



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
CI2Q 1/689 (2015.12)

(21)(22) Заявка: 2013148806, 02.04.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.04.2012

Дата регистрации:
13.02.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
01.04.2011 US 61/470,774

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2015 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 13.02.2018 Бюл. № 5

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 01.11.2013

(86) Заявка РСТ:
US 2012/031814 (02.04.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/135815 (04.10.2012)

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

(72) Автор(ы):

ЦЯНЬ Минвэй (US)

(73) Патентообладатель(и):

ОККАМ БАЙОЛЭБС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: JP 0011225797 A, 24.08.1999. US
0006183999 B2, 06.02.2001. US 0007270982 B2,
18.09.2007. RU 98116294 A, 27.06.2000. EA
14648 B1, 30.12.2010.

R U 2 6 4 4 6 7 2 C 2

(54) СПОСОБЫ И НАБОРЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕСКЛЕТОЧНЫХ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДЛЯ ПАТОГЕНОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Описан способ обнаружения целевой нуклеиновой кислоты, полученной из последовательности ДНК *Mycobacterium tuberculosis* (TB) H37Rv, выбранной из группы, включающей IS6110, IS1084, MPT 64, rrs, esat6, esat6-like, MDR, groB, katG, iniB и их фрагменты, у субъекта. Способ включает амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты парой

праймеров, где целевую нуклеиновую кислоту получают из бесклеточной фракции образца крови, плеврального экссудата и/или цереброспинальных жидкостей (ЦСЖ) субъекта, и в результате получают двухцепочечную ДНК, и обнаружение двухцепочечной ДНК, где наличие двухцепочечной ДНК указывает на присутствие целевой нуклеиновой кислоты у субъекта. 15 з.п. ф-лы, 5 ил., 2 табл., 4 пр.

R U 2 6 4 4 6 7 2 C 2

R U 2 6 4 6 7 2 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19)

RU (11)

2 644 672⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12Q 1/689 (2015.12)

(21)(22) Application: 2013148806, 02.04.2012

(24) Effective date for property rights:
02.04.2012

Registration date:
13.02.2018

Priority:

(30) Convention priority:
01.04.2011 US 61/470,774

(43) Application published: 10.05.2015 Bull. № 13

(45) Date of publication: 13.02.2018 Bull. № 5

(85) Commencement of national phase: 01.11.2013

(86) PCT application:
US 2012/031814 (02.04.2012)

(87) PCT publication:
WO 2012/135815 (04.10.2012)

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

(72) Inventor(s):
TSYAN Minvej (US)

(73) Proprietor(s):
OKKAM BAJOLEBS, INK. (US)

R U

2 6 4 4 6 7 2

C 2

(54) METHODS AND KITS FOR DETECTION OF CELL-FREE NUCLEIC ACIDS SPECIFIC FOR PATHOGENES

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for detection of a target nucleic acid derived from Mycobacterium tuberculosis (TB) H37Rv DNA sequence, selected from the group consisting of IS6110, IS1084, MPT 64, rrs, esat6 esat6-like, MDR, rpoB, katG, iniB and their fragments, from the subject. The method includes amplification of the nucleic acid sequence of the target nucleic acid by a pair of primers, where the target nucleic acid is

produced from a cell-free blood sample fraction, pleural exudate and/or cerebrospinal liquids (CSL) of the subject.

EFFECT: method results in obtaining of a double-chain DNA, and detection of the double-chain DNA, where the presence of the double-chain DNA indicates the presence of the target nucleic acid in the subject.

16 cl, 5 dwg, 2 tbl, 4 ex

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По данной заявке приоритет предварительной патентной заявки США № 61/470774, поданной 1 апреля 2011 г., содержание которой включено в настоящее описание полностью во всех отношениях.

5 Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к способам и наборам, полезным для обнаружения специфических для патогенов нуклеиновых кислот у субъекта.

Уровень техники

Большое число патогенных инфекций вызывает серьезные заболевания. Раннее

10 обнаружение патогенов у индивидуумов играет важную роль при постановке диагноза и лечении заболеваний или расстройств, которые, как известно, связаны с такими патогенами. Туберкулез является известным инфекционным заболеванием, вызываемым различными штаммами микобактерий, обычно *Mycobacterium tuberculosis*. Во многих случаях он приводит к летальному исходу. Туберкулез диагностируют однозначно

15 путем идентификации *Mycobacterium tuberculosis* в клиническом образце (например, в мокроте или гное) путем микробиологического выращивания образца. Неокончательный диагноз может быть сделан с использованием других тестов, таких как радиология (например, флюорография), туберкулиновая кожная проба и анализ высвобождения гамма-интерферона (IGRA).

20 Методику полимеразной цепной реакции (ПЦР) используют для обнаружения *Mycobacterium tuberculosis* в образцах, например, в мокроте, моче, содержимом желудка, цереброспинальной жидкости, плевральной жидкости, крови и материалах из гноевых карманов, костного мозга, образцов биопсии, отсеченных тканей или трансбронхиальной биопсии, чтобы обеспечить раннюю диагностику ТВ. Сообщалось об обнаружении ТВ

25 ДНК во фракции лейкоцитов периферической крови у всех 8 пациентов с подтвержденным легочным ТВ в одном исследовании и у 39 пациентов из 41 пациента с подтвержденным ТВ в другом исследовании (Schluger et al., Lancet 344:232-3 (1994); Cordos et al. Lancet 347:1082-5 (1996)). Однако эти результаты подвергнуты критике

30 другими исследователями, изучающими диагностику ТВ на основе ПЦР крови (Kolk et al. Lancet 344:694 (1994); Palenque et al. Lancet 344:1021 (1994); Aguado et al. Lancet 347: 1836-7 (1996)). В последние два десятилетия предприняты огромные усилия по применению «ПЦР-анализа крови на ТВ» для диагностики туберкулеза, но с весьма ограниченным успехом.

35 Большинство нуклеиновых кислот (например, ДНК и РНК) в организме расположено внутри клеток, но небольшое количество нуклеиновых кислот найдено циркулирующими свободно в плазме индивидуумов. Такие молекулы ДНК и РНК, как полагают, происходят из умерших клеток, которые высвобождают их содержимое в кровь, когда они разрушаются.

40 Обнаружение целевой РНК, полученной из ДНК патогена, может быть использовано для установления отличия активной инфекции от скрытой инфекции. Например, обнаружение целевой РНК, полученной из *Mycobacterium tuberculosis* (ТВ), может быть использовано, чтобы отличить активную ТВ инфекцию от скрытой ТВ инфекции, и может быть полезно для диагностики ТВ. Циркулирующие нуклеиновые кислоты (ЦНК) представляют собой ДНК или РНК, найденные в токе крови. После обнаружения ДНК

45 плода в материнской периферической крови бесклеточные ДНК и РНК из опухолей, ксенотрансплантатов, трансплантатов и паразитов были найдены в периферической крови реципиента. Обнаружение ЦНК было изучено в качестве неинвазивной диагностики ряда клинических состояний. К сожалению, оно не было успешно

адаптировано для обнаружения специфических для патогена циркулирующих нуклеиновых кислот с высокой селективностью и высокой специфичностью.

Таким образом, остается потребность в способе раннего обнаружения патогенов у индивидуумов, например, *Mycobacterium tuberculosis*, с высокой селективностью и высокой специфичностью.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к обнаружению бесклеточных специфических для патогена нуклеиновых кислот у субъекта и к соответствующим наборам для обнаружения.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предложен способ обнаружения целевой нуклеиновой кислоты, полученной из патогена, у субъекта. Способ включает амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты, которая получена из бесклеточной фракции образца крови субъекта. В результате получают двухцепочечную ДНК. Способ дополнительно включает обнаружение двухцепочечной ДНК. Наличие двухцепочечной ДНК указывает на присутствие целевой нуклеиновой кислоты у субъекта. Бесклеточная фракция предпочтительно представляет собой сыворотку крови, плазму крови, плевральную жидкость, или ЦСЖ, более предпочтительно сыворотку крови или плазму крови.

Патоген может быть выбран из группы, включающей бактерии, грибы и паразиты.

Предпочтительно патогеном является *Mycobacterium tuberculosis* (ТВ).

Целевой нуклеиновой кислотой может быть ДНК или РНК. Последовательность нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты может быть получена из последовательности ДНК *Mycobacterium tuberculosis* (ТВ) H37Rv, например, выбранной из группы, включающей IS6110, IS1084, MPT 64, rrs, esat6, esat6-like, MDR, groB, katG, iniB и их фрагменты. Двухцепочечная ДНК может иметь меньше, чем 100 п.о., предпочтительно 40-60 п.о.

Образец крови субъекта может быть в количестве 0,2-10 мл, предпочтительно 2-5 мл.

Последовательность нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты может быть амплифицирована полимеразной цепной реакцией (ПЦР), полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) или лигазной цепной реакцией (ЛЦР). Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты амплифицируют с помощью ПЦР.

Двухцепочечная ДНК может быть обнаружена с использованием детектирующего агента. Детектирующим агентом может быть флуоресцентно-меченный зонд (например, Тақман-зонд, молекулярный маяк или Scorpin), интеркалирующий флуоресцентный краситель или праймер Light Upon Extension (LUX). Предпочтительно детектирующим агентом является интеркалирующий флуоресцентный краситель. Интеркалирующий флуоресцентный краситель может быть выбран из группы, включающей SYBR Green, CytoGreen, Eva Green, BOXTO и SYTO9.

Способ может дополнительно включать концентрирование целевой нуклеиновой кислоты в бесклеточной фракции.

Способ может дополнительно включать получение бесклеточной фракции из образца крови.

Способ может дополнительно включать диагностирование ТВ инфекции у субъекта. ТВ инфекция может быть активной или скрытой.

В соответствии с другим аспектом изобретения предложен набор для обнаружения целевой нуклеиновой кислоты, полученной из патогена, у субъекта. Набор включает

один или несколько реагентов или материалов для амплификации последовательности нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты, которая может представлять собой ДНК или РНК, полученной из бесклеточной фракции образца крови субъекта, с получением двухцепочечной ДНК. Набор дополнительно включает один или несколько реагентов или материалов для обнаружения двухцепочечной ДНК. Патоген может быть выбран из группы, включающей бактерии, грибы и паразиты, предпочтительно *Mycobacterium tuberculosis* (ТВ). Последовательность нуклеиновой кислоты может быть получена из последовательности ДНК *Mycobacterium tuberculosis* (ТВ) H37Rv, выбранной из группы, включающей IS6110, IS1084, MPT 64, rrs, esat6, esat6-like, MDR, groB, katG, iniB и их фрагменты.

Один или несколько реагентов или материалов для амплификации последовательности целевой нуклеиновой кислоты могут включать пару праймеров, и двухцепочечная ДНК может иметь 40-60 нуклеотидов. Пара праймеров может иметь последовательности GGTCAAGCACGATTGGAG (SEQ ID NO:1) и GCCAACACCAAGTAGACGG (SEQ ID NO: 2).

Один или несколько реагентов или материалов для обнаружения двухцепочечной ДНК включают флуоресцентно-меченный зонд (например, Тақман-зонд, молекулярный маяк или Scorpin), интеркалирующий флуоресцентный краситель или праймер Light Upon Extension (LUX), предпочтительно интеркалирующий флуоресцентный краситель. Интеркалирующий флуоресцентный краситель может быть выбран из группы, включающей SYBR Green, CytoGreen, Eva Green, BOXTO и SYTO9.

Краткое описание фигур

На фиг.1 показаны (А) кривые амплификации и (В) кривые плавления для продуктов быстрой ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием геномной ДНК в качестве матриц.

На фиг.2 показаны (А) кривые амплификации и (В) кривые плавления для продуктов быстрой ПЦР в реальном времени для обнаружения ТВ в плазме обезьян.

На фиг.3 показаны (А) кривые амплификации и (В) кривые плавления для продуктов быстрой ПЦР в реальном времени для обнаружения ТВ у людей с использованием фракций плазмы от 6 индивидуумов, у которых клинически диагностирован ТВ (ТВ, стрелка А), или от 2 индивидуумов, у которых клинически ТВ не диагностирован (не-ТВ, стрелка В).

На фиг.4 показаны (А) кривые амплификации и (В) кривые плавления для продуктов быстрой ПЦР в реальном времени для обнаружения ТВ у людей с клинически диагностированным ТВ с использованием бесклеточной фракции образца плеврального экссудата от индивидуума (стрелка А) и фракции осадка того же образца плеврального экссудата (стрелка В).

На фиг.5 показаны (А) кривые амплификации и (В) кривые плавления для продуктов быстрой ПЦР в реальном времени для обнаружения ТВ у двух людей, А и В, у которых клинически диагностирован ТВ, с использованием бесклеточных фракций образцов плазмы (ПЗ) и ЦСЖ от каждого индивидуума.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на открытии нового теста для амплификации нуклеиновой кислоты (NAAT) для обнаружения целевых нуклеиновых кислот, полученных из патогенов, таких как *Mycobacterium tuberculosis*, у субъекта.

Настоящее изобретение предлагает способ обнаружения целевой нуклеиновой кислоты, полученной из патогена, у субъекта. Способ включает амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты, которую

получают из бесклеточной фракции биологического образца субъекта. В результате получают двухцепочечную ДНК. Способ дополнительно включает обнаружение двухцепочечной ДНК. Наличие двухцепочечной ДНК указывает на присутствие целевой нуклеиновой кислоты у субъекта.

- 5 Субъектом может быть животное, включая млекопитающего, например, человека, мышь, корову, лошадь, курицу, собаку, кошку и кролика. Животным может быть сельскохозяйственное животное (например, лошадь, корова и курица) или домашний питомец (например, собака и кошка). Субъектом предпочтительно является человек или мышь, предпочтительно человек. Субъектом может быть самец или самка.
- 10 Субъектом также может быть новорожденный, ребенок или взрослый. Субъект может страдать или может быть предрасположен к заболеванию или медицинскому состоянию.

Патоген может быть выбран из группы, включающей бактерию, паразит и грибы. Бактерия может представлять собой *Brucella*, *Treponema*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Legionella*, *Helicobacter*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* или *Bacillus*; и более предпочтительно *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Clostridium novyi*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus anthracis*, наиболее предпочтительно *Mycobacterium tuberculosis*.

- 15 Паразитом может быть *Trichomonas*, *Toxoplasma*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Schistosoma*, *Filariae*, *Ascaria* или *Fasciola*; и более предпочтительно *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parva*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica*, *Schistosoma*, *Filariae*, *Ascaria* или *Fasciola hepatica*.

- 20 Определение «нуклеиновая кислота», используемое в данном описании, относится к полинуклеотиду, содержащему два или более нуклеотидов. Нуклеиновой кислотой может быть ДНК или РНК. «Разновидностью» нуклеиновой кислоты является полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, идентичную последовательности ее исходной нуклеиновой кислоты, за исключением того, что имеет, по меньшей мере, один нуклеотид, модифицированный, например, делецией, вставкой или заменой, соответственно. Разновидность может иметь нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, приблизительно на 80%, 90%, 95% или 99%, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 95% идентичную нуклеотидную последовательности исходной нуклеиновой кислоты.
- 25
- 30

- 35 Выражение «получена из», используемое в данном описании, относится к происхождению или источнику и может включать существующие в природе, рекомбинантные, неочищенные или очищенные молекулы. Нуклеиновая кислота, полученная из исходной нуклеиновой кислоты, может содержать исходную нуклеиновую кислоту, частично или целиком, и может представлять собой фрагмент или
- 40 разновидность исходной нуклеиновой кислоты.

- 45 «Целевая нуклеиновая кислота» в способе согласно настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, ДНК или РНК, которая должна быть обнаружена. Целевая нуклеиновая кислота, полученная из организма, представляет собой полинуклеотид, который имеет последовательность, полученную из последовательности организма, и является специфической для этого организма. Целевая нуклеиновая кислота, полученная из патогена, относится к полинуклеотиду, имеющему полинуклеотидную последовательность, полученную из последовательности, которая специфична для патогена. Например, целевая нуклеиновая кислота может быть получена

из *Mycobacterium tuberculosis* (TB) H37Rv и содержит последовательность, специфическую для штамма H37Rv. Примеры подходящих специфических последовательностей TB штаммов H37Rv включают последовательности IS6110, IS6184, MPT 64, rrs, esat6, esat6-like, MDR, groB, katG, iniB и их фрагменты. Целевая нуклеиновая кислота может быть любой длины, предпочтительно может иметь приблизительно 30-150 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно 40-100 нуклеотидов.

Биологический образец может представлять собой любой образец, полученный из субъекта. Примеры биологических образцов включают физиологическую жидкость, клетки и ткани. Физиологическая жидкость может представлять собой сыворотку крови или плазму, слизь (включая назальные выделения и мокроту), перитонеальную жидкость, плевральную жидкость, жидкость грудной клетки, слону, мочу, синовиальную жидкость, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), жидкость плевральной полости, абдоминальную жидкость, асцита или перикардиальную жидкость. Предпочтительно биологическим образом является образец крови. Биологический образец из субъекта может иметь любой объем, например, приблизительно 0,2-10 мл, предпочтительно приблизительно 0,5-10 мл, более предпочтительно приблизительно 2-10 мл, наиболее предпочтительно приблизительно 2-5 мл. Бесклеточная фракция предпочтительно представляет собой сыворотку крови, плазму крови, плевральную жидкость или ЦСЖ, более предпочтительно сыворотку крови или плазму крови.

Определение «бесклеточная фракция» биологического образца, используемое в данном случае, относится к фракции биологического образца, которая по существу не содержит клетки. Определение «по существу не содержит клетки», используемое в данном описании, относится к препарату из биологического образца, содержащему меньше, чем приблизительно 20000 клеток на мл, предпочтительно меньше, чем приблизительно 2000 клеток на мл, более предпочтительно меньше, чем приблизительно 200 клеток на мл, наиболее предпочтительно меньше, чем приблизительно 20 клеток на мл. Бесклеточная фракция может быть по существу свободна от геномной ДНК хозяина. Геномная ДНК хозяина представляет собой большие куски ДНК (например, длиннее, чем приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 100 или 200 т.п.н.), полученные из субъекта. Например, бесклеточная фракция биологического образца из субъекта может содержать меньше, чем приблизительно 1000 нг на мл, предпочтительно меньше, чем приблизительно 100 нг на мл, более предпочтительно меньше, чем приблизительно 10 нг на мл, наиболее предпочтительно меньше, чем приблизительно 1 нг на мл, геномной ДНК хозяина.

Способ настоящего изобретения дополнительно может включать приготовление бесклеточной фракции из биологического образца. Бесклеточная фракция может быть получена с использованием обычных методик, известных в данной области техники. Например, бесклеточная фракция образца крови может быть получена центрифугированием образца крови в течение приблизительно 3-30 минут, предпочтительно приблизительно 3-15 минут, более предпочтительно приблизительно 3-10 минут, наиболее предпочтительно приблизительно 3-5 минут, при низкой скорости приблизительно 200-20000 g, предпочтительно приблизительно 200-10000 g, более предпочтительно приблизительно 200-5000 g, наиболее предпочтительно 350-4500 g. Биологический образец может быть получен ультрацентрифугированием, чтобы отделить клетки и их фрагменты от бесклеточной фракции, содержащей растворимые ДНК или РНК. Обычно ультрацентрифугирование проводят с использованием 0,22 мкм мембранных фильтров.

Способ настоящего изобретения дополнительно может включать концентрирование

(или обогащение) целевой нуклеиновой кислоты в бесклеточной фракции биологического образца. Целевая нуклеиновая кислота может быть концентрирована с использованием обычных методик, известных в данной области техники, таких как твердофазная абсорбция в присутствии соли в высокой концентрации, органическая экстракция смесью 5 фенол-хлороформ, с последующим осаждением этанолом или изопропиловым спиртом, или прямое осаждение в присутствии соли в высокой концентрации или 70-80%-ным этанолом или изопропиловым спиртом. Концентрированная целевая нуклеиновая кислота может быть, по меньшей мере, приблизительно в 2, 5, 10, 20 или 100 раз более концентрированной, чем в бесклеточной фракции. Целевая нуклеиновая кислота, 10 концентрирована она или нет, может быть использована для амплификации согласно способу настоящего изобретения.

Последовательность целевой нуклеиновой кислоты может быть амплифицирована с получением двухцепочечной ДНК с использованием различных методов, известных в данной области техники. Например, последовательность может быть амплифицирована 15 полимеразной цепной реакцией (ПЦР), полимеразной цепной реакцией с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), транскрипционно опосредуемой амплификацией (ТОА) или лигазной цепной реакцией (ЛЦР). Предпочтительно последовательность целевой нуклеиновой кислоты амплифицируют с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Может быть сконструирована пара праймеров, чтобы 20 амплифицировать желаемую последовательность целевой нуклеиновой кислоты с получением двухцепочечной ДНК требуемой длины. Например, пара праймеров может иметь последовательности GGTCAAGCACGATTGGAG (SEQ ID NO:1) и GCCAACACCAAGTAGACGG (SEQ ID NO:2). Двухцепочечная ДНК может иметь меньше, чем приблизительно 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40 или 30 нуклеотидов. Например, 25 двухцепочечная ДНК может иметь приблизительно 30-70 п.о., предпочтительно приблизительно 40-60 п.о.

Двухцепочечная ДНК может быть обнаружена различными методиками, известными в данной области техники. Например, двухцепочечную ДНК можно обнаружить с использованием детектирующего агента. Детектирующий агент может быть выбран 30 из группы, включающей флуоресцентно-меченный зонд (например, Taqman-зонд, молекулярный маяк или Scorpin), интеркалирующий флуоресцентный краситель или праймер для Light Upon Extension (LUX). Предпочтительно детектирующим агентом является интеркалирующий флуоресцентный краситель. Интеркалирующий 35 флуоресцентный краситель может быть выбран из группы, включающей SYBR Green, CytoGreen, LC Green, Eva Green, BOXTO или SYTO9.

Способ настоящего изобретения дополнительно может включать количественное определение копийности целевой нуклеиновой кислоты у субъекта. Например, последовательность целевой нуклеиновой кислоты может быть амплифицирована с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Стандартная кривая может быть 40 представлена для стандартной нуклеиновой кислоты с известным числом копий и установленной флуоресценцией. На основании стандартной кривой копийность целевой нуклеиновой кислоты может быть определена, исходя из уровня флуоресценции после ПЦР-РВ.

Способ настоящего изобретения дополнительно может включать диагностику 45 инфекции патогеном у субъекта. Например, патогенная инфекция (например, ТВ инфекция) может быть активной или скрытой. Обнаружение РНК, полученной от патогена (например, бактерии, паразита или грибов), может быть использовано, чтобы отличить активную инфекцию от скрытой инфекции. Например, обнаружение целевой

РНК, полученной из *Mycobacterium tuberculosis* (TB), может быть использовано для дифференциации активной TB инфекции от скрытой TB инфекции, и, таким образом, вносит вклад в диагностику активной или скрытой TB инфекции. Способ может обеспечить высокую селективность, например, по меньшей мере, приблизительно 50%, 5 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99%, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 80%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 95%. Способ может обеспечить высокую специфичность, например, например, по меньшей мере, приблизительно 50%, 10 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99%, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 80%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 90%, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 95%.

Для способов обнаружения согласно настоящему изобретению предложены разные наборы для обнаружения. Предложен набор для обнаружения целевой нуклеиновой кислоты, полученной из патогена, у субъекта. Набор включает (а) один или несколько 15 реагентов или материалов для амплификации последовательности нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты, полученной из бесклеточной фракции биологического образца субъекта, с получением двухцепочечной ДНК, и (б) один или несколько реагентов или материалов для обнаружения двухцепочечной ДНК. Биологическим образцом предпочтительно является образец крови.

20 В наборе настоящего изобретения один или несколько амплифицирующих реагентов или материалов могут включать пару праймеров, приемлемых для получения двухцепочечной нуклеиновой кислоты, имеющей меньше, чем приблизительно 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40 или 30 нуклеотидов. Двухцепочечная ДНК может иметь приблизительно 30-70 пар оснований (п.о.), предпочтительно 40-60 п.о. Праймер может быть 25 сконструирован для амплификации целевой последовательности, специфической к патогену. Целевая последовательность может представлять собой последовательность, специфическую для *Mycobacterium tuberculosis* (TB) H37Rv, например, выбранную из группы, включающей IS6110, IS1084, MPT 64, rrs, esat6, esat6-like, MDR, rpoB, katG, iniB и их фрагменты. Например, пара праймеров может иметь последовательности 30 GGTCAGCACGATTGGAG (SEQ ID NO:1) и GCCAACACCAAGTAGACGG (SEQ ID NO: 2).

В наборе настоящего изобретения один или несколько детектирующих реагентов или материалов могут включать детектирующий агент, выбранный из группы, включающей флуоресцентно-меченный зонд (например, Тацман-зонд, молекулярный 35 маяк или Scorpin), интеркалирующий флуоресцентный краситель или праймер с LUX. Предпочтительно детектирующим агентом является интеркалирующий флуоресцентный краситель. Интеркалирующий флуоресцентный краситель может быть выбран из группы, включающей SYBR Green, CytoGreen, LC Green, Eva Green, BOXTO и SYTO9.

Набор настоящего изобретения дополнительно может включать один или несколько 40 реагентов или материалов для получения бесклеточной фракции из биологического образца (например, образца крови) в количестве, например, приблизительно 0,2-10 мл, предпочтительно приблизительно 0,5-10 мл, более предпочтительно приблизительно 2-10 мл, наиболее предпочтительно приблизительно 2-5 мл. Бесклеточная фракция по существу может быть свободной от клеток, содержащей, например, меньше, чем 45 приблизительно 20000 клеток на мл, предпочтительно меньше, чем приблизительно 2000 клеток на мл, более предпочтительно меньше, чем приблизительно 200 клеток на мл, наиболее предпочтительно меньше, чем приблизительно 20 клеток на мл. Бесклеточная фракция может быть по существу свободна от геномной ДНК хозяина.

Геномная ДНК хозяина представляет собой большие куски ДНК (например, длиннее, чем приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 100 или 200 т.п.н.), полученных из субъекта.

Например, бесклеточная фракция биологического образца субъекта может включать меньше, чем приблизительно 1000 нг на мл, предпочтительно меньше, чем

5 приблизительно 100 нг на мл, более предпочтительно меньше, чем приблизительно 10 нг на мл, наиболее предпочтительно меньше, чем приблизительно 1,0 нг на мл, геномной ДНК хозяина.

Набор настоящего изобретения дополнительно может содержать один или несколько реагентов или материалов для изоляции или очистки целевой нуклеиновой кислоты из 10 бесклеточной фракции. Целевая нуклеиновая кислота может быть, по меньшей мере, приблизительно в 2, 5, 10, 20 или 100 раз более концентрирована, чем в бесклеточной фракции. Целевая нуклеиновая кислота, концентрирована она или нет, может быть использована для амплификации согласно способу настоящего изобретения.

Определение «приблизительно», используемое в данном описании, когда оно

15 относится к измеряемому значению, такому как количество, процент и т.д., как подразумевается, охватывает отклонения $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, даже более предпочтительно $\pm 1\%$, и еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$, от конкретного значения, поэтому такие отклонения являются закономерными.

Пример 1. Планирование праймера

20 Программу планирования праймера Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) используют для планирования всех праймеров для обнаружения ТВ. Для планирования праймеров, специфически комплементарных последовательности ТВ геномной ДНК, полный геном штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank Accession No. NC_000962) используют в качестве стандарта. Для праймеров, специфически комплементарных геномной ДНК 25 человека, используют геном человека в качестве стандартной последовательности из базы данных Gene Bank.

Праймеры ряда размеров ампликона, спланированных для амплификации нуклеиновых кислот, специфические для штамма ТВ H37Rv, оптимизируют с использованием реакции SYBR ПЦР-РВ, после чего следует анализ кривой плавления.

30 Дополнительно праймеры могут быть обоснованы с помощью электрофореза в агарозном геле (3%), который дает доказательства по полосам ДНК правильных размеров без продуктов неспецифической ДНК или праймеров-димеров. Конкретные ТВ праймеры представлены в таблице 1.

35 Таблица 1
Конкретные ТВ праймеры

Праймеры	SEQ ID NO:
GGTCAGCACGATTGGAG	1
GCCAACACCAAGTAGACGG	2
AGCCAACACCAAGTAGACG	3
GAGCTCGGCCGCGAAGAAAG	4
GAGCTCGGCCGCGAAGAAA	5
CAGCTCAGCGGATTCTTCGGT	6
TCAGCGGATTCTCGGTG	7
CGGATTCTCGGTG	8
GCGCAGCCAACACCAAGTAGA	9
CAACACCAAGTAGACGGCG	10
TCTCTGCGACCATCCGCAC	11

	CGCGGATCTCTGCGACCAT	12
	CCGAATTGCGAAGGGCGAA	13
5	CCGAATTGCGAAGGGCGAAC	14
	GCGTAAGTGGGTGCGCCAG	15
	CGGAGACGGTGCGTAAGTG	16
	GACGGTGCGTAAGTGGGTG	17
	GTGGGCAGCGATCAGTGAGG	18
	GGTTCATCGAGGAGGTACCCG	19
10	TCAGGTGGTTCATCGAGGAGG	20
	AGGTGGTTCATCGAGGAGGTA	21
	ACACCAAGTAGACGGCGA	22
	AGCCAACACCAAGTAGACG	23
	CGGAGACGGTGCGTAAGTG	24
15	CTCAGCGGATTCTCGGTCGT	25

Пример 2. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

Последовательные 10-кратные разбавления геномной ДНК ТБ H37Rv используют в качестве матриц в реакции ПЦР в реальном времени. Пару праймеров, имеющих последовательности GGTCAAGCACGATTGGAG (SEQ ID NO:1) и

20 GCCAACACCAAGTAGACGG (SEQ ID NO:2), используют для амплификации целевой последовательности, IS6110 вставочной последовательности, в геномной ДНК ТБ H37Rv. Используемая реакционная программа ПЦР включает 95°C 3 минуты, с последующими 40 циклами "94°C 10 секунд, 60°C 10 секунд, 72°C 30 секунд, с флуоресцентным определением" и фазой плавления от 60 до 95°C. Кривые амплификации (фиг.1А), генерированные для 1000000, 1000 и 10 копий целевых нуклеиновых кислот, показывают растущие уровни накопленной флуоресценции по мере увеличения числа циклов и растущие значения порогового цикла (Ct) по мере снижения копийности амплифицированной последовательности. Стандартная кривая значений Ct

30 относительности копийности может быть получена на основе кривых амплификации и является полезной для количественного определения копийности любой специфической нуклеиновой кислоты в образце на основе накопленной флуоресценции конечных продуктов ПЦР-РВ с использованием подходящей пары праймеров в условиях ПЦР-РВ. Кривые плавления (фиг.1В) показывают специфические пики для 1000000, 1000 или 10 копий целевых нуклеиновых кислот (стрелка А) и неспецифические пики, когда нет

35 матрицы (то есть, 0 копий). Неспецифические шумовые пики и шумовые пики праймера-димера отсутствуют.

Пример 3. Обнаружение ТБ в образцах крови обезьян

В подготовительном опыте группу из 6 макак-резус (Macaca Mulatta) провоцируют с помощью ТБ (*Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv) при 50 KOE (колониеобразующая единица) и 500 KOE/субъект (по 2 животных для каждой инфицированной группы и два в качестве контрольной группы). Во время опытов периодически проводят туберкулиновый тест (Tuberculin OT, Synbiotics Corp. CA), иммунотесты на ТБ антитела, высвобождение цитокинов, стимулированное IFN-гамма. В конце опыта у обезьян отбирают образцы для патологических исследований и ТБ культур. Образцы цельной крови также отбирают дважды в неделю.

Свежую цельную кровь отбирают через 6 и 8 недель и сразу же центрифугируют на 2 фракции, плазму и кровяные клетки. Белые клетки периферической крови (PWBC) дополнительно изолируют с помощью центрифugирования в градиенте плотности Ficoll-

Нураque (Sigma Chemical Co., Mo.). Разделенные фракции сразу же замораживают при -80°C. Такие фракции крови используют для изоляции ТВ ДНК для количественного анализа с помощью ПЦР-РВ. ТВ ДНК из образцов для испытаний выделяют с использованием центрифужных колонок с силикатной мембраной, E.Z.N.A.® Blood

- 5 DNA Midi Kit (Omega Bio-tek, Inc., GA). ДНК, выделенная из цельной крови, PWBC и фракции плазмы используют в качестве матриц для количественного определения ПЦР-РВ SYBR® Premix Ex Taq (Takara Bio USA, CA), следуя протоколу для ПЦР-РВ, описанной в примере 2. Кривые амплификации (фиг.2А) для плазмы (A), PWBC (B) и цельной крови (C) показывают намного более низкое значение Ct для плазмы (A), чем для PWBC (B)
- 10 или цельной крови (C). Кривые плавления (фиг.2В) показывают специфический пик для плазмы (A) и несколько неспецифических пиков для PWBC (B) и цельной крови (C).

Пример 4. Обнаружение ТВ в образцах человеческой крови

- Клинические образцы (которые были подготовлены к выбрасыванию после рутинных 15 клинических лабораторных тестов) собирают у 92 индивидуумов. Среди них у 74 индивидуумов клинически диагностирован ТВ, и у 18 индивидуумов ТВ клинически не диагностирован. Из этих 18 индивидуумов у 15 диагностированы другие заболевания.

Клинические образцы включают образцы крови, плеврального экссудата или 20 цереброспинальных жидкостей (ЦСЖ). Приблизительно 5 мл образцов периферической крови собирают в пробирки для сбора сыворотки или пробирки для сбора плазмы с антикоагулянтами EDTAK2. Сыворотку и плазму разделяют центрифугированием при 1600 g в течение 10 минут. Аликвоты сыворотки и плазмы сразу же замораживают при -20°C. Плевральный экссудат и ЦСЖ собирают в пробирки с антикоагулянтом EDTAK2 или без него и разделяют на бесклеточные фракции и осадки после центрифугирования при 5000 g в течение 10 минут. Бесклеточные фракции плазмы крови (ПЗ), плеврального 25 экссудата и ЦСЖ, и клеточные фракции (осадки) плеврального экссудата и ЦСЖ используют для выделения нуклеиновой кислоты, после лизиса, денатурирования и деструкции протеиназы K, с использованием набора QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen, CA). Обнаружение ТВ проводят, следуя прописи, описанной в примере 2. Кривые амплификации (фиг.3А) и кривые плавления (фиг.3В) для фракций плазмы (ПЗ) от 6 30 индивидуумов с клинически диагностированным ТВ (фракции ТВ плазмы, стрелка А) и 2 индивидуумов с клинически не диагностированным ТВ (фракции не-ТВ плазмы, стрелка В) показывают репрезентативное количественное сравнение. Фрагменты ТВ специфической короткой нуклеиновой кислоты IS6110 (фиг.3В) в бесклеточных фракциях 35 образцов крови количественно характеризуют с использованием стандартной кривой, описанной в примере 2, чтобы иметь приблизительно 20-40 копий на мл фракций ТВ плазмы и 0 копий на мл фракций не-ТВ плазмы.

ТВ специфические нуклеиновые кислоты обнаружены в бесклеточной фракции 40 плеврального экссудата индивидуума с клинически диагнисторованным ТВ (фиг.4А, стрелка А), но не в осадочной фракции того же образца плеврального экссудата (фиг.4А, стрелка В). Кроме того, осадочная фракция показывает четкие неспецифические продукты ПЦР (фиг.4В, стрелка В).

Анализируют бесклеточные фракции образцов ПЗ и ЦСЖ от двух индивидуумов, А и В, у которых клинически диагностирован ТВ. На фиг.5А показаны сравнимые уровни полученных из ТВ фрагментов ДНК, обнаруженных в бесклеточных фракциях (ПЗ 45 относительно ЦСЖ) от индивидуумов А и В. На фиг.5А показаны специфические пики плавления IS6110 ампликона фрагментов ДНК ТВ, указывая на отсутствие неспецифических продуктов ПЦР.

Результаты детектирования с использованием ПЦР-РВ для определения бесклеточной

ТВ специфической нуклеиновой кислоты сравнивают с клиническим диагностированием ТВ (таблица 2), и эти результаты показывают чувствительность приблизительно 91% (67/74) и специфичность приблизительно 83% (15/18).

Таблица 2 Бесклеточная НК ПЦР-РВ относительно клинического диагноза				
ПЦР		Клинический диагноз		
		+	-	Всего
	+	67	3	70
	-	7	15	22
	Всего	74	18	92

Количественно оценивают целевую ТВ специфическую нуклеиновую кислоту. Образец, имеющий значение Ct больше, чем 40, рассматривают как имеющий 0 копий целевой ТВ специфической нуклеиновой кислоты. Образец, имеющий значение Ct 36-40, как полагают, имеет одну копию целевой ТВ специфической нуклеиновой кислоты.

Для образца, имеющего значение Ct меньше, чем 36, копийность целевой ТВ специфической нуклеиновой кислоты определяют с использованием стандартной кривой, описанной в примере 1. Из 67 индивидуумов с клинически диагностированным ТВ и позитивных в тестах с целевой ТВ специфической нуклеиновой кислотой средняя копийность целевой ТВ специфической нуклеиновой кислоты составляет $242,6 \pm 531,8$ на мл фракции. Из 3 индивидуумов с не диагностированным клинически ТВ, но позитивных в тестах с целевой ТВ специфической нуклеиновой кислотой, средняя копийность целевой ТВ специфической нуклеиновой кислоты составляет $16,2 \pm 16,2$ на мл фракции.

Все документы, книги, руководства, статьи, патенты, опубликованные патентные заявки, справочники, рефераты и/или другие ссылки, процитированные в описании, являются включенными полностью посредством ссылки. Другие варианты осуществления изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники из рассмотрения описания и практической реализации изобретения, раскрытоого в данном описании. Полагают, что описание и примеры следует рассматривать только в качестве конкретных примеров, причем на истинный объем и суть изобретения указывает приведенная ниже формула изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ обнаружения целевой нуклеиновой кислоты, полученной из последовательности ДНК *Mycobacterium tuberculosis* (ТВ) H37Rv, выбранной из группы, включающей IS6110, IS1084, MPT 64, rrs, esat6, esat6-like, MDR, groB, katG, iniB и их фрагменты, у субъекта, включающий:

(а) амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты целевой нуклеиновой кислоты парой праймеров, где целевую нуклеиновую кислоту получают из бесклеточной фракции образца крови, плеврального экссудата и/или цереброспинальных жидкостей (ЦСЖ) субъекта, и в результате получают двухцепочечную ДНК, и

(б) обнаружение двухцепочечной ДНК, где наличие двухцепочечной ДНК указывает на присутствие целевой нуклеиновой кислоты у субъекта.

2. Способ по п. 1, где целевой нуклеиновой кислотой является ДНК.

3. Способ по п. 1, где целевой нуклеиновой кислотой является РНК.

4. Способ по п. 1, где бесклеточной фракцией является сыворотка крови.

5. Способ по п. 1, где бесклеточной фракцией является плазма крови.

6. Способ по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты получена из последовательности ДНК *Mycobacterium tuberculosis* (ТВ) H37Rv IS6110.

7. Способ по п. 1, где двухцепочечная ДНК имеет 40-100 п.о.
8. Способ по п. 1, где объем образца крови составляет 0,2-10 мл.
9. Способ по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты амплифицируют полимеразной цепной реакцией (ПЦР).
- ⁵ 10. Способ по п. 1, где двухцепочечную ДНК обнаруживают с помощью детектирующего агента, выбранного из группы, включающей флуоресцентно-меченный зонд, интеркалирующий флуоресцентный краситель или праймер Light Upon Extension, (LUX).
- ¹⁰ 11. Способ по п. 10, где интеркалирующий флуоресцентный краситель выбирают из группы, включающей SYBR Green, CytoGreen, Eva Green, BOXTO и SYTO9.
12. Способ по п. 1, дополнительно включающий концентрирование целевой нуклеиновой кислоты в бесклеточной фракции.
13. Способ по п. 1, дополнительно включающий получение бесклеточной фракции из образца крови.
- ¹⁵ 14. Способ по п. 1, дополнительно включающий диагностирование ТВ инфекции у субъекта.
15. Способ по п. 14, где ТВ инфекция является активной.
16. Способ по п. 14, где ТВ инфекция является скрытой.

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ОККАМ БАЙОЛЭБС, ИНК.
ЦИЯНЬ, Минвэй

<120> СПОСОБЫ И НАБОРЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕСКЛЕТОЧНЫХ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДЛЯ ПАТОГЕНОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

<130> OCC-101WO

<150> US 61/470,774
<151> 2011-04-01

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<400> 1
ggtcagcacg attcggag 18

<210> 2
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<400> 2
gccaaacacca agtagacgg 19

<210> 3
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<400> 3
agccaaacacc aagttagacg 19

<210> 4		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 4		
gagctcggcc gcsgaagaaag		20
<210> 5		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 5		
gagctcggcc gcsgaagaaa		19
<210> 6		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 6		
cagctcagcg gattttcgg t		21
<210> 7		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 7		
tca g cggatt ct tcgggtcgt g		21
<210> 8		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		

<220>		
<223>	Праймер	
<400>	8	
	cggttattttc ggtcggtgg	19
<210>	9	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	9	
	gcgcagccaa caccaggtag a	21
<210>	10	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	10	
	caacaccaag tagacgggacg	20
<210>	11	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	11	
	tctctgcgac catccgcac	19
<210>	12	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	12	

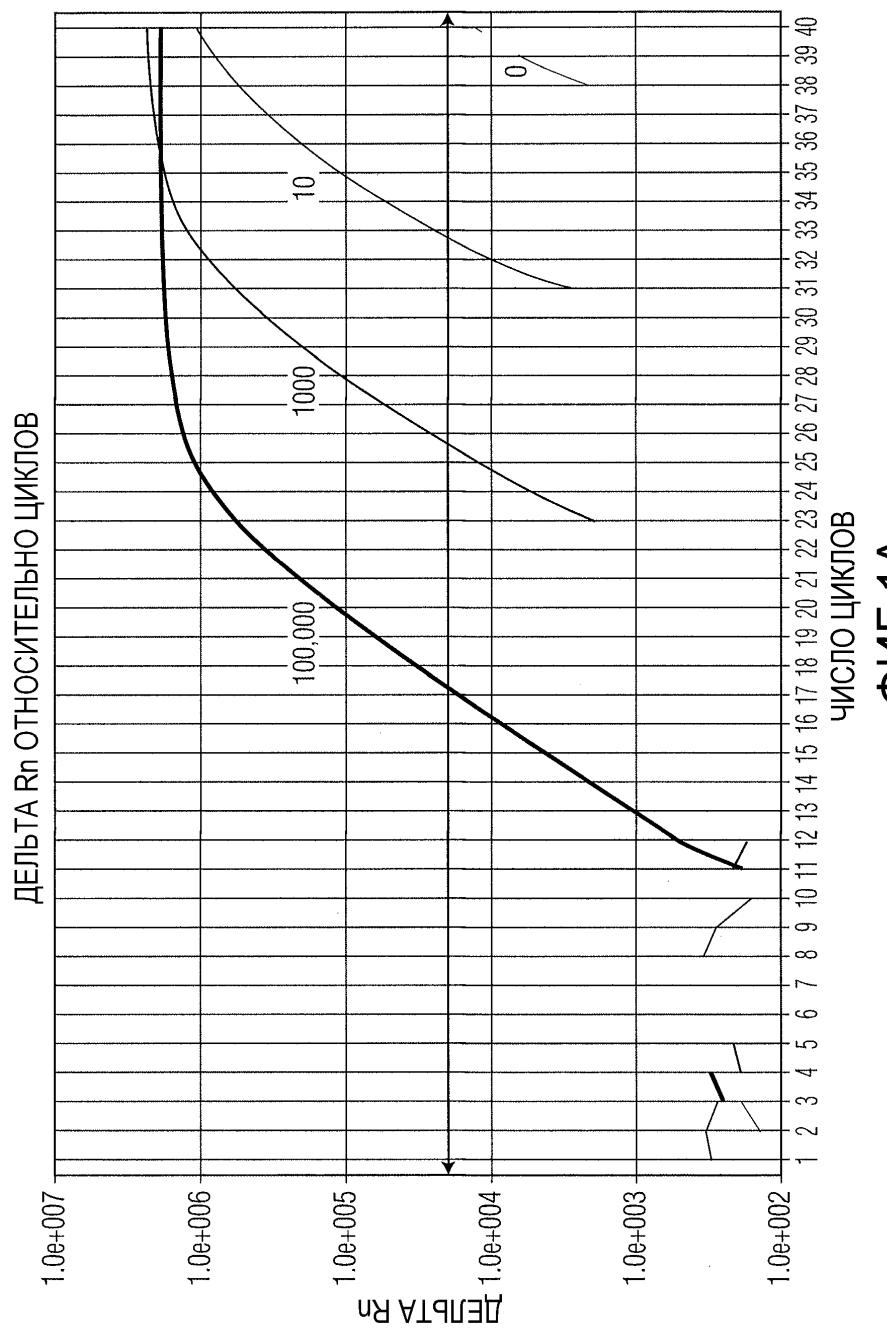
cgccggatctc tgcgaccat	19
<210> 13	
<211> 19	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 13	
ccgaaattgcg aaggggcgaa	19
<210> 14	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 14	
ccgaaattgcg aaggggcgaaac	20
<210> 15	
<211> 19	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 15	
gcgttaagtgg gtgcgccag	19
<210> 16	
<211> 19	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Праймер	
<400> 16	
cggagacggt gcgttaagtg	19
<210> 17	
<211> 19	

<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	17	
gacgggtgcgt aagtgggtg		19
<210>	18	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	18	
gtgggcagcg atcagtgagg		20
<210>	19	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	19	
ggttcatcga ggaggtaccc g		21
<210>	20	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	20	
tcaggtggtt catcgaggag g		21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	

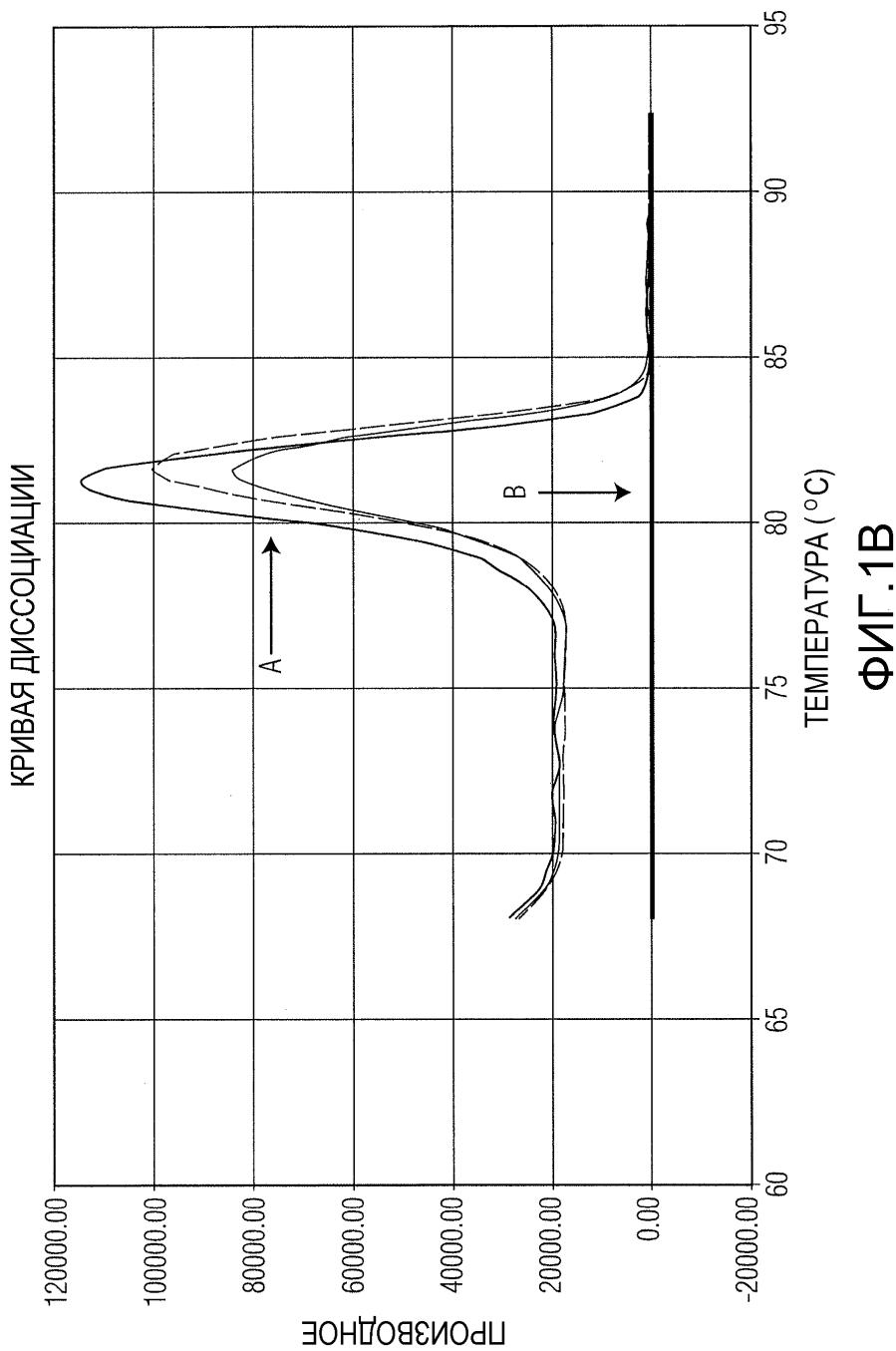
<400> 21		
aggtgttca tcgaggaggt a		21
<210> 22		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 22		
acacccaagt a gacgggcga		19
<210> 23		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 23		
agccaaacacc a aagttagacg		19
<210> 24		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 24		
cggagacggt gcgttaagt		19
<210> 25		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Праймер		
<400> 25		
ctcagcggt tcttcggat t		21

510856

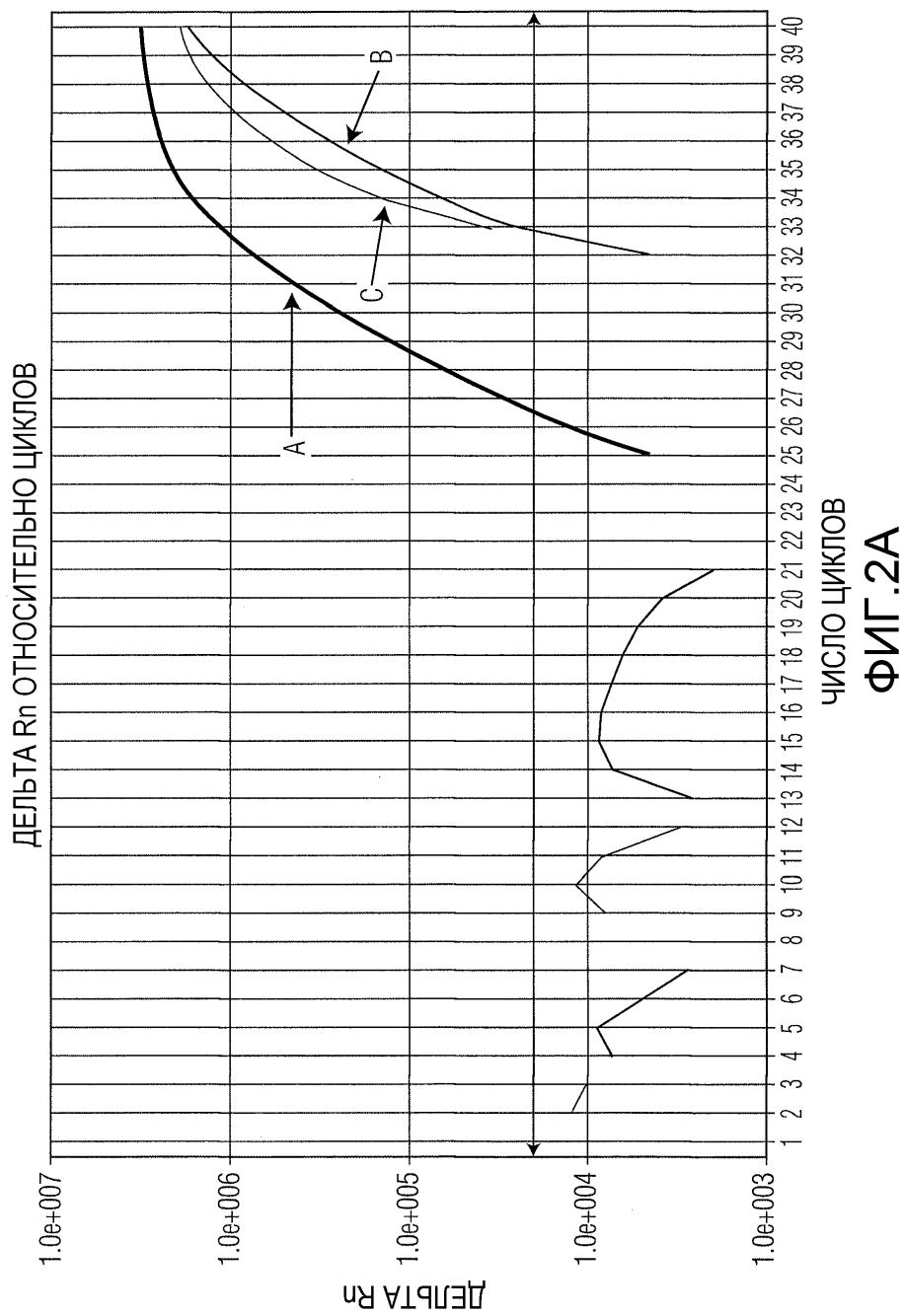
1/10



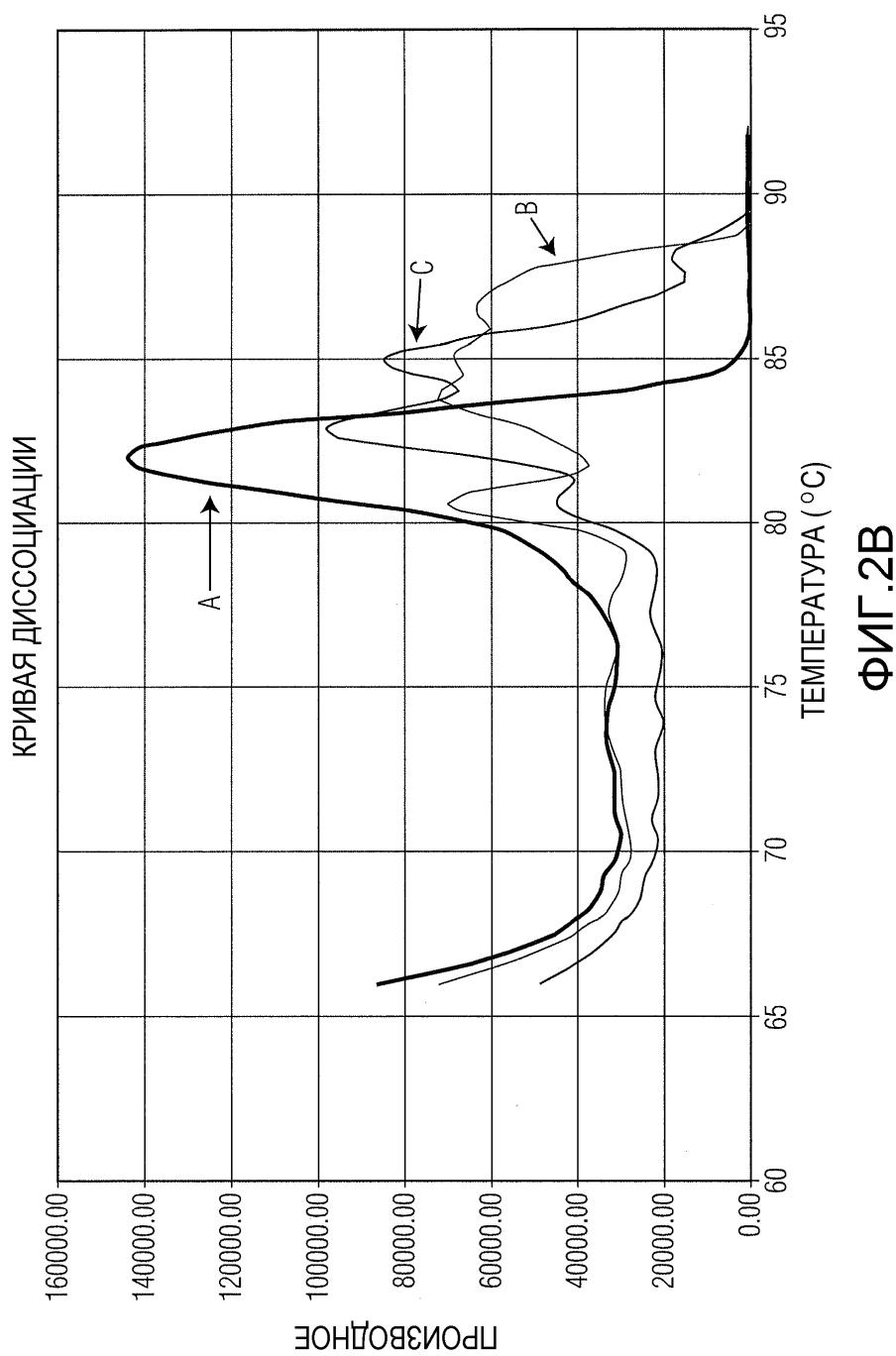
2/10



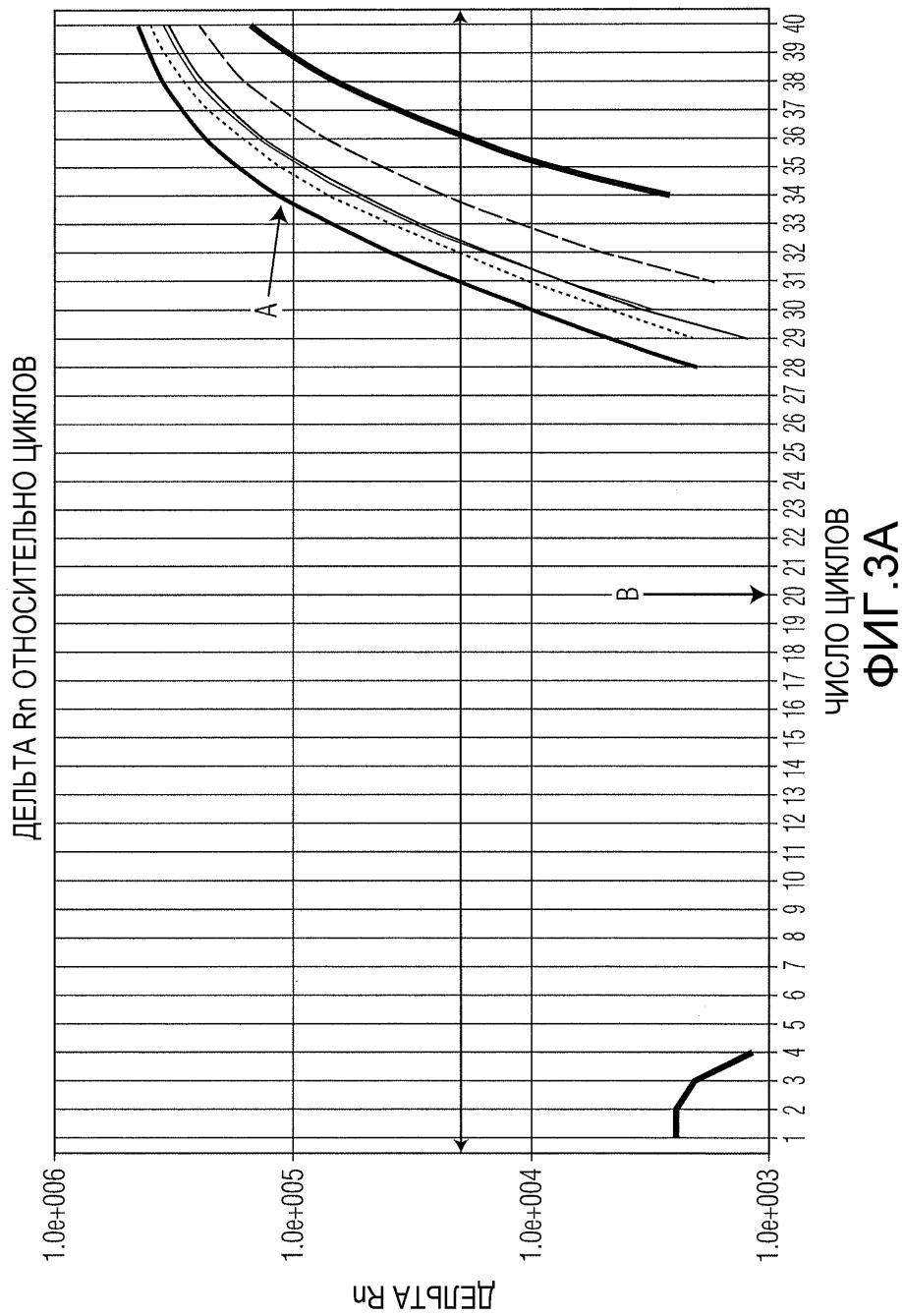
3/10



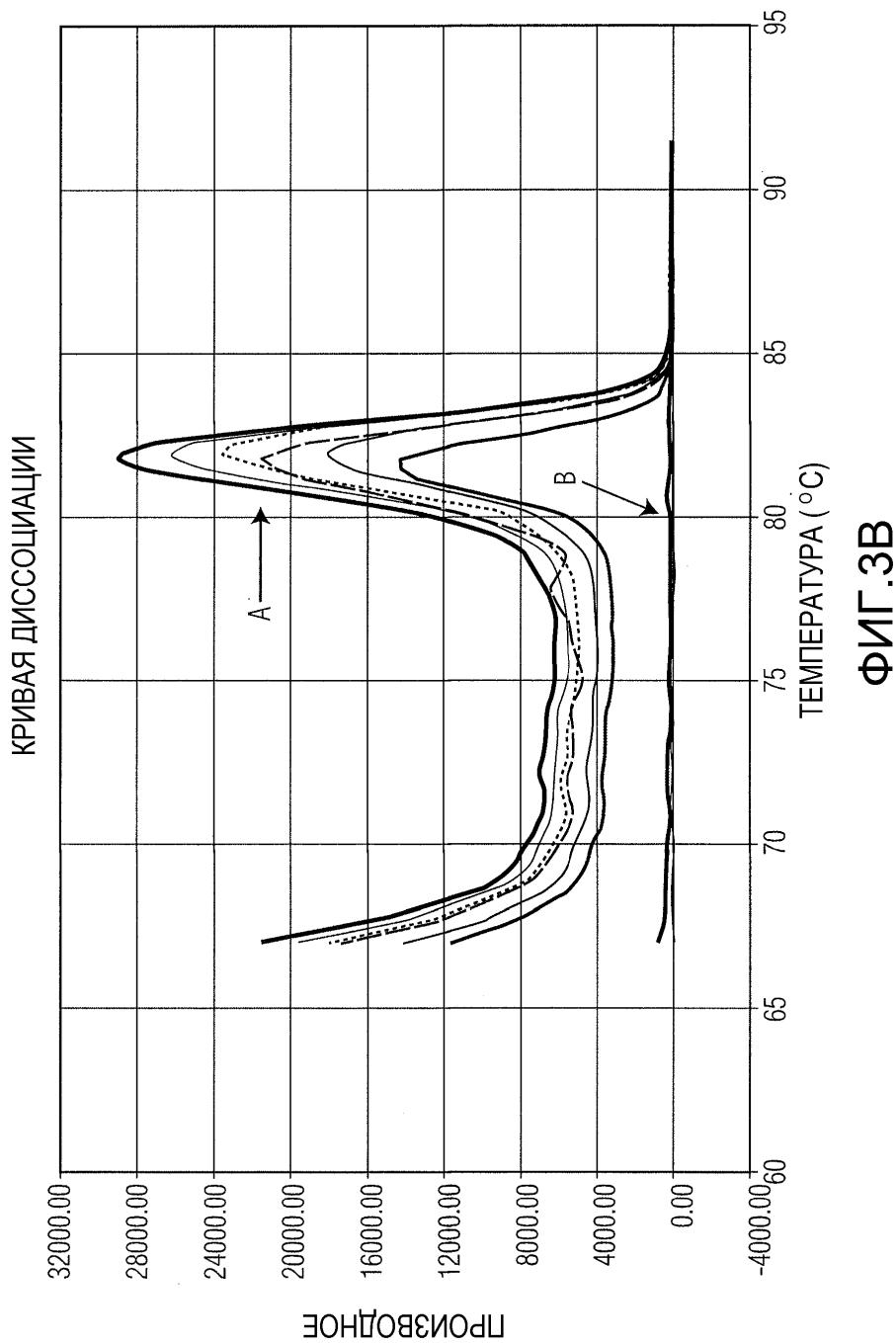
4/10



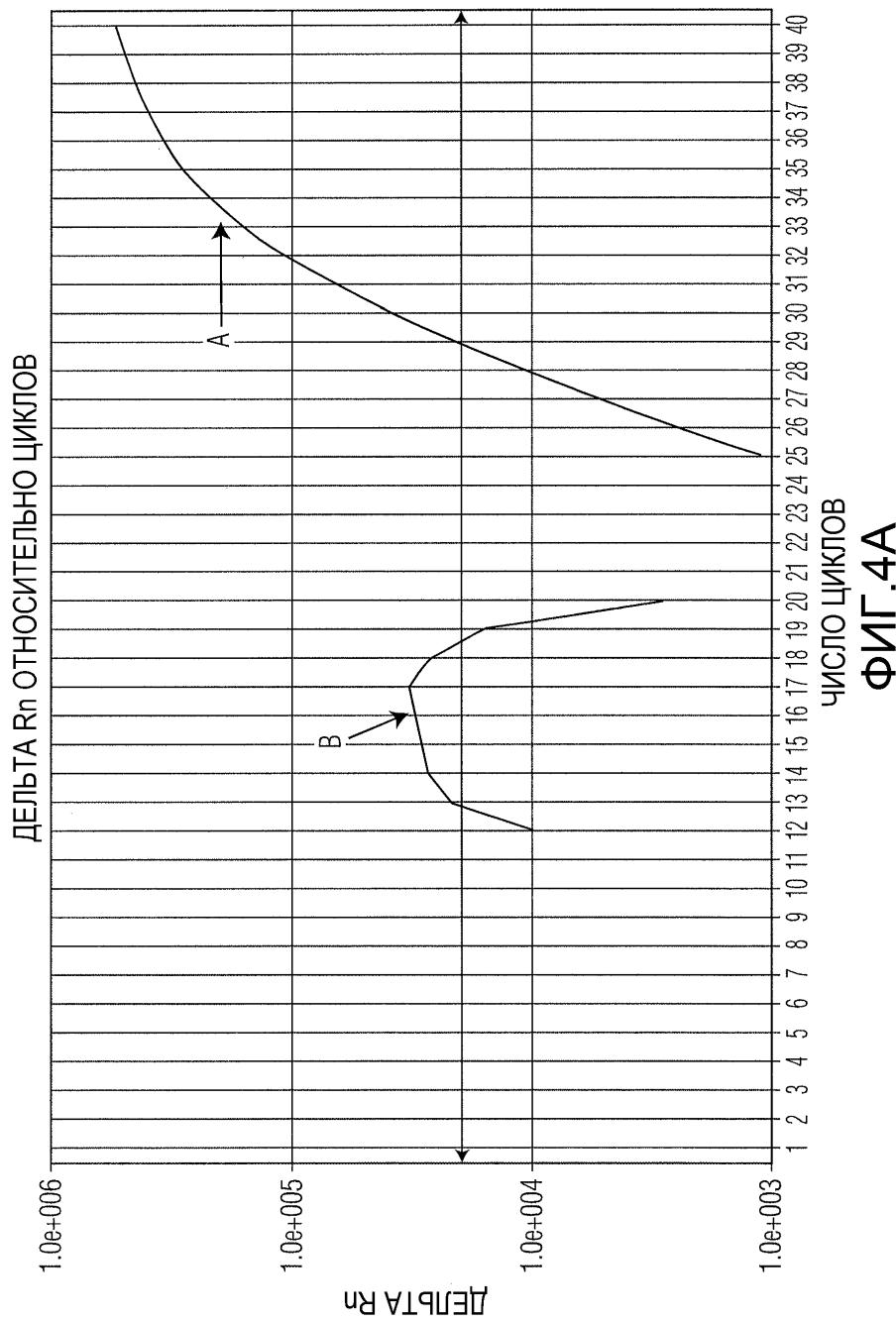
5/10



6/10

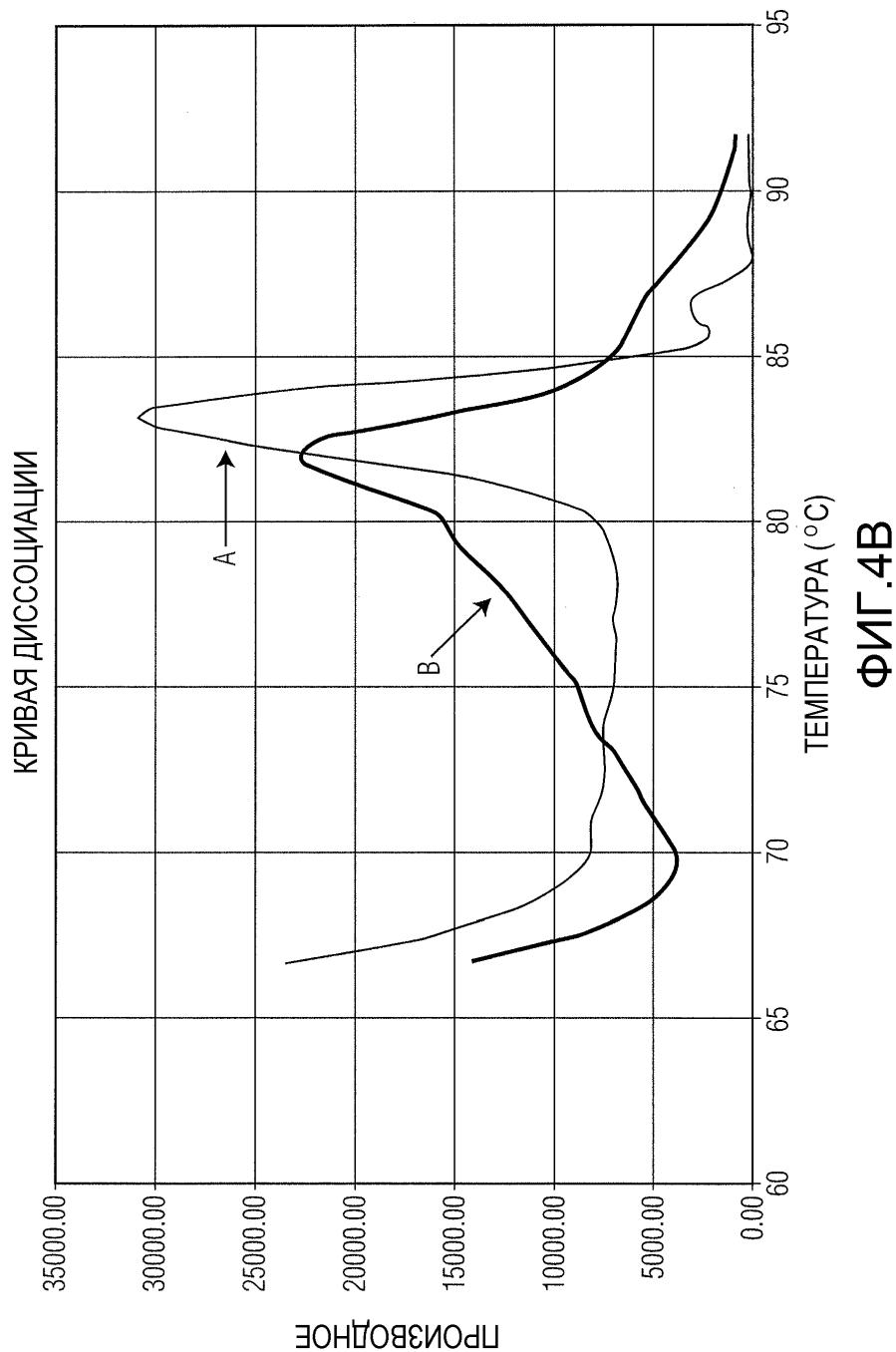


7/10

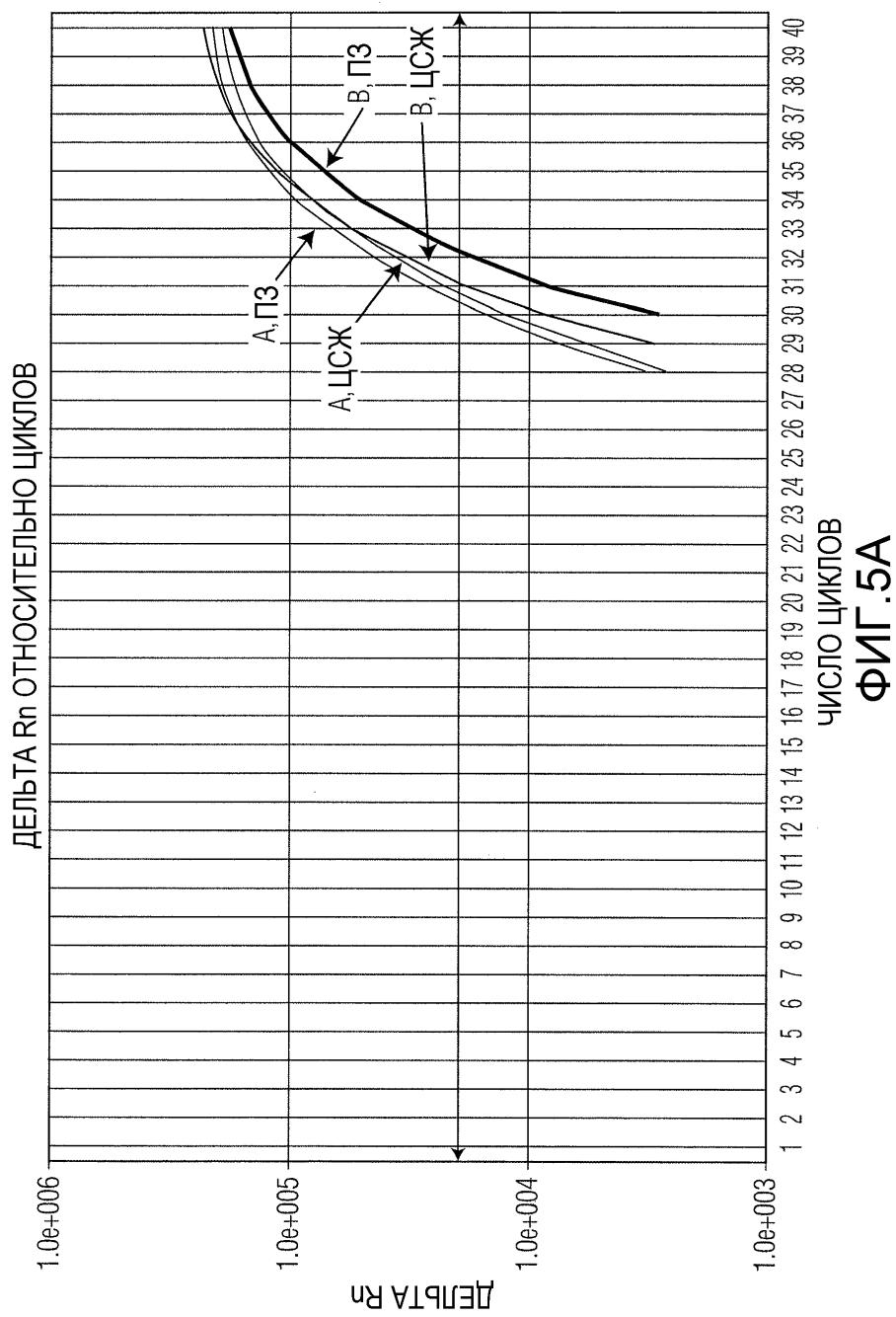


ФИГ. 4А

8/10



9/10



10/10

