



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 99793

(13) C2

(51) МПК

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2011 10011	(72) Винахідник(и):	Джаганнатх Манджула (IN), Наір Чандрасекхар Бхаскаран (IN), Суббарао Пілларісетті Венката (IN)
(22) Дата подання заявки:	27.01.2010	(73) Власник(и):	БІГТЕК ПРАЙВІТ ЛІМІТЕД, II Floor, SID Entrepreneurship Building, Indian Institute of Science [IISc] Campus, Malleshwaram, Bangalore 560 012, Karnataka, India (IN)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.09.2012	(74) Представник:	Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр. №4
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	00314/CHE/2009	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2003031934 A2, 17.04.2003. WO 2007033444 A2, 29.03.2007. WO 2009122422 A1, 08.10.2009. ABE A. ET AL.: 'Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR.' JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY vol. 37, no. 9, 1999, pages 2899 - 2903.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13.02.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	IN		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.10.2011, Бюл.№ 19		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2012, Бюл.№ 18		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/IN2010/000048, 27.01.2010		

(54) НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В

(57) Реферат:

Винахід належить до набору для виявлення вірусу гепатиту В, що містить олігонуклеотидний зонд та пару відповідних праймерів, суміші для ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) для виявлення вірусу гепатиту В, способу виявлення вірусу гепатиту В у зразку.

UA 99793 C2

Галузь техніки

Даний винахід стосується способу визначення присутності та кількісного визначення нуклеїнових кислот HBV (вірусу гепатиту В) в зразках.

Передумови винаходу та попередній рівень техніки

5 HBV викликає гострий і хронічний гепатит (гепатит типу В), а у важких випадках – цироз печінки і рак. Недавні дослідження показали, що в усьому світі число людей, інфікованих вірусом гепатиту В (HBV), становить приблизно 300 мільйонів.

ПЛР аналізи для прямого виявлення нуклеїнових кислот HBV у крові/сироватці або плазмі інфікованого суб'єкту можуть забезпечити перевагу у визначенні точного вірусного навантаження інфікованого пацієнта, що буде корисним для лікаря з метою встановлення точної стадії інфекції. Це може також допомогти лікареві забезпечити належну терапію для пацієнта. Кількісне визначення точного вірусного навантаження також може допомогти у моніторингу перебігу антивірусної терапії. Використовувані в даний час методи діагностики HBV 10 ґрунтуються на ELISA (імуноферментному аналізі - ІФА), який заснований на наявності сироваткових маркерів, таких як, HBeAg, HBsAg, або анти-HBc IgM, анти-HBe, анти-HBs, або анти-HBc IgG. Оскільки засновані на ELISA методи не можуть дати уявлення про точне вірусне навантаження потрібно шукати спосіб, який може надати кількісну міру вірусного навантаження. Існує необхідність в розробці ефективного способу з урахуванням вищезазначених проблем, пов'язаних з відомими методами виявлення, так, щоб один і той же спосіб можна було 20 використати для виявлення HBV, що може дати якісний і кількісний показник вірусного навантаження.

Задачі

Перша задача даного винаходу полягає в забезпеченні способу, який дозволяє визначити наявність нуклеїнових кислот HBV в зразках.

25 Друга задача даного винаходу полягає в забезпеченні зондів і праймерів для виявлення HBV.

Третя задача даного винаходу полягає в забезпеченні суміші для реакції ПЛР для виявлення HBV.

30 Четверта задача даного винаходу полягає в забезпеченні набору, що включає зонди і праймери для виявлення HBV.

Короткий опис фігур, що додаються

Фіг. 1 Реальний графік HBV-позитивних зразків з використанням комерційного набору

Фіг. 2 Реальний графік HBV-позитивних зразків з використанням SEQ ID NO. 1

Фіг. 3 Реальний графік HBV-позитивних зразків з використанням SEQ ID NO. 2

35 Фіг. 4 Реальний графік HBV-негативних зразків з використанням SEQ ID NO. 1

Фіг. 5 Реальний графік HBV-негативних зразків з використанням SEQ ID NO. 2

Фіг. 6 HBV-стандартна крива

Короткий опис винаходу

Таким чином, даний винахід стосується олігонуклеотидних зондів SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 40 2; праймерів SEQ ID NO. 3, 4, 5 і 6; суміші для реакції ПЛР для виявлення вірусу гепатиту В, причому вказаної суміші, яка містить реагенти для ампліфікації нуклеїнових кислот, подвійні мічені зонди, викладені в SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2, праймери SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6 і досліджуваний зразок; способу виявлення вірусу гепатиту В, зазначеного способу, що включає наступні стадії: формування реакційної суміші, яка містить реагенти для ампліфікації нуклеїнових кислот, олігонуклеотидні зонди SEQ ID NO. 1 або SEQ ID NO. 2 з відповідними праймерами SEQ ID NO. 3 та 4 або SEQ ID NO. 5 і 6 відповідно, досліджуваний зразок, і використання реакційної суміші в ПЛР, щоб отримати копії цільової послідовності, що супроводжується вимірюванням збільшення сигналу флуоресценції для виявлення вірусу гепатиту В, а також набір для виявлення вірусу гепатиту В, вказаний набір, що включає подвійні 50 мічені зонди SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2, окремо або в комбінації; відповідну пару праймерів SEQ ID NO. 3, 4 і 5, 6, окремо або в комбінації і реагенти для ампліфікації.

Детальний опис винаходу

Даний винахід стосується олігонуклеотидних зондів SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2.

В одному з варіантів винаходу вказані зонди – подвійні мічені зонди.

55 В одному з варіантів винаходу вказані зонди виявляють вірус гепатиту В.

В одному з варіантів винаходу вказані зонди кон'юговані з мітками, що визначаються, з флуорофором на 5' кінці і агентом для гасіння у внутрішній ділянці або на 3' кінці.

В одному з варіантів винаходу SEQ ID NO. 1 сконструйована для поверхневого гену вірусу гепатиту В, а SEQ ID NO. 2 - спроектована для ділянки Х-гену вірусу гепатиту В.

60 Даний винахід стосується праймерів SEQ ID NO. 3, 4, 5 і 6.

В одному з варіантів винаходу вказані праймери SEQ ID NO. 3 та SEQ ID NO. 5 є смисловими, а SEQ ID NO. 4 і № 6 SEQ ID - антисмисловими праймерами, відповідно.

В одному з варіантів винаходу вказані праймери SEQ ID NO. 3 та SEQ ID NO. 4 призначені для подвійного міченого зонду SEQ ID NO. 1, а праймери SEQ ID NO. 5 і № 6 SEQ ID – для подвійного міченого зонду SEQ ID NO. 2.

Даний винахід стосується суміші для реакції ПЛР для виявлення вірусу гепатиту В, вказаної суміші, яка містить реагенти для ампліфікації нуклеїнових кислот, подвійні мічені зонди, викладені в SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2, праймери SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6 і досліджуваний зразок.

В одному з варіантів винаходу зазначений зразок вибирається з групи, що складається з крові, сироватки та плазми.

В одному з варіантів винаходу вказана ПЛР – ПЛР у реальному часі.

Даний винахід стосується способу виявлення вірусу гепатиту В, що включає наступні стадії:

(а) формування реакційної суміші, яка містить реагенти для ампліфікації нуклеїнових кислот, олігонуклеотидний зонд SEQ ID NO. 1 або SEQ ID NO. 2 з відповідними праймерами SEQ ID NO. 3 та 4 або SEQ ID NO. 5 і 6 відповідно, досліджуваний зразок, і

(б) використання реакційної суміші для ПЛР для отримання копій цільової послідовності, що супроводжується вимірюванням збільшення сигналу флуоресценції для виявлення вірусу гепатиту В.

В одному з варіантів винаходу вказані зонди кон'юговані з мітками, що визначаються, з флуорофором на 5' кінці і агентом для гасіння у внутрішній ділянці або на 3' кінці.

В одному з варіантів винаходу вказані праймери SEQ ID NO. 3 та SEQ ID NO. 5 є смисловими, а SEQ ID NO. 4 і SEQ ID NO. 6 – антисмисловими праймерами, відповідно.

В одному з варіантів винаходу вказаний досліджуваний зразок вибирається з групи, що складається крові, сироватки та плазми.

В одному з варіантів винаходу вказані реагенти для ампліфікації включають хлорид магнію, Таq-полімеразу і буфер для ампліфікації.

В одному з варіантів винаходу вказане виявлення носить якісний або кількісний характер.

В одному з варіантів винаходу вказаний флуорофор вибирається з групи, що складається з флуоресцеїну і похідних флуоресцеїну FAM, VIC, JOE, 5-(2'-аміноетил) амінонафтален-1-сульфонові кислоти, кумарину та похідних кумарину, люциферу жовтого, техаського червоного, тетраметилродаміну, 6-карбоксифлуоресцеїну, тетраклоро-6-карбоксифлуоресцеїну, 5-карбоксиродаміну і ціанінових барвників.

В одному з варіантів винаходу вказаний агент для гасіння вибирається з групи, що включає метилтетрародамін [TAMRA], 4'-(4-диметиламінофенілазо) бензойної кислоти, 4-диметиламінофенілазофеніл-4'-малеїміду, тетраметилродаміну, карбокситетраметилродаміну і BHQ барвників.

В одному з варіантів винаходу вказаний флуорофор – бажано 6-карбоксифлуоресцеїн на 5' кінці, а вказаний агент для гасіння – бажано тетраметилродамін на 3' кінці або "Black hole quencher 1" [BHQ1] у внутрішній ділянці або в 3' кінці.

Даний винахід стосується набору для виявлення вірусу гепатиту В, вказаний набір, що включає подвійні мічені зонди SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2, окремо або в комбінації; відповідні пари праймерів SEQ ID NO. 3, 4, 5, 6, окремо або в комбінації і реагенти для ампліфікації.

В одному з варіантів винаходу вказані реагенти для ампліфікації включають хлорид магнію, Таq-полімеразу і буфер для ампліфікації.

Список біологічних послідовностей винаходу

SEQ ID NO. 1 і відповідні праймери 3 та 4 мають ідентифікаційні номери послідовності як показані в таблиці 1 нижче:

Таблиця 1

ID НОМЕР ПОСЛІДОВНОСТІ	НУКЛЕОТИДНА ПОСЛІДОВНІСТЬ
SEQ ID No. 1	5'– FAM – CCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTT – TAMRA – 3' або 5'–FAM–CCTCAGTCCGTT/iBHQ1T/CTCCTGGCTCAGTT-Phos– 3'
SEQ ID No. 3	5' – TGCACCTGTATTTCCCATCCCC – 3'
SEQ ID No. 4	5' – CCACATCATCCATATAACTGAAAGCC – 3'

SEQ ID NO. 2 і відповідні праймери 5 і 6 мають ідентифікаційні номери послідовності, що показані в таблиці 2

Таблиця 2

ID НОМЕР ПОСЛІДОВНОСТІ	НУКЛЕОТИДНА ПОСЛІДОВНІСТЬ
SEQ ID No. 2	5' – FAM – CCCCTTCTTCGTCTGCCGT – TAMRA – 3' або 5' – FAM – CCCCTTCTTCG/iBHQ1T/CTGCCGT – Phos-3'
SEQ ID No. 5	5' – CGTCGGCGCTGAATCC – 3'
SEQ ID No. 6	5' – GAAGCGAAGTGCACACGG – 3'

5 Спроектвані "олігонуклеотидні" зонди можуть бути використані для виявлення нуклеїнових кислот HBV в інфікованих зразків за рахунок використання ПЛР у реальному часі. Режим виявлення – шляхом вимірювання збільшення флуоресценції при ПЛР.

10 HBV база даних була ретельно досліджена для виявлення найбільш консервативних ділянок, характерних для геному HBV. Найбільш перспективні ділянки з консервативними ділянками були вибрані для розробки наборів праймерів і зондів. Консервативні ділянки з поверхневого і X генів були отримані і проаналізовані для проектування зондів і праймерів.

15 Відповідно до цього винаходу SEQ ID NO. 1 разом з відповідними смисловими і антисмисловими праймерами SEQ ID NO. 3 та SEQ ID NO. 4 призначені для поверхневого гена геному HBV. Аналогічно, SEQ ID NO. 2 разом з відповідними смисловими і антисмисловими праймерами SEQ ID NO. 5 і SEQ ID NO. 6 призначені для X гена геному HBV.

20 Відповідно до цього винаходу вказаний "олігонуклеотид" з SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2, що має мітку, яка виявляється, з флуорофором на 5'кінці і агент для гасіння у внутрішній ділянці або на 3' кінці. Флуорофор вибирається з групи, що включає флуоресцеїн і похідні флуоресцеїну FAM, VIC, JOE, 5-(2'-аміноетил)амінонафтален-1-сульфонову кислоту, кумарин та похідні кумарину, люцифер жовтий, техаський червоний, тетраметилпродамін, 6-карбоксифлуоресцеїн, тетрахлоро-6-карбоксифлуоресцеїн, 5-карбоксипродамін і ціанінові барвники.

25 У ще одному варіанті виконання цього винаходу вказаний агент для гасіння вибирається з групи, що включає тетраметилпродамін, 4'-(4-диметиламінофенілазо)бензойну кислоту, 4-диметиламінофенілазофеніл-4'-малеїмід, тетраметилпродамін, карбокситетраметилпродамін і BHQ барвники. Вказаний флуорофор – бажано 6-карбоксифлуоресцеїн [FAM], і агент для гасіння – "Black hole quencher 1" [BHQ1], коли присутній внутрішньо, і тетраметилпродамін [TAMRA] або "Black hole quencher 1" [BHQ1], коли присутній на 3'кінці.

30 Даний винахід стосується способу виявлення вірусу гепатиту В, в якому зазначена ПЛР суміш, що складається з реагентів для ампліфікації нуклеїнової кислоти, "олігонуклеотидні" зонди, спроектовані як SEQ ID NO. 1 або SEQ ID NO. 2, разом з відповідними праймерами SEQ ID NO. 3, 4, 5 і 6, і досліджуваний зразок підлягає ампліфікації з використанням ПЛР у реальному часі для отримання копії цільової послідовності. Ампліфікація вимірюється з точки зору збільшення сигналу флуоресценції.

35 "Олігонуклеотидний" зонд має розмір 19-27 нуклеотидів. Спроектвані зонди мають флуорофор на 5'кінці і агент для гасіння у внутрішній ділянці або на 3'кінці.

40 Вказаний флуорофор – бажано 6-карбоксифлуоресцеїн [FAM], агент для гасіння – "Black hole quencher 1" [BHQ1], коли присутній внутрішньо, і тетраметилпродамін [TAMRA] або "Black hole quencher 1" [BHQ1], коли присутній на 3'кінці. Даний винахід використовується для виявлення вірусу гепатиту В в крові/сироватці/плазмі крові. Спосіб, що використовується для виявлення – шляхом моніторингу збільшення флуоресценції при ПЛР.

45 Відповідно до цього винаходу "олігонуклеотидний" зонд відноситься до короткої послідовності рибонуклеїнової кислоти (РНК) і дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). "Олігонуклеотидні" зонди можуть специфічно гібридизуватися з нуклеїновими кислотами з усіх генотипів вірусу гепатиту В (HBV). "Олігонуклеотидні" зонди відповідно до цього винаходу, як правило, приблизно 19-27 нуклеотидів в довжину. "Олігонуклеотидні" зонди, згадані авторами, специфічно гібридизуються з послідовністю нуклеїнової кислоти HBV, не виявляючи неспецифічну гібридизацію до не-HBV нуклеїнових кислот.

50 Зонди "олігонуклеотидної" послідовності, що застосовуються авторами, дотримуються принципів хімії Taqman. TaqMan зонди, які також називають подвійні-барвникові олігонуклеотидні або подвійні мічені зонди, є найбільш широко використовуваним типом зондів.

Вони були розроблені компанією Рош [Базель, Швейцарія] і ABI [Фостер-Сіті, США] на основі аналізу, в якому спочатку використовували радіомічений зонд, і складаються з одностанцюгової послідовності зонда, яка є комплементарною до одного з ланцюгів амплікону. Флуорофор при збудженні передає свою енергію через FRET (флуоресцентний резонансний перенос енергії), на агент для гасіння. Під час ПЛР у реальному часі зонд зв'язується з ампліконом протягом кожного етапу відпалу ПЛР. Коли Таq полімераза простягається від праймеру, зв'язаного з ампліконом, він витісняє 5' кінець зонда, який потім розкладається під активністю 5'-3'екзонуклеазної Таq полімерази. Розщеплення триває до тих пір, поки залишок зонда не розтоплюється ампліконом. Цей процес вивільняє флуорофор і агент для гасіння в розчин, специфічно розділяючи їх, у порівнянні з тим, коли вони утримуються разом зондом. Цей процес призводить до необоротного збільшення флуоресценції флуорофору.

"Олігонуклеотидні" зонди SEQ ID NO. 1 і № 2 відповідно до цього винаходу, таким чином, також пропонуються, в поєднанні з відповідними смисловими і антисмисловими праймерами SEQ ID NO. 3, 4, 5 і 6, відповідно, що можуть використовуватися для специфічної ампліфікації і виявлення послідовностей нуклеїнових кислот HBV в досліджуваному зразку шляхом ПЛР у реальному часі.

Технологія даної заявки у подальшому розробляється за допомогою наступних прикладів. Тим не менш, приклади не повинні розглядатися як обмеження обсягу винаходу.

Ефективність і чутливість олігонуклеотидних зондів SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2 були проаналізовані в порівнянні з комерційним стандартним набором. Однакові концентрації реагентів для ПЛР в режимі реального часу, шаблону і олігонуклеотидів були використані в кожному випадку, а умови циклізації також залишалися постійними для всіх реакцій. На підставі результату, отриманого з комерційного набору, олігонуклеотидні зонди з SEQ ID NO. 1 і 2 були проаналізовані на предмет їх чутливості та специфічності.

Приклад: 1

ДНК була виділена з 10 HBV-позитивних і 10 HBV-негативних зразків сироватки з використанням комерційного набору. ПЛР реакції у реальному часі були проведені для всіх зразків з використанням олігонуклеотидних зондів, що позначається як SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2, разом з відповідними праймерами SEQ ID NO. № 3, 4, 5 і 6 відповідно. Чутливість цих олігонуклеотидних зондів у збиранні інфікованих зразків порівнювали з комерційним стандартним набором. Ті ж концентрації в реагентів для ПЛР режимі реального часу, шаблону і праймерів використовували в кожному випадку, а умови циклізації також залишалися постійними для всіх реакцій. Композиція суміші ПЛР у реальному часі і умови ПЛР, як зазначені у Таблиці 3 і 4.

Таблиця 3

ПЛР у реальному часі з преміксом Takara

Композиція основної суміші ПЛР у реальному часі	
Премікс	5,0 мкл
Прямий праймер	0,2 мкл (2 пікомоля)
Зворотній праймер	0,2 мкл (2 пікомоля)
Зонд	0,2 мкл (2 пікомоля)
Зразок	2,0 мкл
Сума	2,4 мкл

Таблиця 4

Умови циклу ПЛР у реальному часі

Програма ПЛР	
Крок 1	95 °C протягом 60 сек
Крок 2	95 °C протягом 5 сек
Крок 3	60 °C протягом 34 сек

Крок 2 і 3 будуть повторюватися 40 разів

Отримані результати показали, що олігонуклеотидні зонди, позначені як SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2 збирали тільки HBV-позитивні зразки і не виявляли якоїсь неправильної ампліфікації для негативних зразків.

5 Олігонуклеотид SEQ ID NO. 1 зібрав всі 10 позитивних зразків протягом 40 циклів (зрізання позитивних зразків), що показало 100 % специфічність. З 10 виявлених позитивних результатів, 9 зразків було виявлено на ранній стадії в порівнянні з комерційним стандартним набором.

10 Аналогічно, олігонуклеотид з SEQ ID NO. 2 зібрав всі 10 позитивних зразків протягом 40 циклів (зрізання позитивних зразків), що показало 100 % специфічність. З 10 виявлених позитивних результатів, 2 зразки було виявлено раніше, в порівнянні з комерційним стандартним набором.

Так як SEQ ID NO. 1 збрала багато зразків раніше, ніж комерційний стандартний набір. Таким чином, SEQ ID NO. 1 – кращий зонд для скринінгу інфекцій HBV з точки зору специфічності та чутливості. Однак обидва олігонуклеотидних зонди, SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2 можуть бути використані для виявлення інфекцій гепатиту В.

15 Таблиця 5 наводить порівняння продуктивності SEQ ID NO. 1 та Ct комерційного набору. Крім того, Таблиця 6 забезпечує порівняння продуктивності SEQ ID NO. 2 та Ct комерційного набору. Графіки ПЛР у реальному часі комерційного набору, SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2 зазначені на Фіг. 1, 2, 3, 4 і 5.

Таблиця 5

Порівняння з комерційним стандартним набором

ID зразка	Ct комерційний набір	Ct SEQ ID NO. 1
Позитивний 1	20,27	19,42
Позитивний 2	17,48	17,22
Позитивний 3	19,44	19,06
Позитивний 4	32,03	26,04
Позитивний 5	28,56	29,69
Позитивний 6	27,37	23,73
Позитивний 7	29,1	27,34
Позитивний 8	30,12	27,99
Позитивний 9	26,92	24,17
Позитивний 10	37,46	35,11

20

Таблиця 6

Порівняння з комерційним стандартним набором

ID зразка	Ct комерційний набір	Ct SEQ ID NO. 2
Позитивний 1	20,27	22,26
Позитивний 2	17,48	20,18
Позитивний 3	19,44	22
Позитивний 4	32,03	30,46
Позитивний 5	28,56	31,19
Позитивний 6	27,37	29,65
Позитивний 7	29,1	30,28
Позитивний 8	30,12	28,64
Позитивний 9	26,92	27,02
Позитивний 10	37,46	39,20

Приклад: 2

Можна також кількісно визначити вірусне навантаження шляхом створення стандартної кривої. Для створення стандартної кривої 25 мкл ДНК HBV підлягали звичайній ПЛР, використовуючи суміш ПЛР, що містить dNTPS, Taq-ДНК-полімераза, ферментний буфер, MgCl₂ і праймери, специфічні для ділянок поверхневого та Х гена. Умови ПЛР є наступними:

Крок 1: 95°C протягом 120 сек

Крок 2: 95°C протягом 20 сек

Крок 3: 60°C протягом 40 сек

Кроки 2 і 3 були повторені протягом 40 циклів

Після ПЛР ампліфікований зразок був підданий електрофорезу на 3 % агарозному гелі і пофарбований бромідом етидію. Ампліконову смугу довжиною приблизно 1,2 kbp і яка відповідає ділянкам поверхневого і Х гена геному HBV, вирізали з гелю і очищали, використовуючи набір для екстракції гелю Qiaquick. Поглинання очищеної ДНК амплікону (2 мкл) оцінювали при 260 нм, використовуючи нанокраплю. Коефіцієнт екстинкції ДНК був розрахований з індивідуального коефіцієнта основи шляхом підсумовування.

Наномолі амплікону були розраховані з використанням наступного рівняння:

$$10 \quad \text{Нмоль/мл} = \frac{1000 \times \text{OD}_{260}(1\text{см}) \times 1\text{мл(об'єм)}}{\text{Коефіцієнт екстинкції амплікону}}$$

Число копій було розраховано за формулою:

Число копій/мл = (молі/мл) × число Авогадро.

Розрахунки:

$$15 \quad \text{OD}_{260} = 0,522$$

$$\text{Коефіцієнт екст.} = 33675,1$$

$$\text{нмоль/мл} = 0,015501068$$

$$\text{Копії/мл} = 9,34 \times 10^{12}$$

20 З числа копій чистого амплікону була отримана стандартна крива, виконавши 10^8 - 10^3 розведень амплікону, використовуючи ПЛР у реальному часі. Композиція преміксу ПЛР у реальному часі і ПЛР програма зазначені в Таблиці 3 і 4.

З Ct, отриманого із стандартної кривої, Фіг. 6, число копій може бути розрахована для невідомих зразків Фіг. 6 і таблиці 7.

Таблиця 7

Значення стандартної кривої щодо Ct

Sl. №	Ct	Копії/мл
1	20,6	1×10^8
2	23,7	1×10^7
3	28,3	1×10^6
4	31,3	1×10^5
5	34,2	1×10^4
6	37,1	1×10^3

Висновок

а) Жоден із негативних зразків не показав хибнопозитивного результату зі спроектованими олігонуклеотидними зондами, що позначаються як SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2.

30 б) Олігонуклеотид з SEQ ID NO. 1, який спроектований для поверхневого гена HBV, показав хорошу чутливість і специфічність (100 %). З 10 позитивних зразків 9 були зібрані раніше, ніж у випадку комерційного стандартного набору, Таблиця 5.

35 в) Олігонуклеотид SEQ ID NO. 2, який спроектований для Х гена HBV, також зібрав всі 10 позитивних зразків, показуючи 100 % специфічність. З 10 позитивних зразків 2 були зібрані раніше, ніж у випадку комерційного стандартного набору, Таблиця 6.

г) На основі загальних оціночних досліджень, SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2 були визнані кращими для виявлення HBV в порівнянні комерційними наборами.

д) Нарешті, олігонуклеотидні зонди, позначені як SEQ ID NO. 1 і SEQ ID NO. 2, можуть бути використані для кількісного визначення вірусного навантаження в інфікованому зразку.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНІСТЕЙ

110> БІГТЕК ПРАЙВІТ ЛІМІТЕД

<120> Олігонуклеотидні зонди і праймери для виявлення вірусу гепатиту В

<130> РСТ0940

<150> 314/CHE/2009

<151> 2009-02-13

<160> 6

<170> PatentIn версія 3,5

<210> 1

<211> 27

<212> ДНК

<213> вірус гепатиту В

<400> 1

cctcagtcgcg tttctctctgg ctcaagt

27

<210> 2

<211> 19

<212> ДНК

<213> вірус гепатиту В

<400> 2

ccccttcttc gtctgcgct

19

<210> 3

<211> 20

<212> ДНК

<213> вірус гепатиту В

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<400> 3

tgcacctgta ttcccatccc

20

<210> 4

<211> 26

<212> ДНК

<213> вірус гепатиту В

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 4

ccacatcatc catataactg aaagcc

26

<210> 5

<211> 16

<212> ДНК

<213> вірус гепатиту В

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(16)

<400> 5

cgtcggcgct gaatcc

16

```

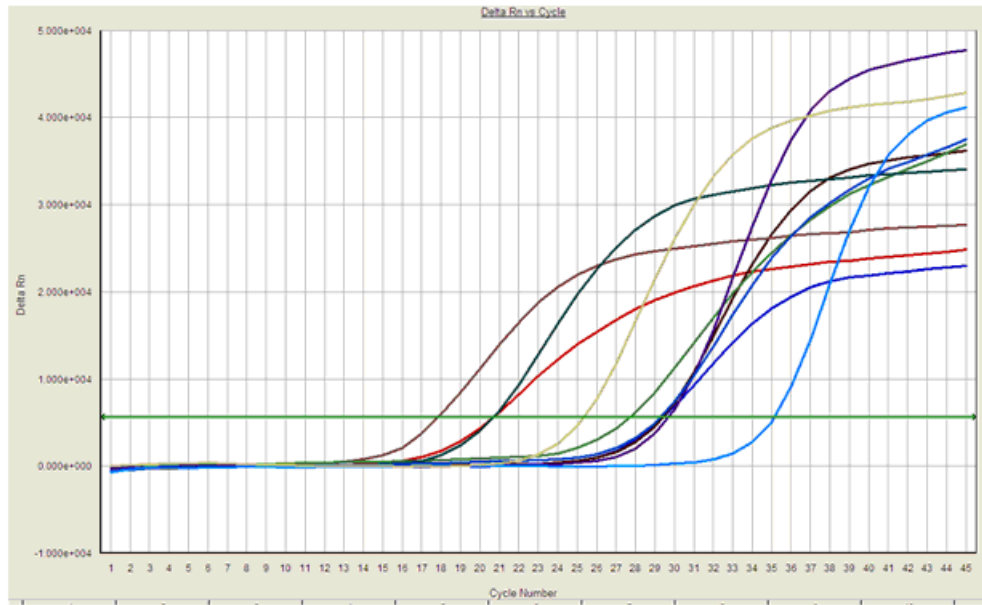
<210> 6
<211> 18
<212> ДНК
<213> вірус гепатиту В
<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(18)
<400> 6
gaagcgaagt gcacacgg

```

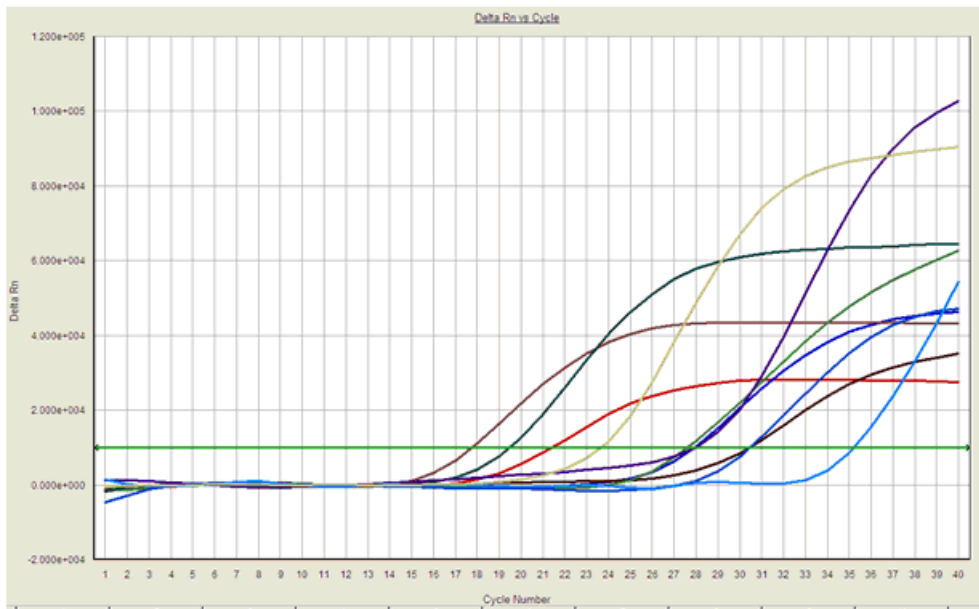
18

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Набір, який містить олігонуклеотидний зонд, як зазначено в SEQ ID NO: 1, і відповідні праймери, як зазначено в SEQ ID NO: 3 і 4, для виявлення вірусу гепатиту В.
2. Набір за пунктом 1, де згаданий зонд являє собою подвійномічений зонд, який кон'югований з мітками, що виявляються, що має флуорофор на 5' кінці та агент для гасіння у внутрішній ділянці або на 3' кінці.
- 10 3. Набір за пунктом 1, де згаданий зонд SEQ ID NO: 1 спроектований для поверхневого гена вірусу гепатиту В.
4. Набір за пунктом 1, де згаданий праймер SEQ ID NO: 3 є смисловим праймером, а SEQ ID NO: 4 є антисмисловим праймером.
5. Суміш для реакції ПЛР для виявлення вірусу гепатиту В, яка містить реагенти для ампліфікації нуклеїнової кислоти, подвійномічений зонд, як визначено в SEQ ID NO: 1, відповідні праймери, як визначено в SEQ ID NO: 3 та 4, та тестовий зразок.
- 15 6. Суміш для реакції ПЛР за пунктом 5, де згаданий зразок вибирають з групи, що містить кров, сироватку та плазму; і згадана суміш використовується в ПЛР у реальному часі.
7. Спосіб виявлення вірусу гепатиту В, де згаданий спосіб включає стадії:
- 20 (а) формування реакційної суміші, що містить реагенти для ампліфікації нуклеїнових кислот, олігонуклеотидний зонд, як зазначено в SEQ ID NO: 1, з відповідними праймерами, як зазначено в SEQ ID NO: 3 та 4, тестовий зразок, і
- (б) проведення ПЛР реакційної суміші з отриманням копій цільової послідовності, з наступним вимірюванням збільшення сигналу флуоресценції для виявлення вірусу гепатиту В.
- 25 8. Спосіб за пунктом 7, де згаданий зонд кон'югований з мітками, що виявляються, які мають флуорофор на 5' кінці і агентом для гасіння у внутрішній ділянці або на 3' кінці.
9. Спосіб за пунктом 7, де згаданий праймер SEQ ID NO: 3 є смисловим і SEQ ID NO: 4 є антисмисловим праймером.
10. Спосіб за пунктом 7, де згаданий досліджуваний зразок вибирають з групи, що містить кров, сироватку та плазму; і згадані реагенти для ампліфікації включають хлорид магнію, Taq-полімеразу і буфер для ампліфікації.
- 30 11. Спосіб за пунктом 7, де згадане виявлення носить якісний або кількісний характер.
12. Спосіб за пунктом 8, де згаданий флуорофор вибирають з групи, що містить флуоресцеїн і похідні флуоресцеїну FAM, VIC, JOE, 5-(2'-аміноетил)амінонафталін-1-сульфонову кислоту, кумарин та похідні кумарину, люцифер жовтий, техаський червоний, тетраметилпродамін, 6-карбоксифлуоресцеїн, тетрахлор-6-карбоксифлуоресцеїн, 5-карбоксипродамін і ціанінові барвники, переважно 6-карбоксифлуоресцеїн; та зазначений агент для гасіння вибирають з групи, що включає тетраметилпродамін [TAMRA], 4'-(4-диметиламінофенілазо)бензойну кислоту, 4-диметиламінофенілазофеніл-4'-малеїмід, тетраметилпродамін, карбокситетраметилпродамін і BHQ барвники, переважно тетраметилпродамін на 3' кінці або "Black hole quencher 1" [BHQ1] у внутрішній ділянці або на 3' кінці.
- 40 13. Набір для виявлення вірусу гепатиту В, що містить подвійно мічений зонд, як зазначено в SEQ ID NO: 1; відповідні пари праймерів, як зазначено в SEQ ID NO: 3 і 4, і реагенти для ампліфікації.
- 45 14. Набір за пунктом 13, де згадані реагенти для ампліфікації включають хлорид магнію, Taq-полімеразу і буфер для ампліфікації.



Φir.1



Φir.2

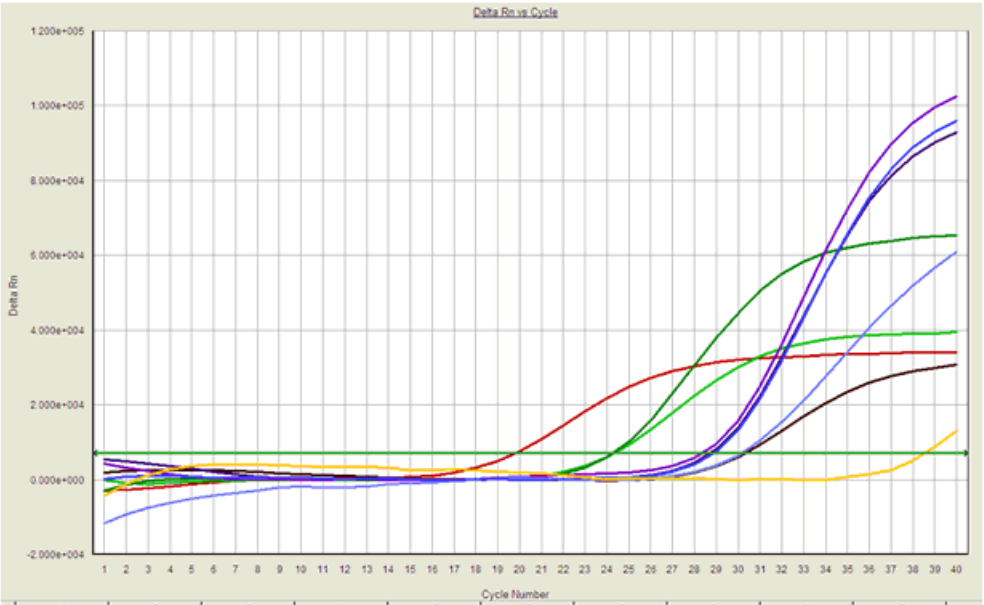


Fig.3

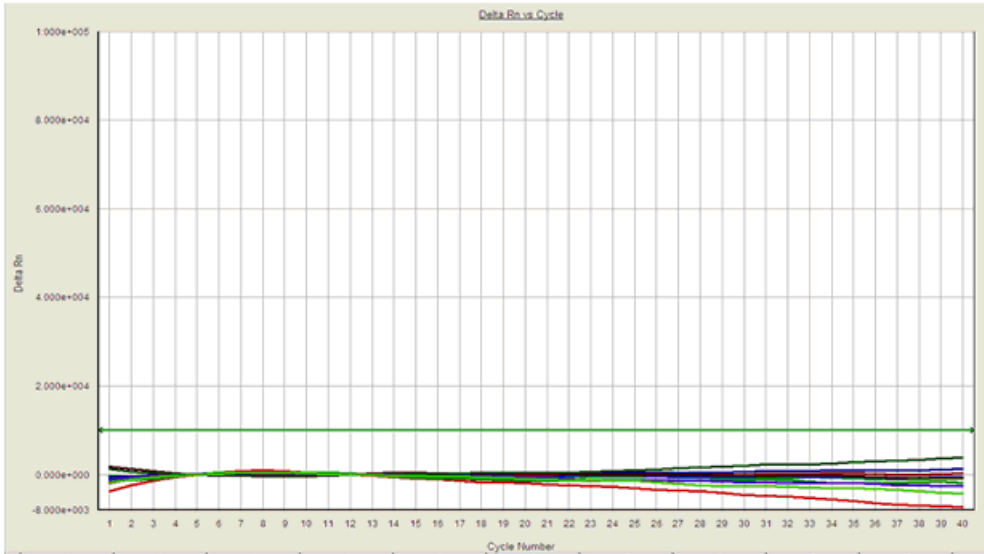
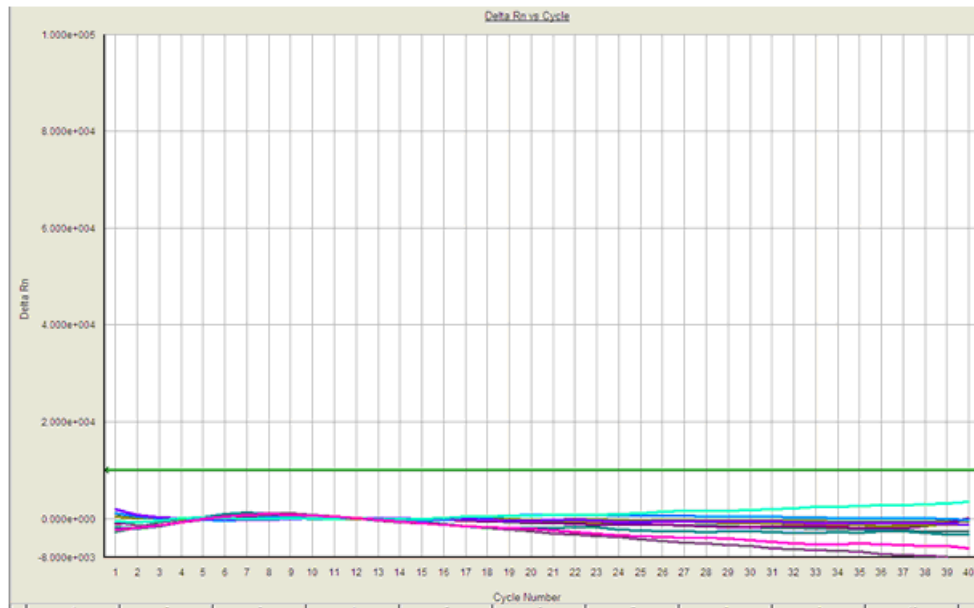
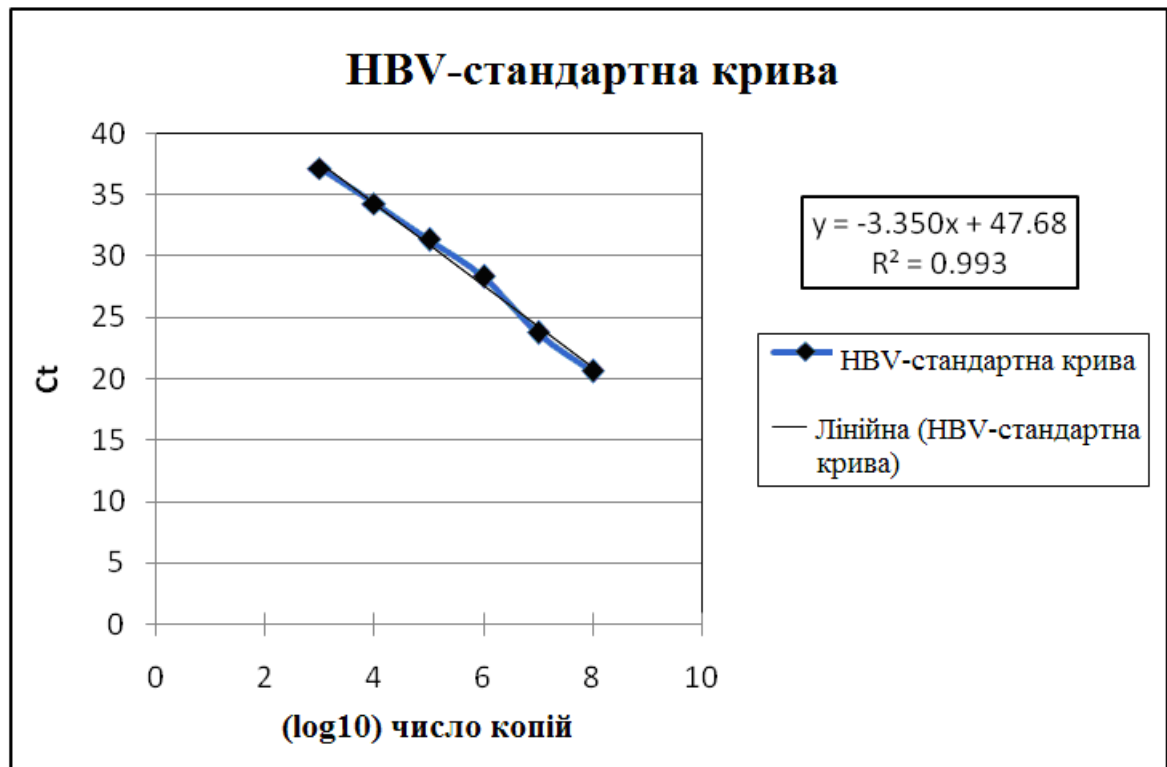


Fig.4



Фіг.5



Фіг.6

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601