



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47432 (13) C2

(51) 6 C12Q1/68, C07H21/04, C12P19/34

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИЙ ПРАЙМЕР, ПРИЗНАЧЕНИЙ ДЛЯ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕІНОВОЇ КИСЛОТИ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ ТИПУ 1 (ВІЛ-1) (ВАРІАНТИ), ПАРА ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПРАЙМЕРІВ (ВАРІАНТИ), НАБІР ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ПРАЙМЕРІВ (ВАРІАНТИ), НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ НУКЛЕІНОВОЇ КИСЛОТИ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ ВІЛ-1 (ВАРІАНТИ), СПОСІБ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕІНОВОЇ КИСЛОТИ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ ВІЛ-1

1

2

(21) 98010265

(22) 16 01 1998

(24) 15 07 2002

(31) 60/037,744

(32) 17 01 1997

(33) US

(46) 15 07 2002, Бюл. № 7, 2002 р

(72) Крістоферсон Сінді Доун, US, Квок Ші-Да Ю, US, Лу Ші-Да Ю, US

(73) Ф ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, CH

(56) US5386022, 1995 US5389512, 1995 US5599662, 1997 US5695926, 1997 US5702926, 1997 EP617132 A2, 1994 Kwok et al, 1990, "Effects of Primer-Template Mismatches on the Polymerase Chain Reaction Human Immunodeficiency Virus Type 1 Model Studies," Nucleic Acids Research, 18 (4) 999-1005 Kellogg et al, 1990, "Detection of Human Immunodeficiency Virus," PCR Protocols A Guide to Methods and Applications 337-347 Jackson et al, 1991, "Non-isotopic Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of HIV-1 in Ugandan Mothers and Infants," AIDS 5 1463-1467 Coutlee et al, 1991, "The Polymerase Chain Reaction A New Tool for the Understanding and Diagnosis of HIV-1 Infection at the Molecular Level," Molecular and Cellular Probes 5 241-259 1993 Product Insert for Amplicor TM HIV-1 Test, pp 1-11 Kwok et al, 1994, "A Guide to the Design and Used of Mismatched and Degenerate Primers," PCR Methods & Applications 3 S39-S47 Fransen et al, 1994, "Design and Evaluation of New, Highly Sensitive and Specific Primers for Polymerase Chain Reaction Detection of HIV-1 Infected Primary Lymphocytes," Molecular and Cellular Probes 8 317-322 Meyers et al, 1994 Human Retroviruses and AIDS, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos New Mexico pp I1-IA49 Arnold et al, Nov 1995, "HIV Type 1 Sequence Subtype G Transmission From Mother to Infant Failure of Variant Sequence Species to Amplify in the Roche Amplicor Test," AIDS Research and Human Retroviruses 11(8) 999-1001 Meyers et al, 1996 Human Retroviruses and AIDS, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos New Mexico pp I1-I19 and I93-I128 1996 Product Insert

for Amplicor HIV-1 Monitor TM Test, pp 1-30 Lyamuya et al, Jan 1997, "Comparison of In-House and Commercial Sample Preparation and PCR Amplification Systems for Detection of Human Immunodeficiency Virus type 1 DNA in Blood Samples from Tanzanian Adults," Journal of Clinical Microbiology 35 (1) 278-280

(57) 1 Олігонуклеотидний праймер, призначений для ампліфікації нуклеїнової кислоти вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), де вказаний олігонуклеотидний праймер SKCC1 включає нуклеотидну послідовність

TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTCC.

2 Олігонуклеотидний праймер, призначений для ампліфікації нуклеїнової кислоти вірусу імунодефіциту людини ВІЛ-1, де вказаний олігонуклеотидний праймер SKCC3 включає нуклеотидну послідовність

TGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTAT.

3 Пара олігонуклеотидних праймерів, що складається з праймеру SK145 з нуклеотидною послідовністю

AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

та праймеру SKCC1 з нуклеотидною послідовністю

TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTCC.

4 Набір олігонуклеотидних праймерів, що складається з пари олігонуклеотидних праймерів за п 3 та праймеру SK145M2 з нуклеотидною послідовністю

AGTGGGGGGACACCAGGCAGCAATGCAAAT

5 Пара олігонуклеотидних праймерів, що складається з праймеру SK145 з нуклеотидною послідовністю

AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

та праймеру SKCC3 з нуклеотидною послідовністю

TGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTAT.

6 Набір олігонуклеотидних праймерів, що складається з пари олігонуклеотидних праймерів за п 5 та праймеру SK145M2 з нуклеотидною послідовністю

(13) C2

(11) 47432

(19) UA

AGTGGGGGGACACCAGGCAGCAATGCAAAT.

7 Набір для виявлення нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини ВІЛ-1, який включає олигонуклеотидний праймер за п 1

8 Набір для виявлення нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини ВІЛ-1, який включає олигонуклеотидний праймер за п 2

9 Набір для виявлення нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини ВІЛ-1, який включає пару олигонуклеотидних праймерів за п 3

10 Набір для виявлення нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини ВІЛ-1, який включає набір олигонуклеотидних праймерів за п 4

11 Набір для виявлення нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини ВІЛ-1, який включає пару олигонуклеотидних праймерів за п 5

12 Набір для виявлення нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини ВІЛ-1, який включає набір олигонуклеотидних праймерів за п 6

13 Спосіб ампліфікації нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини ВІЛ-1, який включає здійснення полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймера SKCC1 з нуклеотидною послідо-

вністю

TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACTTCC

або праймера SKCC3 з нуклеотидною послідовністю

TGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTAT.

14 Спосіб за п 13, який відрізняється тим, що при полімеразній ланцюговій реакції додатково використовують праймер SK145 з нуклеотидною послідовністю

AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

15 Спосіб за п 14, який відрізняється тим, що при полімеразній ланцюговій реакції додатково використовують праймер SK145M2 з нуклеотидною послідовністю

AGTGGGGGGACACCAGGCAGCAATGCAAAT.

16 Спосіб за п 13, який відрізняється тим, що при полімеразній ланцюговій реакції додатково використовують праймер SK145M2 з нуклеотидною послідовністю

AGTGGGGGGACACCAGGCAGCAATGCAAAT.

Даний винахід відноситься до молекулярної біології і хімії нуклеїнових кислот. Зокрема воно відноситься до способів і реагентів, призначених для виявлення вірусу імунodefіциту людини типу 1 (ВІЛ-1). Отже, областю застосування винаходу є медицина загалом, і більш конкретно медична діагностика і молекулярна біологія.

Створення способів ампліфікації певних послідовностей нуклеїнових кислот, зокрема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), робить можливим швидке виявлення нуклеїнових кислот, присутніх в зразку в таких малих кількостях, що їх раніше було неможливо виявити (див патенти США 4683195, 4683202 і 4965188). У літературі є численні дані про вдосконалення і застосування ПЛР. Наприклад, широкий спектр пов'язаних з бензоксазидиона проблем представлений в таких виданнях, як PCR Technology principles and applications for DNA amplification, 1989 (ред H A Erlich), Stockton Press, New York, NY, PCR Protocols A guide to methods and applications, 1990 (ред M A Innis і інш.), Academic Press, San Diego, CA, і в PCR Strategies, 1995 (ред M A Innis і інш.), Academic Press, San Diego, CA. Комерційні постачальники, такі, як фірма Perkin Ebner (Norwalk, CT), постачають на ринок реагенти для ПЛР і публікують ПЛР-протоколи.

Огляд даних по застосуванню ПЛР і гібридації з використанням зондів для ампліфікації і виявлення нуклеїнової кислоти ВІЛ-1 представлений у Kwok, 1992, Ann Med 24 211-214, і у Coutlee і інш., 1991, Mol Cell Probes 5 241-259. Засновані на використанні ПЛР методи виявлення ВІЛ-1 описані, наприклад, в патентах США 5008182 і 5176775, у Kellogg і Kwok, 1990, в PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, (ред Innis і інш.), Academic Press, San Diego, CA, 337-347, у Holodny і інш., 1991, J Inf Dis 163 802-

865, Jackson і інш., 1991, AIDS 5 1463-1467, і у Mulder і інш., 1994, J Clin Microbiol 32(2) 292-300.

Комерційні набори для ампліфікації і виявлення ВІЛ-1 постачаються фірмою Hoffmann-La Roche (Nutley, NY). Набір Amplicor™ HIV-1 Test призначений для виявлення *in vitro* провірусної ДНК ВІЛ-1 набору AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test призначений для кількісної оцінки *in vitro* РНК ВІЛ-1. У обох тест-наборах Amplicor для ампліфікації нуклеїнових кислот ВІЛ-1 використовується пара праймерів SK462 (SEQ ID NO 5) і SK431 (SEQ ID NO 6), описаних у Mulder і інш., 1994, J Clin Microbiol 32(2) 292-300, званих в даному описі Amplicor-праймерами для ВІЛ-1.

ВІЛ-1 володіє значною варіабельністю генетичної послідовності. Філогенетичний аналіз послідовностей нуклеїнових кислот генів *gag* і *env* ВІЛ-1 описаний в роботі Myers і інш., 1993, Human Retrovirus and AIDS, 1993, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, включений в даний опис і якості посилення. Всередині групи М були виявлені підтипи А-Ј.

У літературі описані загальноприйняті методи молекулярної біології і хімії нуклеїнових кислот, що відносяться до області даного винаходу (див, наприклад, Sambrook і інш., 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 Hammes і S J Higgins, 1984), і серія Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)).

Були виявлені численні ізоляти групи М вірусу імунodefіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), які або не ампліфікуються, або недостатньо ефективно ампліфікуються з раніше описаними праймерами для гена *gag*, зокрема з використанням Amplicor-

праймерів для ВІЛ-1 SK462 (SEQ ID NO 5) і SK431 (SEQ ID NO 6) Ці ізоляти виявляють не описану раніше варіабельність послідовностей в області, що включає сайти скріплення праймерів Amplicor-праймерів для ВІЛ-1

Даний винахід відноситься до поліпшених праймерів, які здатні ефективно ампліфікувати ці недавно виявлені ізоляти, в доповнення до всіх ізолятів, які здатні ампліфікуватися з використанням Amplicor-праймерів для ВІЛ-1 Крім того, праймери по винаходу здатні ампліфікувати всі відомі ізоляти групи М ВІЛ-1 з приблизно однаковою ефективністю

Даний винахід відноситься далі до поліпшених олигонуклеотидних праймерів, які здатні здійснювати ампліфікацію з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) області гена gag ізолятів підтипів А групи М ВІЛ-1 з приблизно однаковою ефективністю і без одночасної ампліфікації послідовностей, що не є мішенями

Зокрема, даний винахід відноситься до олигонуклеотидних праймерів, призначених для ампліфікації нуклеїнової кислоти вірусу імунodefіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), причому вказаний олигонуклеотидний праймер вибирають з групи, що складається з SKCC1 (SEQ ID NO 3) і SKCC3 (SEQ ID NO 4)

Переважаю кожний з цих праймерів об'єднаний в пару олигонуклеотидних праймерів, що складається з SK145 (SEQ ID NO 1) і SKCC1 (SEQ ID NO 3), або в пару олигонуклеотидних праймерів, що складається з SK145 (SEQ ID NO 1) і SKCC3 (SEQ ID NO 4)

У іншому варіанті ці пари праймерів можуть бути об'єднані з праймером SK145M2 (SEQ ID NO 2) в набір олигонуклеотидних праймерів, які складаються з олигонуклеотидних праймерів SK145 (SEQ ID NO 1), SKCC1 (SEQ ID NO 3) і SK145M2 (SEQ ID NO 2), або в набір олигонуклеотидних праймерів, що складається з олигонуклеотидних праймерів SK145 (SEQ ID NO 1), SKCC3 (SEQ ID NO 4) і SK145M2 (SEQ ID NO 2)

Винахід відноситься також до поліпшених способів ампліфікації області гена gag з підтипів групи М ВІЛ-1, що включають здійснення ПЛР з використанням праймерів по винаходу

Даний винахід далі відноситься до наборів, що містять ампліфікуючий праймер по даному винаходу Ці набори можуть включати додаткові реагенти, такі, як зонди для виявлення або один або декілька реагентів для ампліфікації, наприклад, полімерази, буфери і нуклеозидтрифосфати

Для кращого розуміння винаходу нижче визначені деякі поняття

"Нуклеїнова кислота" і "олигонуклеотид" відносяться до полідезоксирибонуклеотидам (утримуючим 2-дезоксид-Д-рибозу), до полірибонуклеотидам (утримуючим Д-рибозу) і до будь-якого іншого типу полінуклеотида, що являє собою М-глікозид пуринової або піримідинової основи або модифіковану пуринову або піримідинову основу Поняття "нуклеїнова кислота" і "олигонуклеотид" не мають на увазі відмінності в довжині ланцюга і можуть використовуватися взаємозамінно Ці поняття відносяться тільки до первинної структури молекули Таким чином, ці поняття включають двох- і одно-

ланцюгову ДНК, а також двох- і одноланцюгову РНК

Олигонуклеотиди можуть бути отримані будь-яким придатним для цієї мети способом, включаючи, наприклад, клонування і рестрикцію відповідних послідовностей і прямий хімічний синтез за допомогою такого методу, як фосфотрифірний метод, описаний у Narang і інш., 1979, Meth Enzymol 68 90-99, фосфодіефирний метод, описаний у Brown і інш., 1979, Meth Enzymol 68 109-151, діетилфосфорамідитний метод, описаний у Beaucage і інш., 1981, Tetrahedron Lett 22 1859-1862, і метод з використанням твердої підкладки, описаний в патенті США 4458066 Огляд методів синтезу представлений у Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry, 1(3) 165-187

Поняття "гібридизація" відноситься до утворення дуплексної структури двома одноланцюговими нуклеїновими кислотами внаслідок комплементарного спаровування основ Гібридизація може відбуватися між повністю комплементарними ланцюжками нуклеїнової кислоти або між "практично комплементарними" ланцюжками нуклеїнової кислоти, які містять незначні області помилкового спаровування Умови, при яких можуть гібридуватися тільки повністю комплементарні ланцюжки нуклеїнової кислоти, називаються "суворими умовами гібридизації" або "умовами гібридизації, специфічними для послідовності" Стабільні дуплекси практично комплементарних послідовностей можуть бути отримані при менш суворих умовах гібридизації, міра допустимих помилкових спарувань може контролюватися за допомогою відповідного регулювання умов гібридизації Фахівці в області технології нуклеїнових кислот можуть визначити стабільність дуплекса емпіричним шляхом, враховуючи різні параметри, в тому числі, наприклад, довжину і концентрацію пар основ олигонуклеотидів, йонну силу і частоту помилкових спарувань основ, використовуючи для цієї мети відомий в даній області техніки посібник (див., наприклад, Sambrook і інш., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, і Wetmur, 1991, Critical Reviews in Biochem and Mol Biol, 26(3/4) 227-259)

Поняття "праймер" відноситься до природного або синтетичного олигонуклеотиду, здатному діяти як точка ініціації синтезу ДНК в умовах, при яких індукується синтез продукту подовження праймера, комплементарного ланцюга нуклеїнової кислоти, тобто в присутності чотирьох різних нуклеозидтрифосфатів і агента, що забезпечує полімеризацію (тобто ДНК-полімерази або зворотної транскриптази) у відповідному буфері і при відповідній температурі Праймер переважно являє собою одноланцюговий олигонуклеотид Відповідна довжина праймера залежить від цілей застосування праймера, але звичайно складає від 15 до 35 нуклеотидів Короткі молекули праймера звичайно вимагають більш низьких температур для формування досить стабільних гібридних комплексів з матрицею Не потрібно, щоб праймер відображав точну послідовність нуклеїнової кислоти-матриці, але він повинен бути в достатній мірі комплементарним, щоб гібридува-

тися з матрицею. Праймери можуть включати додаткові структури, які дозволяють виявляти або іммобілізувати праймер, але не змінюють основну властивість праймера, а саме, здатність діяти як точка ініціації синтезу ДНК. Наприклад, праймери можуть містити додаткову нуклеотидну послідовність на 5'-кінці, який не гібридується з нуклеїновою кислотою-мішенню, але яка сприяє клонуванню ампліфікованого продукту. Область праймера, комплементарна матриці в достатній для гібридації міри, в контексті даного опису означається як "область гібридазації".

У контексті даного опису поняття "праймер, що ініціює синтез проти ходу транскрипції" відноситься до праймеру, продукт подовження якого являє собою субпослідовність кодуєчого ланцюжка "Праймер, що ініціює синтез по ходу транскрипції", відноситься до праймера, продукт подовження якого являє собою субпослідовність, комплементарну некодуєчому ланцюжку.

Поняття "послідовність-мішень", "область-мішень" і "нуклеїнова кислота-мішень" відносяться до області нуклеїнової кислоти, що підлягає ампліфікації, виявленню або іншому аналізу. У контексті даного опису праймер є "специфічним" для послідовності-мішені, якщо кількість помилкових спарувань, що утворюються між праймером і послідовністю-мішенню, менше, чим кількість помилкових спарувань, що утворюються між праймером і послідовностями, що не є мішенями, які можуть бути присутніми в зразку. Можуть бути вибрані такі умови гібридазації, при яких стабільні дуплекси формуються тільки в тоді, коли кількість присутніх помилкових спарувань не більше кількості помилкових спарувань, що утворюються між праймером і послідовністю-мішенню. При таких умовах праймер, специфічний для мішені, може утворювати стабільний дуплекс тільки з послідовністю-мішенню. Таким чином, застосування праймерів, специфічних для мішені, в умовах ампліфікації відповідної суворості дозволяє здійснювати специфічну ампліфікацію тих послідовностей, які мають сайти скріплення, що є мішенями для праймера. Аналогічно цьому застосування зондів, специфічних для мішені, в умовах гібридазації відповідної суворості дає можливість виявляти конкретну послідовність-мішень.

Поняття "суміш для реакції ампліфікації" відноситься до розчину, який містить реагенти, необхідні для здійснення реакції ампліфікації, і який звичайно містить праймери, термостабільну ДНК-полімеразу, дНТФ і катіон двовалентного металу у відповідному буфері. Реакційна суміш називається повною, якщо вона містить всі реагенти, необхідні для здійснення реакції, і називається неповною, якщо вона містить неповний набір необхідних реагентів. Для фахівця в даній області техніки очевидно, що для зручності, збереження стабільності при зберіганні або ж для можливості регулювати концентрації компонентів в залежності від призначення, компоненти реакції звичайно зберігають у вигляді окремих розчинів, кожний з яких містить неповний набір всіх компонентів, а самі компоненти реакції об'єднують до реакції для створення повної реакційної суміші. Крім того, для фахівця в даній області техніки очевидно, що для

продажу компоненти реакції упаковують по окремість і що придатні комерційні набори можуть містити будь-який неповний набір компонентів реакції, включаючого праймери поданому винаходу.

Праймери для ампліфікації ВІЛ-1

Праймери по даному винаходу володіють здатністю ампліфікувати нуклеїнову кислоту підтипів групи М ВІЛ-1. Праймери є істотно поліпшеними в порівнянні з раніше описаними праймерами в тому відношенні, що вони володіють здатністю ампліфікувати практично з однаковою ефективністю нуклеїнову кислоту з області гена *gag* всіх ізолятів підтипів А-С, що належать групі М, включаючи недавно відкриті ізоляти. Нуклеотидні послідовності праймерів приведені нижче в орієнтації зліва направо 5'→3'.

Праймери, що ініціюють синтез проти ходу транскрипції

SK145 (SEQ ID NO 1)

AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAAT

SK145M2 (SEQ ID NO 2)

AGTGGGGGGACACCAGGCAGCAATGCAAAAT

Праймери, що ініціюють синтез по ходу транскрипції

SKCC1 (SEQ ID NO 3)

TACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACTTCC

SKCC3 (SEQ ID NO 4)

TGAAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTAT

Праймери по даному винаходу, що ініціюють синтез по ходу транскрипції, можуть застосовуватися з будь-яким приведеним в даному описі праймером, що ініціює синтез проти ходу транскрипції. Праймери по даному винаходу, що ініціюють синтез по ходу транскрипції, переважно застосовують з тим праймером SK145 (SEQ ID NO 1), який ініціює синтез проти ходу транскрипції, необов'язково в поєднанні з праймером SK145M2 (SEQ ID NO 2), що ініціює синтез проти ходу транскрипції. Ініціюючий синтез проти ходу транскрипції праймер SK145 (SEQ ID NO 1), описаний у Kellogg і Kwok, 1990, в PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, (ред. Innis і інш.), Academic Press, San Diego, CA 337-347. Другий ініціюючий синтез проти ходу транскрипції праймер SK145M2 (SEQ ID NO 2) гібридується з такою ж областю, що і SK145 (SEQ ID NO 1), але він створений для більш точного спаровування з нуклеотидною послідовністю певних ізолятів підтипу А і Е ВІЛ-1. Як зазначено нижче в прикладах, застосування обох праймерів, що ініціюють синтез проти ходу транскрипції, може сприяти вирівнюванню ефективності ампліфікації певних підтипів.

Ампліфікація

Ампліфікації здійснюють в умовах, які дозволяють ампліфікувати всі підтипи групи М ВІЛ-1, але які володіють достатньою суворістю для того, щоб уникнути ампліфікації послідовностей, що не є мішенями. Переважні умови реакції ампліфікації описані в прикладах у Mulder і інш., 1994, J Clin Microbiol 32(2) 292-300, і в інструкції, включений в тест-набір AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Точні умови не мають вирішального значення при практичному здійсненні винаходу. Оптимізація умов ампліфікації може бути проведена звичайним способом, засновуючись вказівками, які представлені

в даному описі

Праймери і способи, які пропонуються, можуть застосовуватися для виявлення або провірусний ДНК ВІЛ-1, або РНК ВІЛ-1. Ампліфікація РНК з використанням полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) добре відома в даній області техніки і описана в патентах США 5322770 і 5310652, у Myers і Geland, 1991, *Biochemistry*, 30(31) 7661-7666, і у Young і інш., 1993, *J Clin Microbiol*, 31(4) 882-886. Ампліфікація РНК ВІЛ-1 з використанням ЗТ-ПЛР описана у Mulder і інш., 1994, *J Clin Microbiol* 32(2) 292-300 і у Holodny і інш., 1991, *J Inf Dis* 163 802-865.

Методи підготовки зразка, придатні для ампліфікації ДНК і РНК ВІЛ-1, описані в літературі. Вибір конкретного методу не має істотного значення при практичному здійсненні даного винаходу. Фахівець в даній області техніки може вибрати і оптимізувати придатні методи отримання зразка, засновані на даних, представлених в описі винаходу. Переважні методи підготовки зразка, що застосовуються для виявлення провірусної ДНК ВІЛ-1, описані у Casareale і інш., 1992, *PCR Methods and Applications*, 2 149-153, і у Butcher і Spadaro, 1992, *Clin Immunol Newsletter*, 12 73-76. Переважний набір для підготовки зразка для виявлення провірусної ДНК ВІЛ-1 є на ринку у вигляді частини набору Amplicor HIV-1 Test. Переважні методи підготовки зразка, що застосовуються для виявлення РНК ВІЛ-1 в плазмі, описані у Mulder і інш., 1994, *J Clin Microbiol* 32(2) 292-300. Переважний набір для підготовки зразка для виявлення і/або кількісної оцінки РНК ВІЛ-1 є на ринку у вигляді частини набору AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Аналіз ампліфікованого продукту

Праймери для ампліфікації і способи по даному винаходу придатні для будь-якого застосування, заснованого на використанні ампліфікованої нуклеїнової кислоти. Наприклад, клонування і/або секвенування послідовностей ВІЛ-1 поперізується при використанні праймерів по даному винаходу. Методи виявлення нуклеїнових кислот, ампліфікованих з допомогою ПЦР, добре відомі в даній області техніки. Метод, який застосовується для аналізу ампліфікованої нуклеїнової кислоти, не має істотного значення при практичному здійсненні винаходу, і тому може використовуватися будь-який придатний метод. Переважно використовують ампліфікацію РНК ВІЛ-1, як описано в прикладах, що стосуються кількісної оцінки вмісту вірусу.

Приклади способів виявлення ампліфікованої нуклеїнової кислоти включають аналіз продукту ампліфікації з допомогою гель-електрофореза і виявлення з допомогою гібридації з комплементарними олігонуклеотидними зондами.

Придатні методи аналізу для дослідження гібридації мішень-зонд добре відомі в даній області техніки і включають такі методи, як дот-блотинг і зворотний дот-блотинг.

При використанні методу дот-блотинга ампліфіковану ДНК-мішень іммобілізують на твердій підкладці, такий, як найлонова мембрана. Комплекс мембрана-мішень інкубують з міченим зондом при відповідних умовах гібридації, негібридизований зонд видаляють шляхом промивки в умовах відпо-

відній суворості і мембрану досліджують на присутність зв'язаного зонда. Виявлення за допомогою дот-блотинга продуктів ПЛР-ампліфікації описане, наприклад, у Saiki і інш., 1986, *Nature*, 324 163-166, і в патенті США 5468613.

При використанні методу зворотного дот-блотинга зонди іммобілізуються на твердій підкладці, такий, як найлонова мембрана, і мітять ампліфіковану ДНК-мішень. ДНК-мішень звичайно мітять в процесі ампліфікації включенням мічених праймерів. Один або обидва праймера можуть бути міченими. Комплекс мембрана-зонд інкубують з міченою ампліфікованою ДНК-мішенню при відповідних умовах гібридації, негібридизовану ДНК-мішень видаляють шляхом промивки в умовах відповідної суворості і потім фільтр досліджують на присутність пов'язаної ДНК-мішені. Виявлення за допомогою методів зворотного дот-блотинга описане, наприклад, у Saiki і інш., 1989, *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 6230, і в патенті США 5468613.

У альтернативному варіанті аналіз на основі зворотного дот-блотинга може бути проведений з використанням твердої підкладки, що має множинні сайти для відпау зонда або лунок. Наприклад, мікропунктовий планшет найбільш придатний для крупномасштабних клінічних застосувань методів по даному винаходу. Зонди можуть бути іммобілізовані на мікропунктовому планшеті або шляхом пасивного скріплення, або за допомогою проміжного протеїну, такого, як бичачий сироватковий альбумін (БСА), який прилипає до мікропунктових планшетів (див. Tung і інш., 1991, *Bioconjugate Chem*, 2 464-465). Методи на основі зворотного дот-блотинга, в яких використовується мікропунктовий планшет, описані в патенті США 5232829, у Loeffelholz і інш., 1992, *J Clin Microbiol*, 30(11) 2847-2851, у Jackson і інш., 1991, *AIDS*, 5 1463-1467, у Mulder і інш., 1994, *J Clin Microbiol* 32(2) 292-300, в інструкції, включеній в комерційний набір Amplicor HIV-1 Test, і в інструкції, включеній в комерційний набір AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Переважно виявлення і/або кількісну оцінку ампліфікованого продукту здійснюють з допомогою гібридації з олігонуклеотидним зондом, іммобілізованим на мікропунктовому планшеті, з використанням реагентів і протоколів Amplicor HIV-1 Test або AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Застосування методів по даному винаходу для кількісної оцінки РНК ВІЛ-1 описане нижче в прикладах.

У іншому варіанті зонди, кон'юговані з БСА, зв'язують з магнітними мікрочастками. Пов'язані зонди гібридизують в розчині з міченим продуктом ампліфікації і продукт, що утворився видаляють з розчину магнітного шляхом. Іммобілізовані магнітні шляхом гібридні дуплекси потім виявляють описаними вище способами.

Інший придатний метод аналізу, названий 5'-нуклеазним методом, описаний в патентах США 5210015 і 5487972 і у Holland і інш., 1986, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 7276-7280. В 5'-нуклеазним методі мічені зонди, що виявляються, модифіковані таким чином, щоб вони не могли діяти в якості праймерів в синтезі ДНК, додають в реакційну суміш в процесі ампліфікації. Будь-який зонд, який гібридується з ДНК-мішенню протя-

гом кожної стадії синтезу, тобто в процесі подовження праймера, розщеплюють за допомогою 5'→3' екзонуклеазної активності ДНК-полімерази, наприклад, ДНК-полімерази Taq. Потім виявляють продукт розкладання зонда. Таким чином, присутність продукту розкладання зонда свідчить як про те, що сталася гібридизація між зондом і ДНК-мішенню, так і про те, що сталася реакція ампліфікації. У патентах США 5491063 і 5571673 описані поліпшені способи виявлення розщеплення зонда, яке супроводить ампліфікацію.

У описаних вище методах аналізу для полегшення виявлення гібридних дуплексів звичайно використовують мічені олигонуклеотиди. Олигонуклеотиди можуть бути помічені шляхом включення мітки, що виявляється спектроскопічним, фотохімічним, біохімічним, імунохімічним або хімічним методами. Придатні мітки включають ³²P, флуоресцентні фарби, електронно-щільні реагенти, ферменти (наприклад, такі, які використовуються в методі ELISAS), біотин або гаптени і протеїни, для яких доступні антисироватка або моноклональні антитіла. Мічені олигонуклеотиди по винаходу можуть бути синтезовані і помічені з використанням способів, описаних вище для олигонуклеотидів, що синтезуються.

Альтернативний метод виявлення ампліфікації нуклеїнової кислоти ВІЛ-1 шляхом оцінки збільшення загальної кількості двохланцюгової ДНК в реакційній суміші описаний у Higuchi і інш., 1992, Bio/Technology, 10: 413-417, Higuchi і інш., 1993, Bio/Technology, 11: 1026-1030, і в публікації європейської заявки 512334. Виявлення двохланцюгової ДНК-мішені засноване на зростанні флуоресценції, яка виявляється, коли етидйбромід (EBBr) і інші мітки, що зв'язуються з ДНК, зв'язуються з двохланцюговою ДНК. Мітку, що зв'язується з ДНК, додають в реакційну суміш для ампліфікації. Ампліфікація послідовності-мішені приводить до збільшення кількості двохланцюгової ДНК, що в свою чергу приводить до збільшення, що виявляється флуоресценції.

Даний винахід також відноситься до наборів, багатоконтейнерних наборів, що містять відповідні компоненти для практичного здійснення способу по даному винаходу. Такий набір містить, наприклад, праймери для ПЛР-ампліфікації нуклеїнової кислоти ВІЛ-1. Набір також може містити засоби для виявлення ампліфікованій нуклеїнової кислоти ВІЛ-1, такі, як олигонуклеотидні зонди. У деяких випадках зонди фіксують на відповідній підкладці-мембрані. Інші необов'язкові компоненти набору включають, наприклад, агент, придатний як каталізатор синтезу продуктів подовження праймера, нуклеозидтрифосфати як субстрат, засоби, що застосовуються для мічення (наприклад, кон'югат авидин-фермент, або ферментний субстрат і хромоген, в тому випадку, коли мітка являє собою біотин), відповідні буфери для ПЛР або реакцій гібридизації і інструкції по здійсненню даного методу.

Нижче винахід детальніше проілюстрований на прикладах, які не обмежують об'єм винаходу. Численні варіанти здійснення винаходу в об'ємі формули винаходу, які витікають з прикладів, повинні бути очевидні фахівцям в даній області тех-

ніки на основі вищенаведеного опису і подальших прикладів.

Приклад 1

Конструювання кількісного стандарту

Для кількісної оцінки змісту вірусу, здійснюваної з допомогою AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, використовують кількісний стандарт (КС), який ампліфікують із застосуванням тієї ж самої пари праймерів, але який виявляють з використанням іншого зонда. КС додають до зразка, що тестується, у відомій концентрації з метою отримати відомий еталонний сигнал. Для широкого діапазону концентрацій мішені сигнал, що генерується ампліфікованій мішенню або ампліфікованим КС, пропорційний кількості, що є. Кількість копій мішені оцінюють шляхом порівняння сигналу, що генерується при ампліфікації невідомої мішені, і сигналу, що генерується відомим КС.

Праймери по даному винаходу ампліфікують область, яка не повністю охоплюється КС, включеним в набір AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test (KC-Amplacor). Тому для застосування праймерів по даному винаходу конструювали новий КС. Новий КС конструювали з KC-Amplacor шляхом подовження послідовності KC-Amplacor з метою включити сайти скріплення SKCC1 (SEQ ID NO 3) і SKCC3 (SEQ ID NO 4). КС, що утворився, може бути виявлений за допомогою КС-специфічного зонда, що використовується в AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Конструювання плазмиди, що містить послідовність нового КС, з якої транскрибують РНК КС, може бути здійснене з використанням стандартних методів, як описане нижче.

КС-ID-Amplacor, отриманий з AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, ампліфікують з використанням праймерів SK145 (SEQ ID NO 1) і SK151 (SEQ ID NO 7) в умовах, практично відповідних таким, які описані нижче в прикладі 2. В результаті ампліфікації отримували ДНК-продукт, що містить сайти скріплення для SK145 (SEQ ID NO 1) і SK151 (SEQ ID NO 7) і що зберігає внутрішню послідовність, що містить сайт скріплення КС-специфічного зонда.

Ампліфікований продукт, що далі утворився, подовжують для включення сайту скріплення праймера SKCC1 (SEQ ID NO 3) і додають лінкер для можливості клонування продукту. Цього досягають за допомогою повторної ампліфікації продукту з використанням праймера SK145 (SEQ ID NO 1), подовженого на 5'-кінці з тією метою, щоб включити лінкер HindIII і SKCC1 (SEQ ID NO 3). Відповідні умови ампліфікації описані у Kellogg і Kwok, 1990, в PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (ред. Innis і інш.), Academic Press, San Diego, CA: 337-347, за винятком того, що використовують більш низьку температуру відпау/подовження (наприклад, 42°C) для гібридизації SKCC1 (SEQ ID NO 3).

Після цього ампліфікований продукт, що утворився, ще раз подовжують для включення сайту скріплення праймера SKCC3 (SEQ ID NO 4) і додають другу лінкер до іншого кінця для забезпечення можливості клонування продукту. Цього досягають за допомогою ампліфікації продукту з використанням праймера SK145 (SEQ ID NO 1), подовженого на 5'-кінці з тією метою, щоб включи-

ти лінкер HindIII, як описано вище, поряд з праймером SKCC3 (SEQ ID NO 4), подовженим на 5'-кінці для включення лінкера XbaI з використанням описаних вище умов ампліфікації

Потім ампліфікований продукт вбудовують в плазмиду Ампліфіковану ванну ДНК і плазмиду рSP64 (фірма Promega, Madison, WI) по окремої розщеплюють з допомогою HindIII і XbaI, а потім лігують з використанням стандартних методів. Компетентні клітки трансформують рекомбінантними плазмидами і отримують клон, який містить правильну вставку. Клоновану вставку в отриманій рекомбінантній плазміді необхідно секвенувати з метою визначити, що в сайти скріплення праймера або зонда не введені мутації

РНК кількісного стандарту транскрибують виходячи з рекомбінантної плазмиди, що містить КС-послідовність, з використанням набору MEGAscript™ SP6 (фірма Ambion, Inc., Austin, TX)

Приклад 2

Кількісна оцінка РНК ВІЛ-1

У цьому прикладі описаний спосіб оцінки відносної ефективності ампліфікації різних ізолятів ВІЛ-1. Для порівняння також здійснювали ампліфікації з використанням набору AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test

Ізоляти ВІЛ-1 отримували з ВІЛ-1-позитивних клінічних зразків. Область гена gag клонували і секвенували по стандартних методах, а підтип клонуемого ВІЛ-1 визначали, засновуючись на

аналізі послідовності. Був виявлений ряд нових ізолятів ВІЛ-1. Для цієї мети на основі нуклеотидних послідовностей вибирали певні ізоляти, для яких передбачається наявність проблем при використанні набору AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Крім того, використали ізоляти, яким була властива варіабельність послідовності, характерна для підтипів групи М

Нуклеїнова кислота-мішень

Конструювали плазмиди, що містять область гена gag ВІЛ-1 з кожного ізолята, і РНК-матриці ВІЛ-1 транскрибували практично відповідно до методу, описаного у Holodny і інш., 1991, J. Inf. Dis., 163: 802-865. Готували маточні розчини кожної матриці і визначали концентрації матриць. Маточні розчини розбавляли, засновуючись на визначенні відносних концентрацій, таким чином, щоб концентрація матриць, що додаються в кожну реакційну суміш, була однаковою. Абсолютна кількість копій матриці, що додаються в реакційні суміші, становила приблизно 4000-8000

Кількісний стандарт

КС, описаний в прикладі 1, вносили в кожну реакційну суміш у відомій концентрації, звичайно приблизно 100 копій на реакційну суміш

Праймери

Реакції А-Е здійснювали з використанням наступних комбінацій праймерів

Комбінації праймерів, що зрівнюються

Реакція	Комбінація праймерів
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) і 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) і SK145M2 (SEQ ID NO 2)
	SKCC3 (SEQ ID NO 4)

Всі праймери біотинували на 5'-кінці для виявлення методом зворотного дот-блотинга на мікролунковому планшеті. Послідовності додаткових, не описаних вище праймерів, приведені нижче в орієнтації 5'→3'

Праймери, що ініціюють синтез проти ходу транскрипції

SK462 (SEQ ID NO 5)
AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

Праймери, що ініціюють синтез по ходу транскрипції

SK431 (SEQ ID NO 6)
TGCTATGTCAGTTCCTCCCTTGGTTCTCT

SK151 (SEQ ID NO 7)
TGCTATGTCACTTCCCTTGGTTCTCT

Ампліфікація

Реакцію ампліфікації А проводили з використанням реагентів і умов з набору

AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test

Реакцію ампліфікації Б проводили в об'ємах по 100мкл, що містять наступні реагенти

РНК-матриця ВІЛ-1

РНК КС

50мМ біцин, рН 8,3

111мМ К(ОАс)

3, 6мМ Mn(OAc)₂

500мкМ дУТФ

300мкМ кожного з дАТФ, дЦТФ і дГТФ

50мкМ дТТФ

15%- ний гліцерин

0,2мкМ кожного біотинованого праймера

2 одиниці урацил-ДНК-глікозилази (УДГ) *

10 одиниць ДНК-полімерази rTth *

* Виробництво і розробка фірми Hoffman-La Roche і продаж фірмою Perkin Elmer (Norwalk, CT)

Реакції ампліфікації В і Г здійснювали практично при таких же умовах, які використовувалися в реакції Б, але з наступними змінами

100мМ К(ОАс)
500мкМ кожного з дАТФ, дЦТФ і дГТФ
7,5% -ний глицерин
10 одиниць УДГ

Реакції ампліфікації Д і Е здійснюють практично при таких же умовах, які використовувалися в реакціях В і Г, але за винятком того, що концентрація глицерину, що використовується, становила

10% Невеликі відмінності в реакційних сумішах були результатом попередньої оптимізації умов ампліфікації для кожної пари праймерів

Реакції ампліфікації Б-Е проводили в ДНК-термоциклі типу TC9600 (фірма Perkin Elmer, Norwalk, CT) з використанням наступного температурного профілю

інкубація перед реакцією		50°C протягом 2 хвилин
зворотна транскрипція		60°C протягом 30 хвилин,
4 циклу	Денатурація	95°C протягом 10 секунд,
	Відпал	55°C протягом 10 секунд і
	Подовження	72°C протягом 10 секунд,
26 циклів	Денатурація	90°C протягом 10 секунд,
	Відпал	60°C протягом 10 секунд і
	Подовження	72°C протягом 10 секунд,
остаточне подовження		72°C протягом 15 хвилин

Виявлення ампліфікованого продукту з допомогою гібридизації із зондом

Ампліфіковані продукти виявляли з використанням реагентів і протоколів з набору AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test Початкову концентрацію мішені, що оцінюється, обчислювали відповідно до даного опису

Результати

При використанні кількісного методу AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test початкову концентрацію мішені оцінюють шляхом порівняння сигналу, генерованого після ампліфікації мішені, з сигналом, генерованим після ампліфікації КС відомої концентрації. Оскільки відома концентрація КС являє собою концентрацію перед ампліфікацією, а сигнали, що порівнюються, являють собою сигнали, отримані після ампліфікації, то зміни у відносній ефективності ампліфікації повинні впливати на оцінку початкової концентрації невідомої мішені. При кількісній оцінці з допомогою AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test використовують калібрування, засноване на ефективності ампліфі-

кації підтипа В ВІЛ-1. Відомо, що інші підтипи ВІЛ-1 можуть ампліфікуватися з більш низькою ефективністю, і, отже, концентрація мішені, що оцінюється, може бути занижена в порівнянні з істинною. У даному експерименті до кожної реакційної суміші додавали РНК-мішені у відомій концентрації. Таким чином, відносна ефективність ампліфікації для кожного ізолята може бути визначена шляхом порівняння концентрацій мішені, що оцінюються. Оскільки при кількісній оцінці в наборі AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test використовують калібрування, засноване на ефективності ампліфікації підтипа В ВІЛ-1, як еталон використали концентрацію мішені підтипа В (клон 105-1), що оцінюється. Для кожного ізолята концентрацію мішені підтипа В (клон 105-1), що оцінюється, співвідносили з концентрацією мішені для ізолята, що оцінюється, отримуючи міру відносної ефективності ампліфікації. Ця відносна ефективність ампліфікації приведена нижче в таблиці. Символ "—" означає, що реакцію не проводили

Ефективність відносно підтипа В

Клон	Підтип	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	1Д	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	—	U	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
106-3	Г	0,6	—	0,5	0,8	0,5	0,5
109-1	Г	32,5	1	0,5	0,6	0,6	0,3

Результати показують, що при використанні набору AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test (реакція А) різні ізоляти ВІЛ-1 ампліфікувалися з істотно

різною ефективністю. Деякі з ізолятів, включаючи ізолят підтипа Е, клон 110-5, ампліфікувалися з ефективністю принаймні приблизно в 500 раз

більш низької, ніж ефективність ампліфікації клону 105-1 підтипа В

Хоч не всі ізоляти були досліджені, застосування пари праймерів SK145 (SEQ ID NO 1) і SK1S1 (SEQ ID NO 7) (реакція Б) дозволило істотно вирівняти ефективність ампліфікації. Однак клон 110-5 підтипа Е як і раніше ампліфікувався з ефективністю принаймні приблизно в 500 раз більш низької, ніж ефективність ампліфікації клону 105-1 підтипа В

Застосування праймерів SK145 (SEQ ID NO 1) і SKCC1 (SEQ ID NO 3) (реакція В) дозволило ампліфікувати всі ізоляти, включаючи ізолят підтипа Е, клон 110-5, з ефективністю приблизно в 3 рази меншої, ніж ефективність ампліфікації клону 105-1 підтипа В. Додавання праймера SK145M2 (SEQ ID NO 2) (реакція Г) ще більш поліпшило ефективність ампліфікації ізолята 110-5, зробивши її практично рівною такого для еталонного штаму підтипа В. Аналогічно цьому застосування праймерів SK145 (SEQ ID NO 1) і SKCC3 (SEQ ID NO 4) (реакція Д) дозволило ампліфікувати всі ізоляти, включаючи ізолят підтипа Е, клон 110-5, з ефективністю приблизно в 5 раз менше, ніж ефективність ампліфікації клону 105-1 підтипа В

Додавання праймера SK145M2 (SEQ ID NO 2) (реакція Е) ще більш поліпшило ефективність ампліфікації ізолята 110-5, зробивши її практично рівною ефективності для еталонного штаму підтипа В

Приклад 3

Кількісна оцінка ВІЛ-1 в клінічних зразках

У цьому прикладі 30 клінічних зразків, отриманих від пацієнтів з Сенегалу з позитивною серологічною реакцією, аналізували на присутність РНК

ВІЛ-1. Підтипи, присутні в клінічних зразках, не визначали. Однак підтипи А і D є звичайними для цього регіону Африки, тому потрібно було чекати, що деякі з цих клінічних зразків або не будуть ампліфікуватися зовсім, або будуть ампліфікуватися неефективно при використанні AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Зразки готували таким чином. Зразки плазми (80 - 250мкл) об'єднували в конічний центрифужної пробірці об'ємом 1,5мл з 20мкл 0,25% (маси/об'єм) червоних полістиролових мікросфер типу Estapor (фірма Bangs Laboratories, Inc., Carmel, IN) і центрифугували протягом 1 ч при 25300g при 4°C. Супернатант відсмоктували і дебрис ресуспендували в 250мкл лізуючого буфера (50мкл лізуючого буфера містить 6,7мкл 30од/мл RNasin (фірма Promega, Madison, WI), 0,67мкл 100мМ дитиотрептола (ДТТ), 2мкл 10%-ного NP40 (фірма Pierce, Rockford, IL), 0,25мкл 4мг/мл poly-rA РНК, і 40,4мкл обробленої Дерс H₂O). Дебрис інкубували при кімнатній температурі протягом принаймні 15хв і інтенсивно перемішували для забезпечення повного змішання

Ампліфікації здійснювали в реакційних сумішах об'ємом 100мкл, що містять 50мкл розчину вірусного пізата і 50мкл 2-кратний суміші ампліфікованих реагентів, складеної таким чином, щоб кінцева концентрація реагенту відповідала вказаній вище. У кожен реакційну суміш у вигляді частини сумілі реагентів додавали приблизно 100 копій відповідного КС. Виявлення ампліфікованого продукту здійснювали з використанням реагентів і протоколів AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, як описано вище

Ампліфікації кожного зразка проводили з наступними комбінаціями праймерів

Комбінації праймерів, що порівнюються	
Реакція	Комбінація праймерів
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) і SK145M2 (SEQ ID NO 2)
	SKCC1 (SEQ ID NO 3)

Результати, виражені у вигляді кількості копій

ВІЛ-1-матриці на мл плазми, узагальнені нижче

Визначувальна концентрація мішені (копи/мл)

Ізолят	А	Б		В	
		Дублікат		Дублікат	
DKN035	0	800	1860	1600	1100
DKN079	360	30060	37240	91780	152300
DKN154	1140	21660	54560	68820	67120
DKN162	0	16020	25980	64340	21880
DKN162	0	12180	10520	14300	8047
DKN169	0	3140	7000	5651	1040
DKN 171	1180	640	500	560	1040
DKN282	560	3400	4360	5560	3460
DKN 402	340	4260	10520	7000	5060
MBN26	27740	16940	19220	16700	18680
MBN31	180	1820	1820	1720	2240
MBN34	840	2160	2200	3100	3120

MIN 002	2320	51320	121100	144180	123900
MIN 012	2960	33620	40920	40740	75840
MIN 013	30360	31980	55360	42800	71220
MIN 030	17625	178500	273938	169750	189625
MIN 053	+	534960	231620	530900	878340
MIN 055	10560	43960	542220	49400	37400
MIN 074	5700	3980	6020	3640	4940
MIN 112	30480	271980	490780	423600	416140
MIN 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

Ізолят	А	Б		В	
		Дублікат		Дублікат	
MIN 146	200	49920	32100	19900	30400
MIN 217	0	32220	1880	2320	2580
MIN 589	154780	267740	127100	144160	228040

Результати свідчать про те, що комбінації праймерів Б і В по даному винаходу дозволяють ампліфікувати більшу кількість клінічних зразків. Комбінації праймерів Б і В дозволяють ампліфікувати всі з 30 зразків, крім одного. У протилежність цьому при використанні AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test не вдалося ампліфікувати 6 із 29 зразків. Ампліфікація зразка MIN 053 з використанням AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test привела до отримання сильного сигналу від мішені, але не вдалося генерувати сигнал КС. Тому не вдалося оцінити кількісно цей зразок, і він позначений символом "+" в приведений вище таблиці.

Крім того, для значної кількості зразків кількість копій, виявлених з використанням як комбінації праймерів Б, так і В, було значно вище, ніж

така, що виявлено з використанням AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test. Враховуючи варіабельність ефективності ампліфікації, яка показана вище в прикладі 2, можна передбачити, що більш низькі виявлені концентрації матриці, отримані з використанням AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, ймовірно є результатом істотно більш низької ефективності ампліфікації.

Вірусна РНК не була виявлена в зразку MIN 067. Однак невідомо, чи є це слідством невиявленої варіабельності послідовності-мішені, що слугує перешкодою для гібридизації праймера або зонда, або це зумовлене якою-небудь іншою причиною.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

(1)	ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ	
(i)	ЗАЯВНИК	
	(E)	КРАЇНА Швейцарія
	(F)	ПОШТОВИЙ КОД (ZIP) CH-4070
	(G)	ТЕЛЕФОН 061 688 37 82
	(H)	ТЕЛЕФАКС 061 688 13 95
	(I)	ТЕЛЕКС 962292/965542 hlr ch
(ii)	НАЗВА ВІНАХОДУ Праймери для виявлення ВІЛ-1	
(iii)	КІЛЬКІСТЬ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ 7	
(iv)	ФОРМА УЯВЛЕННЯ ДЛЯ КОМП'ЮТЕРА	
	(A)	ТИП НОСІЯ флорпи-диск
	(B)	КОМП'ЮТЕР Apple Macintosh
	(C)	ОПЕРАЦІЙНА СИСТЕМА System 7.1 (Macintosh)
	(D)	ПРОГРАМНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ Word 5.1
(vi)	ДАНІ ПРО ПРІОРИТЕТНУ ЗАЯВКУ	
	(A)	НОМЕР ЗАЯВКИ 60-037744
	(B)	ДАТА ПОДАВАННЯ 17.01.97
(2)	ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO. 1	
(i)	ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ	
	(A)	ДОВЖИНА 30 пар основ
	(B)	ТИП нуклеїнова кислота
	(C)	ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАНЦЮГА одноланцюгова
	(D)	ТОПОЛОГІЯ лінійна
(ii)	ТИП МОЛЕКУЛИ ДНК (геномна)	

(xi)	ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 1
	AGTGGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT
(2)	ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO 2
(i)	ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
	(A) ДОВЖИНА 30 пара основ
	(B) ТИП нуклеїнова кислота
	(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАНЦЮГА одноланцюгова
	(D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
(ii)	ТИП МОЛЕКУЛИ ДНК (геномна)
(xi)	ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 2
	AGTGGGGGGA CACCAGGCAG CAATGCAAAT
(2)	ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO 3
(i)	ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
	(A) ДОВЖИНА 28 пара основ
	(B) ТИП нуклеїнова кислота
	(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАНЦЮГА одноланцюгова
	(D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
(ii)	ТИП МОЛЕКУЛИ ДНК (геномна)
(xi)	ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 3
	TACTAGTAGT TCCTGCTATG TCACTTCC
(2)	ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO 4
(i)	ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
	(A) ДОВЖИНА 26 пара основ
	(B) ТИП нуклеїнова кислота
	(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАНЦЮГА одноланцюгова
	(D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
(ii)	ТИП МОЛЕКУЛИ ДНК (геномна)
(xi)	ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 4
	TGAAGGGTAC TAGTAGTTCC TGCTAT
(2)	ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO 5
(i)	ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
	(A) ДОВЖИНА 30 пара основ
	(B) ТИП нуклеїнова кислота
	(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАНЦЮГА одноланцюгова
	(D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
(ii)	ТИП МОЛЕКУЛИ ДНК (геномна)
(xi)	ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 5
	AGTTGGAGGA CATCAAGCAG CCATGCAAAT
(2)	ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO 6
(i)	ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
	(A) ДОВЖИНА 27 пара основ
	(B) ТИП нуклеїнова кислота
	(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАНЦЮГА одноланцюгова
	(D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
(ii)	ТИП МОЛЕКУЛИ ДНК (геномна)
(xi)	ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 6
	TGCTATGTCA GTTCCSCTTG GTTCTCT
(2)	ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПОСЛІДОВНІСТЬ SEQ ID NO 7
(i)	ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛІДОВНОСТІ
	(A) ДОВЖИНА 27 пара основ
	(B) ТИП нуклеїнова кислота
	(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАНЦЮГА одноланцюгова
	(D) ТОПОЛОГІЯ лінійна
(ii)	ТИП МОЛЕКУЛИ ДНК (геномна)
(xi)	ОПИС ПОСЛІДОВНОСТІ SEQ ID NO 7
	TGCTATGTCA GTTCCSCTTG GTTCTCT

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71