



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 186 112** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **С 12 Q 1/68, 1/70, С 12 Р 19/30**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

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

(21), (22) Заявка: 98100921/13, 16.01.1998
(24) Дата начала действия патента: 16.01.1998
(30) Приоритет: 17.01.1997 US 60/037744
(43) Дата публикации заявки: 10.12.1999
(46) Дата публикации: 27.07.2002
(56) Ссылки: WO 9514109, 26.05.1995. WO 9403635, 17.02.1994. SU 1792972 A1, 07.02.1996. US 5328825, 12.07.1994. US 5196305, 23.03.1993. US 5384242, 24.01.1995.
(98) Адрес для переписки:
101000, Москва, пер.Малый Златоустинский 10,
кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", И.А.Веселицкой

(71) Заявитель:
Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)
(72) Изобретатель: КРИСТОФЕРСОН Синди Дон (US),
КВОК Ширли Е. (US), ЛУ ЮЙ Ши-Да (US)
(73) Патентообладатель:
Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)
(74) Патентный поверенный:
Веселицкая Ирина Александровна

(54) **ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПРАЙМЕР, ПАРА ПРАЙМЕРОВ, НАБОР ПРАЙМЕРОВ (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ВИЧ-1**

(57)
Изобретение относится к области молекулярной биологии и может быть использовано для обнаружения вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Для диагностики ВИЧ-1 используют способ амплификации, предусматривающий использование улучшенных олигонуклеотидных праймеров SKCC1 и SKCC3, а также их сочетание с праймером SK145, на основе данных праймеров созданы наборы, один из которых дополнительно к

парам праймеров содержит праймер SK145M2, а другой - один праймер, пару праймеров или вышеописанный набор праймеров. Последовательности нуклеотидов перечисленных праймеров приведены в тексте описания. Предлагаемые праймеры способны эффективно амплифицировать новые, недавно обнаруженные изоляты группы М ВИЧ-1, а также все известные изоляты группы М ВИЧ-1 с приблизительно одинаковой эффективностью. 5 с. и 4 з.п. ф-лы, 4 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 186 112** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 Q 1/68, 1/70, C 12 P 19/30**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98100921/13, 16.01.1998

(24) Effective date for property rights: 16.01.1998

(30) Priority: 17.01.1997 US 60/037744

(43) Application published: 10.12.1999

(46) Date of publication: 27.07.2002

(98) Mail address:
101000, Moskva, per.Malyj Zlatoustinskij 10,
kv.15, "EVROMARKPAT", I.A.Veselitskoj

(71) Applicant:

F.KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

(72) Inventor: KRISTOFERSON Sindi Don (US),
KVOK Shirli E. (US), LU JuJ Shi-Da (US)

(73) Proprietor:

F.KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

(74) Representative:

Veselitskaja Irina Aleksandrovna

(54) OLIGONUCLEOTIDE PRIMER, PRIMER PAIR, PRIMER SET (VARIANTS), METHOD OF THEIR USING FOR AMPLIFICATION OF HIV-1 NUCLEIC ACID

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology, virology, medicine. SUBSTANCE: method of amplification involving the use of improved oligonucleotide primers SKCC1 and SKCC3 and also their combination with primer SK145 is used for diagnosis of HIV-1. Based on primers data sets are constructed. One set comprises primer SK145M2 additionally to primers pairs and another primer comprises one primer, two primers or the above

described set of primers. Nucleotide sequences of indicated primers are given in the description text. The proposed primers are able to amplify novel recently found isolates of the group M HIV-1 efficiently and also all known isolates of the group M HIV-1 being with about similar efficiency. Invention can be used for detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). EFFECT: improved method of diagnosis of HIV-1. 9 cl, 2 tbl, 3 ex

Настоящее изобретение относится к молекулярной биологии и химии нуклеиновых кислот. В частности, оно относится к способам и реагентам, предназначенным для обнаружения вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Следовательно, областью применения изобретения является медицина в целом и более конкретно медицинская диагностика и молекулярная биология.

Создание способов амплификации определенных последовательностей нуклеиновых кислот, в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР), делает возможным быстрое обнаружение нуклеиновых кислот, присутствующих в образце в столь малых количествах, что их ранее было невозможно обнаружить (см. патенты США 4683195, 4683202 и 4965188). В литературе имеются многочисленные данные о совершенствовании и применении ПЦР. Например, широкий спектр связанных с ПЦР проблем представлен в таких изданиях, как PCR Technology - principles and applications for DNA amplification, 1989 (ред. H.A.Erich), Stockton Press, New York, NY; PCR Protocols: A guide to methods and applications, 1990 (ред. M. A. Innis и др.), Academic Press, San Diego, CA; и в PCR Strategies, 1995 (ред. M. A. Innis и др.), Academic Press, San Diego, CA. Коммерческие поставщики, такие как фирма Perkin Elmer (Norwalk, CT), поставляют на рынок реагенты для ПЦР и публикуют ПЦР-протоколы.

Обзор данных по применению ПЦР и гибридизации с использованием зондов для амплификации и обнаружения нуклеиновой кислоты ВИЧ-1 представлен у Kwok, 1992, Ann. Med. 24: 211-214; и у Coutlee и др., 1991, Mol. Cell. Probes 5: 241-259. Основанные на использовании ПЦР методы обнаружения ВИЧ-1 описаны, например, в патентах США 5008182 и 5176775; у Kellogg и Kwok, 1990, в PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (ред. Innis и др.), Academic Press, San Diego, CA, 337-347; у Holodniy и др., 1991, J. Inf. Dis. 163: 802-865; Jackson и др., 1991, AIDS 5: 1463-1467; и у Mulder и др., 1994, J. Clin. Microbiol. 32(2): 292-300.

Коммерческие наборы для амплификации и обнаружения ВИЧ-1 поставляются фирмой Hoffmann-La Roche (Nutley, NY). Набор Amplicor™ HIV-1 Test предназначен для обнаружения in vitro провирусной ДНК ВИЧ-1. Набор AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test предназначен для количественной оценки in vitro РНК ВИЧ-1. В обоих тест-наборах Amplicor для амплификации нуклеиновых кислот ВИЧ-1 используется пара праймеров SK462 (SEQ ID NO: 5) и SK431 (SEQ ID NO: 6), описанных у Mulder и др., 1994, J. Clin. Microbiol. 32(2): 292-300, называемых в настоящем описании Amplicor-праймерами для ВИЧ-1.

ВИЧ-1 обладает значительной вариабельностью геномной последовательности. Филогенетический анализ последовательностей нуклеиновых кислот генов gag и env ВИЧ-1 описан в работе Myers и др., 1993, Human Retrovirus and AIDS, 1993, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Внутри группы М были выявлены подтипы А-Ј.

В литературе описаны общепринятые методы молекулярной биологии и химии нуклеиновых кислот, относящиеся к области настоящего изобретения (см., например, Sambrook и др., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis (ред. M.J.Gait, 1984); Nucleic Acid Hybridization (ред. B.D.Hames и S.J.Higgins, 1984); и серии Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)).

Были выявлены многочисленные изоляты группы М вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), которые либо не амплифицируются, либо недостаточно эффективно амплифицируются с ранее описанными праймерами для гена gag, в частности с использованием Amplicor-праймеров для ВИЧ-1 SK462 (SEQ ID NO: 5) и SK431 (SEQ ID NO: 6). Эти изоляты проявляют не описанную ранее вариабельность последовательностей в области, включающей сайты связывания праймеров Amplicor-праймеров для ВИЧ-1.

Настоящее изобретение относится к улучшенным праймерам, способным эффективно амплифицировать эти недавно обнаруженные изоляты, в дополнение ко всем изолятам, которые способны амплифицироваться с использованием Amplicor-праймеров для ВИЧ-1. Кроме того, праймеры по изобретению способны амплифицировать все известные изоляты группы М ВИЧ-1 с приблизительно одинаковой эффективностью.

Настоящее изобретение относится далее к улучшенным олигонуклеотидным праймерам, способным осуществлять амплификацию с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) области гена gag изолятов подтипов А-Г группы М ВИЧ-1 с приблизительно одинаковой эффективностью и без одновременной амплификации последовательностей, не являющихся мишенями.

В частности, настоящее изобретение относится к олигонуклеотидным праймерам, предназначенным для амплификации нуклеиновой кислоты вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), причем указанный олигонуклеотидный праймер выбирают из группы, состоящей из SKCC1 (SEQ ID NO: 3) и SKCC3 (SEQ ID NO: 4).

Предпочтительно каждый из этих праймеров объединен в пару олигонуклеотидных праймеров, состоящую из SK145 (SEQ ID NO: 1) и SKCC1 (SEQ ID NO: 3), или в пару олигонуклеотидных праймеров, состоящую из SK145 (SEQ ID NO: 1) и SKCC3 (SEQ ID NO: 4).

В другом варианте эти пары праймеров могут быть объединены с праймером SK145M2 (SEQ ID NO: 2) в набор олигонуклеотидных праймеров, состоящий из олигонуклеотидных праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1), SKCC1 (SEQ ID NO: 3) и SK145M2 (SEQ ID NO: 2), или в набор олигонуклеотидных праймеров, состоящий из олигонуклеотидных праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1), SKCC3 (SEQ ID NO: 4) и SK145M2 (SEQ ID NO: 2).

Изобретение относится также к улучшенным способам амплификации области гена gag из подтипов группы М

ВИЧ-1, включающим осуществление ПЦР с использованием праймеров по изобретению.

Настоящее изобретение далее относится к наборам, содержащим амплифицирующий праймер по настоящему изобретению. Эти наборы могут включать дополнительные реагенты, такие как зонды для обнаружения, или один или несколько реагентов для амплификации, например полимеразу, буферы и нуклеозидтрифосфаты.

Для лучшего понимания изобретения ниже определены некоторые понятия.

"Нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" относятся к полидезоксирибонуклеотидам (содержащим 2-дезоксид-Д-рибозу), к полирибонуклеотидам (содержащим Д-рибозу) и к любому другому типу полинуклеотида, представляющего собой N-гликозид пуринового или пиримидинового основания или модифицированного пуринового или пиримидинового основания. Понятия "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" не подразумевают различия в длине цепи и могут использоваться взаимозаменяемо. Эти понятия относятся только к первичной структуре молекулы. Таким образом, эти понятия включают двух- и одноцепочечную ДНК, а также двух- и одноцепочечную РНК.

Олигонуклеотиды могут быть получены любым пригодным для этой цели способом, включая, например, клонирование и рестрикцию соответствующих последовательностей и прямой химический синтез с помощью такого метода, как фосфотриэфирный метод, описанный у Narang и др., 1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99; фосфодиэфирный метод, описанный у Brown и др., 1979, Meth. Enzymol. 68: 109-151; диэтилфосфорамидитный метод, описанный у Beaucage и др., 1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862; и метод с использованием твердой подложки, описанный в патенте США 4458066. Обзор методов синтеза представлен у Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry, 1(3): 165-187.

Понятие "гибридизация" относится к образованию дуплексной структуры двумя одноцепочечными нуклеиновыми кислотами в результате комплементарного спаривания оснований. Гибридизация может происходить между полностью комплементарными цепочками нуклеиновой кислоты или между "практически комплементарными" цепочками нуклеиновой кислоты, которые содержат минорные области ошибочного спаривания. Условия, при которых могут гибридизоваться только полностью комплементарные цепочки нуклеиновой кислоты, называются "строгими условиями гибридизации" или "условиями гибридизации, специфичными для последовательности". Стабильные дуплексы практически комплементарных последовательностей могут быть получены при менее строгих условиях гибридизации; степень допустимых ошибочных спариваний может контролироваться с помощью соответствующего регулирования условий гибридизации. Специалисты в области технологии нуклеиновых кислот могут определить стабильность дуплекса эмпирическим путем, учитывая различные параметры, в том числе, например, длину и концентрацию пар оснований

олигонуклеотидов, ионную силу и частоту ошибочных спариваний оснований, используя для этой цели известное в данной области техники руководство (см., например, Sambrook и др., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; и Wetmur, 1991, Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol., 26(3/4): 227-259).

Понятие "праймер" относится к природному или синтетическому олигонуклеотиду, способному действовать в качестве точки инициации синтеза ДНК в условиях, при которых индуцируется синтез продукта удлинения праймера, комплементарного цепи нуклеиновой кислоты, т.е. в присутствии четырех различных нуклеозидтрифосфатов и агента, обеспечивающего полимеризацию (т.е. ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы) в соответствующем буфере и при соответствующей температуре. Праймер предпочтительно представляет собой одноцепочечный олигодезоксирибонуклеотид. Соответствующая длина праймера зависит от целей применения праймера, но обычно составляет от 15 до 35 нуклеотидов. Короткие молекулы праймера обычно требуют более низких температур для формирования достаточно стабильных гибридных комплексов с матрицей. Не требуется, чтобы праймер отражал точную последовательность нуклеиновой кислоты-матрицы, но он должен быть в достаточной степени комплементарным, чтобы гибридизироваться с матрицей. Праймеры могут включать дополнительные структуры, которые позволяют обнаруживать или иммобилизовать праймер, но не изменяют основное свойство праймера, а именно способность действовать в качестве точки инициации синтеза ДНК. Например, праймеры могут содержать дополнительную нуклеотидную последовательность на 5'-конце, которая не гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью, но которая способствует клонированию амплифицированного продукта. Область праймера, комплементарная матрице в достаточной для гибридизации степени, в контексте настоящего описания обозначается как "область гибридизации".

В контексте настоящего описания понятие "праймер, иницирующий синтез против хода транскрипции" относится к праймеру, продукт удлинения которого представляет собой субпоследовательность кодирующей цепочки. "Праймер, иницирующий синтез по ходу транскрипции" относится к праймеру, продукт удлинения которого представляет собой субпоследовательность, комплементарную некодирующей цепочке.

Понятия "последовательность-мишень", "область-мишень" и "нуклеиновая кислота-мишень" относятся к области нуклеиновой кислоты, подлежащей амплификации, обнаружению или другому анализу.

В контексте настоящего описания праймер является "специфичным" для последовательности-мишени, если количество ошибочных спариваний, образующихся между праймером и последовательностью-мишенью, меньше, чем количество ошибочных спариваний,

образующихся между праймером и последовательностями, не являющимися мишенями, которые могут присутствовать в образце. Могут быть выбраны такие условия гибридизации, при которых стабильные дуплексы формируются только в тех случаях, если количество присутствующих ошибочных спариваний не больше количества ошибочных спариваний, образующихся между праймером и последовательностью-мишенью. При таких условиях праймер, специфичный для мишени, может образовывать стабильный дуплекс только с последовательностью-мишенью. Таким образом, применение праймеров, специфичных для мишени, в условиях амплификации соответствующей строгости позволяет осуществлять специфическую амплификацию тех последовательностей, которые имеют сайты связывания, являющиеся мишенями для праймера. Аналогично этому применение зондов, специфичных для мишени, в условиях гибридизации соответствующей строгости дает возможность обнаруживать конкретную последовательность-мишень.

Понятие "смесь для реакции амплификации" относится к раствору, который содержит реагенты, необходимые для осуществления реакции амплификации, и который обычно содержит праймеры, термостабильную ДНК-полимеразу, ДНТФ и катион двухвалентного металла в соответствующем буфере. Реакционная смесь называется полной, если она содержит все реагенты, необходимые для осуществления реакции, и называется неполной, если она содержит неполный набор необходимых реагентов. Для специалиста в данной области техники очевидно, что для удобства, сохранения стабильности при хранении или же для возможности регулировать концентрации компонентов в зависимости от назначения компоненты реакции обычно хранят в виде отдельных растворов, каждый из которых содержит неполный набор всех компонентов, а сами компоненты реакции объединяют до реакции для создания полной реакционной смеси. Кроме того, для специалиста в данной области техники очевидно, что для продажи компоненты реакции упаковывают по отдельности и что пригодные коммерческие наборы могут содержать любой неполный набор компонентов реакции, включающий праймеры по настоящему изобретению.

Праймеры для амплификации ВИЧ-1

Праймеры по настоящему изобретению обладают способностью амплифицировать нуклеиновую кислоту подтипов группы М ВИЧ-1. Праймеры являются существенно улучшенными по сравнению с ранее описанными праймерами в том отношении, что они обладают способностью амплифицировать практически с одинаковой эффективностью нуклеиновую кислоту из области гена *gag* всех изолятов подтипов А-Г, принадлежащих группе М, включая недавно открытые изоляты. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены ниже в ориентации слева направо 5'-->3'.

Праймеры, иницирующие синтез против хода транскрипции:

SK145 (SEQ ID NO: 1)
AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT
SK145M2 (SEQ ID NO: 2)

AGTGGGGGGACACCAGGCAGCAATGCAAAT

Праймеры, иницирующие синтез по ходу транскрипции:

SKCC1 (SEQ ID NO: 3)
TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACTTCC
SKCC3 (SEQ ID NO: 4)
TGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTAT

Праймеры по настоящему изобретению, иницирующие синтез по ходу транскрипции, могут применяться с любым приведенным в настоящем описании праймером, иницирующим синтез против хода транскрипции. Праймеры по настоящему изобретению, иницирующие синтез по ходу транскрипции, предпочтительно применяют с иницирующим синтез против хода транскрипции праймером SK145 (SEQ ID NO: 1), необязательно в сочетании с иницирующим синтез против хода транскрипции праймером SK145M2 (SEQ ID NO: 2). Иницирующий синтез против хода транскрипции праймер SK145 (SEQ ID NO: 1) описан у Kellogg и Kwok, 1990, в PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (ред. Innis и др.), Academic Press, San Diego, CA: 337-347. Второй иницирующий синтез против хода транскрипции праймер SK145M2 (SEQ ID NO: 2) гибридизируется с такой же областью, что и SK145 (SEQ ID NO: 1), но он создан для более точного спаривания с нуклеотидной последовательностью определенных изолятов подтипа А и Е ВИЧ-1. Как указано ниже в примерах, применение обоих иницирующих синтез против хода транскрипции праймеров может способствовать выравниванию эффективности амплификации определенных подтипов.

Амплификация

Амплификации осуществляют в условиях, которые позволяют амплифицировать все подтипы группы М ВИЧ-1, но которые обладают достаточной строгостью для того, чтобы избежать амплификации последовательностей, не являющихся мишенями. Предпочтительные условия реакции амплификации описаны в примерах у Mulder и др., 1994, J. Clin. Microbiol. 32(2): 292-300, и в инструкции, включенной в тест-набор AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Точные условия не имеют решающего значения при практическом осуществлении изобретения. Оптимизация условий амплификации может быть проведена обычным способом, основываясь на руководстве, представленном в данном описании.

Предлагаемые праймеры и способы могут применяться для обнаружения либо провирусной ДНК ВИЧ-1, либо РНК ВИЧ-1. Амплификация РНК с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) хорошо известна в данной области техники и описана в патентах США 5322770 и 5310652; у Myers и Gelfand, 1991, Biochemistry, 30(31): 7661-7666; и у Young и др., 1993, J. Clin. Microbiol. 31(4): 882-886. Амплификация РНК ВИЧ-1 с использованием ОТ-ПЦР описана у Mulder и др., 1994, J. Clin. Microbiol. 32(2): 292-300 и у Holodniy и др., 1991, J. Inf. Dis. 163: 802-865.

Методы подготовки образца, пригодные для амплификации ДНК и РНК ВИЧ-1,

описаны в литературе. Выбор конкретного метода не имеет существенного значения при практическом осуществлении настоящего изобретения. Специалист в данной области техники может выбрать и оптимизировать пригодные методы получения образца, основываясь на руководстве, представленном в данном описании. Предпочтительные методы подготовки образца, применяемые для обнаружения провирусной ДНК ВИЧ-1, описаны у Casareale и др., 1992, PCR Methods and Applications, 2: 149-153, и у Butcher и Spadaro, 1992, Clin. Immunol. Newsletter, 12: 73-76. Предпочтительный набор для подготовки образца для обнаружения провирусной ДНК ВИЧ-1 имеется на рынке в виде части набора Amplicor HIV-1 Test. Предпочтительные методы подготовки образца, применяемые для обнаружения РНК ВИЧ-1 в плазме, описаны у Mulder и др., 1994, J. Clin. Microbiol. 32(2): 292-300. Предпочтительный набор для подготовки образца для обнаружения и/или количественной оценки РНК ВИЧ-1 имеется на рынке в виде части набора AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Анализ амплифицированного продукта

Праймеры для амплификации и способы по настоящему изобретению пригодны для любого применения, основанного на использовании амплифицированной нуклеиновой кислоты. Например, клонирование и/или секвенирование последовательностей ВИЧ-1 облегчается при использовании праймеров по настоящему изобретению. Методы обнаружения нуклеиновых кислот, амплифицированных с помощью ПЦР, хорошо известны в данной области техники. Метод, который применяется для анализа амплифицированной нуклеиновой кислоты, не имеет существенного значения при практическом осуществлении изобретения и поэтому может использоваться любой пригодный метод. Предпочтительно используют амплификацию РНК ВИЧ-1, как описано в примерах, касающихся количественной оценки содержания вируса.

Примеры способов обнаружения амплифицированной нуклеиновой кислоты включают анализ продукта амплификации с помощью гель-электрофореза и обнаружение с помощью гибридализации с комплементарными олигонуклеотидными зондами.

Пригодные методы анализа для исследования гибридализации мишень-зонд хорошо известны в данной области техники и включают такие методы, как дот-блоттинг и обратный дот-блоттинг.

При использовании метода дот-блоттинга амплифицированную ДНК-мишень иммобилизуют на твердой подложке, такой как нейлоновая мембрана. Комплекс мембрана-мишень инкубируют с меченым зондом при соответствующих условиях гибридализации, негибридизованный зонд удаляют путем промывки в условиях соответствующей строгости и мембрану исследуют на присутствие связанного зонда. Обнаружение с помощью дот-блоттинга продуктов ПЦР-амплификации описано, например, у Saiki и др., 1986, Nature, 324: 163-166, и в патенте США 5468613.

При использовании метода обратного

дот-блоттинга зонды иммобилизуют на твердой подложке, такой как нейлоновая мембрана, и метят амплифицируемую ДНК-мишень. ДНК-мишень обычно метят в процессе амплификации включением меченых праймеров. Один или оба праймера могут быть мечеными. Комплекс мембрана-зонд инкубируют с меченой амплифицируемой ДНК-мишенью при соответствующих условиях гибридализации, негибридизованную ДНК-мишень удаляют путем промывки в условиях соответствующей строгости и затем фильтр исследуют на присутствие связанной ДНК-мишени. Обнаружение с помощью методов обратного дот-блоттинга описано, например, у Saiki и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6230, и в патенте США 5468613.

В альтернативном варианте анализ на основе обратного дот-блоттинга может быть проведен с использованием твердой подложки, имеющей множество сайтов для отжига зонда или лунок. Например, микролуночный планшет наиболее пригоден для крупномасштабных клинических применений методов по настоящему изобретению. Зонды могут быть иммобилизованы на микролуночном планшете либо путем пассивного связывания, либо с помощью промежуточного протеина, такого как бычий сывороточный альбумин (BSA), который прилипает к микролуночным планшетами (см. Tung и др., 1991, Bioconjugate Chem., 2: 464-465). Методы на основе обратного дот-блоттинга, в которых используется микролуночный планшет, описаны в патенте США 5232829; у Loeffelholz и др., 1992, J. Clin. Microbiol., 30(11): 2847-2851; у Jackson и др., 1991, AIDS, 5: 1463-1467; у Mulder и др., 1994, J. Clin. Microbiol. 32(2): 292-300; в инструкции, включенной в коммерческий набор Amplicor HIV-1 Test; и в инструкции, включенной в коммерческий набор AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Предпочтительно обнаружение и/или количественную оценку амплифицированного продукта осуществляют с помощью гибридализации с олигонуклеотидным зондом, иммобилизованным на микролуночном планшете, с использованием реагентов и протоколов Amplicor HIV-1 Test или AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Применение методов по настоящему изобретению для количественной оценки РНК ВИЧ-1 описано ниже в примерах.

В другом варианте зонды, конъюгированные с БСА, связывают с магнитными микрочастицами. Связанные зонды гибридируют в растворе с меченым продуктом амплификации и образовавшийся продукт удаляют из раствора магнитным путем. Иммобилизованные магнитным путем гибридные дуплексы затем выявляют описанными выше способами.

Другой пригодный метод анализа, названный 5'-нуклеазным методом, описан в патентах США 5210015 и 5487972 и у Holland и др., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7276-7280. В 5'-нуклеазном методе меченые обнаруживаемые зонды, которые были модифицированы таким образом, чтобы они не могли действовать в качестве праймеров в синтезе ДНК, добавляют в реакционную смесь в процессе амплификации. Любой зонд,

который гибридизуется с ДНК-мишенью в течение каждой стадии синтеза, т.е. в процессе удлинения праймера, расщепляют с помощью 5'-->3' экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, например ДНК-полимеразы Taq. Затем выявляют продукт разложения зонда. Таким образом, присутствие продукта расщепления зонда свидетельствует как о том, что произошла гибридизация между зондом и ДНК-мишенью, так и о том, что произошла реакция амплификации. В патентах США 5491063 и 5571673 описаны улучшенные способы обнаружения расщепления зонда, которое сопутствует амплификации.

В описанных выше методах анализа для облегчения обнаружения гибридных дуплексов обычно используют меченые олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды могут быть помечены путем включения метки, выявляемой спектроскопическим, фотохимическим, биохимическим, иммунохимическим или химическим методами. Пригодные метки включают ³²P, флуоресцентные краски, электронно-плотные реагенты, ферменты (например, такие, которые используются в методе ELISAS), биотин или гаптены и протеины, для которых доступны антисыворотка или моноклональные антитела. Меченые олигонуклеотиды по изобретению могут быть синтезированы и помечены с использованием способов, описанных выше для синтезируемых олигонуклеотидов.

Альтернативный метод обнаружения амплификации нуклеиновой кислоты ВИЧ-1 путем оценки увеличения общего количества двухцепочечной ДНК в реакционной смеси описан у Higuchi и др., 1992, Bio/Technology, 10: 413-417; Higuchi и др., 1993, Bio/Technology, 11: 1026-1030; и в публикации европейской заявки 512334. Обнаружение двухцепочечной ДНК-мишени основано на возрастании флуоресценции, которая проявляется, когда этидийбромид (EtBr) и другие связывающиеся с ДНК метки связываются с двухцепочечной ДНК. Метку, связывающуюся с ДНК, добавляют в реакционную смесь для амплификации. Амплификация последовательности-мишени приводит к увеличению количества двухцепочечной ДНК, что в свою очередь приводит к обнаруживаемому увеличению флуоресценции.

Настоящее изобретение также относится к наборам, многоконтainerным наборам, содержащим соответствующие компоненты для практического осуществления способа по настоящему изобретению. Такой набор содержит, например, праймеры для ПЦР-амплификации нуклеиновой кислоты ВИЧ-1. Набор также может содержать средства для обнаружения амплифицированной нуклеиновой кислоты ВИЧ-1, такие как олигонуклеотидные зонды. В некоторых случаях зонды фиксируют на соответствующей подложке-мембране. Другие необязательные компоненты набора включают, например, агент, пригодный в качестве катализатора синтеза продуктов удлинения праймера, нуклеозидтрифосфаты в качестве субстрата, средства, применяемые для мечения (например, конъюгат авидин-фермент, или ферментный субстрат и хромоген в том случае, когда метка

представляет собой биотин), соответствующие буферы для ПЦР или реакций гибридизации и инструкции по осуществлению настоящего метода.

Ниже изобретение подробнее проиллюстрировано на примерах, которые не ограничивают объем изобретения. Многочисленные варианты осуществления изобретения в объеме формулы изобретения, которые вытекают из примеров, должны быть очевидны специалистам в данной области техники на основе вышеприведенного описания и последующих примеров.

Пример 1

Конструирование количественного стандарта

Для количественной оценки содержания вируса, осуществляемой с помощью AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, используют количественный стандарт (КС), который амплифицируют с применением той же самой пары праймеров, но который выявляют с использованием другого зонда. КС добавляют к тестируемому образцу в известной концентрации с целью получить известный эталонный сигнал. Для широкого диапазона концентраций мишени сигнал, генерируемый амплифицированной мишенью или амплифицированным КС, пропорционален имеющемуся количеству. Количество копий мишени оценивают путем сравнения сигнала, генерируемого при амплификации неизвестной мишени, и сигнала, генерируемого известным КС.

Праймеры по настоящему изобретению амплифицируют область, которая не полностью охватывается КС, включенным в набор AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test (КС-Ampligor). Поэтому для применения праймеров по настоящему изобретению конструировали новый КС. Новый КС конструировали из КС-Ampligor путем удлинения последовательности КС-Ampligor с целью включить сайты связывания SKCC1 (SEQ ID NO: 3) и SKCC3 (SEQ ID NO: 4). Образовавшийся КС может быть обнаружен с помощью КС-специфического зонда, используемого в AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Конструирование плазмиды, содержащей последовательность нового КС, из которой транскрибируют РНК КС, может быть осуществлено с использованием стандартных методов, как описано ниже.

КС-Ampligor, полученный из AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, амплифицируют с использованием праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1) и SK151 (SEQ ID NO: 7) в условиях, практически соответствующих таковым, которые описаны ниже в примере 2. В результате амплификации получали ДНК-продукт, содержащий сайты связывания для SK145 (SEQ ID NO: 1) и SK151 (SEQ ID NO: 7) и сохраняющий внутреннюю последовательность, содержащую сайт связывания КС-специфического зонда.

Далее образовавшийся амплифицированный продукт удлиняют для включения сайта связывания праймера SKCC1 (SEQ ID NO: 3) и добавляют линкер для возможности клонирования продукта. Этого достигают с помощью повторной амплификации продукта с использованием праймера SK145 (SEQ ID NO: 1), удлиненного на 5'-конце с той целью, чтобы включить линкер HindIII и SKCC1 (SEQ ID NO: 3).

Соответствующие условия амплификации описаны у Kellogg и Kwok, 1990, в PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (ред. Innis и др.), Academic Press, San Diego, CA: 337-347, за исключением того, что используют более низкую температуру отжига/удлинения (например, 42°C) для гибридизации SKCC1 (SEQ ID NO: 3).

После этого образовавшийся амплифицированный продукт еще раз удлиняют для включения сайта связывания праймера SKCC3 (SEQ ID NO: 4) и добавляют второй линкер к другому концу для возможности клонирования продукта. Этого достигают с помощью амплификации продукта с использованием праймера SK145 (SEQ ID NO: 1), удлиненного на 5'-конце с той целью, чтобы включить линкер HindIII, как описано выше, наряду с праймером SKCC3 (SEQ ID NO: 4), удлиненным на 5'-конце для включения линкера XbaI с использованием описанных выше условий амплификации.

Затем амплифицированный продукт встраивают в плазмиду. Амплифицированную ДНК и плазмиду pSP64 (фирма Promega, Madison, WI) по отдельности расщепляют с помощью HindIII и XbaI, а затем лигируют с использованием стандартных методов. Компетентные клетки трансформируют рекомбинантными плазмидами и получают клон, который содержит правильную вставку. Клонированную вставку в полученной рекомбинантной плазмиде необходимо секвенировать с целью определить, что в сайты связывания праймера или зонда не введены мутации.

РНК количественного стандарта транскрибируют исходя из рекомбинантной плазмиды, содержащей КС-последовательность, с использованием набора MEGAscript™ SP6 (фирма Ambion, Inc., Austin, TX).

Пример 2

Количественная оценка РНК ВИЧ-1

В этом примере описан способ оценки относительной эффективности амплификации различных изолятов ВИЧ-1. Для сравнения также осуществляли амплификации с использованием набора AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Изоляты ВИЧ-1 получали из ВИЧ-1-положительных клинических образцов. Область гена gag клонировали и секвенировали по стандартным методам, а подтип клонируемого ВИЧ-1 определяли, основываясь на анализе последовательности. Был обнаружен ряд новых изолятов ВИЧ-1. Для этой цели на основе нуклеотидных последовательностей выбирали определенные изоляты, для которых предполагалось наличие проблем при использовании набора AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Кроме того, использовали изоляты, которым была присуща вариабельность последовательности, характерная для подтипов группы М.

Нуклеиновая кислота-мишень

Конструировали плазмиды, содержащие область гена gag ВИЧ-1 из каждого изолята, и РНК-матрицы ВИЧ-1 транскрибировали практически в соответствии с методом, описанным у Holodniy и др., 1991, J. Inf. Dis., 163: 802-865. Готовили маточные

растворы каждой матрицы и определяли концентрации матриц. Маточные растворы разбавляли, основываясь на определении относительных концентраций, таким образом, чтобы концентрация матриц, добавляемых в каждую реакцию, была одинаковой. Абсолютное количество копий матрицы, добавляемых в реакционные смеси, составляло приблизительно 4000-8000.

Количественный стандарт

КС, описанный в примере 1, вносили в каждую реакцию смесь в известной концентрации, обычно приблизительно 100 копий на реакцию смесь.

Праймеры

Реакции А-Е осуществляли с использованием комбинаций праймеров, представленных в табл. А.

Все праймеры биотинилировали на 5'-конце для обнаружения методом обратного дот-блоттинга на микролуночном планшете. Последовательности дополнительных, не описанных выше праймеров приведены ниже в ориентации 5'-->3'.

Праймеры, иницирующие синтез против хода транскрипции:

SK462 (SEQ ID NO: 5)
AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

Праймеры, иницирующие синтез по ходу транскрипции:

SK431 (SEQ ID NO: 6)
TGCTATGTCACTTCCCCTTGGTTCTCT
SK151 (SEQ ID NO: 7)
TGCTATGTCACTTCCCCTTGGTTCTCT

Амплификация

Реакцию амплификации А проводили с использованием реагентов и условий из набора AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Реакцию амплификации Б проводили в объемах по 100 мкл, содержащих следующие реагенты:

РНК-матрица ВИЧ-1

РНК КС

50 mM бисин, pH 8,3

111 mM K(OAc)

3,6 mM Mn(OAc)₂

500 мкМ дУТФ

300 мкМ каждого из дАТФ, дЦТФ и дГТФ

50 мкМ дТТФ

15%-ный глицерин

0,2 мкМ каждого биотинилированного праймера

2 единицы урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ)*

10 единиц ДНК-полимеразы rTth*

*Производство и разработка фирмы Hoffmann-La Roche и продажа фирмой Perkin Elmer (Norwalk, CT).

Реакции амплификации В и Г осуществляли практически при таких же условиях, которые использовались в реакции Б, но со следующими изменениями:

100 mM K(OAc)

500 мкМ каждого из дАТФ, дЦТФ и дГТФ

7,5%-ный глицерин

10 единиц УДГ

Реакции амплификации Д и Е осуществляют практически при таких же условиях, которые использовались в реакциях В и Г, но за исключением того, что используемая концентрация глицерина составляла 10%. Небольшие различия в реакционных смесях были результатом предварительной оптимизации условий амплификации для каждой пары праймеров.

Реакции амплификации Б-Е проводили в

ДНК-термоячейке типа TC9600 (фирма Perkin Elmer, Norwalk, CT) с использованием следующего температурного профиля:

инкубация перед реакцией: - 50 °C в течение 2 мин

обратная транскрипция: - 60 °C в течение 30 мин

4 цикла: денатурация: - 95°C в течение 10 с

отжиг: - 55°C в течение 10 с

удлинение: - 72°C в течение 10 с

26 циклов: денатурация: - 90 °C в течение 10 с

отжиг: - 60°C в течение 10 с

удлинение: - 72°C в течение 10 с

окончательное удлинение: - 72°C в течение 15 мин

Обнаружение амплифицированного продукта с помощью гибридизации с зондом

Амплифицированные продукты выявляли с использованием реагентов и протоколов из набора AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Оцениваемую начальную концентрацию мишени вычисляли в соответствии с настоящим описанием.

Результаты

При использовании количественного метода AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test начальную концентрацию мишени оценивают путем сравнения сигнала, генерированного после амплификации мишени, с сигналом, генерированным после амплификации КС известной концентрации. Поскольку известная концентрация КС представляет собой концентрацию перед амплификацией, а сравниваемые сигналы представляют собой сигналы, полученные после амплификации, то изменения в относительной эффективности амплификации должны оказывать влияние на оценку начальной концентрации неизвестной мишени. При количественной оценке с помощью AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test используют калибровку, основанную на эффективности амплификации подтипа В ВИЧ-1. Известно, что другие подтипы ВИЧ-1 могут амплифицироваться с более низкой эффективностью и, следовательно, оцениваемая концентрация мишени может быть занижена по сравнению с истинной.

В настоящем эксперименте к каждой реакционной смеси добавляли РНК-мишень в известной концентрации. Таким образом, относительная эффективность амплификации для каждого изолята может быть определена путем сравнения оцениваемых концентраций мишени. Поскольку при количественной оценке в наборе AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test используют калибровку, основанную на эффективности амплификации подтипа В ВИЧ-1, в качестве эталона использовали оцениваемую концентрацию мишени подтипа В (клон 105-1). Для каждого изолята оцениваемую концентрацию мишени подтипа В (клон 105-1) соотносили с оцениваемой концентрацией мишени для изолята, получая меру относительной эффективности амплификации. Эти относительные эффективности амплификации приведены в табл. 1. Символ "----" обозначает, что реакцию не проводили.

Результаты показывают, что при использовании набора AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test (реакция А) различные изоляты ВИЧ-1 амплифицировались с

существенно различной эффективностью. Некоторые из изолятов, включая изолят подтипа Е, клон 110-5, амплифицировались с эффективностью по крайней мере приблизительно в 500 раз более низкой, чем эффективность амплификации клона 105-1 подтипа В.

Хотя не все изоляты были исследованы, применение пары праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1) и SK151 (SEQ ID NO: 7) (реакция Б) позволило существенно выровнять эффективность амплификации. Однако клон 110-5 подтипа Е по-прежнему амплифицировался с эффективностью по крайней мере приблизительно в 500 раз более низкой, чем эффективность амплификации клона 105-1 подтипа В.

Применение праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1) и SKCC1 (SEQ ID NO: 3) (реакция В) позволило амплифицировать все изоляты, включая изолят подтипа Е, клон 110-5, с эффективностью приблизительно в 3 раза меньшей, чем эффективность амплификации клона 105-1 подтипа В. Добавление праймера SK145M2 (SEQ ID NO: 2) (реакция Г) еще более улучшило эффективность амплификации изолята 110-5, сделав ее практически равной таковой для эталонного штамма подтипа В.

Аналогично этому применение праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1) и SKCC3 (SEQ ID NO: 4) (реакция Д) позволило амплифицировать все изоляты, включая изолят подтипа Е, клон 110-5, с эффективностью приблизительно в 5 раз меньшей, чем эффективность амплификации клона 105-1 подтипа В. Добавление праймера SK145M2 (SEQ ID NO: 2) (реакция Е) еще более улучшило эффективность амплификации изолята 110-5, сделав ее практически равной таковой для эталонного штамма подтипа В.

Пример 3

Количественная оценка ВИЧ-1 в клинических образцах

В этом примере 30 клинических образцов, полученных от пациентов из Сенегала с положительной серологической реакцией, анализировали на присутствие РНК ВИЧ-1. Подтипы, присутствующие в клинических образцах, не определяли. Однако подтипы А и D являются обычными для этого региона Африки, поэтому следовало ожидать, что некоторые из этих клинических образцов либо не будут амплифицироваться вовсе, либо будут амплифицироваться неэффективно при использовании AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Образцы готовили следующим образом. Образцы плазмы (80-250 мкл) объединяли в конической центрифужной пробирке объемом 1,5 мл с 20 мкл 0,25% (мас. /об.) красных полистироловых микросфер типа Estapor (фирма Bangs Laboratories, Inc., Carmel, IN) и центрифугировали в течение 1 ч при 25300xg при 4°C. Супернатант отсасывали и дебрис ресуспендировали в 250 мкл лизирующего буфера (50 мкл лизирующего буфера содержит 6,7 мкл 30 ед/мл RNasin (фирма Promega, Madison, WI); 0,67 мкл 100 мМ дитиотреитола (ДТТ); 2 мкл 10%-ного NP40 (фирма Pierce, Rockford, IL); 0,25 мкл 4 мг/мл poly-rA РНК; и 40,4 мкл обработанной Дертс Н₂О). Дебрисы инкубировали при комнатной температуре в течение по крайней мере 15 мин и интенсивно перемешивали для

обеспечения полного смешения.

Амплификации осуществляли в реакционных смесях объемом 100 мкл, содержащих 50 мкл раствора вирусного лизата и 50 мкл 2-кратной смеси амплифицированных реагентов, составленной таким образом, чтобы конечная концентрация реагента соответствовала указанной выше. В каждую реакционную смесь в виде части смеси реагентов добавляли приблизительно 100 копий соответствующего КС. Обнаружение амплифицированного продукта осуществляли с использованием реагентов и протоколов AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, как описано выше.

Амплификации каждого образца проводили с комбинациями праймеров, представленных в табл. В.

Результаты, выраженные в виде количества копий ВИЧ-1-матрицы на 1 мл плазмы, обобщены в табл. 2.

Результаты свидетельствуют о том, что комбинации праймеров Б и В по настоящему изобретению позволяют амплифицировать большее количество клинических образцов. Комбинации праймеров Б и В позволяют амплифицировать все, кроме одного, из 30 образцов. В противоположность этому при использовании AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test не удалось амплифицировать 6 из 29 образцов. Амплификация образца MIN 053 с использованием AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test привела к получению сильного сигнала от мишени, но не удалось генерировать сигнал КС. Поэтому не удалось оценить количественно этот образец и он обозначен символом "+" в табл. 2.

Кроме того, для значительного количества образцов количество копий, выявленных с использованием как комбинации праймеров Б, так и В, было значительно выше, чем таковое, выявленное с использованием AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Учитывая вариабельность эффективности амплификации, которая показана выше в примере 2, можно предположить, что более низкие выявленные концентрации матрицы, полученные с использованием AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, вероятно являются результатом существенно более низкой эффективности амплификации.

Вирусная РНК не была обнаружена в образце MIN 067. Однако неизвестно, является ли это следствием невыявленной

вариабельности

последовательности-мишени, что служит помехой для гибридизации праймера или зонда, либо это обусловлено какой-либо иной причиной.

5

Формула изобретения:

1. Олигонуклеотидный праймер, предназначенный для амплификации нуклеиновой кислоты вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), причем олигонуклеотидный праймер выбирают из группы, включающей SKCC1 (SEQ ID NO: 3) и SKCC3 (SEQ ID NO: 4).

10

2. Пара олигонуклеотидных праймеров, предназначенная для амплификации нуклеиновой кислоты вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) и состоящая из SK145 (SEQ ID NO: 1) и SKCC1 (SEQ ID NO: 3) или из SK145 (SEQ ID NO: 1) и SRCC3 (SEQ ID NO: 4).

15

3. Набор олигонуклеотидных праймеров, предназначенный для амплификации нуклеиновой кислоты вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) и состоящий из пары олигонуклеотидных праймеров по п. 2 и SK145M2 (SEQ ID NO: 2).

20

4. Набор, предназначенный для амплификации нуклеиновой кислоты вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), включающий олигонуклеотидный праймер по п. 1, или пару праймеров по п. 2, или набор праймеров по п. 3.

25

5. Способ амплификации нуклеиновой кислоты вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), включающий осуществление полимеразной цепной реакции с использованием по крайней мере одного праймера SKCC1 (SEQ ID NO: 3) или SKCC3 (SEQ ID NO: 4).

30

6. Способ по п. 5, где полимеразную цепную реакцию осуществляют с использованием праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1) и SKCC1 (SEQ ID NO: 3).

35

7. Способ по п. 6, где полимеразную цепную реакцию осуществляют также с использованием праймера SK145M2 (SEQ ID NO: 2).

40

8. Способ по п. 5, где полимеразную цепную реакцию осуществляют с использованием праймеров SK145 (SEQ ID NO: 1) и SKCC3 (SEQ ID NO: 4).

45

9. Способ по п. 8, где полимеразную цепную реакцию осуществляют также с использованием праймера SK145M2 (SEQ ID NO: 2).

50

55

60

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ:

- (A) ИМЯ: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
- (B) УЛИЦА: Grenzacherstrasse 124
- (C) ГОРОД: Базель
- (D) КАНТОН: BS
- (E) СТРАНА: Швейцария
- (F) ПОЧТОВЫЙ КОД (ZIP): CH-4070
- (G) ТЕЛЕФОН: 061 - 688 37 82
- (H) ТЕЛЕФАКС: 061 - 688 13 95
- (I) ТЕЛЕКС: 962292/965542 hlr ch

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Праймеры для обнаружения ВИЧ-1

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 7

(iv) ФОРМА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРА:

- (A) ТИП НОСИТЕЛЯ: флоппи-диск
- (B) КОМПЬЮТЕР: Apple Macintosh
- (C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: System 7.1 (Macintosh)
- (D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: Word 5.1

(vi) ДАННЫЕ О ПРИОРИТЕТНОЙ ЗАЯВКЕ:

- (A) НОМЕР ЗАЯВКИ: 60-037744
- (B) ДАТА ПОДАЧИ: 17.01.97

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 30 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 1:

AGTGGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT

30

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 30 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота

- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 2:

AGTGGGGGGA CACCAGGCAG CAATGCAAAT

30

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 28 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 3:

ТАСТАGТАGT TCCTGCTATG TCACTTCC

28

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 26 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 4:

TGAAGGGTAC TAGTAGTTCC TGCTAT

26

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 30 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 5:

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 27 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 6:

TGSTATGTCA GTTCCCSTTG GTTCTCT

27

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO: 7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 27 пар оснований
- (B) ТИП: нуклеиновая кислота
- (C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
- (D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: ДНК (геномная)

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 7:

TGSTATGTCA STTCCCSTTG GTTCTCT

27

Сравниваемые комбинации праймеров

Таблица А

<u>Реакция</u>	<u>Комбинация праймеров</u>
А	SK462 (SEQ ID NO: 5)
	SK431 (SEQ ID NO: 6)
Б	SK145 (SEQ ID NO: 1)
	SK151 (SEQ ID NO: 7)
В	SK145 (SEQ ID NO: 1)
	SKCC1 (SEQ ID NO: 3)
Г	SK145 (SEQ ID NO: 1) и SK145M2 (SEQ ID NO: 2)
	SKCC1 (SEQ ID NO: 3)
Д	SK145 (SEQ ID NO: 1)
	SKCC3 (SEQ ID NO: 4)
Е	SK145 (SEQ ID NO: 1) и SK145M2 (SEQ ID NO: 2)
	SKCC3 (SEQ ID NO: 4)

Клон	Подтип	А	Б	В	Г	Д	Е
113-1	А	694,3	1,7	0,9	1,4	1,4	0,9
113-2	А	19	---	1,3	1,1	1,3	0,6
114-1	А	12,4	---	1,4	1,3	0,7	0,9
114-2	А	9,8	1,2	1,1	1,8	1,5	0,8
115-1	А	497,6		0,8	1,2	1	1,6
115-2	А	646,4	2,4	1	1,5	0,9	1,4
105-1	В	1	1	1	1	1	1
101-15	С	7,3	---	1,1	3,5	1,9	1,4
107-6	Д	0,8	---	0,6	0,7	0,7	0,8
308-1	Д	0,9	---	0,6	0,7	0,7	0,5
110-5	Е	520,7	465,7	3,5	1,2	4,6	0,8
111-6	Е	0,8	---	1,1	1,6	0,9	1,1
112-7	Е	3,3	0,8	1,5	1,9	1,2	1,4
106-1	Г	1,9	---	2,3	2	1,8	1,5
108-3	Г	0,6	---	0,5	0,8	0,5	0,5
Клон	Подтип	А	Б	В	Г	Д	Е
109-1	Г	32,5	1	0,5	0,6	0,6	0,3

Таблица В

Сравниваемые комбинации праймеров

Реакция	Комбинация праймеров
А	SK462 (SEQ ID NO: 5) SK431 (SEQ ID NO: 6)
Б	SK145 (SEQ ID NO: 1) SKCC1 (SEQ ID NO: 3)
В	SK145 (SEQ ID NO: 1) и SK145M2 (SEQ ID NO: 2) SKCC1 (SEQ ID NO: 3)

Изолят	А	Б		В	
		дубликат		дубликат	
DKN 035	0	800	1860	1600	1100
DKN 079	360	30060	37240	91780	152300
DKN 154	1140	21660	54560	68820	67120
DKN 162	0	16020	25980	64340	21880
DKN 162	0	12180	10520	14300	18320
DKN 169	0	3140	7000	5651	8047
DKN 171	1180	640	500	560	1040
DKN 282	560	3400	4360	5560	3460
DKN 402	340	4260	10520	7000	5060
MBN 26	27740	16940	19220	16700	18680
MBN 31	180	1820	1820	1720	2240
MBN 34	840	2160	2200	3100	3120
MIH 002	2320	51320	121100	144180	123900
MIH 012	2960	33620	40920	40740	75840
MIH 013	30360	31980	55360	42800	71220
MIH 030	17625	178500	273938	169750	189625
MIH 053	+	534960	231620	530900	878340
MIH 055	10560	43960	54220	49400	37400

(продолжение таблицы 2)

Изолят	А	Б		В	
		дубликат		дубликат	
МІН 074	5700	3980	6020	3640	4940
МІН 112	30480	271980	490780	423600	416140
МІН 157	520	165480	82920	169980	146320
MIN 003a	1300	57720	21620	35380	34560
MIN 003b	1760	32820	30940	27760	26600
MIN 017	540	437380	375120	447740	902780
MIN 067	0	0	0	0	0
MIN 126	44320	63600	38460	56680	40300
MIN 139	460	146320	142800	94520	105600
MIN 146	200	49920	32100	19900	30400
MIN 217	0	3220	1880	2320	2580
MIN 589	154780	267740	127100	144160	228040