - (A) набор из двух частотных графиков, полученных в результате FC детекции образцов, исследованных с использованием зонда к зеленому флуоресцентному белку до (левая панель) и после (правая панель) дополнительного гейтирования для
25 разделения клеток на цитокин-положительные и цитокин-отрицательные популяции, как описано в примере 12, и (B) набор из двух частотных графиков, полученных в результате FC детекции образцов, исследованных одновременно с использованием четырех наборов мРНК зондов, до (левая панель) и после (правая панель) дополнительного гейтирования для разделения клеток на цитокин-положительные и
30 цитокин-отрицательные популяции, как описано в примере 12.

Фиг. 8A и 8B - (A) таблица, в которой показаны пороговые циклы амплификации двух генов в сортированных (+/-) популяциях клеток, описанных в примере 12, и (B) фотография, на которой показан электрофоретический гель продуктов амплификации, описанных в примере 12.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу измерения и оценки экспрессии одного или более генов, включая РНК транскрипты, которые кодируют белки, например, матричную РНК (мРНК) и пре-мРНК, и которые не кодируют белки.

Как раскрыто в настоящем описании, способ может использоваться для оценки РНК транскриптов в клетках, экспрессия генов в которых изменяется в ответ на различные индукции. Индукция может происходить естественно или ее могут стимулировать любые известные лиганды клеточных рецепторов, в том числе, без ограничения, TCR, и
40 включать, в принципе, любой рецептор или лиганд (например, toll-подобные рецепторы или рецепторы хемокинов и их лиганды) или соединение, которое инициирует сигнальный каскад, и может приводить к синтезу транскриптов и экспрессии некоторых генов, например, по меньшей мере одного гена цитокина, такого как IL-2, TNF α или IFN γ .

В некоторых вариантах осуществления индукция представляет собой стимуляцию соединением или соединениями, которые связывают специфические рецепторы и таким

образом инициируют экспрессию генов, например, пептидом или смесью пептидов, связанных с молекулами МНС I или МНС II. Соединение или соединения могут быть получены из микроорганизма, например, стимулирующие молекулы, которые являются полученными из *M. tuberculosis* иммуногенными пептидами. Индукцию экспрессии генов, например, стимуляцию сигнализации Т-клеточных рецепторов и последующей экспрессии генов могут производить APC, которые присутствуют в исследуемой популяции клеток. В альтернативе стимуляцию могут производить искусственные APC (аAPC). Пептид или смесь пептидов, которые связываются с молекулами МНС класса I или класса II, могут быть добавлены к APC или аAPC, предпочтительно в концентрации в пределах от 1 до 20 мкг/мл, с получением нагруженных пептидами молекул МНС, которые взаимодействуют с TCR. Некоторые варианты осуществления способов настоящего изобретения включают костимуляцию по меньшей мере с одним моноклональным антителом в дополнение к APC или аAPC. В случае аAPC, с аAPC могут быть связаны mAb.

Способ настоящего изобретения позволяет выполнять быстрые и чувствительные измерения изменений состава и функции популяции клеток, которые происходят в процессе инфекционного или неинфекционного заболевания и ассоциированной прогрессии патологии. Такие измерения могут описывать свойства неопластических и/или злокачественных клеток гематопоезического и негематопоезического происхождения, а также клеток, вовлеченных в аутоиммунное заболевание.

Способ может также использоваться в мониторинге ответа в ходе терапии для лечения болезни. В случае инфекционной болезни иммунный контроль в ответ на антибиотикотерапию может быть определен при сопоставлении прогресса в устранении патогена, например *M. tuberculosis*, и изменений клеточных ответов на стимуляцию, таких как ответы субпопуляций функциональных Т-клеток против антигенных пептидов.

Способы настоящего изобретения в целом могут быть использованы фактически для всех клеток млекопитающих (включая, без ограничения, человека) и низших эукариотов, которые экспрессируют специфические рецепторы, способные инициировать сигнальные каскады при связывании с лигандом/стимулирующей молекулой. Они могут использоваться для популяций бактерий, а также многоклеточных организмов.

Некоторые предпочтительные варианты осуществления относятся к применению способов настоящего изобретения для клеток животных, в том числе, без ограничения, для клеток человека. Подходящий источник обеспечивает достаточное количество клеток для обнаружения редких событий и/или для статистического анализа. В некоторых вариантах осуществления это количество составляет всего лишь 1000 или даже 100 клеток. Во многих вариантах осуществления, например, когда клетки являются Т-клетками, предпочтителен источник, который обеспечивает по меньшей мере 10000 клеток. Более предпочтительно источник обеспечивает по меньшей мере 100000 клеток или по меньшей мере один миллион клеток. Подходящие источники включают образцы крови и образцы ткани, например, биоптат. Образцы ткани необходимо разделить на индивидуальные клетки, то есть для обработки требуется дезагрегированная ткань.

Как указано выше, способы настоящего изобретения включают быструю индукцию в течение не более 5 дней и предпочтительно меньше, например 4, 3, 2 или 1 день, или 16, 12, 10, 8, 6 или 4 часа. Предпочтительное время индукции составляет от 30 минут до 8 часов, предпочтительно от 30 минут до 6 часов, более предпочтительно от 30 минут до 4 часов и еще более предпочтительно от 30 минут до 2 часов.

Способы настоящего изобретения включают быстрое измерение экспрессии одного или более генов в иммунных и неиммунных клетках, основанное на активации и

функциональных последствиях, вызванных потоками ионов, включая, без ограничения, потоки ионов, вызванные ионофорами и/или митогенами, или сигнализацией посредством клеточных поверхностных или внутриклеточных рецепторов, включая, без ограничения, рецепторы распознавания паттерна, включая toll-подобные рецепторы, NOD и NOD-подобные рецепторы, G-белок-сопряженные рецепторы, включая рецепторы хемокинов, рецепторы полипептидных гормонов, рецепторы цитокинов, В-клеточные рецепторы или TCR. Способы по настоящему изобретению, как предполагают, способны улучшить медицинское обслуживание при различных инфекционных и неинфекционных патологиях. Предпочтительные варианты осуществления включают обнаружение экспрессии РНК, включая мРНК и пре-мРНК, одного или более цитокинов в индивидуальных лимфоцитах, будь то выделенные РВМС, Т-клетки или пробы цельной крови (а не выделенные РВМС), а также в других типах клеток, как указано ниже.

Способы по настоящему изобретению применяются, например, для анализа $CD3^+CD4^+$ Т-клеток (Т-хэлперов 1 или Th1-клеток), которые продуцируют IL-2, $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$; $CD3^+CD4^+$ Т-клеток (Т-хэлперов 2 или Th2-клеток), которые продуцируют IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13; $CD3^+CD8^+$ Т-клеток, которые продуцируют (IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, MIP-1a и другие хемокины), и субпопуляций других специализированных Т-клеток, включая, без ограничения, клетки Th17 и Treg, или субпопуляций других лимфоцитов, включая, без ограничения, NK-клетки, NKT-клетки, субпопуляции макрофагов и дендритных клеток, клеток, формирующих эндотелий и эпителий различных органов тела, или клеток нервной системы, включая, без ограничения, нейроны и глию, а также пре-мРНК и мРНК цитокинов, хемокинов и функциональных молекул (например, смотрите таблицу 2), вырабатываемых этими клетками.

Некоторые способы по настоящему изобретению включают *ex vivo* стимуляцию клеток или индукцию специфичных молекулярных взаимодействий, приводящих к экспрессии маркеров активации и модулированию клеточных функций. Стимуляция может быть выполнена на клетках либо сразу, либо после культивирования в культуральной среде. Стимуляция может быть естественной, то есть являться простым инкубированием клеток в культуре. Предпочтительно стимуляции может способствовать инкубирование клеток в культуре с одним или более соединениями, которые активируют специфичные рецепторы/лиганды и индуцируют сигнальные каскады. Эти соединения могут быть синтетическими или полученными из микроорганизмов, включающих, без ограничения, бактерии, вирусы и грибы, например, липополисахариды, липоарабиноманнаны, пептидогликаны, миколовые кислоты бактериального происхождения или белки вирусного происхождения, включая, без ограничения, вирус Эпштейна-Барра или цитомегаловирус (например, белки *ebvIL-10*, *cmvIL-10* и *UL146*, соответственно), или грибковые (например, *Cryptococcus*- и *Aspergillus*-ассоциированные) галактоксило- и галактоманнаны и растворимые антигены; полипептидные гормоны, например, тромбоцитарный фактор роста или VEGF; цитокины; и антигены, включая антигенные пептиды. В предпочтительном способе стимуляции используют искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC; смотрите ниже).

Способы по настоящему изобретению также включают детекцию отдельных клеток, включая, в частности, активированные клетки, имеющие биомаркерный набор характеристик, предпочтительно набор характеристик из множества биомаркеров, а именно одной или более РНК, включая, в частности, молекулы мРНК или пре-мРНК *in situ* в интактных клетках.

Предпочтительные способы по настоящему изобретению включают обнаружение

индуцированной экспрессии генов, например цитокинов, и наиболее предпочтительно множества цитокинов, в отдельных клетках, например, активированных Т-клетках, посредством мечения экспрессированных молекул РНК, включая молекулы мРНК или пре-мРНК, в фиксированных, пермеабилizованных клетках, при использовании наборов флуоресцентно меченных гибридизационных зондов и удаления не связавшихся зондов при промывке. Чувствительность к одиночной молекуле получают при использовании множества нуклеотидных гибридизационных зондов, которые обеспечивают множество флуоресцентных меток для каждой РНК-мишени. Они могут быть небольшим количеством зондов, множественно меченных специфическим флуорофором, или меченных зондов, дающих флуоресценцию при резонансном переносе энергии флуоресценции (FRET), когда они гибридизуются с когнатной мРНК или пре-мРНК. В предпочтительных способах настоящего изобретения используют большее количество, например от 10 до 100, более предпочтительно от 20 до 60, еще более предпочтительно от 30 до 50, например, приблизительно 50, более коротких олигонуклеотидных зондов, каждый из которых помечен одним флуоресцентным красителем, которые одновременно связываются с мишеневой последовательностью. Присоединение множества меток к каждой молекуле РНК делает клетку в достаточной степени флуоресцентной, выше фона, чтобы ее можно было обнаружить с помощью методов ФС.

Кроме того, способы по настоящему изобретению включают обнаружение и анализ отдельных клеток, экспрессирующих мишеневую молекулу РНК или молекулы РНК, с помощью ФС. Некоторые предпочтительные способы настоящего изобретения включают применение количественной ФС для обнаружения клеток, которые содержат продукты экспрессии РНК генов цитокинов, индуцированные в требуемых клетках при стимуляции APC или aAPC.

ФС включает гидроструйную систему для гидродинамического фокусирования, позволяющую создавать единый файл клеток. Одиночные клетки затем можно проанализировать на эмиссию флуоресценции при одной или нескольких длинах волн. ФС является стандартной методикой в лабораториях клинической патологии. Например, иммунное фенотипирование с применением ФС является важным инструментом в диагностике и определении стадии различных гематологических неоплазий. Важные этапы ФС включают мечение клеток одной или более флуоресцентными молекулами, например флуорофорами, введение меченых клеток в проточный цитофлуориметр, облучение каждой клетки источником света возбуждения, таким как лазер, который испускается при длине волны, которая возбуждает флуоресцентные молекулы, и детекцию испускаемого флуоресцентного излучения при использовании фильтров и зеркал, которые отделяют определенные испускаемые длины волны для каждой используемой флуоресцентной молекулы, с получением данных, которые показывают присутствие и, предпочтительно, количество каждой флуоресцентной молекулы, связанной с каждой клеткой, основанной на возбуждении и испускании.

Как раскрыто в настоящей заявке, ФС может использоваться для обнаружения клеток, экспрессирующих РНК, с помощью множества одиночно меченных флуоресцентных гибридизационных зондов. Наиболее предпочтительным вариантом осуществления является обнаружение РНК (мРНК или пре-мРНК), экспрессируемой с генов цитокинов в Т-клеточной фракции выделенных РВМС, которые подвергли стимулированию посредством презентации антигенов M.tuberculosis эндогенными APC или, более предпочтительно, aAPC. РНК нескольких цитокинов можно обнаружить при помощи зондов, специфичных к каждому типу РНК, которые помечены различными флуоресцентными молекулами (например, различными флуорофорами) для каждого

типа детектируемой РНК.

В способах настоящего изобретения, FC проводят на популяциях клеток (от не более 10000 клеток до более чем одного миллиона клеток). Данные регистрируют для одного или более событий. Событие представляет собой набор измерений для одной клетки.

5 Данные для каждого события распределяют в определяемые пользователем окна, например, сигнал для флуорофора А или сигнал для флуорофора А, который находится между уровнем интенсивности X и уровнем интенсивности Y. Распределение данных FC - процесс, называемый гейтированием, причем события гейтируют или отбирают
10 определенными пороговыми пределами. Результаты затем могут быть представлены как абсолютные количества клеток в определенном окне или, предпочтительно, как фракция клеток в одном или более окнах, то есть частота. Например, в анализе состояния болезни результаты могли бы быть такими, что 10% клеток были бы положительными по мРНК А и мРНК В, 7% клеток были бы положительными по мРНК В и мРНК С, и
15 2% клеток были бы положительными по всем трем мРНК А, мРНК В и мРНК С. Если проанализировано 10000 клеток, минимальный положительный результат состоит в том, что определенное событие происходит в одной из 10000 клеток. С другой стороны, если проанализирован один миллион клеток, минимальный положительный результат состоит в том, что определенное событие происходит в одной из одного миллиона
20 клеток.

Анализ результатов FC может включать дисперсионный анализ (ANOVA), который является набором статистических моделей для анализа дисперсии, обычно для проверки
25 значимого различия между средними значениями для групп или переменных при разделении полной дисперсии на компоненты, обусловленные истинной случайной ошибкой, и компоненты, обусловленные различием между средними.

В настоящем изобретении также раскрыты наборы реагентов для осуществления описанный ранее способов. Наборы по настоящему изобретению включают по меньшей мере одно стимулирующее соединение, например белки или пептиды, которые будут
30 стимулировать экспрессию одного или более цитокинов в качестве характеристики ответа тестируемого заболевания, или aAPC, которые загружены такими пептидами и несут костимулирующие молекулы, как описано ниже, и один или более наборов олигонуклеотидных зондов, каждый из которых специфично гибридизуется с одной последовательностью, присутствующей в мРНК или пре-мРНК, где каждый набор
35 предпочтительно включает по 20-60 олигонуклеотидов длиной по 16-20 оснований, и при этом каждый олигонуклеотид помечен одним флуорофором. Набор, помимо мРНК-специфичных зондов, может дополнительно включать, например, флуорофор-конъюгированные антитела, узнающие клеточные белки, или химические зонды, меченные флуорофорами, связывающиеся с целевыми мишенями, реактивы для фиксации и пермеабилзации анализируемых клеток, реактивы для гибридизации включенных
40 зондов с клетками и реактивы для постгибридизационной обработки, например, промывки, для удаления избыточного, негибридизованного зонда(ов) или других не связавшихся меченых зондов.

В предпочтительном варианте осуществления способ настоящего изобретения включает стимуляцию сигнализации TCR и последующей экспрессии генов AP-клетками,
45 которые присутствуют в популяции клеток, или синтетическими сферами, которые именуются в настоящем описании как aAPC. Синтетические сферы служат в качестве механической подложки, то есть платформы, к которой белки (MHC и/или костимулирующие рецепторы и лиганды) могут быть присоединены посредством

химического, электростатического или любого другого типа связывания. Таким образом, например, любая полимерная поверхность с или без химической модификации или дериватизации при необходимости может использоваться в качестве механической подложки или платформы для аАРС.

5 АРС взаимодействуют (или реагируют) с добавляемыми пептидами (или белками) таким образом, что они связываются с (или эндогенно процессируются и презентуются) молекулами МНС и затем могут стимулировать TCR. аАРС взаимодействуют с добавляемыми пептидами, которые связываются с молекулами МНС, и затем эти нагруженные пептидами аАРС могут стимулировать TCR. Таким
10 образом, аАРС несут один или более классов нагруженных пептидами молекул МНС, чтобы взаимодействовать с TCR, с или без одного или более антител или другого типа лигандов, которые взаимодействуют с костимулирующими рецепторами, экспрессируемыми на Т-клетках, такими как CD28 и/или CD49d. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления стимулирующие пептиды являются
15 полученными из *M.tuberculosis* иммуногенами. Стадия стимулирования TCR включает инкубирование TCR-экспрессирующих клеток с АРС или аАРС, которые включают молекулы МНС класса I или класса II, нагруженные соответствующими пептидами, и в некоторых вариантах осуществления костимулирующими белками или функциональными эквивалентами, такими как антитела, пептиды, различные углевод-
20 и липид-несущие молекулы, которые связывают свои мишени на костимулирующих рецепторах, что усиливает сигнализацию, приводя к активации Т-клеток.

Функционально различные субпопуляции Т-клеток часто экспрессируются с частотой, близкой к доступным на сегодня пределам чувствительности (обычно 0,01-0,1%). Таким образом, их обнаружение требует мощной стимуляции TCR и применения
25 высокочувствительных методов детекции, чтобы даже редкие субпопуляции Т-клеток можно было непосредственно обнаруживать или размножить до титра выше предела чувствительности конкретного метода анализа. Способы настоящего изобретения включают индукцию эффективной стимуляции TCR АР-клетками, которые присутствуют в популяции клеток, или аАР-клетками, синтетической платформой на основе сфер,
30 которая содержит: (i) молекулы МНС класса I или класса II, нагруженные соответствующими пептидами, и в некоторых предпочтительных вариантах осуществления (ii) костимулирующие белки (моноклональное антитело против CD28 и/или против CD49d), которые обеспечивают дополнительные сигналы (Oelke et al., 2003, *Nature Medicine* 9 (5):619-24]. Практически любой аллель МНС может быть
35 присоединен к платформе на основе сфер, при этом любой костимулирующий сигнал можно представить как присоединенное к сферам специфичное моноклональное антитело (mAb) или лиганд корецептора, природные или определенные химически. В дополнение к своим превосходным свойствам стимуляции, аАРС очень стабильны: готовые аАРС клеточных размеров, со связанными синтетическими пептидами или без
40 них, имеют длительный срок хранения в лиофилизированной форме и с легкостью могут переносить транспортировку.

В способах настоящего изобретения методика стимуляции обычно включает получение требуемых клеток у индивида, инкубирование клеток в культуральной среде и добавление соединений для стимуляции культивируемых клеток в течение различного
45 времени, например, 30 минут, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 14 ч, 16 ч или более длительных периодов (например, 1, 2, 3, 4 или 5 дней). Клетки могут быть получены при биопсии твердой ткани или аспирации клеток в жидкости из мишеневого участка, такой как бронхоальвеолярный лаваж, или источником клеток может быть

периферическая кровь. Нужные клетки можно культивировать после их отделения от нежелательных клеток, подвергая последние лизису и отделяя интактные мишеневые клетки от остатков лизированных клеток, или отделения мишеневых клеток от нежелательных клеток на основе определенных свойств клеток. Например, РВМС из крови можно культивировать после лизиса эритроцитов (RBC) или после разделения на основе плотности клеток при осаждении в фиколле и удаления фиколла перед инкубированием в культуральной среде. Стимуляцию можно выполнить путем добавления стимулирующего соединения, как описано выше (такого как бактериальный, грибковый или вирусный продукт, или белок или пептид организма-хозяина), в достаточном количестве, чтобы производить ответ, который будет обнаружен, и инкубирования в течение достаточного времени, чтобы производить ответ. Ответ может быть синтезом пре-мРНК или мРНК в культивируемых стимулированных клетках. Ответ можно интерпретировать как набор характеристик ответа мишеневых клеток на данный стимул.

Для получения набора характеристик инфекции *M.tuberculosis*, например, аАРС на основе HLA-A*0201 могут быть нагружены HLA-A*0201 эпитопами (пептидами), которые, как известно, связываются с человеческим белком МНС класса I HLA-A-0201, полученным из известных антигенов, таких как Rv1886c, Rv3874 и Rv3875, и нагруженная антигеном аАРС на основе A2 может быть смешана с РВМС в отношении 1:1, при стандартных условиях культивирования, для обнаружения CD8⁺ Т-эффекторов. аАРС на основе HLA-DRB1*04 можно нагружать подобным образом и использовать для обнаружения CD4⁺ Т-эффекторов.

Для обнаружения клеток, содержащих копии одной или более определенных РНК, для каждой РНК можно использовать набор из множества флуоресцентно меченных олигонуклеотидных гибридизационных зондов. Олигонуклеотидные зонды могут представлять собой ДНК, РНК или смеси ДНК и РНК. Они могут включать неприродные нуклеотиды, аналоги нуклеотидов и неприродные межнуклеотидные связи. Каждый зонд может быть помечен множеством флуоресцентных молекул, например, множеством копий флуорофора, квантовой точкой или другой флуоресцентной молекулой. Например, в WO/1997/014816 описана детекция мРНК бета- и гамма-актинов с помощью одностадийной гибридизации *in situ* с использованием пяти зондов на одну мишень, зонды представляют собой одноцепочечную ДНК длиной приблизительно 50 нуклеотидов, меченную флуорофором (флуоресцеин или Cy3) по каждому десятому нуклеотиду, то есть по пять флуорофоров на зонд. В предпочтительных способах настоящего изобретения используется большее количество, например, от 10 до 100, более предпочтительно от 20 до 60, еще более предпочтительно от 30 до 50, например приблизительно 50, коротких олигонуклеотидных зондов, каждый из которых помечен одним флуоресцентным красителем, которые одновременно связываются с мишеневой последовательностью. Присоединение множества меток к каждой молекуле РНК делает клетку достаточно флуоресцентной, выше фона, чтобы ее можно было обнаружить с помощью методов FC. В большинстве вариантов осуществления каждый набор зондов будет иметь одну флуоресцентную молекулу, причем каждую флуоресцентную молекулу можно будет отличить при детекции от других присутствующих флуоресцентных молекул. Если же требуется обнаружить, экспрессирует ли каждая клетка первую РНК или вторую РНК, или нет, оба набора зондов могут быть помечены одной и той же флуоресцентной молекулой.

Фоновая флуоресценция представляет иную проблему для способов настоящего изобретения, в которых используется FC, нежели в микроскопических методах smFISH,

в которых используется микроскопическая визуализация отдельных РНК в виде ярких пятен в клетках. В способах настоящего изобретения могут использоваться методы снижения фона. Одна из таких методик заключается в применении FRET между зондами, которые располагаются рядом на РНК мишени. Учитывая, например, что первый зонд и второй зонд, который расположен рядом с 5'-концом первого зонда (в пределах подходящей FRET дистанции, которая известна), примыкающего к 3'-концу второго зонда, можно добавить FRET донор на 5'-конец первого зонда и добавить FRET акцептор на 3'-конец второго зонда. При такой комбинации, клетки возбуждаются при длине волны поглощения донорного флуорофора, например, флуоресцеина, но сигнал детектируют при длине волны испускания акцепторного флуорофора, например, техасского красного. Поскольку флуорофоры по типу техасского красного не возбуждаются непосредственно, негибридизованные зонды или ошибочно гибридизованные зонды не испускают флуоресценцию. Другая методика состоит в применении FRET между красителем для двухцепочечной ДНК и флуорофором набора зондов, как это выполняют в анализе с использованием зондов ResonSense. В этом случае включают краситель для дцДНК, такой как SYBR Green (SYBR Green имеет сходные с флуоресцеином длины волн поглощения и испускания), при этом набор зондов метят флуорофором, который поглощает эмиссию от SYBR Green, например, TMR. При такой комбинации клетки можно возбуждать длиной волны поглощения SYBR Green, а детектировать испускание при длине волны эмиссии флуорофора. Поскольку флуорофор не возбуждается непосредственно, негибридизованные зонды не испускают флуоресценцию.

Хотя мишенями для зондов могут служить все области РНК, при подборе таких зондов следует учитывать несколько факторов. Предпочтительно мишеневая область не должна экспрессироваться в клетке с других областей генома или, более предпочтительно, мишеневая область вообще не должна присутствовать где-либо в геноме. Это можно обеспечить при проверке последовательности желаемой мишени в базах данных, в которых содержатся экспрессируемые гены и полные геномные последовательности изучаемого организма. Эта "фильтрация" последовательностей, потенциально генерирующих фоновый сигнал, может быть выполнена при использовании таких общедоступных компьютерных программ, как RepeatMasker. Зонды могут быть подобраны из непосредственно смежных областей мишеней, или между ближайшими зондами может быть некоторое пространство. Длина зондов может варьировать в зависимости от строгости гибридизации.

Как показано ниже, в примере 1 продемонстрирована индукция и применение зондов при распознавании наборов характеристик экспрессии генов в одиночных клетках.

Более конкретно, анализы проводили с целью исследования дифференцированных клеток ТНР-1, стимулированных облученной *M.tuberculosis*. Клетки фиксировали при инкубировании в течение 20 минут с 4% параформальдегидом через 24 часа после возбуждения и затем гибридовали с зондами к двум мишеням мРНК. Одой из них являлся TNF α , ключевая мишень для анализа активированных Т-клеток и макрофагов. Другой мишенью был ACSL1 (ген метаболизма липидов, GenBank, по каталогу № BC050073.1), который, как также ожидали, должен индуцироваться стимулом. Набор зондов, специфичных к TNF α (последовательность Ensembl ID ENST00000376122), включал 48 зондов длиной приблизительно по 20 нуклеотидов каждый, меченных на конце флуорофором тетраметилродамином. Набор зондов, специфичных к ACSL1, включал 48 зондов длиной приблизительно по 20 нуклеотидов каждый, меченных оптически распознаваемым флуорофором, а именно AlexaFluor 596.

В примере 1 экспрессируемые продукты РНК детектировали, используя известную микроскопическую методику, описанную в Raj et al., 2010, *Methods in Enzymology*, 472: 365-386; и Raj et al., 2008, *Nature Methods*, 5:877-879, а именно smFISH. Эта методика включает обнаружение флуоресцентных пятен в качестве признака гибридизации набора зондов с отдельной молекулой РНК. В примере 1 детектировали пятна, соответствующие обеим молекулам мРНК. Изображения TNF α и ACSL1 накладывали в 3D стеки для каждого канала для одного набора клеток. Расшифровка включала обработку изображений при использовании компьютерной программы для идентификации дифракционно-ограниченных пятен, соответствующих индивидуальным молекулам мРНК, наложение их на изображение DIC клеток и получение поклеточного подсчета количества молекул мРНК, как описано в ссылках. Наблюдали сильную вариацию количества транскриптов для каждого гена в зависимости от клетки, что согласуется с предыдущим наблюдением, что синтез мРНК в клетках млекопитающих крайне стохастический. Результаты, среднее количество пятен для TNF α в стимулированных и нестимулированных клетках от общего количества пятен, которое подсчитывали в 50 последовательно проанализированных клетках, показали, что измерения одиночных клеток намного более информативны, нежели групповые измерения.

Регистрация данных FC для способов настоящего изобретения может быть выполнена обычными методами FC. Свет можно детектировать как в канале прямого рассеяния (FSC), так и в канале бокового рассеяния (SSC). Данные могут быть представлены в виде графиков плотности и контурных диаграмм. Для визуализации мишеневых клеток, с исключением результатов нежелательных частиц, например, дебриса, используются FC гейтирование. Диапазоны и окна, или области, определяют стандартным способом так, что в окне появляются положительные события. Чтобы гейтирование позволяло отличать истинно положительные события от ложноположительных, полезно использовать отрицательный контроль, то есть зонды к чему то, что клетки не могут экспрессировать. В принципе это аналогично белковой FC, где используются изотипический отрицательный контроль и/или неокрашенные клетки.

FC детекция показывает число положительных событий в образце, например, одно положительное событие на 10000 клеток (1/10000), три положительных события на 100000 клеток (3/100000) или два положительных события на один миллион клеток (2/10⁶). Частота события может привести к заключению относительно биологического состояния, например, состояния болезни. В альтернативе, комбинации могут быть такими: например, 10% клеток в образце являются положительными по первому цитокину (цитокин А), а также положительными по второму цитокину (цитокин В). В качестве другого примера, состояние болезни можно было бы охарактеризовать следующей комбинацией: 10% или более клеток являются положительными по цитокинам А и В; 7% или более клеток являются положительными по цитокину В и третьему цитокину (цитокину С); и 2% или больше клеток являются положительными по всем трем цитокинам.

Как раскрыто в настоящем описании, было продемонстрировано, что FC может применяться для считывания данных в способах настоящего изобретения. Эксперимент, описанный ниже в примере 2, был разработан с целью проверки, можно ли с помощью FC обнаруживать сигналы, генерируемые наборами зондов, гибридизованных с РНК мишенями в отдельных клетках. В этом примере описаны этапы обнаружения мРНК GAG ВИЧ в клеточных культурах, экспрессирующих его с лентивирусной конструкции. Более конкретно, клетки 293Т трансфицировали тремя плазмидами, которые вместе обеспечивают экспрессию рекомбинантной лентивирусной конструкции, и гибридизовали

с зондами, специфичными к мРНК GAG. Результаты FC представлены на Фиг. 1, слева показаны графики интенсивности флуоресценции против канала прямого рассеяния (FSC-A), полученные для клеток, которые не были трансфицированы, и справа показаны

клетки, трансфицированные тремя плазмидами из лентивирусной системы упаковки. Оба набора клеток гибридизовали с набором зондов к мРНК GAG. Популяция трансфицированных клеток производила сигналы интенсивности, которые на 1-2 порядка превышали величину, наблюдаемую для сигналов от исключаемых нетрансфицированных клеток (то есть выше установленного порога). В качестве контроля, основанный на изображениях анализ результатов smFISH показал, что приблизительно 25% клеток экспрессировали конструкцию. В анализе FC той же популяции установили, что флуоресцентной была та же фракция клеток. Эти результаты демонстрируют, что экспрессию мРНК с легкостью можно обнаруживать с помощью FC. Кроме того, данные обеспечивают руководство для отделения низкой частоты сильно стимулированных (с яркой флуоресценцией) Т-клеток от выбросов в нестимулированной популяции. Анализ с использованием рабочей характеристической кривой (ROC, от англ. receiver operating characteristic, рабочая характеристика приемника) может позволить определить оптимальный порог. ROC-анализ известен специалистам в области разработки тест-систем. Смотрите, например, Zweig et al., 1993, *Clinical Chemistry*, 39 (8):561-577, и Pepe, 2003, *The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction*, New York, NY: Oxford.

В детекции транскрипционных наборов характеристик активации Т-клеток две сложные задачи - лишь малая субпопуляция клеток индуцирована, и индуцированные клетки экспрессируют всего несколько копий мРНК. В экспериментах, описанных в примере 7, авторы изобретения с помощью способов настоящего изобретения сумели продемонстрировать и чувствительное обнаружение низких частотных характеристик, и одновременное обнаружение нескольких мишеней мРНК. Анализ, который включал возбуждение, использование зондов на фиксированных клетках и FC, позволил обнаружить клетки, экспрессирующие пару IL-2/IFN γ с частотой 3,46% (Фиг. 2, правая панель), тогда как клетки, экспрессирующие пары цитокинов IL-2/TNF α и IFN γ /TNF α , были обнаружены с частотой 3,35% и 6,37%, соответственно. Сравнения популяций с одиночными и двойными цитокинами, например, IFN γ (4,76-5,40%) по отношению к IL-2/IFN γ (3,46%), позволили предложить, что не все продуценты IFN γ могли продуцировать IL-2. Напротив, большинство продуцентов IFN γ (5,40%), как оказалось, также экспрессировали TNF α , на что указывал размер IFN γ /TNF α -продуцирующей популяции (6,37%). Этот результат ожидали для популяции Т-клеток, неспецифично активированных посредством комбинированной TCR активации и лектин-опосредованной стимуляции (mAb против CD3 и фитогемагглютинин). Таким образом, анализ по настоящему изобретению дал результаты, согласующиеся с известной цитологией Т-клеток.

Как показано в примере 8, способ по настоящему изобретению использовали для обнаружения *M. tuberculosis*-специфичных клеток, стимулированных *ex vivo*. PBMC инкубировали в течение 5 ч со смесью ESAT6- и CFP10-производных пептидов (T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, UK) при концентрации 5 мкг/мл. Как показано на Фиг. 3, наблюдали приблизительно 2-кратное увеличение клеток, экспрессирующих мРНК цитокинов в Ag-специфичных Т-клетках после этой стимуляции. Таким образом, даже в отсутствие костимуляции, обеспечиваемой mAb против CD28, анализ позволил обнаружить низкие частоты циркулирующих *M. tuberculosis*-специфичных Т-клеток, присутствующих в этом доноре LTBI. Данный результат демонстрирует применимость

анализа в соответствии с настоящим изобретением.

В примере 9 описан способ по настоящему изобретению с усиленным сигналом по сравнению с примером 8. Захват корецептора CD28 TCR моноклональным антителом использовали для применения превосходной стимуляции к Ag-специфичным Т-клеткам.

5 Как показано в примере 8, РВМС инкубировали в течение 5 ч со смесью ESAT6- и CFP10-производных пептидов (T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, UK) в концентрации 5 мкг/мл, но на этот раз с или без mAb против CD28, 53D10. Фиксированные и промытые клетки инкубировали с Су5-меченными ДНК зондами, специфичными к зеленому флуоресцентному белку (GFP, отрицательный контроль) или IFN γ , и затем анализировали с помощью FC. Частоты продуцентов цитокина показаны на Фиг. 4. В присутствии mAb против CD28 наблюдали более чем 2-кратное увеличение экспрессии мРНК IFN γ в Ag-специфичных Т-клетках донора LTBI. Костимуляция CD28 не влияла на неспецифичную гибридизацию с контрольными зондами к GFP и ВИЧ-1 GAG. В примере 9 показана иная стратегия усиления сигнала, а именно посредством передачи 15 костимулирующих сигналов TCR, специфично захваченному когнатным Ag. Кроме того, так как костимуляция, опосредуемая mAb против CD28, не влияла на неспецифичное связывание контрольных зондов (GFP и ВИЧ-1 GAG), костимуляция может использоваться для увеличения силы специфичного сигнала по отношению к фоновому шуму.

20 Несколько стратегий особенно удобны для оптимизации анализов по настоящему изобретению. Они включают следующее:

i) Кинетика обнаружения сигнала. Кинетику экспрессии анализатора мРНК для каждой из мишеней РНК (например, мРНК цитокинов IL-2, IFN γ и TNF α) определяют с клетками данного источника (например, разделенные через фиколл РВМС, полученные из проб 25 крови доноров LTBI+ и LTBI-), которые стимулируют соответствующим индуктором или индукторами (например, смесью антигенов (например, ESAT6- и CFP10-производных пептидов (T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, UK), присутствующих в концентрации 5 мкг/мл)), как в примере 8. Экспрессию каждого цитокина затем оценивают отдельно в Ag-стимулированных РВМС в разное время (например, 30 минут, 2, 4, 8, 12 и 16 ч). В 30 частности, в случае цитокинов РВМС, неспецифично стимулированные с использованием mAb против CD3 и фитогемагглютинаина (РНА), служат в качестве положительного контроля стимуляции. В анализе для исследования специфичного ответа РВМС, в предпочтительном способе измерения неспецифичного ответа используют и сравнивают РВМС из групп, которые включают лиц, которые, как известно, не поражены и поражены 35 заболеванием, в отношении которого измеряют специфичный ответ.

ii) Эффект дозы. Эффект дозы в отношении стимуляции Ag может быть определен аналогичным способом (например, для каждого из этих трех цитокинов) при изменении концентраций (от 1 до 20 мкг/мл) смеси пептидов ESAT6 и CFP10 в оптимальный момент обнаружения сигнала. Дополнительно, неспецифичная стимуляция (антитело к CD3+ 40 РНА) РВМС от любых доноров может быть оптимизирована путем тестирования различных концентраций, отдельно и в комбинации, с обеспечением стандартного положительного контроля для конкретного анализа. В анализе для исследования специфичного ответа РВМС, в предпочтительном способе измерения неспецифичного ответа используют и сравнивают РВМС из групп, которые включают лиц, которые, как известно, не поражены и поражены заболеванием, в отношении которого будут 45 измерять специфичный ответ.

iii) Усиление сигнала по отношению к шуму. Могут быть созданы наборы зондов с большей или более высокой интенсивностью флуорофоров. Эта цель также будет

достигнута посредством нескольких стратегий улучшения. Дополнительно, способы мечения зондов могут быть изменены, как описано выше. Строгость гибридизации может быть оптимизирована опытным путем для увеличения отношения сигнал/шум.

Еще одна стратегия усиления сигнала состоит в передаче костимулирующих сигналов к TCR, специфично захваченному когнатным Ag, как описано в отношении примера 9. Условия костимуляции могут быть оптимизированы, как указано выше в отношении кинетики и эффекта дозы, для достижения надежного обнаружения множества молекул РНК (например, трех цитокинов) с помощью анализа, описанного в настоящей заявке.

iv) Определение порога. Начальная оценка порога для обнаружения РНК может служить для стандартизации оптимизированного анализа, хотя клинически принятый порог для конкретного анализа может быть определен на более поздней стадии создания коммерческого теста. В фазе исследования можно оценить порог обнаружения РНК (экспрессия цитокина) в Ag-специфичных Т-клетках, полученных у доноров и стимулированных *ex vivo*. Ag-специфичные ответы можно вычислить, вычитая сигнал от нестимулированных РВМС из значений, полученных с Ag-стимулированными РВМС, за оптимальное время и при оптимальной дозе Ag. Для каждого считывания данных цитокина ROC кривая, как оценивают, показывает отношение между чувствительностью и специфичностью в различных точках пересечения (включая средние значения для доноров плюс два стандартных отклонения), и оптимальные пороговые значения выбирают для идентификации Ag-специфичных ответов.

v) Уменьшение объема крови и продолжительности обработки. В настоящее время анализируют 2×10^6 клеток/параметр (например, каждый цитокин), что соответствует, в среднем, 0,8 мл крови. С применением лизиса эритроцитов в цельной крови вместо разделения в фиколле при получении РВМС, а также других модификаций обработки крови, например, вакуумного осаждения (96-луночный формат) вместо центрифугирования, можно уменьшить объемы проб и сократить время анализа. Предварительные эксперименты показывают, что время гибридизации можно уменьшить до 2 часов (ч) без существенной потери сигнала.

Разработку анализа можно проводить обычными методами. Например, РВМС трех групп доноров (активный ТВ, LTBI и неинфицированные контрольные лица) можно стимулировать аАРС на основе HLA-A2 и HLA-DR4, нагруженными пептидами ESAT6 и CFP10, как в примере 4. Каждый анализ позволяет протестировать набор из 4 маркеров реакции на стимуляцию (оцениваемой вместе на основе свойств экспрессии), выбранных из группы, включающей, без ограничения, гены, показанные в таблице 1, при использовании 4-цветной FC для анализа. Это позволяет анализировать все мишени для каждого донора. Маркеры, выбранные в первоначальных тестах, могут быть повторно протестированы в комбинациях, выбранных с целью группировки генов, экспрессируемых на сходных уровнях в каждой группе. Статистический анализ может быть выполнен как описано в примере 4. При необходимости также можно измерять экспрессию мишеней, индуцированных при обычной стимуляции APC, для подтверждения способности аАРС повышать чувствительность обнаружения для множества аналитов внутри одиночных клеток. Кроме того, анализ также может быть протестирован с помощью флуоресцентной микроскопии. Статистический анализ может быть выполнен как описано в примере 5.

Эксперимент, описанный в примере 10, демонстрирует, что та же самая методика, которая именуется как "FISH-Flow", используемая для обнаружения экспрессии цитокинов мРНК в Т-клетках, может успешно использоваться в других типах клеток, включая, без ограничения, первичные макрофаги. Кроме того, эксперимент

демонстрирует, что ответы на различные стимулы можно распознавать в первичных макрофагах, отслеживая экспрессию одного гена в разное время.

Результаты, показанные на Фиг. 5, показывают, что фоновая экспрессия, оцениваемая по отрицательному контролю GFP, оставалась постоянной, но незначительной (приблизительно 0,1-0,2% гейтированных клеток). Обработка смесью липополисахарида (LPS) и IFN γ или N-пальмитоил-5'-[2,3-бис(пальмитоилокси)-пропил]-(R)-цистеинил-(лизил)3-лизина (Pam₃CSK₄) с легкостью вызвала экспрессию транскриптов TNF α в этих культивируемых макрофагах до уровня от 6 до 42% всех клеток, являющихся положительными. Четкая экспрессия транскриптов TNF α ожидается в активированных макрофагах и контрастирует с умеренной (меньше 2%) экспрессией мРНК IFN γ , на которую не влиял выбор стимулов и/или длительности возбуждения, и, таким образом, может отражать необычно высокий фон в этих клетках, а не реальный профиль экспрессии. Кинетика экспрессии мРНК TNF α , индуцируемая LPS и IFN γ , вероятно, отличается от кинетики экспрессии, индуцируемой Pam₃CSK₄, при этом указанная выше стимуляция приводит к стойкому, долговременному повышению уровней мРНК. Напротив, стимуляция той же мРНК при воздействии Pam₃CSK₄ была значительно менее стойкой.

Пример 11 демонстрирует идентификацию временных профилей экспрессии генов цитокинов, хемокинов и рецепторов хемокинов, которые являются маркерами активации Т-клеток, в стимулированных Т-клетках человека, при сравнении с результатами проточной цитометрии, полученными при использовании зондов FISH, специфичных к указанным мРНК (Фиг. 6А) или при использовании mAb, узнающих их белковые продукты (Фиг. 6В). Частоты продуцентов цитокинов согласно FISH-Flow (Фиг. 6А) показали, что экспрессия мРНК IL-2, IFN γ , TNF α , CCL3, CCR7 и cFos в нестимулированных клетках являлась либо незначительной (контроль GFP, IL-2, IFN γ и CCR7), либо очень низкой (TNF α , CCL3 и cFos) и наблюдалась в <1% гейтированных клеток. Неожиданно индуцированная экспрессия этих мРНК, как оказалось, достигает максимума через 2 часа после стимуляции, а затем падает в 1 день и 3 день. Это отличается от параллельных данных, полученных с теми же клетками (в присутствии 1 мкг/мл брефелдина А) при использовании обычного иммуноокрашивания mAb и проточной цитометрии. В данном случае нестимулированные клетки четко показывают базальные уровни (1-3%) экспрессии белка, обнаруживаемые по меньшей мере для некоторых маркеров, таких как IL-2, IFN γ и TNF α , при сравнении с отрицательным контролем - сходным по изотипу (Iso) mAb. Кроме того, все мишени через 2 часа индуцированы и остаются на повышенных уровнях в течение 3-дневного периода исследования. Таким образом, никаких других временных профилей нельзя было обнаружить с использованием mAb, которые связываются с цитокинами. Пример 11 демонстрирует различия в кинетике, что обеспечивает превосходную профильную дискриминацию при использовании FISH-Flow по сравнению с обычным окрашиванием mAb и проточной цитометрией и указывает на то, что вышеуказанный способ обеспечивает существенно более высокую чувствительность для обнаружения активации.

Для полного определения функционального набора характеристик клетки любого типа (то есть способности выполнять специализированные биологические функции) может быть важно знать экспрессию всех других мРНК в активированных клетках при сравнении с неактивированными (неотвечающими) клетками. Исследование, представленное в примере 12, демонстрирует, что FISH-Flow позволяет выполнять мечение клеток, которые экспрессируют одну или множество мишеней в ответ на

стимуляцию, и что такие респондеры могут быть выделены из целой клеточной популяции с целью исследования их профилей экспрессии генов.

5 Стимулированные Т-клетки человека инкубировали либо с Су5-меченными зондами ДНК, комплементарными к РНК, специфичной к GFP, и анализировали с помощью FC в качестве контроля, либо со смесью нескольких наборов зондов FISH (таблица 3),
 10 активных в отношении мРНК IL-2, IFN γ , TNF α и CCL3, при этом все зонды одиночно помечены Су5. Результаты, полученные с зондами GFP, показаны на Фиг. 7А. Результаты, полученные со смесью зондов, показаны на Фиг. 7В. После гейтирования в случае популяции лимфоцитов (левая панель на каждой фигуре) применяли консервативное дополнительное гейтирование для разделения проанализированных
 15 лимфоцитов на две различные популяции (правая панель на каждой фигуре), что позволяет отличить клетки, экспрессирующие IFN γ (IFN+), от клеток, не экспрессирующих IFN γ (IFN-). Гейтирование клеток, гибридных с зондами GFP (Фиг. 7А), определило две популяции: 0,1% в популяции IFN+ и 71,2% в популяции IFN-, из всех проанализированных лимфоцитов. Клетки, гибридные с зондами IL-2: IFN γ :TNF α :CCL3 (Фиг. 7В), были следующими: 10,2% IFN+ и 33,7% IFN- с таким же гейтированием. Последние, гибридные с зондами FISH, клетки (Фиг. 7В) разделяли на положительные и отрицательные популяции с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) для выполнения анализа экспрессии генов в выделенных
 20 активированных и неответающих клетках. Сортированные популяции клеток анализировали с целью демонстрации различных профилей экспрессии генов, согласующихся с их активностью в отношении определенных зондов FISH. Экспрессию мРНК, кодируемых двумя генами, IFN γ и геном "домашнего хозяйства" GAPDH (контрольным), выбрали, чтобы иллюстрировать вариант осуществления данного
 25 аспекта изобретения. Сортированные популяции клеток подвергали ОТ-ПЦР при использовании праймеров, специфичных к одному из этих двух генов. Количественное измерение амплифицированного продукта выполняли при включении красителя SYBR Green в реакционную смесь для амплификации. Результаты, показанные на Фиг. 8А, демонстрируют, что IFN γ -специфичные праймеры обнаруживают мишени в большем
 30 количестве в клетках IFN+, которые были идентифицированы с использованием зондов к IL-2, IFN γ , TNF α и CCL3, чем в клетках IFN-, которые были на минимальном уровне помечены указанными зондами. Амплификация сигнала контрольного GAPDH, который не изменяется при активации, как ожидают, будет аналогичным и в активированных клетках, и в клетках-нереспондерах. Немного пониженная амплификация, которую
 35 наблюдали в случае GAPDH-специфичных праймеров в активированных клетках, отражает тот факт, что эта сортированная популяция значительно меньше и, таким образом, могла давать меньшее количество мРНК.

Эти результаты (подтвержденные анализом размера, Фиг. 8В) демонстрируют, что экспрессия генов может быть также проанализирована в требуемых субпопуляциях
 40 клеток, идентифицированных с применением платформы FISH-flow настоящего изобретения, при использовании методов, известных специалистам в области сортировки и получения субпопуляций клеток, а также методов измерения экспрессии генов, таких как ОТ-ПЦР или транскриптомный анализ. Субпопуляция, которая может быть идентифицирована и изучена, может содержать одну клетку или больше одной клетки,
 45 в том числе, без ограничения, 10, 100, 1000, 10000, 100000 или больше клеток.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. ДЕМОНСТРАЦИЯ ИНДУКЦИИ И НАБОРОВ ЗОНДОВ

Данный пример демонстрирует применение искусственной стимуляции клеток с

целью продукции РНК, в данном случае мРНК, и применение наборов одиночно меченных флуоресцентных зондов для гибридизации с экспрессируемыми РНК.

В этом примере методику smFISH использовали для визуализации пятен, соответствующих индивидуальным молекулам мРНК, связанным с зондами. Смотрите Raj et al., 2010, *Methods in Enzymology* 472:365-386; и Raj et al., 2008, *Nature Methods* 5:877-879. Условия гибридизации зондов и условия промывки клеток описаны в указанных ссылках. Методика отличалась одним важным моментом. Чтобы избежать потери клеток на стадиях промывки, в промывочные растворы включали 0,5% эмбриональной бычьей сыворотки. Набор нуклеотидных зондов, в данном случае зондов ДНК, был подобран для мРНК TNF α , ключевой мишени для анализа активированных Т-клеток и макрофагов, и использован при тестировании дифференцированных клеток THP-1, стимулированных облученной *M.tuberculosis*. Также был включен второй набор зондов ДНК, меченных флуорофором другого цвета и предназначенных для связывания с мРНК ACSL1 (ген метаболизма липида). Последний ген, как также ожидали, будет индуцироваться стимулом. Набор зондов, специфичных к TNF α человека, включал 48 зондов длиной приблизительно по 20 нуклеотидов каждый, меченных на конце флуорофором тетраметилпродамино. Набор зондов, специфичных к гену ACSL1 человека, включал 48 зондов длиной приблизительно по 20 нуклеотидов каждый, меченных оптически распознаваемым флуорофором, а именно alexafluor 594. Последовательности зондов перечислены в списке последовательностей в конце настоящего описания (таблица 3). Хотя зонды, перечисленные в каждом наборе, подходят для детекции мишени мРНК, также могут использоваться альтернативные зонды, отобранные из различных областей мишеней РНК, как описано в Raj et al., 2010, *Methods in Enzymology* 472:365-386; и Raj et al., 2008, *Nature Methods* 5:877-879. Как обсуждается выше, детектировали пятна, соответствующие обоим мРНК в клетках. Число молекул РНК TNF α увеличилось с 0,24 на клетку без индукции до 14 на клетку, в среднем, после стимуляции.

ПРИМЕР 2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ FC ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН

В данном эксперименте анализы проводили с целью обнаружения мРНК GAG ВИЧ в культурах клеток, экспрессирующих лентивирусную конструкцию.

Коротко, клетки 293Т трансфицировали тремя плазмидами, которые вместе обеспечивают экспрессию рекомбинантной лентивирусной конструкции, и подвергали гибридизации с зондами, специфичными к области мРНК GAG ВИЧ (GenBank, по каталогу № AY835771.1). Последовательности зондов перечислены в конце настоящего описания (таблица 3). Зонды гибридизовали, после чего клетки промывали согласно методикам, описанным в статьях Raj et al., 2010, *Methods in Enzymology* 472:365-386; и Raj et al., 2008, *Nature Methods* 5:877-879, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Опять же, чтобы избежать потери клеток на стадиях промывки, в промывочные растворы включали 0,5% эмбриональной бычьей сыворотки. Затем выполняли FC, чтобы обнаружить клетки, экспрессирующие конструкцию. Гейты устанавливали по флуоресценции клеток, которые не были трансфицированы. В клетках, которые были трансфицированы, приблизительно 25% клеток экспрессировали конструкцию, что было отражено сигналом большей интенсивности по сравнению с уровнем, установленным гейтом. Результаты FC представлены на Фиг. 1, на которой показаны две диаграммы интенсивности флуоресценции ("y.e.") в зависимости от прямого рассеяния ("FSC-A"). На диаграмме слева (Лентивирус-) показаны клетки, которые не были трансфицированы. На диаграмме справа (Лентивирус+) показаны клетки, которые

были трансфицированы тремя плазмидами из лентивирусной системы упаковки.

ПРИМЕР 3. ОБНАРУЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ, СТИМУЛИРОВАННОЙ М-ТВ ПРОИЗВОДНЫМИ ПЕПТИДАМИ

РВМС получали у неинфицированных доноров, доноров с бессимптомной латентной инфекцией (LTBI) и доноров с активной формой ТВ. Т-клетки активировали добавлением смеси пептидов, используемой в анализе секреции IFN γ T-SPOT.TB IFN γ Release Assay (IGRA) (Oxford Immunotec, Marlborough, MA) согласно инструкциям производителя, которая получена из иммунодоминантных микобактериальных Ag Rv3875 (ESAT6) и Rv3874 (CFP10). В разные моменты времени (от 4 до 120 ч) стимулированные клетки подвергали фиксации и пермеабиллизации, а затем гибридизовали с один или более наборами зондов, описанных ниже. Клетки анализировали FC для определения частоты клеток, которые экспрессируют мишени, отдельно и в комбинации, при использовании доступных наборов фильтров, которые позволяют различать флуорофторы, используемые для мечения зондов.

Набор зондов для TNF α является набором зондов, описанным в примере 1. Получали два дополнительных набора зондов, один для IL-2 и один для IFN γ , содержащие по 50 зондов (номера последовательностей Ensembl ENST00000226730 и ENST00000229135, соответственно). Зонды во всех трех наборах представляют собой линейные (случайная спираль) олигонуклеотиды длиной 15-25 нуклеотидов, меченные одиночным флуорофором. Три флуорофора, используемые в трех наборах, являются оптически различимыми. Эти три гена цитокинов являются известными маркерами активации и пролиферации Т-клеток, которые позволяют дифференцировать подтипы Т-клеток. Транскрипты-мишени имеют достаточную длину, чтобы на каждом транскрипте можно было использовать по меньшей мере 50 зондов.

Для обнаружения экспрессии маркера в малой фракции (<0,01%) клеток с помощью FC, регистрировали результаты для 1×10^6 событий. Чтобы определить статистическое значение различий между группами доноров, порог для разделения клеток-нереспондеров от клеток-респондеров определяли с помощью ROC-анализа (смотрите, например, Zweig et al., 1993, Clinical Chemistry 39(8):561-577, и Pepe, 2003, The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. New York, NY: Oxford), и определяли частоту положительных клеток. Для анализа данных может использоваться смешанная модель дисперсионного анализа (ANOVA). Перед анализом данные преобразовывали (например, логарифмически). В случаях, когда простое преобразование было недостаточным, чтобы обратиться к допущения ANOVA, применяли непараметрический аналог статистического метода.

В активированных клетках была определена обнаруживаемая частота экспрессии для всех трех маркеров. Частоты клеток, которые экспрессируют различные комбинации маркеров, являются набором характеристик болезни.

ПРИМЕР 4. АНАЛИЗ ДЛЯ M.TUBERCULOSIS-СПЕЦИФИЧНЫХ ЭФФЕКТОРНЫХ Т-КЛЕТОК

Данный пример описывает анализы для детекции M.Tuberculosis-специфичных эффекторных Т-клеток.

а. Обнаружение CD8⁺ Т-эффекторов. Пациенты с ТВ проходили HLA-типирование с помощью FC детекции РВМС, иммунно-окрашенных с использованием аллель-специфичных mAb BB7.2 и 0222, или посредством подтверждения ПЦР. аАРС на основе HLA-A*0201 нагружали известными отдельными эпитопами HLA-A*0201 (пептидами), полученными из Rv1886с, Rv3874 и Rv3875.

Эти пептиды получены из иммунодоминантных Ag M.tuberculosis. РВМС выделяли

у HLA-A2-типированных пациентов с ТВ и стимулировали аAPC, нагруженными Ag, на основе A2, в соотношении 1:1, в стандартных условиях культивирования. В альтернативе, выделенные PBMC инкубировали с добавлением пептидов для стимуляции Т-клеток эндогенными APC. В различное время, от 4 до 120 ч, клетки фиксировали, пермеабелизовывали и инкубировали с зондами, специфичными к IL-2, IFN γ и TNF α . Отрицательный контроль включал PBMC от здоровых, неинфицированных (IGRA-отрицательных) доноров, стимулированные вышеописанными Ag-нагруженными аAPC, и PBMC от положительных доноров, стимулированные аAPC, нагруженными нерелевантными меланомаспецифическим пептидом Mart 1 (эпитоп 26-35) и пептидом дифференцировки Ag gp100 (эпитоп 44-59). Положительный контроль включал PBMC, неспецифично стимулированные mAb против CD3+PHA.

б. Обнаружение CD4⁺ Т-эффекторов. Сначала конструировали аAPC на основе HLA-DRB1*04, используя методику, описанную выше для сборки аAPC на основе HLA-A*0201. Главным аспектом данного подхода является экспрессия растворимой формы молекулы HLA-DR4, что требует спаривания полипептидов α и β класса II в процессе биосинтеза. Для облегчения спаривания субъединиц растворимых аналогов молекул MHC класса II, в качестве молекулярного каркаса использовали молекулу IgG: она является бивалентной и ее можно с легкостью модифицировать с целью включения целого ряда белковых доменов. Модифицированные цепи α и β клонировали в бифункциональный бакуловирусный вектор экспрессии. Клетки, трансфицированные таким вектором, секретируют приблизительно от 0,5 до 2,0 мг/мл растворимого HLA-DR4-Ig-подобного материала. Для сборки растворимых комплексов MHC класса II HLA-DR4-Ig, при использовании универсального вектора клонирования pZig ДНК, кодирующую внеклеточные домены класса II цепей α и β белков DR4 лигировали с ДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи Ig, используя сайты эндонуклеаз рестрикции; и лигировали химерные конструкции последовательно в модифицированный вектор pAcUW51. Выход, чистоту и целостность секретируемых белков подтверждали биохимическим анализом (ДСН-ПААГ и Вестерн-блоттинг) с HLA-DR4-специфичным mAb 0222HA (One Lambda). Очищенные растворимые белки HLA-DR4-Ig и mAb против CD28 в соотношении 1:1 конъюгировали с магнитными сферами (M-450 Epoxy Dynabeads, Dynal Invitrogen).

Известными пептидами, полученными из Rv1886c, Rv3874 и Rv3875 и ограниченными аллелем HLA-DRB1*04 (таблица 1), нагружали аAPC на основе HLA-DR4 и использовали для стимуляции PBMC, полученных от неинфицированных доноров, доноров с LTBI и доноров с активным ТВ. В альтернативе, выделенные PBMC инкубировали с добавлением пептидов для стимуляции Т-клеток эндогенными APC. После стимуляции в различные моменты времени, от 4 до 72 ч, клетки гибридизовали с зондами к мРНК IL-2, IFN γ и TNF α и анализировали с помощью FC. Использовали отрицательный и положительный контроль, как описанный выше для CD8⁺ Т-клеток.

Таблица 1
HLA-A*0201- и HLA-DRB1*04-ограниченные эпитопы

Белок M.tb	Эпитоп HLA-A2 (SEQ ID NO:)	Эпитоп HLA-DR4 (SEQ ID NO:)
Rv1886c	FIYAGSLSAL (1)	PVEYLQYPSPSMGRD (4)
	KLVANNTL (2)	LPVEYLQVPSPSMGR* (5)
	GLAGGAATA (3)	PQQFIYAGSLSALLD* (6)

5	Rv1986	ALGISLTV* (7) FLACFTLIAA* (8) FLIGYGLLA* (9)	AGRLRGLFTNPGSWR (10) VGFLACFTLIAAIGA* (11) LDTVVLGALANEHS* (12)
	Rv2220	GLLHHAPSL (13) SLWKDGAPL (14)	***
	Rv2659c	RKAAGRPDLRV* (15) KLLDNHILA* (16) FVLMAAWLA* (17)	PDPYQAFVLMAAWLA* (18) TMRAHSYSLLRAIMQ* (19) RAHYRKLLDNHILAT* (20)
15	Rv2780	VLMGGVPGVE (21) LLDSGTTSI (22)	***
	Rv3407	ARVEAGEELGV* (23) ALIESGVLIPA* (24) RLVARLIPV* (25)	AIGIRELRQHASRYL* (26) RLVARLIPVQAAERS* (27) KRTLSDVLNEMRDEQ* (28)
25	Rv3874	SGDLKTQIDQV* (29) IRQAGVQYSR** (30)	IRQAGVQYSR** (30) EISTNIRQA (31)
	Rv3875	AMASTEAGNV (32) LLDEGKQSL (33)	FAGIEAAASAIQGNV (34) SAIQGNVTSIHSLLD* (35)
* предсказано с использованием программы, доступной на вебсайте Immune Epitope Data And Analysis Resource по адресу immuneepitope.org			
** этот эпитоп ограничен обоими классами I/II.			
*** не требуется, используется только с aAPC на основе I класса.			

К этим результатам применяли методы статистического анализа, описанные в примере 3. Методы множественной стимуляции в этом примере также требуют смешанной модели ANOVA для сравнений.

Предыдущий тест позволяет обнаруживать как CD4⁺, так и CD8⁺ эффекторные Т-клетки в крови пациентов с ТВ на основе стимуляции аллельспецифическими HLA класса I или класса II-ограниченными пептидами. Активированные эффекторные Т-клетки, узнающие антигены Rv1886с, Rv3874 и Rv3875 и способные вырабатывать по меньшей мере один цитокин, IFN γ или TNF α , можно обнаруживать с легкостью. Одновременная продукция двух цитокинов (IL-2+IFN γ + и IL-2+TNF α +) является менее распространенной в полностью дифференцированных Т-клетках, которые представляют большинство эффекторов в крови пациентов с активным ТВ.

ПРИМЕР 5. ЦИТОКИНОВЫЕ ПРОФИЛИ ОДИНОЧНЫХ Т-КЛЕТОК, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ИНФЕКЦИЕЙ СТАДИЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ АГ

РВМС от доноров с активным ТВ, ЛТБИ и неинфицированных доноров стимулировали в различные моменты времени (от 4 до 120 ч) aAPC на основе HLA-A2 и HLA-DR4, нагруженными смесями пептидов, полученных из Rv1886с (активная стадия ТВ) и Rv1986, Rv2659с и Rv3407 (стадия ЛТБИ). В альтернативе выделенные РВМС инкубировали с добавлением пептидов для стимуляции Т-клеток эндогенными APC.

Регистрируемым результатом является экспрессия IL-2, IFN γ и TNF α при использовании трех наборов из приблизительно по 50 одиночно меченных флуоресцентных зондов и обнаружение с помощью FC количества экспрессирующих клеток. Для идентификации кандидатных Ag, которые могут позволять различать состояния болезни, использовали

однофакторные ANOVA и высокое р-значение ($p=0,25$) в качестве порогового. Отобранные Ag использовали для создания модели ответов, которая распознает группы доноров, используя обобщения логистической регрессии, такие как политомную или интегральную логистическую регрессию.

Стимуляция с использованием Rv1886с дает характерный, связанный со стадией инфекции, цитокиновый профиль Т-клеток: одиночные, двойные и тройные продуценты в случае пациентов с ТВ и, главным образом, продуценты IL-2 в случае пациентов с ЛТВ1.

ПРИМЕР 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАБОРА ХАРАКТЕРИСТИК ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ, СВЯЗАННЫХ СО СТАДИЕЙ ИНФЕКЦИИ, В ОДИНОЧНЫХ Т-КЛЕТКАХ

Функциональные маркеры, индуцируемые при активации TCR, могут быть измерены с применением способов настоящего изобретения, чтобы точно описать главные функциональные субпопуляции Т-клеток. Для этого анализа были отобраны кандидатные маркеры, индуцируемые в течение 4-6 часов после захвата TCR, и/или гены, которые отражают стадию созревания и функцию известных субпопуляций Т-клеток. Полученная группа активации и функциональные маркеры, экспрессируемые в эффекторных Т-клетках, эффекторных Т-клетках памяти и центральных Т-клетках памяти (таблица 2), удовлетворяет таким критериям. Данные в таблице 2 были составлены из Zinkernagel RM., T cell activation, в Mak TW, Saunders ME, editors. New York: Elsevier; 2006. p. 373-401, и из Doherty P., T cell differentiation and effector function, в Mak TW, Saunders ME, editors. New York: Elsevier; 2006. p. 403-432, а также приведенных там ссылок.

Таблица 2 Ключевые маркеры при определении набора характеристик Т-клеток*		
Маркер	Субпопуляция	Функция
CD27	Наивные, эффекторные	Пролиферация, вторичный иммунный ответ
CD40L	Эффекторные	Активация APC, первичный иммунный ответ
CD44high	Эффекторные, памяти	Вторичный иммунный ответ
CD69high	Эффекторные, памяти	Активация, ответ Th17
CD107a	CD8+ эффекторные, памяти	Дегрануляция CTL
CD137	Эффекторные	Пролиферация CTL, продукция IFN γ
IL-2	Эффекторные, памяти	Пролиферация, ответ Th1
IFN γ	Эффекторные, памяти	Ответ Th1
TNF α	Эффекторные, памяти	Ответ Th1
MIP-1a	Эффекторные, памяти	Ответ Th1
IL-2Ra	Эффекторные, памяти	Пролиферация
CCR1	Эффекторные	Хоминг
CCR5	Эффекторные	Хоминг, активированная память
CCR7	Центральной памяти	Хоминг, активированная центральная память
CXCR4	Эффекторные	Хоминг, миграция
CXCR5	CD4+ памяти	Хоминг, миграция, память
LPAM-1	Эффекторные, памяти	Хоминг, дифференцировка CTL, память
VLA-4	Эффекторные, памяти	Направленная миграция, адгезия, память
Bcl-2	Памяти	Антиапоптозная, клеточное выживание
Bcl-xL	CD8+ памяти	Антиапоптозная, клеточное выживание
Перфорин	CD8+ эффекторные	Цитотоксичность

Гранзим В	CD8+ эффекторные	Цитотоксичность
-----------	------------------	-----------------

Использование аAPC, нагруженных пептидами (как в примере 3 или 4), для стимуляции через TCR и костимуляции через CD28 или, в альтернативе, mAb против CD28 в сочетании с пептидами (как в примере 3 или 4) для стимуляции эндогенными APC, быстро увеличивает экспрессию ключевых хемокинов и цитокинов (в том числе, без ограничения, MIP-1 α , IFN γ и TNF α) и других костимулирующих молекул (в том числе, без ограничения, CD40L, CD137), что в свою очередь дополнительно повышает реактивность.

Положительная обратная связь усиливает ответы во временных рамках, используемых для детекции, и повышает чувствительность результатов FC для мультипараметрического анализа. Комбинации отобранных маркеров выбирают для обеспечения воспроизводимой идентификации и определения характеристик отдельных эффекторных клеток и клеток памяти, а также их количественного анализа в периферической крови групп доноров. Они служат в качестве функциональных наборов характеристик Т-клеток. Четырехцветную FC используют, чтобы определяемый набор(ы) характеристик был пригоден для анализа с применением инструментов, обычно используемых в клинических условиях.

Высокую воспроизводимость по донорам обнаружили для данных, полученных с PBMC, стимулируемых коммерческой смесью пептидов ESAT6 и CFP10 и аAPC на основе HLA-A2 или HLA-DR4. Данные, полученные с этой смесью пептидов, совпадают со стандартным IGRA, основанным на эндогенных APC. Надежная стимуляция, которую обеспечивают аAPC, распространяется на индукцию множественных мишеней, как описано выше в отношении стандартных цитокиновых мишеней. Клетки, экспрессирующие множественные маркеры, также обнаруживали с более высокой частотой, чем обычно наблюдают при стандартной стимуляции APC. Способ в настоящем примере позволяет проводить идентификацию наборов маркеров, которые служат в качестве наборов характеристик отдельных Т-клеток, которые присутствуют при различных стадиях инфекции, в данном случае инфекции ТВ.

ПРИМЕР 7. ОДНОВРЕМЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ мРНК ДВУХ ЦИТОКИНОВ В СТИМУЛИРОВАННЫХ PBMC

В данном примере показано, что можно обнаруживать очень малую популяцию флуоресцентных клеток. Коротко, CFSE-меченные PBMC последовательно разводили в MITOTRACKER (Invitrogen)-меченных PBMC. Было установлено, что анализ позволял обнаруживать первые при частоте 0,0013%, что демонстрирует достаточную чувствительность.

Чтобы продемонстрировать обнаружение мРНК IL-2, IFN γ и TNF α , PBMC неспецифично стимулировали через TCR, используя mAb против CD3 и PHA, который, как известно, вызывает экспрессию различных цитокинов в этих клетках. После стимуляции, клетки фиксировали и исследовали с использованием парных комбинаций наборов зондов против IL-2 и IFN γ , IL-2 и TNF α , а также IFN γ и TNF α . Один набор зондов в каждой паре был помечен флуорофором Cy5, а другой был помечен флуорофором TMR. В частности, PBMC стимулировали mAb ОКТ3 против CD3 и PHA (оба в концентрации 1 мг/мл) в течение 5 дней, а затем фиксировали 4% параформальдегидом и 70% этанолом. Фиксированные и промытые клетки метили путем инкубирования с Cy5- или TMR-мечеными зондами РНК, специфичными к IL-2 и IFN γ , снова промывали и анализировали с помощью двухцветной FC (LSRII, Becton Dickinson). Результаты показаны на Фиг. 2. Четыре графика на Фиг. 2 относятся к следующему, слева направо: неокрашенный/фиктивно гибридный контроль; одиночный цитокин, IFN γ -Cy5-меченные клетки; одиночный цитокин, IFN γ -TMR-

меченные клетки; и двойной цитокин (IL-2, Су5-меченные и IFN γ , TMR-меченные)-меченные клетки. Гэйтирование демонстрирует популяции клеток, экспрессирующих один или два цитокина, и их частоты.

ПРИМЕР 8. ОБНАРУЖЕНИЕ ЦИТОКИНОВ МРНК В M.TUBERCULOSIS-СПЕЦИФИЧНЫХ КЛЕТКАХ, СТИМУЛИРОВАННЫХ EX VIVO

В данном примере способ по настоящему изобретению применяли для обнаружения M.tuberculosis-специфичных клеток, стимулированных ex vivo. Циркулирующие M.tuberculosis-специфичные клетки обычно присутствуют с низкими частотами у лиц с латентной формой ТВ инфекции (LTBI). Кровь у донора с LTBI получали и стимулировали в течение 5 часов смесью пептидов, полученных из Ag M.tuberculosis ESAT6 и CFP10 (обычно используемых в тесте T-SPOT.TB). PBMC инкубировали в течение 5 ч либо в одной среде, либо со смесью ESAT6- и CFP10-производных пептидов (T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, UK) при концентрации 5 мкг/мл. Фиксированные и промытые клетки инкубировали с Су5-меченными зондами ДНК, комплементарными к РНК, специфичной к GFP, в качестве отрицательного контроля, или к IL-2 и TNF α , а затем анализировали с помощью FC. Частоты продуцентов цитокинов показаны на Фиг. 3, где три верхних графика относятся к PBMC, которые инкубировали в одной среде, а три нижних графика - к PBMC, которые инкубировали в среде, содержащей смесь Ag.

ПРИМЕР 9. ОБНАРУЖЕНИЕ IFN γ В КОСТИМУЛИРОВАННЫХ PBMC ДОНОРА С LTBI

PBMC инкубировали в течение 5 ч со смесью ESAT6- и CFP10-производных пептидов (T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, UK) при концентрации 5 мкг/мл, с или без mAb 53D10 против CD28. Фиксированные и промытые клетки инкубировали с Су5-меченными ДНК зондами, специфичными к мРНК GFP (GFP, отрицательный контроль) (последовательность GFP соответствует pTRED2EGFP (Invitrogen)) или мРНК IFN γ , а затем анализировали с помощью FC. Частоты продуцентов цитокинов показаны на Фиг. 4. На неспецифичное окрашивание GFP контроля костимуляция CD28 не повлияла.

ПРИМЕР 10. ИНДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В АКТИВИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ

Данный пример иллюстрирует применение искусственной стимуляции не Т-клеток, в данном случае макрофагов человека, полученных из периферической крови при адгезии на пластике и культивируемых в течение 2 недель в стандартных условиях (среда RPMI 1640 с добавкой 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотиков).

Коротко, активацию выполняли смесью липополисахарида (LPS) (100 нг/мл) и IFN γ (20 нг/мл) или N-пальмитоил-5'-[2,3-бис(пальмитоилокси)-пропил]-(R)-цистеинил-(лизил) 3-лизина (Pam₃CSK₄) (100 нг/мл) в течение 4 часов или 1 дня. Стимулированные первичные макрофаги снимали с пластика в 0,2-0,3% ЭДТА в PBS, фиксировали и пермеабелизовывали, как описано в примере 7, а затем инкубировали с зондами FISH, специфичными к мРНК IFN γ и TNF α (таблица 3), и анализировали с помощью проточной цитометрии. Как и в примере 8, фиксированные и промытые клетки инкубировали с Су5-меченными зондами ДНК, комплементарными к РНК, специфичной к GFP (таблица 3), и анализировали с помощью FC в качестве отрицательного контроля. Частоты клеток, детектированных зондами с помощью анализа FISH-flow, описанного выше, например, в примере 2, показаны на Фиг. 5, где верхний ряд соответствует результатам с зондами GFP, средний ряд - с зондами IFN γ , и нижний ряд - с зондами TNF α . Первая колонка в каждом ряду относится к стимуляции с использованием LPS и IFN γ в течение 4 часов, вторая - к стимуляции с использованием LPS и IFN γ в течение 1 дня, третья - к

стимуляции с использованием Pam₃CSK₄ в течение 4 часов, и четвертая - к стимуляции с использованием Pam₃CSK₄ в течение 1 дня.

ПРИМЕР 11. КИНЕТИКА ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ И АКТИВАЦИЯ МАРКЕРОВ В АКТИВИРОВАННЫХ Т-КЛЕТКАХ

Данный пример демонстрирует идентификацию временных профилей экспрессии генов цитокинов, хемокинов и рецепторов хемокинов, которые являются маркерами активации Т-клеток, в ответ на стимуляцию РМА (25 нг/мл) и иономицином (350 нг/мл) Т-клеток человека, полученных из периферической крови в градиенте фиколла. Более конкретно, после различных периодов стимуляции (2 часа, 1 день, 3 дня) клетки фиксировали и пермеабелизовывали, как описано в примере 7, а затем инкубировали с зондами FISH, специфичными к указанным мРНК (таблица 3), или с mAb, узнающими их белковые продукты, с последующим анализом методом проточной цитометрии. Частоты клеток, детектированных с помощью анализа FISH-flow, описанного выше, например, в примере 2, представлены на Фиг. 6А, где верхний ряд соответствует результатам без стимуляции, а следующие ряды - результатам после стимуляции в течение 2 часов, 1 дня и 3 дней, соответственно. Первая колонка в каждом ряду содержит результаты, полученные с зондами GFP; вторая колонка - при использовании зондов IL-2; третья колонка - при использовании зондов IFN γ ; четвертая колонка - при использовании зондов TNF α ; пятая колонка - при использовании зондов CCL3; шестая колонка - при использовании зондов CCR7, и последняя колонка - при использовании зондов cFos. Верхний ряд соответствует зондам GFP, средний ряд - зондам IFN γ , и нижний ряд - зондам TNF α . Частоты клеток, обнаруженных при использовании mAb с помощью FC, представлены на Фиг. 6В, где верхний ряд соответствует результатам без стимуляции, а следующие ряды - результатам после стимуляции в течение 2 часов, 1 дня и 3 дней, соответственно. Первая колонка в каждом ряду содержит результаты, полученные для отрицательного контроля - сходного по изотипу (Iso) mAb; вторая колонка - при использовании mAb, узнающего IL-2; третья колонка - при использовании mAb, узнающего IFN γ ; четвертая колонка - при использовании mAb, узнающего TNF α .

ПРИМЕР 12. РАЗДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ АКТИВИРОВАННЫХ, МЕЧЕННЫХ ЗОНДАМИ FISH Т-КЛЕТОК В ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ И НЕ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЦИТОКИНЫ ПОПУЛЯЦИЯХ

Данный пример демонстрирует, что вышеописанный FISH-Flow позволяет выполнять мечение клеток, которые экспрессируют одну или множественные мишени в ответ на стимуляцию, и что такие респондеры могут быть выделены из целой клеточной популяции с целью исследования их профилей экспрессии генов.

Часть I: Разделение на популяции

Т-клетки человека, полученные из периферической крови в градиентах фиколла и глобально стимулированные РМА (25 нг/мл) и иономицином (350 нг/мл), инкубировали в течение 2 часов либо с Су5-мечеными зондами ДНК, комплементарными к РНК, специфичной к GFP, и анализировали с помощью FC как контроль, или со смесью нескольких наборов зондов FISH (таблица 3), реактивных с мРНК IL-2, IFN γ , TNF α и CCL3, причем все зонды одиночно помечены Су5. Частоты клеток, обнаруженных при использовании зондов с помощью анализа FISH-Flow, описанного выше, например, в примере 2, представлены на Фиг. 7А и Фиг. 7В. Результаты, полученные с зондами GFP, показаны на Фиг. 7А. Результаты, полученные со смесью зондов, показаны на Фиг. 7В. После гейтирования популяции лимфоцитов на основе FSC и SSC (левая панель на каждой фигуре), применяли дополнительное консервативное гейтирование, чтобы разделить проанализированные лимфоциты на две различных популяции (правая панель

на каждой фигуре) - цитокин-положительную (обозначенную IFN+) и отрицательную (обозначенную IFN-). Гейтирование, установленное для меченных зондами GFP клеток (Фиг. 7А), определило две популяции: 0,1% IFN+ и 71,2% IFN-, из всех проанализированных лимфоцитов. Популяции, меченные зондами IL-2:IFN γ :TNF α :CCL3 (Фиг. 7В), являлись следующими: 10,2% IFN+ и 33,7% IFN- при таком же гейтировании. Последние, меченные зондами FISH клетки (Фиг. 7В), разделяли на положительные и отрицательные популяции с помощью FACS для выполнения анализа экспрессии генов в выделенных клетках, экспрессирующих и не экспрессирующих цитокины, как описано ниже. Данный подход также успешно применяли в отношении стимулированных Т-клеток, меченных только IFN γ -специфичным зондом FISH, которые различали и сортировали на субпопуляции IFN+ и IFN-.

Часть II: Анализ экспрессии генов цитокинов в Т-клетках, меченных зондами FISH и сортированных на активированные и нереспондерные популяции

Активированные и нереспондерные Т-клетки, полученные и сортированные на отдельные популяции, как описано в части I, анализировали, чтобы продемонстрировать различные профили экспрессии генов, согласующиеся с их реактивностью по отношению к специфичным зондам FISH. Экспрессию мРНК, кодируемых двумя генами, IFN γ и геном "домашнего хозяйства" GAPDH (контроль), выбирали, чтобы проиллюстрировать возможность решения данной задачи. РНК, выделенную из сортированных популяций клеток стандартными методами, подвергали ОТ-ПЦР (обратная транскрипция с последующей амплификацией полученной кДНК с помощью полимеразной цепной реакции) при использовании набора QIAGEN OneStep для ОТ-ПЦР, согласно методике, описанной поставщиком, и при использовании праймеров, специфичных к одному из этих двух генов. Последовательности праймеров для реакций амплификации являлись следующими:

прямой праймер IFN γ : 5' GAGCATCCAAAAGAGTGTGGAG (SEQ ID NO: 36),
 обратный праймер IFN γ : 5' TTCATGTATTGCTTTGCGTTGG (SEQ ID NO: 37),
 прямой праймер GAPDH: 5' CCAATATGATTCCACCCATGGC (SEQ ID NO: 38),
 обратный праймер GAPDH: 5' TCCTGGAAGATGGTGATGGGAT (SEQ ID NO: 39).

После инкубирования при комнатной температуре и первичной денатурации в течение 15 мин при 94°C использовали следующие тепловые циклы: 0,5 мин при 94°C, 0,5 мин при 55°C, 1 мин при 72°C. Выполняли сорок циклов. Обнаружение амплифицированных продуктов осуществляли при использовании красителя SYBR Green. Пороговые циклы реакций амплификации показаны на Фиг. 8А. Для подтверждения результатов амплификации и исключения возможности артефактов, размер идентифицированных ампликонов проверяли при использовании IFN γ - и GAPDH-специфичных праймеров с помощью гель-электрофореза. Результаты показаны на Фиг. 8В.

Таблица 3

Последовательности зондов

SEQ ID NO		SEQ ID NO	
	Зонды IFN γ		
40	atcagaacaatgtgctgcac	64	tctaatactgctgatcttcaga
41	ccaaaggacttaactgatct	65	tcttgatcaagctgatcag
42	gccaaagaagttgaaatcag	66	tcacgcttccgagagaatt
43	gagctgaaaagccaagatat	67	caagagaacccaaaacgatg
44	tatgggtcctggcagtaaca	68	aagggtttctgcttctttta
45	gacctgcattaaaatatttc	69	ccattatccgctacatctga
46	caaaatgcctaagaaaagag	70	cactctcctctttccaattc
47	tggtctctgcattatcttct	71	gtttgaagtaaaaggagaca
48	gctctggctcatctttaaagt	72	atgggtctccacactcttttg
49	cttgacattcatgtcttcct	73	ctcggttctttttgttgcta
50	ttagtcagcttttcgaagtc	74	gacattcaagtcagttaccg
51	gttcatgtattgctttgcgt	75	agttcagccatcacttggat
52	ttcgcttccctgttttagct	76	cgaaacagcatctgactcct
53	attactgggatgctcttcga	77	caaataattgcaggcaggaca
54	ccccatataaataatgttaa	78	cttatttgattgatgagtct
55	cattacacaaaagttgctat	79	gacagtcacaggatatagga
56	cagaaaacaaaggattaagt	80	cacatagccttgccctaatta
57	ccctgagataaagccttgta	81	ttaggttggtgcctagttg
58	aaacacacaacccatgggat	82	gttcattgtatcatcaagtg
59	ctggatagtatcacttcact	83	catattttcaaaccggcagt
60	aagcactggctcagattgca	84	agttctgtctgacatgccat
61	tcagggtcacctgacacatt	85	ctcctgagatgctatgtttt

	62	ttggaagcaccagggcatgaa	86	cagtcacagttgtcaacaat
	63	tgagttactttccatttggg	87	gtgaacttacactttattca
5		Зонды IL-2		
	88	tagcccacacttaggtgata	112	gtgaaatccctctttgttac
	89	agactgactgaatggatgta	113	ggaatttctttaaaccccca
	90	ttcctcttctgatgactctt	114	gaaaaaacattaccttcatt
10	91	tttcaaagactttacctgtc	115	tgttttacatattacacata
	92	aatattatgggggtgtcaaa	116	ttatactgttaattctggaa
	93	ctcttgaacaagagatgcaa	117	attaaagagagtgataggga
	94	ttgaggttactgtgagtagt	118	tcctgtacattgtggcagga
	95	caatgcaagacaggagttgc	119	tgacaagtgcaagacttagt
15	96	ttgaagtaggtgcactgttt	120	gctgtgttttctttgtagaa
	97	gcagtaaatagtccagttgt	121	tcaaaatcatctgtaaatcc
	98	tcttgtaattattaattcca	122	gcacctcgttgagtttggga
	99	gcatgtaaaacttaaatgtg	123	tcagttctgtggccttcttg
	100	cttctagacactgaagatgt	124	cctccagaggtttgagttct
20	101	tttgagctaaatttagcact	125	gtcttaagtgaagtttttg
	102	tattgctgattaagtccctg	126	gttcagaactattacgttg
	103	atgttgtttcagatcccttt	127	catcagcatattcacacatg
	104	attctacaatggttgctgtc	128	aggtaatccatctgttcaga
25	105	gttgagatgatgctttgaca	129	gcacttaattatcaagtcag
	106	ctgatatgttttaagtggga	130	atattttaaataaatagaagg
	107	caacaataaatataaaattt	131	ataggtagcaaaccatacat
	108	agattaagaataatagttac	132	agatccatatttatagtttt
	109	gggcttacaaaaagaatcat	133	gaaaccatttttagagcccct
30	110	aatattttgggataaataag	134	ctatatttaacattcaacat
	111	actaaccaatctacatagat	135	tcaaattttattaaatagttt
		Зонды TNFα		
35	136	tcctctgctgtccttgctga	160	agttgcttctctccctctta
	137	tctgaggggtgttttcaggg	161	atgtgagaggaagagaacct
	138	tgtcctttccaggggagaga	162	gatcatgctttcagtgtca
	139	aagaggctgaggaacaagca	163	aaagtgcagcaggcagaaga
40	140	tgattagagagaggtccctg	164	agaagatgatctgactgcct
	141	tgggctacaggcttgctact	165	agcttgaggggttgctacaa
	142	tggttatctctcagctccac	166	tgaggtagagggcctctgat
	143	ttgaagaggacctgggagta	167	ttgaccttggtctggttagga
	144	gctcttgatggcagagagga	168	agatagatgggctcatacca
45	145	acccttctccagctggaaga	169	attgatctcagcgctgagtc
	146	tcggcaaagtcgagatagtc	170	atgatcccaaagtagacctg
	147	tttggggaagggttgatgttc	171	taataaagggattggggcgag

148	agaggttgaggggtgtctgaa	172	cccaattctcttttttgagcc
149	ttctaagcttgggttccgac	173	gtggtggtcttgttgcttaa
150	attcctgaatcccaggtttc	174	tagtggttgccagcacttca
151	tggaggccccagtttgaatt	175	aaagctgtaggccccagtga
152	tctccagattccagatgtca	176	attctggccagaaccaaagg
153	taggtgaggtcttctcaagt	177	ctaaggtccacttgtgtcaa
154	aaacatctggagagaggaag	178	tccgtgtctcaaggaagtct
155	ataaatagaggagctggct	179	ccggtctcccaaataaatac
156	acattgggtccccaggata	180	aaaacatgtctgagccaagg
157	ttgttcagctccgttttcac	181	atcaaaagaaggcacagagg
158	ggtcaccaaatacagcattgt	182	aggctcagcaatgagtga
159	attacagacacaactcccct	183	ttctcgccactgaatagtag
	Зонды ACSL1		
184	tgcaatgtgatgcctttgac	208	gaaggccattgtcgatagaa
185	ttcgccttcattgttgaggt	209	tgaaatagttccgcagctct
186	tagaggtcatctatctgcga	210	acactaaaccttgatagtgg
187	ccatttcctctgagctttct	211	gagaagagattgtggaactg
188	aacaacatgaaggccatcag	212	ccctacacttgcgtgtattca
189	aagtcaaacacgaacgcttc	213	tatgagaagaaccccgaatg
190	gtgttctctttcctctagca	214	aacatgaggtgactgtaagg
191	ggctcatttttgaaagtgtg	215	gcacatttatagtatcccct
192	ctgaggaagtctcaaataac	216	gaaacagggagacagaagat
193	caaagtcctaacccttgat	217	gtagcagacatctcagagat
194	agacagctgcagaatttgca	218	gcactgtactcttttagagca
195	aaagggaacacttccctcta	219	gccaggacagttgttcttat
196	tgggtccgcttgtgagattct	220	ggacagtagcagggatttaa
197	ttctgtgaatgcctgtgaga	221	cgtaacccttacgaatcaga
198	gactggagaagaacatgagt	222	atgctccaacagaaaccaca
199	atggttctgagttggatctg	223	atttgccagaggctccttat
200	aatccacgcgttctgatgag	224	agagcattctgccatgaaag
201	aaccctgaaaaaggatgga	225	cactatagaatctaaggcag
202	ctgatccaggtaactctttc	226	acagttattcaggcgtcaca
203	gtgagtggttcagtgaagat	227	ggcaagttaatcccaacatg
204	gaaatgcttgctgagagtt	228	gtactcaagtatatactccc
205	ccaggaaatgaactttccag	229	caaagtgtggcaaagactcac
206	ccccaaaacagctgctttaa	230	gccctgttgtgcttgtatat
207	gttaggctaccaagtagtgt	231	caaaacccaagggtgacaaa
	Зонды CCL3		
232	ctgctgcccgtgtcctt	252	agaaaggactgaccact
233	ctcgagtgtcagcagag	253	gagcaggtgacggaatg

234	agtggagacctgcatga	254	gaggacagcaagggcag
235	gagagccatggtgcaga	255	tgcagagaactggttgc
236	cgtgtcagcagcaagtg	256	gtagctgaagcagcagg
237	gtggaatctgccgggag	257	agtcagctatgaaattc
238	ggctgctcgtctcaaag	258	caccgggcttggagcac
239	gcttggtttaggaagatg	259	cacagacctgccggctt
240	cactcctcactggggctc	260	cgctgacataatttctgg
241	ctcaggcactcagctcc	261	ctcgaagcttctggacc
242	ccaccgaggtcgctggg	262	tcaggctcctgctcctc
243	acacgcatgttcccaag	263	aagaggtagctgtggag
244	gcaacaaccagtcacata	264	ccacagtgtggctgttt
245	tttaagttaagaagagt	265	agtataaataaattaaa
246	aaattacaaaaactaaa	266	acacactgtgaaatcga
247	cagagcaaacaatcaca	267	aggggacaggggaactc
248	gttgtcaccagacgcgg	268	gctgatgacagccactc
249	gccatgactgcctacac	269	tcagtctggtggctttg
250	gcatccgatacacattt	270	tcacagccctgaacaaa
251	attatttcccagggcgg	271	acctttttaaagagcat
	Зонды CCR7		
272	cggtaaaaccacacagga	296	cagggtccatgacgctctc
273	cagcacgcttttctattgg	297	aatgacaaggagagccac
274	ttgacacaggcatacctg	298	tgtaatcgctccgtgacct
275	ccactgtggtgttgtctc	299	aagactcgaacaaagtgt
276	cgcacgtccttcttggag	300	ggaggaaccaggctttaa
277	acaaatgatggagtacat	301	attgcccagtaggcccac
278	ataggtcaacacgaccag	302	tggtcttgagcctcttga
279	ttgagcaggtaggtatcg	303	tgtaggcccagaagggaa
280	cgaagacccaggacttgg	304	tgagcttgcaaaagtgga
281	gctcatcttgtagatggc	305	taggagcatgccactgaa
282	gtcaatgctgatgcaaag	306	ctggacgatggccacgta
283	ggacagcttgctgatgag	307	gcactgtggctagtatcc
284	tacaggagctctgggatg	308	ctgctcctctggagggtca
285	agagcatcgcacgcttg	309	ctccacatgctctgtgat
286	ccacctggatggtgataa	310	cagaaagccgatcaccat
287	gaagctcatggccagcag	311	gcggatgatgacaaggta
288	ctcaaagttagctgcttg	312	atcaccttgatggccttg
289	atgaagaccacgaccaca	313	attgtagggcagctggaa
290	cgtctggggccaggaccac	314	gctactggtgatgttgaa
291	ttgcttactgagctcaca	315	gacgtcgtaggcgatggt
292	gacgcaggccaggctgta	316	gaaaggggttgacgcagca
293	gacgccgatgaaggcgta	317	gaagagatcgttgcggaa

5	294	gccaggtccttgaagag	318	gagctgctcctggctgag
	295	gatgtgccgacaggaaga	319	ctccacactcatggagga
		Зонды cFos		
	320	tctgcaaagcagactttctca	344	tctgcaaagcagactttctca
10	321	ttcagcaggttggcaatctc	345	actctagtttttcttctcc
	322	tcggtgagctgccaggatga	346	aggatcatcagggatcttgca
	323	agacatctcttctgggaagc	347	agtcagatcaagggaagcca
	324	tgaaggcctcctcagactcc	348	agggtcattgaggagaggca
	325	acaggttccactgagggctt	349	tccatgctgctgatgctctt
15	326	atcaaagggtcgggtcttca	350	tgatgctgggaacaggaagt
	327	tcagagccactgggcctgga	351	tcagagccactgggcctgga
	328	tgctgcatagaaggacccag	352	actgtgcagaggctcccagt
	329	tctgtggccatgggccccat	353	tacaggtgaccaccggagtg
	330	tgtaagcagtgacagctggga	354	taggtgaagacgaaggaaga
20	331	acagctggggaaggagtcag	355	tcattgctgctgctgccctt
	332	agctgagcgagtcagaggaa	356	agtggcacttggtgggtgccg
	333	tgtaatgcaccagctcgggc	357	gaagatgtgtttctcctctc
	334	gtctacaggaaccctctagg	358	acagataaggctcctccctag
	335	acagcctgggtgtgtttcacg	359	ctttcaagtccttgaggccc
25	336	cttgagtccacacatggatg	360	atctccggaagaggtaagga
	337	cactccatgcgttttgctac	361	gtgtcactgggaacaataca
	338	ctaactaccagctctctgaa	362	aggcctgggtcaacatgcta
	339	agagaaaagagacacagacc	363	tatgagaagactaaggaga
	340	cccaatagattagttaatgc	364	ccaggttaattccaataatg
30	341	caatttgaaaatatccagca	365	gttaaaatcagctgcactag
	342	ccaggaacacagtagttatt	366	ctaatacagaacacactattg
	343	cttagtataatatattggatc	367	ccagaaaataaagtcgtatc
		Зонды GFP		
35	368	tcgcccttgctcaccat	392	accccggtgaacagctc
	369	tcgaccaggatgggcac	393	ttacgtcgccgtccagc
	370	gctgaacttggtggcgt	394	tcgccctcgccggacac
	371	cgtaggtggcatcgccc	395	cttcagggtcagcttgct
	372	ccggtggtgcagatgaa	396	agggcacgggcagcttg
40	373	agggtggtcacgagggt	397	actgcacgccgtaggctc
	374	tcggggtagcggctgaa	398	cgtgctgcttcatgtgg
	375	ggcggacttgaagaagt	399	acgtagccttcgggcat
	376	agatggtgcgctcctgg	400	gccgtcgctccttgaaga
	377	gcgcgggtccttgtagtt	401	cctcgaacttcacctcg
45	378	gttcaccagggtgtcgc	402	cccttcagctcgatgcg
	379	cctccttgaagtcgatg	403	ccccaggatggtgccgt

380	ttgtactccagcttgtg	404	cgttgtggctgtttag
381	gtcggccatgatataga	405	atgccgttcttctgctt
382	tcttgaagttcaccttg	406	ctcgatgttgtggcgga
383	agctgcacgctgccgtc	407	tgctggtagtggtcggc
384	tcgccgatgggggtgtt	408	ttgtcgggcagcagcac
385	gggtgctcaggtagtgg	409	tttgctcagggcggaact
386	cgcttctcgttggggtc	410	gcaggaccatgtgatcg
387	ggcggtcacgaactcca	411	atgccgagagtgatccc
388	tcttgtacagctcgtec	412	gaagccatggctaagct
389	tcctgctcctccacctc	413	tgggcagcgtgccatca
390	ctcctgggcacaagaca	414	tgacgggtccatcccgt
391	agaagcacaggctgcag	415	tacacattgatcctagc
	Зонды ВИЧ Gag PHK		
416	ttaatactgacgctctcgca	440	catttatctaactctcccc
417	ccctgggtcttaaccgaattt	441	ctgcttgccatactatatg
418	aactgcgaatcggtctagct	442	atgtttctaacaggccagga
419	ccagtatttgtctacagcct	443	tgtctgaagggtggttgta
420	gaggggtggctactgtattat	444	ctatcctttgatgcacacaa
421	gcttccttgggtgtcttttac	445	gctcttcctctatcttctct
422	gctgtgcctttttcttactt	446	tttttcctgtgtcagctgct
423	gtaattttggctgacctggt	447	cctggatgttctgcactata
424	atggcctgatgtaccatttg	448	ctgaaagccttctcttctac
425	gctccttctgataatgctga	449	gggtgtttaaactcttggtggg
426	tttgcatggctgcttgatgt	450	cttcctcattgatgggtctct
427	tgcaatctatcccattctgc	451	tcatctggcctgggtgcaata
428	tatgtcacttccccttggtt	452	gaagggtactagtagttcct
429	gtcatccatcctatttgctc	453	ctactgggataggtggatta
430	cccaggattatccatctttt	454	gtagggtctatacatccttac
431	gtccttgtcttatgtccaga	455	catagtctctaaagggttcc
432	agagttttatagaaccggtc	456	tttacctcctgtgaagcttg
433	caacaagggtttctgtcatcc	457	aatctgggttcgcatttttg
434	gctgggtcccaatgcttttaa	458	ggcatgctgtcatcatttct
435	aaactcttgctttatggccg	459	tacttggctcattgcttcag
436	ctgcatcattatggtagctg	460	cccttctttgccacaattga
437	ggctctgcaatttttggtta	461	tccaacagcccttttctcta
438	tttggtgtccttcctttcca	462	cctgtctctcagtacaatct
439	gggccagattttccctaaaa	463	aagaaaattccctggccttc

Предшествующие примеры и описание предпочтительных вариантов осуществления следует рассматривать как иллюстрацию, а не как ограничение объема настоящего изобретения, определяемого в соответствии с формулой изобретения. Как будет с легкостью оценено, многочисленные изменения и комбинации признаков, изложенных

выше, могут использоваться без отступления от настоящего изобретения, изложенного в формуле изобретения. Такие изменения не следует рассматривать как отступление от объема изобретения, и все такие изменения должны быть включены в объем следующей формулы изобретения. Все ссылки, цитируемые в настоящем описании, включены в настоящую заявку в полном объеме.

(57) Формула изобретения

1. Способ анализа активации Т-клеток путем детекции копий по меньшей мере одной молекулы РНК, экспрессируемой в отдельных Т-клетках, включающий:

(а) предоставление образца, содержащего популяцию клеток, содержащую Т-клетки;
(б) индукцию экспрессии генов в Т-клетках *ex vivo*, либо сразу, либо после культивирования, при инкубировании клеток по меньшей мере с одним соединением, которое связывается специфическими рецепторами и инициирует экспрессию генов;

(с) фиксацию и пермеабиллизацию клеток;

(d) мечение копий по меньшей мере одной молекулы РНК, экспрессируемой Т-клетками, с помощью набора флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов гибридизации, которые имеют комплементарные последовательности к молекулам РНК, и удаление не связавшихся зондов при промывке; и

(е) детекцию клеток с событиями экспрессии с помощью проточной цитометрии (FC), где событие экспрессии является одним или более измерениями флуоресценции, которые группируют с помощью гейтирования интенсивности флуоресценции.

2. Способ по п.1, где стадия индукции включает стимуляцию сигнализации Т-клеточных рецепторов (TCR) и последующей экспрессии генов с помощью антигенпрезентирующих клеток (APC), которые присутствуют в популяции клеток, или с помощью искусственных APC (aAPC).

3. Способ по п.2, где стимуляция с помощью APC или aAPC индукции происходит в течение периода, выбранного из группы, состоящей из: от 30 минут до 6 часов, от 6 до 24 часов и от 24 до 72 часов.

4. Способ по п.2, где стадия индукции включает костимуляцию с использованием по меньшей мере одного моноклонального антитела (mAb).

5. Способ по п.2, где стадия индукции включает костимуляцию с использованием по меньшей мере одного моноклонального антитела (mAb), которое связывается с aAPC.

6. Способ по п.1, где соединение получено из микроорганизма.

7. Способ по п.1, где соединение включает пептид или смесь пептидов.

8. Способ по п.2, где пептид или смесь пептидов, которые связываются с молекулами МНС класса I или МНС класса II, добавляют к APC или aAPC.

9. Способ по п.8, где пептид или смесь пептидов присутствует в концентрации от 1 до 20 мкг/мл.

10. Способ по п.1, где по меньшей мере одна молекула РНК кодируется геном цитокина.

11. Способ по п.10, где ген кодирует IL-2, TNF α или IFN γ .

12. Способ по п.1, где стимулирующие молекулы являются иммуногенными пептидами, полученными из *M. tuberculosis*.

13. Способ по п.1, где набор зондов включает от 20 до 60 зондов, каждый из которых однократно помечен одной и той же флуоресцентной молекулой.

14. Способ по п.1, где популяция клеток представляет собой Т-клетки, полученные из РВМС человека, по меньшей мере одна молекула РНК кодируется геном цитокина, клетки в популяции клеток индуцируются aAPC с одной или более нагруженными

пептидами молекулами МНС, которые взаимодействуют с TCR, и набор зондов включает от 20 до 60 зондов, каждый из которых однократно помечен одной и той же флуоресцентной молекулой.

15. Способ по п.1, где по меньшей мере одну детектированную клетку с событием экспрессии отделяют от клеток, не имеющих событий экспрессии, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток.

16. Способ по п.15, где экспрессию генов измеряют в отделенных клетках.

17. Способ по п.16, где измерение экспрессии генов проводят с помощью ОТ-ПЦР или транскриптомного анализа РНК в клетках.

18. Способ по п.1, где стадия индукции включает стимуляцию сигнализации toll-подобных рецепторов и последующей экспрессии генов с помощью микробного продукта или синтетического соединения, где микробный продукт является липидом, гликаном, гликолипидом, сульфолипидом, гликопротеином, белком, пептидом или нуклеиновой кислотой и где стимул присутствует в концентрации в пределах от 1 до 100 нг/мл, от 100 до 1000 нг/мл или от 1 до 20 мкг/мл.

19. Способ по п.18, где стимуляцию проводят в течение периода, выбранного из группы, состоящей из: от 30 минут до 6 часов, от 6 до 24 часов и от 24 до 72 часов.

20. Способ по п.1, где соединение является цитокином.

21. Способ по п.20, где цитокин является цитокином, выбранным из группы, состоящей из IFN γ , IL-2, IL-15 и TNF α .

22. Способ по п.1 или 18, в котором присутствует больше одного соединения.

23. Способ по п.22, где различные соединения подают в разное время.

24. Способ по п.1, где рецепторы выбраны из группы, состоящей из toll-подобных рецепторов, NOD и NOD-подобных рецепторов, сопряженных с G-белком рецепторов, рецепторов полипептидных гормонов, рецепторов цитокинов, В-клеточных рецепторов и Т-клеточных рецепторов.

25. Способ по п.1, где популяция включает клетки, выбранные из группы, состоящей из PBMC, лимфоцитов, CD3⁺CD4⁺ Т-клеток (Т-хэлперов 1 или Th1 клеток), CD3⁺CD4⁺ Т-клеток (Т-хэлперов 2 или Th2 клеток), CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, Th17, Treg клеток, НК-клеток, НКТ-клеток, макрофагов, дендритных клеток, клеток, формирующих эндотелий и эпителий различных органов тела, и клеток нервной системы.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Bushkin, Yuri
 Gennaro, Maria
 Tyagi, Sanjay
 Pine, Richard

<120> ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗЫ АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК, ОСНОВАННЫЕ НА ИЗМЕРЕНИИ РНК
 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

<130> 096747.00231/PN 12-06

<140> TBA
 <141> 2013-06-26

<150> US 61/665231
 <151> 2012-06-27

<150> US 61/784802
 <151> 2013-03-14

<160> 463

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu
 1 5 10

<210> 2
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Leu Val Ala Asn Asn Thr Arg Leu
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Leu Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala
 1 5

<210> 4
 <211> 15
 <212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Val Glu Tyr Leu Gln Tyr Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 5

Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 6

Pro Gln Gln Phe Ile Tyr Ala Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Asp
1 5 10 15

<210> 7

<211> 8

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Leu Gly Ile Ser Leu Thr Val
1 5

<210> 8

<211> 10

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 8

Phe Leu Ala Cys Phe Thr Leu Ile Ala Ala
1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Ala
1 5

<210> 10
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Gly Arg Leu Arg Gly Leu Phe Thr Asn Pro Gly Ser Trp Arg
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Val Gly Phe Leu Ala Cys Phe Thr Leu Ile Ala Ala Ile Gly Ala
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Leu Asp Thr Val Val Leu Leu Gly Ala Leu Ala Asn Glu His Ser
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Leu Leu His His Ala Pro Ser Leu
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Leu Trp Lys Asp Gly Ala Pro Leu
 1 5

<210> 15
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Lys Ala Ala Gly Arg Pro Asp Leu Arg Val
1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 16

Lys Leu Leu Asp Asn His Ile Leu Ala
1 5

<210> 17

<211> 9

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 17

Phe Val Leu Met Ala Ala Trp Leu Ala
1 5

<210> 18

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Asp Pro Tyr Gln Ala Phe Val Leu Met Ala Ala Trp Leu Ala
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Met Arg Ala His Ser Tyr Ser Leu Leu Arg Ala Ile Met Gln
1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Ala His Tyr Arg Lys Leu Leu Asp Asn His Ile Leu Ala Thr
1 5 10 15

5

<210> 21
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Val Leu Met Gly Gly Val Pro Gly Val Glu
 1 5 10

<210> 22
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Leu Leu Asp Ser Gly Thr Thr Ser Ile
 1 5

<210> 23
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Arg Val Glu Ala Gly Glu Glu Leu Gly Val
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Leu Ile Glu Ser Gly Val Leu Ile Pro Ala
 1 5 10

<210> 25
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val
 1 5

<210> 26
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Ile Gly Ile Arg Glu Leu Arg Gln His Ala Ser Arg Tyr Leu
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Leu Val Ala Arg Leu Ile Pro Val Gln Ala Ala Glu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 28

Lys Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Asn Glu Met Arg Asp Glu Gln
1 5 10 15

<210> 29

<211> 11

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Arg Gln Ala Gly Val Gln Tyr Ser Arg
1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala
1 5

7

<210> 32
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val
 1 5

<210> 33
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu
 1 5

<210> 34
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Ser Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 36
 gagcatccaa aagagtgtgg ag
 22

<210> 37
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 37
ttcatgtatt gctttgcgtt gg
22

<210> 38
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 38
ccaatatgat tccaccatg gc
22

<210> 39
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 39
tcctggaaga tggatgatgg at
22

<210> 40
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 40
atcagaacaa tgtgctgcac
20

<210> 41
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 41
ccaaaggact taactgatct
20

<210> 42
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 42
gccaagaag ttgaaatcag
20

<210> 43
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 43
gagctgaaaa gccaagatat
20

<210> 44
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 44
tatgggtcct ggcagtaaca
20

<210> 45
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 45
gacctgcatt aaaatatattc
20

<210> 46
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 46

10

caaaatgcct aagaaaagag
20

<210> 47
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 47
tggctctgca ttatttttct
20

<210> 48
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 48
gctctggtca tctttaaagt
20

<210> 49
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 49
cttgacattc atgtcttcct
20

<210> 50
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 50
ttagtcagct ttctgaagtc
20

<210> 51
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

11

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 51
gttcacgtat tgctttgcgt
20

<210> 52
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 52
ttcgcttccc tggttttagct
20

<210> 53
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 53
attactggga tgctcttcga
20

<210> 54
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 54
ccccatataa ataatgttaa
20

<210> 55
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 55
cattacacaa aagttgctat
20

<210> 56

<211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 56
 сагаааасаа аггаттаагт
 20

<210> 57
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 57
 ссctgagata aagccttgta
 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 58
 ааасасасаа сссатггггт
 20

<210> 59
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 59
 ctggatagta tcacttcact
 20

<210> 60
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 60
 ааgсactggc tcagattgca

20

<210> 61
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 61
tcagggtcac ctgacacatt
20

<210> 62
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 62
ttggaagcac caggcatgaa
20

<210> 63
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 63
tgagttactt tccatttggg
20

<210> 64
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 64
tctaatagct gatcttcaga
20

<210> 65
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 65
tcttgatca agctgatcag
20

<210> 66
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 66
tcacggttc cgaagaatt
20

<210> 67
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 67
caagagaacc caaacgatg
20

<210> 68
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 68
aagggtttct gcttctttta
20

<210> 69
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 69
ccattatccg ctacatctga
20

<210> 70
<211> 20

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 70
cactctctctc ttccaattc
20

<210> 71
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 71
gtttgaagta aaagagaca
20

<210> 72
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 72
atggtctcca cactcttttg
20

<210> 73
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 73
ctcgtttctt ttgttgcta
20

<210> 74
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 74
gacattcaag tcagttaccg
20

<210> 75
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 75
agttcagcca tcacttggat
20

<210> 76
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 76
cgaaacagca tctgactcct
20

<210> 77
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 77
caaatattgc aggcaggaca
20

<210> 78
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 78
cttatttgat tgatgagtct
20

<210> 79
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 79
gacagtcaca ggatatagga
20

<210> 80
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 80
cacatagcct tgcctaatta
20

<210> 81
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 81
ttaggttggc tgcctagttg
20

<210> 82
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 82
gttcattgta tcatcaagtg
20

<210> 83
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 83
catattttca aaccggcagt
20

<210> 84
<211> 20
<212> ДНК

18

<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 84
agttctgtct gacatgccat
20

<210> 85
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 85
ctcctgagat gctatgtttt
20

<210> 86
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 86
cagtcacagt tgtcaacaat
20

<210> 87
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 87
gtgaacttac actttattca
20

<210> 88
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 88
tagccacac ttaggtgata
20

<210> 89
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 89
agactgactg aatggatgta
20

<210> 90
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 90
ttcctcttct gatgactctt
20

<210> 91
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 91
tttcaaagac ttacctgtc
20

<210> 92
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 92
aatattatgg ggggtgcaaa
20

<210> 93
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

20

<400> 93
ctcttgaaca agagatgcaa
20

<210> 94
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 94
ttgaggttac tgtgagtagt
20

<210> 95
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 95
caatgcaaga caggagttagc
20

<210> 96
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 96
ttgaagtagg tgcactgttt
20

<210> 97
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 97
gcagtaaatg ctccagttgt
20

<210> 98
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 98
tcttgtaatt attaattcca
20

<210> 99
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 99
gcatgtaaaa cttaaatgtg
20

<210> 100
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 100
cttctagaca ctgaagatgt
20

<210> 101
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 101
tttgagctaa atttagcact
20

<210> 102
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 102
tattgctgat taagtcctg
20

<210> 103
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 103
atgttggttc agatcccttt
20

<210> 104
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 104
attctacaat gggtgctgtc
20

<210> 105
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 105
gttgagatga tgctttgaca
20

<210> 106
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 106
ctgatatggt ttaagtggga
20

<210> 107
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 107

caacaataaa tataaaattt
20

<210> 108
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 108
agattaagaa taatagttac
20

<210> 109
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 109
gggcttaca aaagaatcat
20

<210> 110
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 110
aatattttgg gataaataag
20

<210> 111
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 111
actaaccsaat ctacatagat
20

<210> 112
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 112
 gtgaaatccc tctttgttac
 20

<210> 113
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 113
 ggaatttctt taaaccccc
 20

<210> 114
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 114
 gaaaaaacat taccttcatt
 20

<210> 115
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 115
 tgttttacat attacacata
 20

<210> 116
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 116
 ttatactggt aattctggaa
 20

<210> 117

<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 117
attaaagaga gtgataggga
20

<210> 118
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 118
tcctgtacat tgtggcagga
20

<210> 119
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 119
tgacaagtgc aagacttagt
20

<210> 120
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 120
gctgtgtttt cttttagaа
20

<210> 121
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 121
tcaaaatcat ctgtaaатcc

20

<210> 122
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 122
gcatcctggt gagtttggga
20

<210> 123
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 123
tcagttctgt ggccttcttg
20

<210> 124
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 124
cctccagagg tttgagttct
20

<210> 125
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 125
gtcttaagtg aaagtttttg
20

<210> 126
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 126
gttccagaac tattacgttg
20

<210> 127
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 127
catcagcata ttcacacatg
20

<210> 128
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 128
aggtaatcca tctgttcaga
20

<210> 129
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 129
gcacttaatt atcaagtcag
20

<210> 130
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 130
atattttaaat aaatagaagg
20

<210> 131
<211> 20

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 131
ataggtagca aaccatacat
20

<210> 132
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 132
agatccatat ttatagtttt
20

<210> 133
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 133
gaaaccattt tagagccct
20

<210> 134
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 134
ctatatattaa cattcaacat
20

<210> 135
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 135
tcaaatttat taaatagttt
20

<210> 136
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 136
tcctctgctg tccttgctga
20

<210> 137
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 137
tctgagggtt gttttcaggg
20

<210> 138
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 138
tgtcctttcc aggggagaga
20

<210> 139
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 139
aagaggctga ggaacaagca
20

<210> 140
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 140
tgattagaga gaggtccctg
20

<210> 141
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 141
tgggctacag gcttgctcact
20

<210> 142
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 142
tgggttatctc tcagctccac
20

<210> 143
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 143
ttgaagagga cctgggagta
20

<210> 144
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 144
gctcttgatg gcagagagga
20

<210> 145
<211> 20
<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 145
acccttctcc agctggaaga
20

<210> 146
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 146
tcggcaaagt cgagatagtc
20

<210> 147
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 147
tttgggaagg ttggatgttc
20

<210> 148
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 148
agaggttgag ggtgtctgaa
20

<210> 149
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 149
ttctaagctt gggttccgac
20

<210> 150
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 150
attcctgaat cccaggtttc
20

<210> 151
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 151
tggaggcccc agtttgaatt
20

<210> 152
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 152
tctccagatt ccagatgtca
20

<210> 153
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 153
taggtgaggt cttctcaagt
20

<210> 154
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 154
aaacatctgg agagaggaag
20

<210> 155
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 155
ataaataagag ggagctggct
20

<210> 156
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 156
acattgggtc cccagcata
20

<210> 157
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 157
ttgttcagct ccgttttcac
20

<210> 158
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 158
ggtcacaaaa tcagcattgt
20

<210> 159
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 159
attacagaca caactccct
20

<210> 160
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 160
agttgcttct ctccctctta
20

<210> 161
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 161
atgtgagagg aagagaacct
20

<210> 162
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 162
gatcatgctt tcagtgtca
20

<210> 163
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 163
aaagtgcagc aggcagaaga
20

<210> 164
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 164
agaagatgat ctgactgcct
20

<210> 165
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 165
agcttgaggg ttgctaca
20

<210> 166
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 166
tgaggtacag gccctctgat
20

<210> 167
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 167
ttgaccttgg tctggttagga
20

<210> 168
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 168

agatagatgg gctcatacca
20

<210> 169
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 169
attgatctca gcgctgagtc
20

<210> 170
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 170
atgatcccaa agtagacctg
20

<210> 171
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 171
taataaaggg attggggcag
20

<210> 172
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 172
cccaattctc tttttgagcc
20

<210> 173
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 173
gtgggtggtct tgttgcttaa
20

<210> 174
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 174
tagtggttgc cagcacttca
20

<210> 175
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 175
aaagctgtag gccccagtga
20

<210> 176
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 176
attctggcca gaassaaagg
20

<210> 177
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 177
ctaaggtcca cttgtgtcaa
20

<210> 178

<211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 178
 tccgtgtctc aaggaagtct
 20

<210> 179
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 179
 ccggtctccc aaataaatc
 20

<210> 180
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 180
 aaaacatgtc tgagccaagg
 20

<210> 181
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 181
 atcaaaaaga ggcacagagg
 20

<210> 182
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Синтетическая последовательность

<400> 182
 aggctcagca atgagtgaca

20

<210> 183
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 183
ttctcgccac tgaatagtag
20

<210> 184
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 184
tgcaatgtga tgcctttgac
20

<210> 185
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 185
ttcgccttca ttgttgagat
20

<210> 186
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 186
tagaggtcat ctatctgcga
20

<210> 187
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 187
ccatttcctc tgagctttct
20

<210> 188
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 188
aacaacatga aggccatcag
20

<210> 189
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 189
aagtcaaaca cgaacgcttc
20

<210> 190
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 190
gtgttctctt tcctctagca
20

<210> 191
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 191
ggctcatctt ggaaagtgtg
20

<210> 192
<211> 20

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 192
ctgaggaagt ctcaataac
20

<210> 193
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 193
caaagtccta accccttgat
20

<210> 194
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 194
agacagctgc agaatttgca
20

<210> 195
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 195
aaagggaaca cttccctcta
20

<210> 196
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 196
tggtccgctt gtgagattct
20

<210> 197
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 197
ttctgtgaat gcctgtgaga
20

<210> 198
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 198
gactggagaa gaacatgagt
20

<210> 199
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 199
atgggttctga gttggatctg
20

<210> 200
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 200
aatccacgcg ttctgatgag
20

<210> 201
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 201
aaccctgaa aaaggatgga
20

<210> 202
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 202
ctgatccagg taactcttgc
20

<210> 203
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 203
gtgagtgggt cagtgaagat
20

<210> 204
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 204
gaaatgcttg cctgagagtt
20

<210> 205
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 205
ccaggaaatg aactttccag
20

<210> 206
<211> 20
<212> ДНК

<213> Искусственная
<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 206
ссссaaaаса gctgctttaa
20

<210> 207
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 207
gttaggctac caagtagtgt
20

<210> 208
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 208
gaaggscatt gtcgataгаа
20

<210> 209
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 209
tgaaatagtt ccgcagctct
20

<210> 210
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 210
асастааасс ttgatagtgg
20

<210> 211
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 211
gagaagagat tgtggaactg
20

<210> 212
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 212
ccctacactt gctgtattca
20

<210> 213
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 213
tatgagaaga accccgaatg
20

<210> 214
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 214
aacatgaggt gactgtaagg
20

<210> 215
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 215
gcacatttat agtatccct
20

<210> 216
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 216
gaacacagga gacagaagat
20

<210> 217
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 217
gtacagaca tctcagagat
20

<210> 218
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 218
gcactgtact ctttagagca
20

<210> 219
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 219
gccagacag ttgttcttat
20

<210> 220
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 220
ggacagtagc agggatttaa
20

<210> 221
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 221
cgtaaccctt acgaatcaga
20

<210> 222
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 222
atgctccaac agaaaccasa
20

<210> 223
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 223
atttgccaga ggctccttat
20

<210> 224
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 224
agagcattct gccatgaaag
20

<210> 225
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 225
cactatagaa tctaaggcag
20

<210> 226
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 226
acagttattc aggcgtcaca
20

<210> 227
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 227
ggcaagttaa tccsaacatg
20

<210> 228
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 228
gtactcaagt atatactccc
20

<210> 229
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 229

caaatgtggc aaagactcac
20

<210> 230
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 230
gccctgttgt gctgtatat
20

<210> 231
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 231
caaaaacccca aggtgacaaa
20

<210> 232
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 232
ctgctgcccg tgcctt
17

<210> 233
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 233
ctcgagtgtc agcagag
17

<210> 234
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 234
agtggagacc tgcata
17

<210> 235
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 235
gagagccatg gtgcaga
17

<210> 236
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 236
cgtgtcagca gcaagtg
17

<210> 237
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 237
gtggaatctg ccgggag
17

<210> 238
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 238
ggctgctcgt ctcaaaag
17

<210> 239

<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 239
gcttggttag gaagatg
17

<210> 240
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 240
cactcctcac tggggtc
17

<210> 241
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 241
ctcaggcact cagctcc
17

<210> 242
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 242
ccaccgaggt cgctggg
17

<210> 243
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 243
acacgcatgt tcccaag

17

<210> 244
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 244
gsaasaacca gtccata
17

<210> 245
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 245
tttaagttaa gaagagt
17

<210> 246
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 246
aaattacaaa aactaaa
17

<210> 247
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 247
cagagcaaac aatcaca
17

<210> 248
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 248
gttgtcacca gacgcgg
17

<210> 249
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 249
gccatgactg cctacac
17

<210> 250
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 250
gcatccgata cacatctt
17

<210> 251
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 251
attatttccc caggccg
17

<210> 252
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 252
agaaaggact gaccact
17

<210> 253
<211> 17

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 253
gagcaggtga cggaatg
17

<210> 254
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 254
gaggacagca agggcag
17

<210> 255
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 255
tgcagagaac tggttgc
17

<210> 256
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 256
gtagctgaag cagcagg
17

<210> 257
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 257
agtcagctat gaaattc
17

<210> 258
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 258
сассgggctt ggagcac
17

<210> 259
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 259
сасagacctg ccggctt
17

<210> 260
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 260
cgctgacata tttctgg
17

<210> 261
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 261
ctcgaagctt ctggacc
17

<210> 262
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 262
tcaggctcct gctcctc
17

<210> 263
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 263
aagaggtagc tgtggag
17

<210> 264
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 264
ccacagtgtg gctgttt
17

<210> 265
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 265
agtataaata aattaa
17

<210> 266
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 266
acacactgtg aaatcga
17

<210> 267
<211> 17
<212> ДНК

<213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая последовательность
 <400> 267
 aggggacagg ggaactc
 17
 <210> 268
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая последовательность
 <400> 268
 gctgatgaca gccactc
 17
 <210> 269
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая последовательность
 <400> 269
 tcagtctggg ggctttg
 17
 <210> 270
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая последовательность
 <400> 270
 tcacagccct gaacaaa
 17
 <210> 271
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Синтетическая последовательность
 <400> 271
 accttttaaa agagcat
 17

<210> 272
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 272
cggtaaaaacc acacagga
18

<210> 273
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 273
cagcacgctt ttcattgg
18

<210> 274
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 274
ttgacacagg catacctg
18

<210> 275
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 275
ccactgtggt gttgtctc
18

<210> 276
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 276
cgcacgtcct tcttgag
18

<210> 277
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 277
acaaatgatg gagtacat
18

<210> 278
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 278
ataggtcaac acgaccag
18

<210> 279
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 279
ttgagcaggt aggtatcg
18

<210> 280
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 280
cgaagaccca ggacttgg
18

<210> 281
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 281
gctcatcttg tagatggc
18

<210> 282
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 282
gtcaatgctg atgcaaag
18

<210> 283
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 283
ggacagcttg ctgatgag
18

<210> 284
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 284
tacaggagct ctgggatg
18

<210> 285
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 285
agagcatcgc atcgcttg
18

61

<210> 286
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 286
ccacctggat ggtgataa
18

<210> 287
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 287
gaagctcatg gccagcag
18

<210> 288
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 288
ctcaaagtgg cgtgcctg
18

<210> 289
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 289
atgaagacca cgaccaca
18

<210> 290
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 290

cgtctgggsc aggcacc
18

<210> 291
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 291
ttgcttactg agtcaca
18

<210> 292
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 292
gacgcaggsc aggcgtga
18

<210> 293
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 293
gacgccgatg aaggcgta
18

<210> 294
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 294
gcccaggtcc ttgaagag
18

<210> 295
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 295
gatgtgccga caggaaga
18

<210> 296
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 296
caggtccatg acgctctc
18

<210> 297
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 297
aatgacaagg agagccac
18

<210> 298
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 298
tgtaatcgtc cgtgacct
18

<210> 299
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 299
aagactcga aagagtgt
18

<210> 300

<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 300
ggaggaacca ggctttaa
18

<210> 301
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 301
attgcccagt agccccac
18

<210> 302
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 302
tggctctgag cctcttga
18

<210> 303
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 303
tgtaggccca gaaggga
18

<210> 304
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 304
tgagcttgca aaagtgga

18

<210> 305
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 305
taggagcatg ccactgaa
18

<210> 306
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 306
ctggacgatg gccacgta
18

<210> 307
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 307
gcactgtggc tagtatcc
18

<210> 308
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 308
ctgctcctct ggaggtca
18

<210> 309
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 309
ctccacatgc tctgtgat
18

<210> 310
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 310
cagaaaagccg atcaccat
18

<210> 311
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 311
gcggatgatg acaaggta
18

<210> 312
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 312
atcaccttga tggccttg
18

<210> 313
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 313
attgtagggc agctggaa
18

<210> 314
<211> 18

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 314
gctactggtg atgttgaa
18

<210> 315
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 315
gacgtcgtag gcgatgtt
18

<210> 316
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 316
gaaaggggtg acgcagca
18

<210> 317
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 317
gaagagatcg ttgcgga
18

<210> 318
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 318
gagctgctcc tggctgag
18

<210> 319
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 319
ctccacactc atggagga
18

<210> 320
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 320
tctgcaaagc agacttctca
20

<210> 321
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 321
ttcagcaggt tggcaatctc
20

<210> 322
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 322
tcggtgagct gccaggatga
20

<210> 323
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 323
agacatctct tctgggaagc
20

<210> 324
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 324
tgaaggcctc ctсagactcc
20

<210> 325
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 325
acaggttcca ctгagggctt
20

<210> 326
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 326
atcaaagggc tcggtcttca
20

<210> 327
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 327
tcagagccac tgggcctgga
20

<210> 328
<211> 20
<212> ДНК

<213> Искусственная
<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 328
tgctgcatag aaggacccag
20

<210> 329
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 329
tctgtggcca tgggccccat
20

<210> 330
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 330
tgtaagcagt gcagctggga
20

<210> 331
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 331
acagctgggg aaggagtcag
20

<210> 332
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 332
agctgagcga gtcagagga
20

<210> 333
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 333
tgtaatgcac cagctcgggc
20

<210> 334
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 334
gtctacagga accctctagg
20

<210> 335
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 335
acagcctggt gtgtttcacg
20

<210> 336
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 336
cttgagtcca cacatggatg
20

<210> 337
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 337
cactccatgc gttttgctac
20

<210> 338
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 338
стаactacca gctctctgaa
20

<210> 339
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 339
agagaaaaaga gacacagacc
20

<210> 340
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 340
cccaatagat tagttaatgc
20

<210> 341
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 341
caatttgaaa atatccagca
20

<210> 342
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 342
ccaggaacac agtagttatt
20

<210> 343
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 343
cttagtataa tattgggtcat
20

<210> 344
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 344
tctgcaaagc agactttctca
20

<210> 345
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 345
actctagttt ttccttctcc
20

<210> 346
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 346
agggtcatcag ggatcttgca
20

<210> 347
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 347
agtcagatca agggaagcca
20

<210> 348
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 348
agggtcattg aggaagcca
20

<210> 349
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 349
tccatgctgc tgatgctctt
20

<210> 350
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 350
tgatgctggg aacaggaagt
20

<210> 351
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 351

75

tcagagccac tgggcctgga
20

<210> 352
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 352
actgtgcaga ggctccsagt
20

<210> 353
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 353
tacaggtgac caccggagtg
20

<210> 354
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 354
taggtgaaga cgaaggaaga
20

<210> 355
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 355
tcattgctgc tgctgccctt
20

<210> 356
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

76

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 356
agtggcactt gtgggtgccg
20

<210> 357
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 357
gaagatgtgt ttctctcttc
20

<210> 358
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 358
acagataagg tcctccctag
20

<210> 359
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 359
ctttcaagtc cttgaggccc
20

<210> 360
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 360
atctccgga gaggtgaagga
20

<210> 361

<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 361
gtgtcactgg gaacaataca
20

<210> 362
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 362
aggcctggct caaatgcta
20

<210> 363
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 363
tatgagaaga ctaaggaga
19

<210> 364
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 364
ccagggttaat tccaataatg
20

<210> 365
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 365
gttaaaatca gctgcactag

20

<210> 366
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 366
стаатсaгaa cacactattg
20

<210> 367
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 367
ccagaaaata aagtcgtatc
20

<210> 368
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 368
tcgcccttgc tcaccat
17

<210> 369
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 369
tcgaccagga tgggcac
17

<210> 370
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 370
gctgaacttg tggccgt
17

<210> 371
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 371
cgtaggtggc atcgccc
17

<210> 372
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 372
ccgggtggtgc agatgaa
17

<210> 373
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 373
aggggtggtca cgagggt
17

<210> 374
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 374
tcggggtagc ggctgaa
17

<210> 375
<211> 17

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 375
ggcggacttg aagaagt
17

<210> 376
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 376
agatgggtgcg ctccctgg
17

<210> 377
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 377
gcgcgggtct ttagtatt
17

<210> 378
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 378
gttcaccagg gtgtcgc
17

<210> 379
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 379
cctccttgaa gtcgatg
17

<210> 380
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 380
ttgtactcca gcttg
17

<210> 381
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 381
gtcggccatg atataga
17

<210> 382
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 382
tcttgaagtt caccttg
17

<210> 383
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 383
agctgcacgc tgccgtc
17

<210> 384
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 384
tcgccgatgg ggggtgtt
17

<210> 385
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 385
gggtgctcag gtagtgg
17

<210> 386
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 386
cgcttctcgt tggggtc
17

<210> 387
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 387
ggcggtcacg aactcca
17

<210> 388
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 388
tcttgtagag ctcgtcc
17

<210> 389
<211> 17
<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 389

tcctgctcct ccacctc

17

<210> 390

<211> 17

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 390

ctcctgggca caagaca

17

<210> 391

<211> 17

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 391

agaagcacag gctgcag

17

<210> 392

<211> 17

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 392

accccggtga acagctc

17

<210> 393

<211> 17

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 393

ttacgtcgcc gtccagc

17

<210> 394
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 394
tcgccctcgc cggacac
17

<210> 395
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 395
cttcagggtc agcttgc
17

<210> 396
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 396
agggcacggg cagcttg
17

<210> 397
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 397
actgcacgcc gtaggtc
17

<210> 398
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 398
cgtgctgctt catgtgg
17

<210> 399
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 399
acgtagcctt cgggcat
17

<210> 400
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 400
gccgctcgcc ttgaaga
17

<210> 401
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 401
cctcgaactt cacctcg
17

<210> 402
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 402
cccttcagct cgatgcs
17

<210> 403
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 403
ccccaggatg ttgccgt
17

<210> 404
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 404
cgttgtggct gttgtag
17

<210> 405
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 405
atgccgttct tctgctt
17

<210> 406
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 406
ctcgatgttg tggcgga
17

<210> 407
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 407
tgctgtagt ggtcggc
17

<210> 408
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 408
ttgtcgggca gсagсac
17

<210> 409
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 409
tttgctcagg gcggact
17

<210> 410
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 410
gcaggaccat gtgatcg
17

<210> 411
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 411
atgccgagag tgatccc
17

<210> 412
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 412

gaagccatgg ctaagct
17

<210> 413
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 413
tgggcagcgt gccatca
17

<210> 414
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 414
tgacggtcca tcccgct
17

<210> 415
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 415
tacacattga tcctagc
17

<210> 416
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 416
ttaatactga cgctctcgca
20

<210> 417
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 417
ccctgggtctt aaccgaattt
20

<210> 418
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 418
aactgcgaat cggtcttagct
20

<210> 419
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 419
ccagtatttg tctacagcct
20

<210> 420
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 420
gaggggtggct actgtattat
20

<210> 421
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 421
gcttccttgg tgtcttttac
20

<210> 422

<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 422
gctgtgcctt tttcttactt
20

<210> 423
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 423
gtaattttgg ctgacctggt
20

<210> 424
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 424
atggcctgat gtaccatttg
20

<210> 425
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 425
gctccttctg ataatgctga
20

<210> 426
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 426
tttgcattggc tgcttgatgt

20

<210> 427
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 427
tgcaatctat cccattctgc
20

<210> 428
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 428
tatgtcactt ccccttggtt
20

<210> 429
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 429
gtcatccatc ctatttggtc
20

<210> 430
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 430
cccaggatta tccatctttt
20

<210> 431
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>

<223> Синтетическая последовательность

<400> 431
gtccttgtct tatgtccaga
20

<210> 432
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 432
agagttttat agaaccggtc
20

<210> 433
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 433
саасаagggtt tctgtcatcc
20

<210> 434
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 434
gctgggccca atgcttttaa
20

<210> 435
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 435
aaactcttgc tttatggccg
20

<210> 436
<211> 20

<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 436
ctgcatcatt atggtagctg
20

<210> 437
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 437
ggctctgcaa tttttggcta
20

<210> 438
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 438
tttgggtgtcc ttccctttcca
20

<210> 439
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 439
gggscagatt ttccctaata
20

<210> 440
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 440
catttatcta actctcccc
20

<210> 441
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 441
ctgcttgccc atactatatg
20

<210> 442
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 442
atgtttctaa caggccagga
20

<210> 443
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 443
tgtctgaagg gatggttgta
20

<210> 444
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 444
ctatcctttg atgcacacaa
20

<210> 445
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 445
gctcttctctc tatcttctct
20

<210> 446
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 446
tttttctgt gtcagctgct
20

<210> 447
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 447
cctggatggt ctgcactata
20

<210> 448
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 448
ctgaaagcct tctcttctac
20

<210> 449
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 449
ggtgtttaaa tcttgtggg
20

<210> 450
<211> 20
<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 450
cttcctcatt gatggtctct
20

<210> 451
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 451
tcatctggcc tggtgcaata
20

<210> 452
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 452
gaagggtact agtagttcct
20

<210> 453
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 453
ctactgggat aggtggatta
20

<210> 454
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 454
gtagggctat acatccttac
20

<210> 455
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 455
catagctctct aaagggttcc
20

<210> 456
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 456
tttacctcct gtgaagcttg
20

<210> 457
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 457
aatctggggt cgcattttgg
20

<210> 458
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 458
ggcatgctgt catcatttct
20

<210> 459
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 459
tacttggctc attgcttcag
20

<210> 460
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 460
cccttccttg ccacaattga
20

<210> 461
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

<400> 461
tccaacagcc ctttttccta
20

<210> 462
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

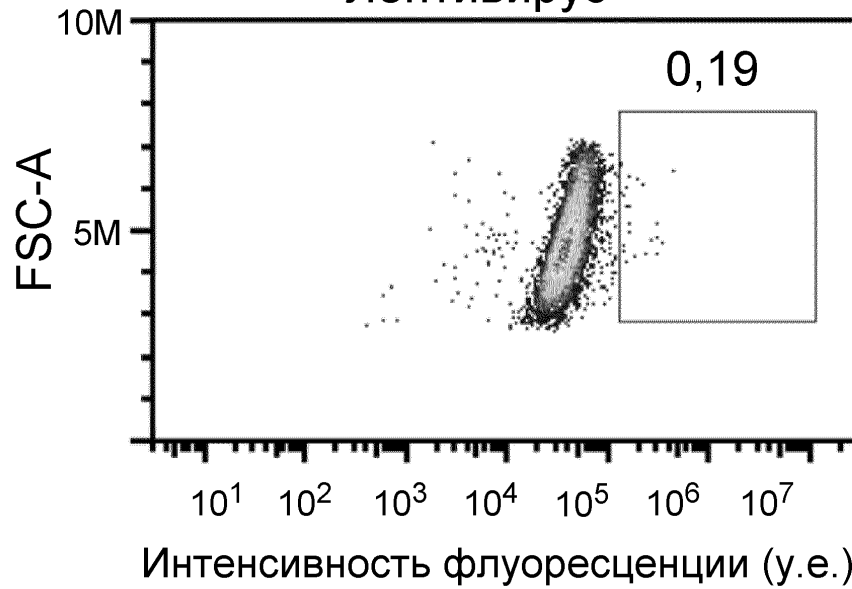
<400> 462
cctgtctctc agtacaatct
20

<210> 463
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетическая последовательность

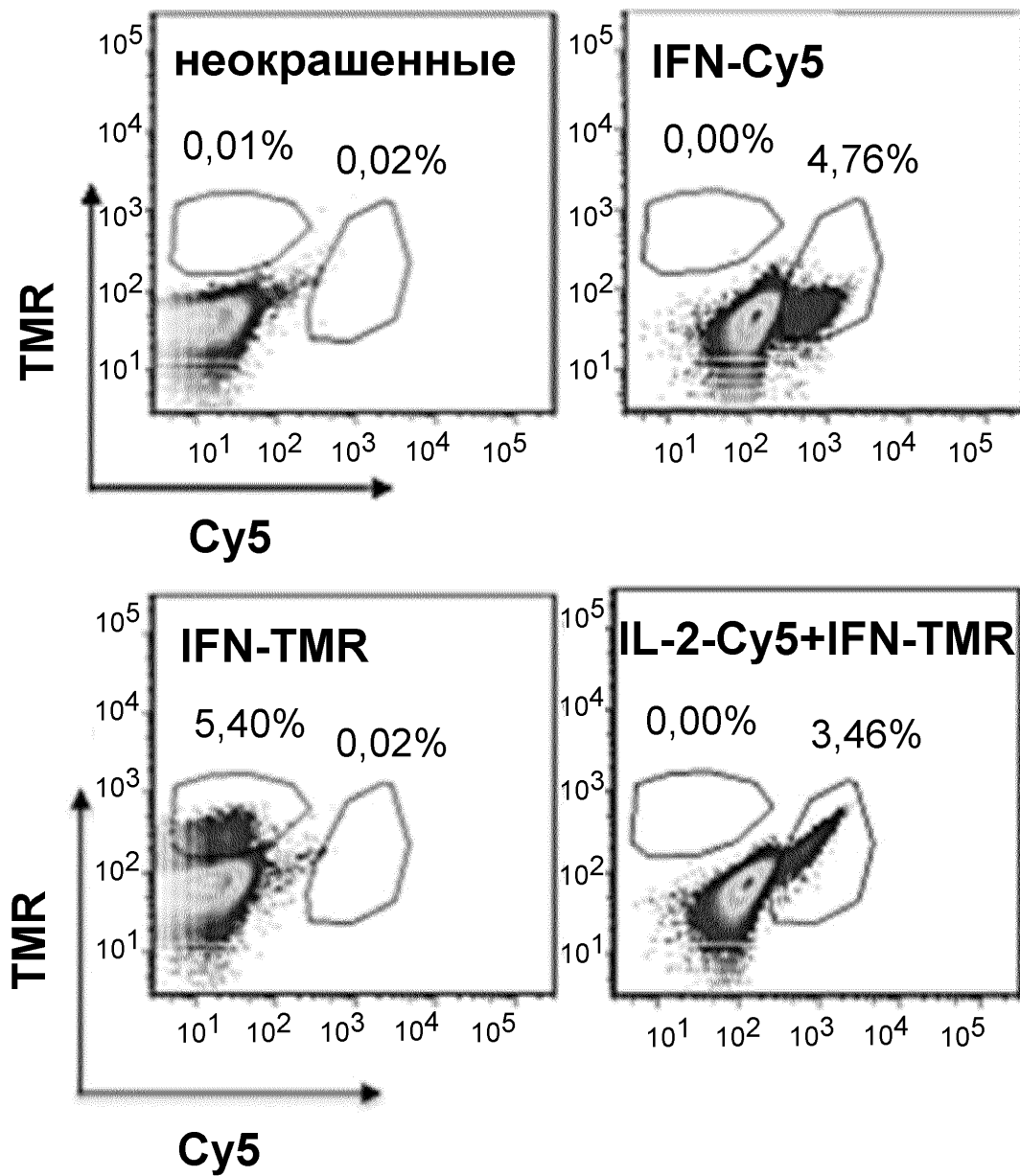
<400> 463
aagaaaattc cctgaccttc
20

1/11

ФИГ.1**Лентивирус -****Лентивирус +**

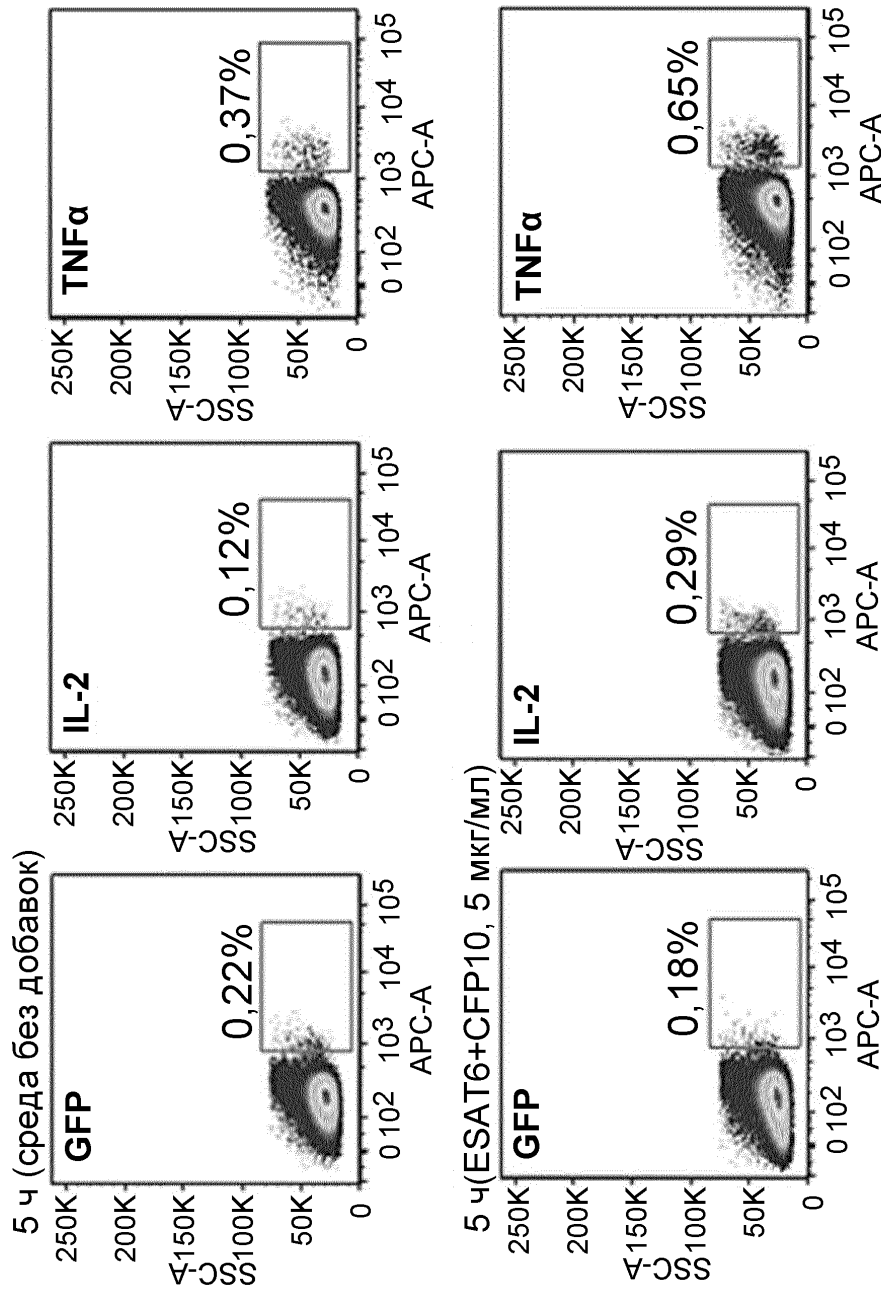
2/11

ФИГ.2



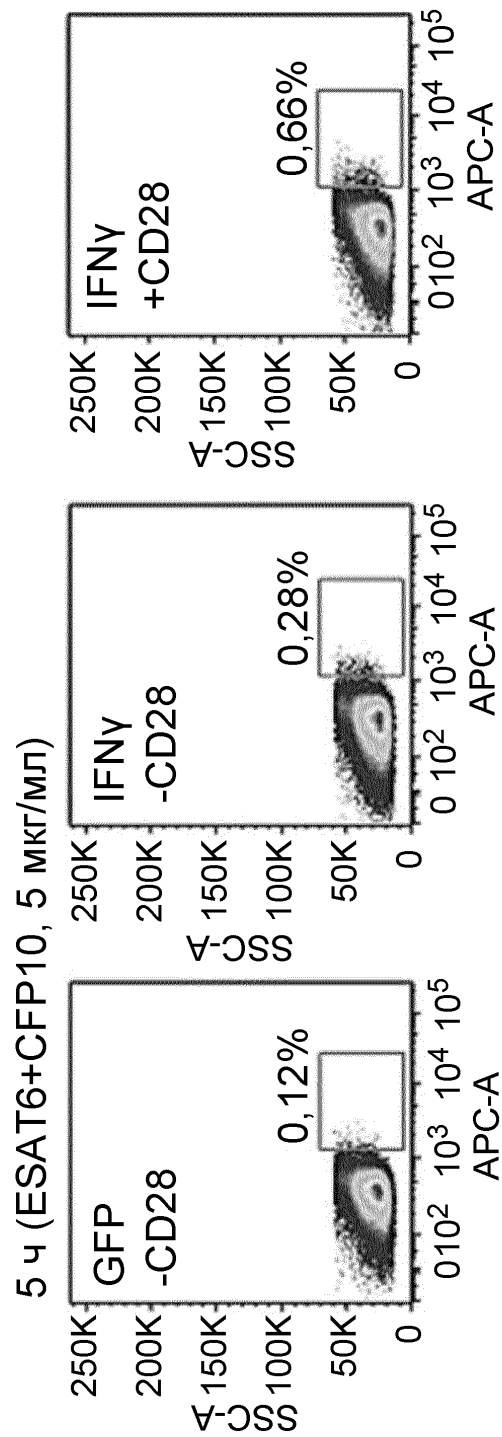
3/11

ФИГ.3

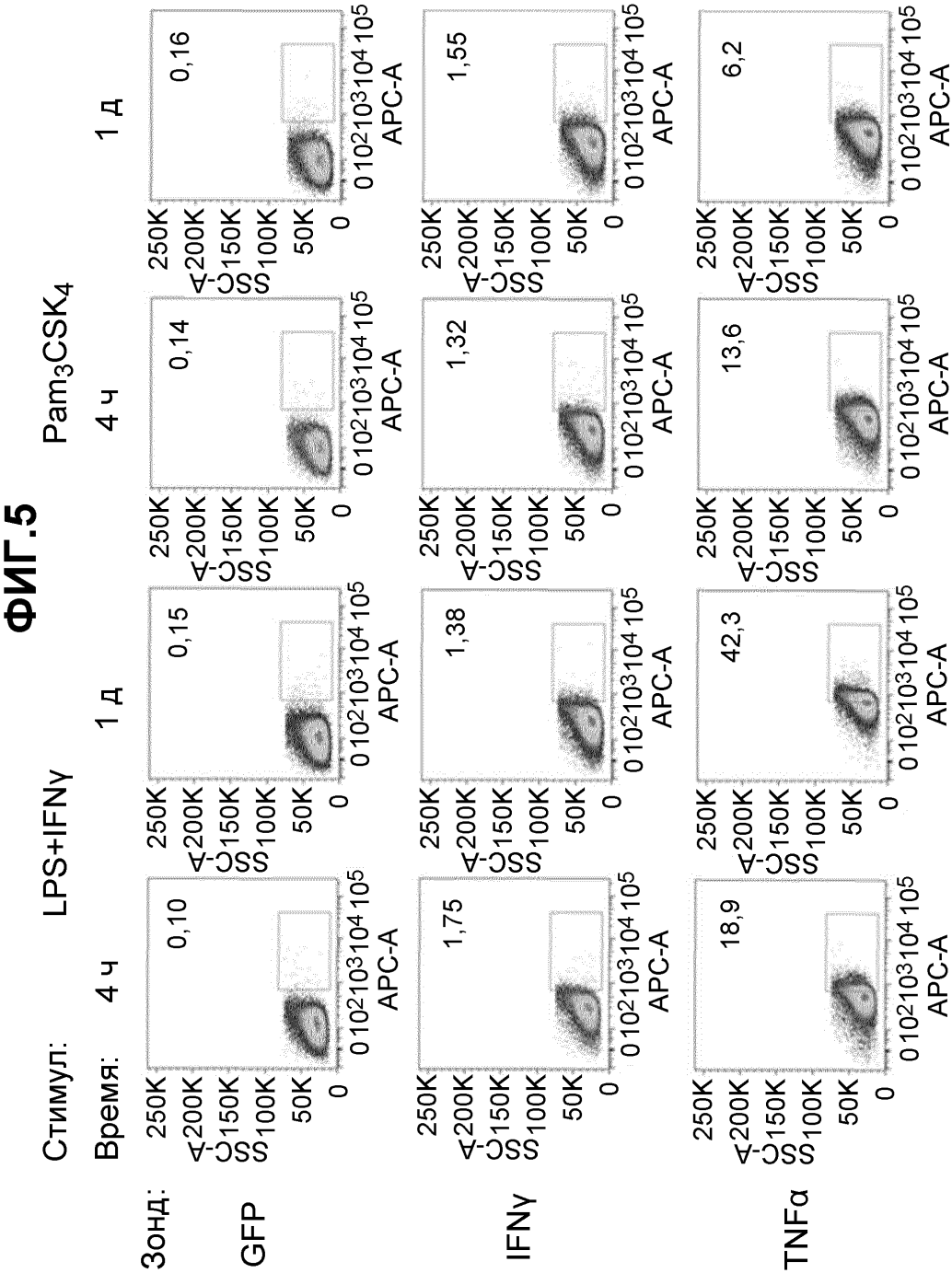


4/11

ФИГ.4

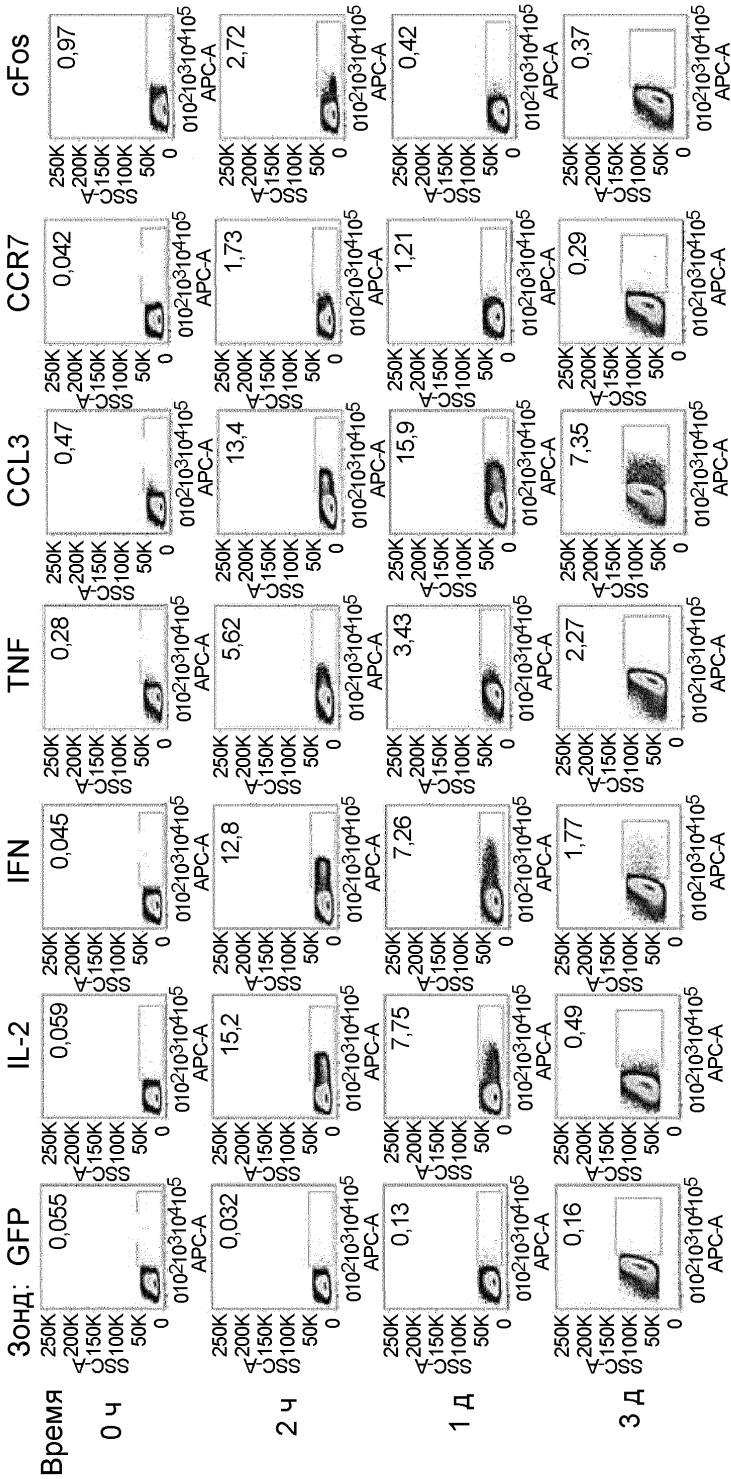


5/11



ФИГ.6А

Анализ: FISH-Flow
Стимул: ФМА+иономицин

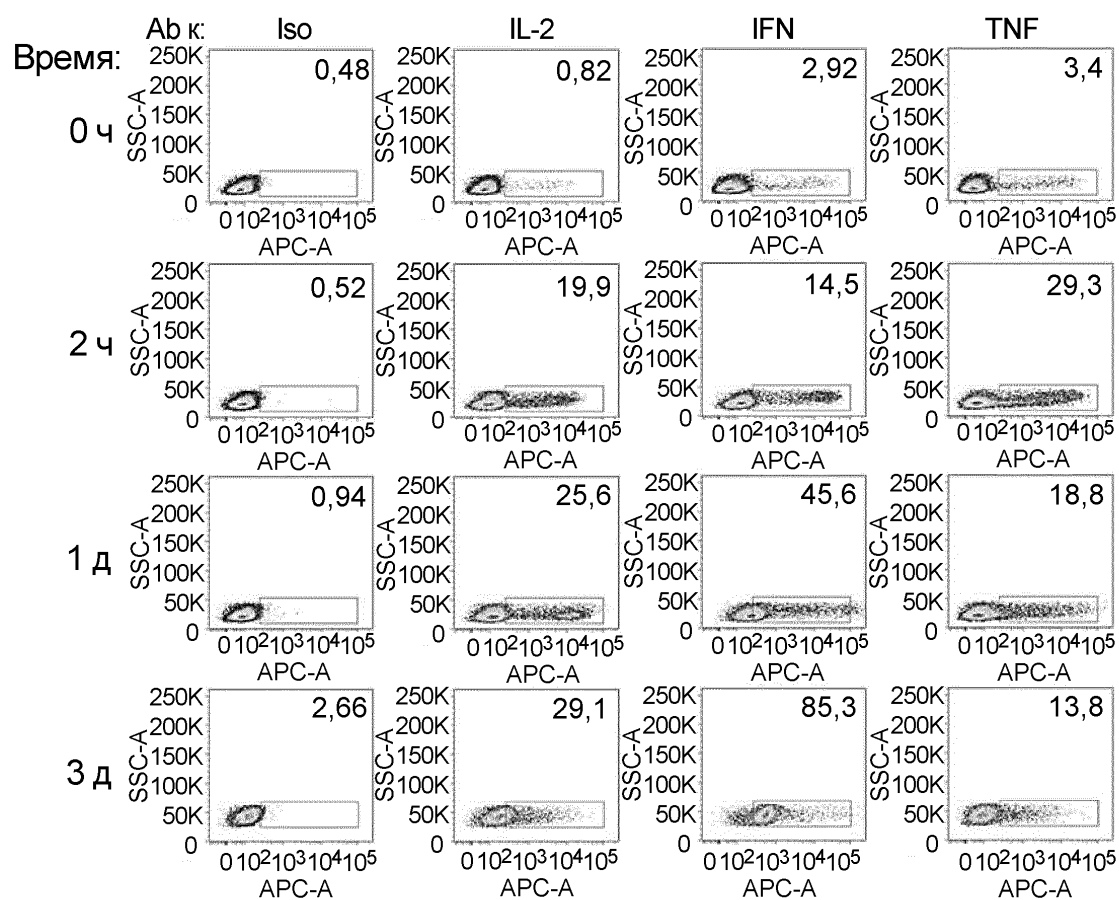


7/11

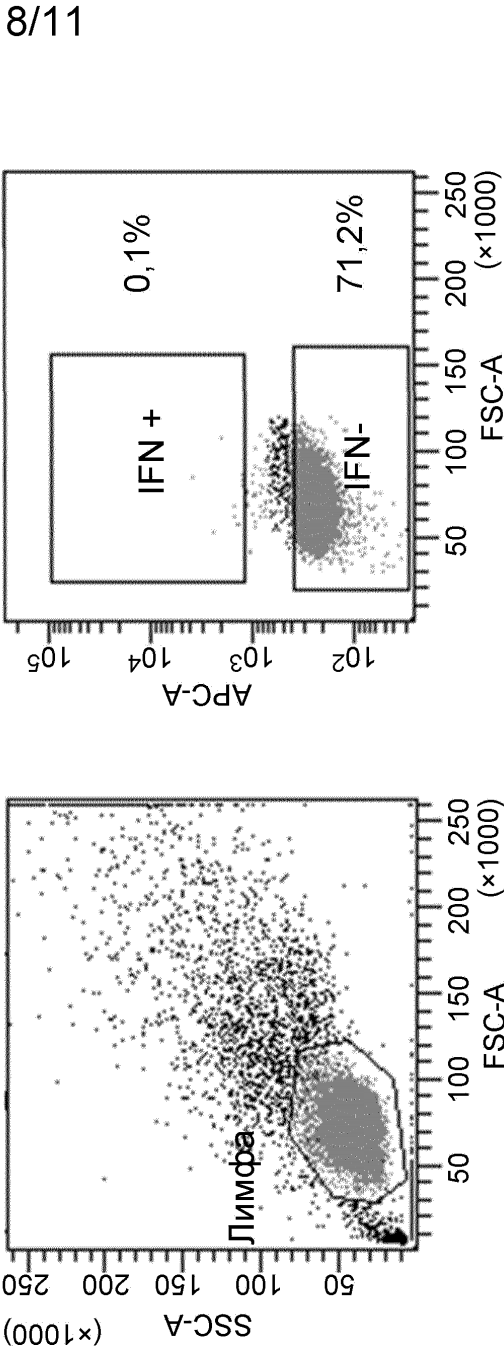
ФИГ.6В

Анализ: Ab-Flow

Стимул: ФМА+иономицин



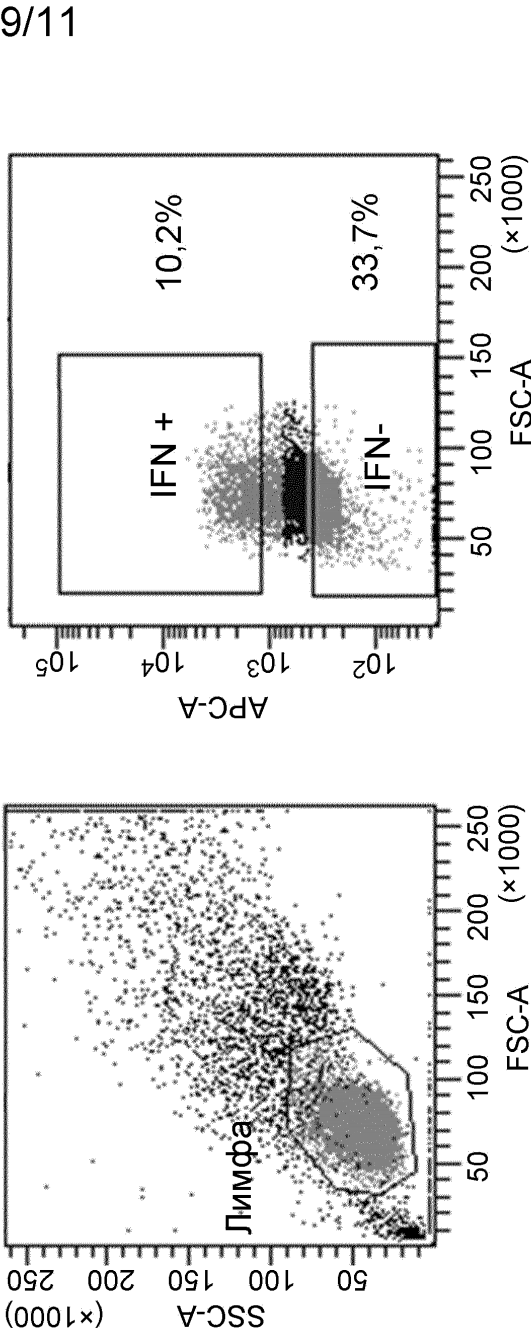
ФИГ.7А
Анализ: FISH-Flow/сортинг
Стимул: ФМА+иономицин
Зонд: GFP



ФИГ.7В
Анализ: FISH-Flow/сортинг

Стимул: ФМА+иономицин

Зонд: IFN γ :IL-2:TNF α :CCL3



10/11

ФИГ.8А

Анализ: ОТ-ПЦР на Т-клетках после
FISH-Flow/сортинга

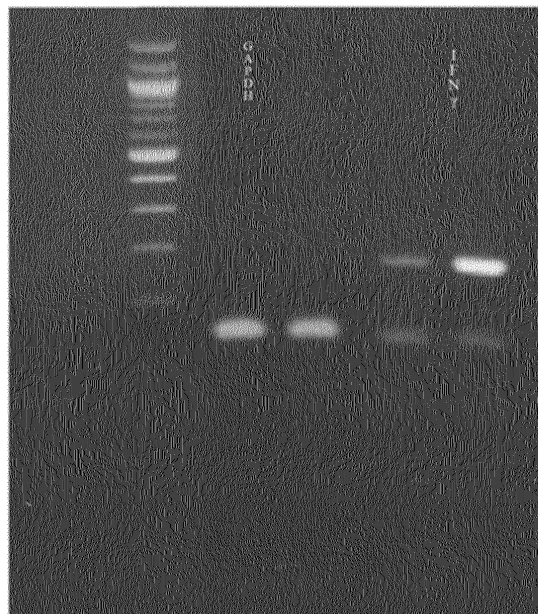
FISH- сортированная популяция	Праймер	Пороговый цикл
IFN+	IFN γ	26,1
IFN-	IFN γ	28,3
IFN+	GAPDH	21,0
IFN-	GAPDH	20,5

11/11

ФИГ.8В

Анализ: подтверждение размера
ампликона ОТ-ПЦР

M GAPDH IFN γ



Сортированные
популяции: IFN- IFN+ IFN- IFN+