



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92720** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
C12Q 1/68
C07H 21/00
C12R 1/32 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДНОЧАСНОГО ВИЯВЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗНОГО КОМПЛЕКСУ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ МУТАЦІЙ ДНК МІКОБАКТЕРІЙ, ЩО ПРИЗВОДЯТЬ ДО СТІЙКОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО РИФАМПІЦИНУ ТА ІЗОНІАЗИДУ, НА БІОЛОГІЧНИХ МІКРОЧИПАХ, НАБІР ПРАЙМЕРІВ, БІОЧИП І НАБІР ОЛІГОНУКЛЕОТИДНИХ ЗОНДІВ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ У СПОСОБІ

1

2

(21) a200613828

(22) 26.12.2006

(24) 10.12.2010

(31) 2005140679

(32) 26.12.2005

(33) RU

(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.

(72) ЗАСЕДАТЕЛЄВ АЛЕКСАНДР СЕРГЄЄВИЧ, RU, СОБОЛЄВ АЛЕКСАНДР ЮРЬЄВИЧ, RU, ГРЯДУНОВ ДМІТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ, RU, ЛАПГА СЕРГЕЙ АНАТОЛЬЄВИЧ, RU, МІХАЙЛОВИЧ ВЛАДИМІР МІХАЙЛОВИЧ, RU, МІРЗАБСКОВ АНДРЕЙ ДАРЬЄВИЧ, RU

(73) УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А.ЕНГЕЛЬГАРДТА РАН (ИМБ РАН), RU

(56) WO A1 0036142, 22.06.2000.

WO A1 0222872, 21.03.2002.

US B1 6242584, 05.06.2001.

US A 5643723, 01.07.1997.

KR A 20050009052, 24.01.2005.

KR A 20030008620, 29.01.2003.

KR A 20000000849, 15.01.2000.

JP A 2004154125, 03.06.2004.

JP A 2005087132, 07.04.2005.

CN A 1341752, 27.03.2002.

RU C2 2204608, 20.05.2003.

RU C1 2200323, 10.03.2003.

RU C1 2175015, 20.20.2001.

RU C 2000331, 07.09.1993.

Grace Lin S.Y. : "Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons", Journal of clinical microbiology, Sept. 2004, Vol. 42, No. 9, p. 4204-4208.

Mercedes Marin et al.: "Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in Mycobacteriu tuberculosis in respiratory samples by real-time PCR", Antimicrobial agents and chemotherapy, Nov. 2004, Vol. 48, No. 11, p. 4293-4300.

Telenti A. Et al.: "genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level", Journal of clinical microbiology, Mar. 1997, Vol. 35, No. 3, p. 719-723.

(57) 1. Спосіб одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу та ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, які приводять до стійкості мікроорганізмів до рифампіцину й ізоніазиду, у клінічних зразках, який включає:

(А) - мультиплексну ампліфікацію фрагментів генів *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, мобільного елемента IS6110 із використанням набору пар специфічних праймерів для першої стадії ПЦР; послідовності яких представлені SEQ ID NO: 70, 71, 74, 75, 77, 78, 80, 81, 83, 84;

(Б) - мультиплексну ампліфікацію фрагментів генів *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, мобільного елемента IS6110 із використанням як матриці продукту ПЦР, отриманого на стадії (А), і набору пар специфічних праймерів для другої стадії ПЦР, послідовності яких представлені SEQ ID NO: 72, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82, 83, 85, причому один праймер у кожній парі праймерів є флуоресцентно міченим, з одержанням переважно одноланцюгових флуоресцентно мічених фрагментів;

(В) - забезпечення біочипа для одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій, які приводять до стійкості до рифампіцину й ізоніазиду, що являє собою підкладку з гелевими елементами, у кожному з яких іммобілізований унікальний олігонуклеотидний зонд, що має послідовність, вибрану із групи, яка включає послідовності: а) відповідні послідовності фрагмента гена *groB* дикого типу; б) відповідні послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *groB*, що приводить до стійкості мікроорганізмів до рифампіцину; в) комплементарні до послідовностей, охарактеризованих в а) і б); г) відповідні послідовності фрагмента гена *katG* дикого типу; д) відповідні послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *katG*, що приводить до стійкості мікроорганізмів до ізоніазиду; е) комплементарні до

(13) **C2**
(11) **92720**
(19) **UA**

послідовностей, охарактеризованих у г) і д); ж) відповідні послідовності фрагмента гена *inhA* дикого типу; з) відповідні послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *inhA*, що приводить до стійкості мікроорганізмів до ізоніазиду; і) комплементарні до послідовностей, охарактеризованих у ж) і з); к) відповідні послідовності фрагмента гена *ahrC* дикого типу; л) відповідні послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *ahrC*, що приводить до стійкості мікроорганізмів до ізоніазиду; м) комплементарні до послідовностей, охарактеризованих у к) і л); н) відповідні послідовності фрагмента мобільного елемента IS6110; о) комплементарні до послідовностей, охарактеризованих у н); (Г) - гібридизацію ампліфікованих мічених продуктів, отриманих на стадії (Б), на біочипі в умовах, які забезпечують розрізнення в один нуклеотид між довершеними і недовершеними дуплексами, які утворюються в результаті гібридизації; (Д) - реєстрацію й інтерпретацію результатів гібридизації.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на другій стадії мультиплексної ПЦР (Б) з метою одержання переважно одноланцюгових флуоресцентно мічених фрагментів для всіх використаних пар праймерів флуоресцентно мічений праймер використовують у молярному надлишку відносно іншого праймера, який входить до тієї ж пари.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ампліфікацію фрагментів генів і мобільного елемента IS6110 проводять, використовуючи безпосередньо матеріал клінічного зразка (мокротиння, ексудат, змивки, бронхоальвеолярний лаваж) або попередньо вирощену культуру мікроорганізмів.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що з метою забезпечення розрізнення в один нуклеотид між довершеними і недовершеними дуплексами, які утворюються в результаті гібридизації, використовують гібридизаційний буфер, який дозволяє проводити гібридизацію в розширеному інтервалі температур.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що реєстрацію результатів на стадії (Д) проводять за допомогою портативного аналізатора флуоресценції й програмного забезпечення, що дозволяє використовувати програмну обробку інтенсивностей сигналів з наступною інтерпретацією результатів.

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що інтерпретацію зареєстрованих результатів на стадії (Д) виконують шляхом порівняння інтенсивності флуоресценції сигналів комірок, у яких утворилися довершені й недовершені гібридизаційні дуплекси.

7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що інтерпретовані результати можуть бути застосовані для підтвердження клінічного діагнозу - туберкульоз, і цілей епідеміологічного генотипування, використовуючи як маркер наявності тієї або іншої мутації.

8. Набір специфічних пар праймерів для здійснення способу одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, які приводять до стійкості їх до рифампіцину й ізоніазиду, у клінічних зразках за п. 1, причому послідовності праймерів представлені SEQ ID NO: 70-85.

9. Біочип, використовуваний у способі одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, які приводять до стійкості до рифампіцину й ізоніазиду, у клінічних зразках за п. 1, який є підкладкою з гелевими елементами, у кожному з яких іммобілізований унікальний олігонуклеотидний зонд, причому послідовності зондів представлені SEQ ID NO: 1-69.

10. Набір олігонуклеотидних зондів, використовуваний для одержання біочипа, що його використовують в способі одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, які приводять до стійкості до рифампіцину й ізоніазиду, у клінічних зразках за п. 1, причому зонди мають послідовності SEQ ID NO: 1-69.

Винахід відноситься до молекулярної біології, мікробіології й медицини та забезпечує спосіб виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* і *M. microti*) з одночасним визначенням чутливості штамів до рифампіцину й ізоніазиду в клінічному зразку на диференціюючому біочипі.

Для виявлення мутацій, відповідальних за стійкість до лікарських засобів, у цей час застосовуються наступні методи:

I. Екстанція ланцюга міченим дідезоксирибонуклеозидтри фосфатом (SNP - single nucleotide polymorphism);

Dubiley S., Kirillov E and A. Mirzabekov. 1999. Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized

primers. *Nucleic Acids Research*, Vol.27, No.18 (e19).

Marth GT, Korf I, Yandell MD et al. 1999. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nat Genet.*, Dec/23 (4):452-456.

II. Апель-Специфічна ПЦР (Allele specific PCR);

De los Monteras L.E.E., J.C.Galan, M.Gutierrez, S.Samper, J.F.G.Marin, C.Martin, L.Donington, L. de Rafael, F.Baquero, E.Gomez-Mampaso, and J.Blazquez. 1998. Allele-Specific PCR Method Based on *pncA* and *oxyR* Sequences for Distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M.bovis pncA* Sequence Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 36.; 239-242.

III. Вивчення поліморфізму фрагментів після рестрикції (RFLP - restriction fragment length polymorphism);

PCR-RFLP Detection of point Mutations in the Catalase-Peroxidase Gene (katG) of Mycobacterium tuberculosis Associated with Isoniazid Resistance. In: PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases (D.H.Persing, Ed.) (1996) ASM Press, Washington, pp.144-149.

IV. Аналіз конформаційного поліморфізму одно- і дволанцюгової ДНК (SSCP і DSCP - single-(double)-strand conformation polymorphism);

Delgado M.B. and A.Telenti. Detection of Fluoroquinolone Resistance Mutations in Mycobacterium tuberculosis. In: PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases (D.H.Persing, Ed.) (1996) ASM Press, Washington, pp.138-143.

Pretorius G.S., P.D. van Helden, F.Sirgel, K.D.Eisenach and T.C.Victor. 1995. Mutations in katG Gene Sequences in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis Are Rare. Antimicrob. Agents Chemother., 39, 10, 2276-2281.

V. Гібридизація на олігонуклеотидних мікроматрицях високої щільності (Hybridization on high-density microarray);

Troesch A, Nguyen H, Miyada CG et al. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. J Clin Microbiol 1999; 37: 49-55.

W. Sougakoff, M. Rodrigue, C. Truffot-Pernot, M. Renard, N. Durin, M. Szpytma, R. Vachon, A. Troesch and V. Jarlier. Use of a high-density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Infect. 2004;10(4): 289-94.

VI. Гібридизація на спеціалізованих олігонуклеотидних мікрочіпах (Hybridization on specialized microarray);

Jun Yue, Wei Shi, Jingping Xie, Yao Li, Erlang Zeng and Honghai Wang. Detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by using a specialized oligonucleotide microarray. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 47-54. Грядунів Д.А., В.М. Михайлович, С.А. Лапа, Н.І. Рудінський, В.Е. Панський, А.В. Чудінов, А.С. Засєдательєв, А.Д. Мірзабеков. Ідентифікація штамів Mycobacterium tuberculosis з одночасним визначенням їхньої стійкості до ліків методом гібридизації на олігонуклеотидних мікрочіпах. Молекулярна генетика, мікробіологія, вірусологія 2003; (4): 24-7.

VII. Методи, засновані на секвенуванні (sequencing);

Kapur, V., L.-L. Li, S. Iordanescu, M. R. Hamrick, A. Wanger, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase β subunit in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York City and Texas. J. Clin. Microbiol. 32:1095-1098.

Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgiç A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates with known rpoB mutations. Clin Microbiol Infect. 2004; 10(7): 662-5.

VIII. Дідезоксифінгерпринтинг (ddF-method);

Rys P.N. and T.A.Felmlee. Detection of Rifampicin Resistance Mutations in Mycobacterium tuberculosis by Dideoxy Fingerprinting. In: PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases

(D.H.Persing, Ed.) (1996) ASM Press, Washington, pp.112-121.

IX. ПЦР-Гетеродуплексний аналіз (PCR-heteroduplex analysis);

Williams D.L., C.W.Limbers, L.Spring, S.Jayachandra, and T.P.Gillis. PCR-Heteroduplex Detection of Rifampicin-Resistant Mycobacterium tuberculosis. In: PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases (D.H.Persing, Ed.) (1996) ASM Press, Washington, pp.122-129.

X. Метод недовершеного дуплекса із РНК (RNA mismatch analysis);

Dracopoli, N.C. Ed. "Detection of Mutations by RNase Cleavage". Current Protocols in Human Genetics. 1998. John Wiley & Sons, Inc.

Marth GT, Korf I, Yandell MD et al. 1999. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. Nat Genet., Dec;23(4): 452-456.

XI. Метод структурно-специфічного розщеплення (Structure-specific endonuclease cleavage);

Brow M.A.D., M.C.Oldenburg, V.Lyamichev, L.M.Heisler, N.Lyamicheva, J.G.Hall, N.J.Eagan, D.M.Olive, L.M.Smith, I.L.Fors, and J.E.Dahlberg. 1996. Differentiation of Bacterial 16S rRNA Genes and Intergenic Regions and Mycobacterium tuberculosis katG Genes by Structure-Specific Endonuclease Cleavage. J. Clin. Microbiol., 34: 3129-3137.

XII. Метод Зондів (Line Probe assay (LiPA));

Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2093-2098.

Drobniewski FA, Watterson SA, Wilson SM, Harris GS. A clinical, microbiological and economic analysis of a national UK service for the rapid molecular diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Med Microbiol 2000; 49: 271-278.

XIII. Метод із застосуванням фагів (PhaB assay).

Wilson, S. M., Z. Al-Suwaidi, R. McNerney, J. Porter, and F. Drobniewski. 1997. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Nat. Med. 3: 465-468.

XIV. Метод розщеплення клівазою (CFLP - Cleavase fragment length polymorphism).

Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis FM, Mogazeh SL, Kreiswirth BN, Pottathil RR, Barathur RR. 1998. Comparative Evaluation of Cleavase Fragment Length Polymorphism With PCR-SSCP and PCR-RFLP to Detect Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Mol Diagn. 1998 Jun; 3(2): 81-91.

XV. Методи, засновані на лігуванні (Ligation-based assays).

Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirovskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., and Mirzabekov A. 2001.

Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2531-2540.

XVI. Метод ПЦР із детекцією у режимі реального часу (Real-time PCR).

Marin M, Garcia de Viedma D, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Nov; 48(11): 4293-300.

XVII. Мас-спектрометричні методи (Differential sequencing with mass spectrometry).

Griffin, T.J. and L.M. Smith. 2000. Single nucleotide polymorphism analysis by MALDI - TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol.* 18: 77-84.

XVIII. Метод резонансного переносу енергії на флуорофор (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Viedma G. D., del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcala L, Bouza E. 2002. New Real-Time PCR Able To Detect in a Single Tube Multiple Rifampin Resistance Mutations and High-Level Isoniazid Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 40(3): 988-95.

XIX. ПЦР на олігонуклеотидних мікрочіпах (PCR on oligonucleotide microchips).

Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirovskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., and Mirzabekov A. 2001. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2531-2540.

Tillib SV, Strizhkov BN, Mirzabekov AD. Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Anal Biochem.* 2001 May 1; 292(1): 155-60.

Для виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу застосовуються наступні методи:

XX. Установлення наявності мобільного генетичного елемента IS 6110 або білка теплового шоку (65kDa) методом ПЦР (Polymerase Chain Reaction for IS 6110 or 65kD heat shock protein);

Gunisha P, Madhavan HN, Jayanthi U, Therese KL. 2001. Polymerase chain reaction using IS6110 primer to detect *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Pathol Microbiol.* 44(2): 97-102.

XXI. Установлення наявності гена рибосомного спейсера методом ПЦР (Ribosomal intergenic spacer detection by Polymerase Chain Reaction);

Glennon M, Smith T, Cormican M, Noone D, Barry T, Maher M, Dawson M, Gilmartin JJ, Gannon F. 1994. The ribosomal intergenic spacer region: a target for the PCR based diagnosis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 75(5): 353-60.

Kraus G, Cleary T, Miller N, Seivright R, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ. 2001. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol Cell Probes* 15(6): 375-83.

XXII. Автоматизована ПЦР на приладі Амплікор (Рош) (Amplicor *M. tuberculosis* test (ROCHE) for amplifying part of the 16S rRNA gene.)

J. Schirm, L. A. B. Oostendorp, and J. G. Mulder. 1995. Comparison of Amplicor, In-House PCR, and Conventional Culture for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3221-3224.

XXIII. Лігазна ланцюгова реакція (Ligase Chain Reaction).

Viinanen AH, Soini H, Marjamaki M, Liippo K, Viljanen MK. 2000. Ligase chain reaction assay is clinically useful in the discrimination of smear-positive pulmonary tuberculosis from atypical mycobacterioses. *Ann Med* 32(4): 279-83.

Lin IJ, Che MJ, Yeh A, Hwang JJ, Wei CY, Tsao WL, Lee CP. 1999. Comparison of the sensitivity and specificity of an automatic ligase chain reaction assay system with a one-step polymerase chain reaction assay in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Changcheng Yi Xue Za Zhi* 22(2): 204-11.

XXIV. Метод ПЦР із детекцією у режимі реального часу (Real-time PCR).

Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Nov; 41(11): 5121-6.

Для перерахованих вище методів установлення мутацій відзначені наступні недоліки:

Методи екстенції ланцюга й алей-специфічної ПЦР у пробірці (I, II) вимагають постановки незалежних реакцій відповідно до числа досліджуваних мутацій (тобто більше 30 у випадку гена *groB*) і, відповідно, великої кількості досліджуваного зразка;

Методи вивчення поліморфізму (III, IV), ПЦР-гетеродуплексний аналіз (IX) і метод недовершеного дуплекса із РНК (X) трудомісткі, потребують великої кількості часу, дають непрямий висновок про тип мутації й вимагають типових стандартів (на кожну мутацію); крім того, для методу недовершеного дуплекса пред'являються підвищені вимоги щодо відсутності РНК-ази, він трудомісткий і неприйнятний для детекції дуплекса G-U (Nash, K.A., A. Gaytan, and C.B. Inderlied. 1997. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by means of a rapid, simple, and specific RNA/RNA mismatch assay. *J. Infect. Dis.* 176: 533-536; Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M.J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer. 1993. Detection of rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341: 647-650);

Гібридизація на олігонуклеотидних мікроматрицях високої щільності (V) вимагає складного комп'ютерного обчислення отриманих результатів і дорогих видаткових матеріалів (зокрема мікроматриця); у цей час розроблені мікрочіпи високої щільності тільки для аналізу мутацій у гені *groB*, що приводять до стійкості до рифампіцину;

Відомі методи гібридизації на спеціалізованих мікрочіпах (VI) не можуть бути застосованими для аналізу клінічних зразків, оскільки як досліджуваний матеріал використовується ДНК, виділена з культур штамів, що вимагає додаткового культивування.

ування й очищення клітин, отриманих із клінічного матеріалу (Д.А. Грядинов, В.М. Михайлович, С.А. Лапа, Н.І. Рудинський, В.Е. Панський, А.В. Чудінов, А.С. Заседаєлев, А.Д. Мірзабеков. Ідентифікація штамів *Mycobacterium tuberculosis* з одночасним визначенням їхньої стійкості до ліків методом гібридизації на олігонуклеотидних мікрочіпах. Молекулярна генетика, мікробіологія, вірусологія 2003; (4): 24-7; Yue Jue, Wei Shi, Jingping Xie, Yao Li, Erliang Zeng and Honghai Wang. Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a specialized oligonucleotide microarray. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 47-54);

Пряме визначення нуклеотидної послідовності (VII) вимагає виділення чистої культури, постановки реакцій ампліфікації й секвенування й додаткового очищення продукту для аналізу на автоматичному секвенаторі;

Методи дидеоксифінгерпринтинга (VIII) і структурно-специфічного розщеплення (XI) вимагають попередньої стандартизації (підбора умов), що збільшує трудомісткість, а також наявності типових стандартів. Крім того, дидеоксифінгерпринтинг вимагає використання радіоактивної мітки, що перешкоджає його широкому використанню в умовах клінічної лабораторії;

Комерційний набір INNO-LiPA (XII) відрізняється високою собівартістю й ідентифікує обмежену кількість мутацій у гені *groB* (Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2093-2098);

Метод із застосуванням фагів (XIII) потребує великої кількості часу, тому що пов'язаний з реплікацією фагів і наступною реєстрацією лізису на культурі *M. smegmatis*, а також він трудомісткий;

Методи розщеплення клівазою (XIV) і мас-спектрометрії (XVII) вимагають гомогенного високоочищеного зразка ДНК; стадія підготовки зразка й вартість устаткування також є обмежувачами факторами для широкого застосування мас-спектрометричного аналізу (XVII);

Методи, засновані на літуванні (XV), застосовуються дуже обмежено через складність створення набору зондів на велику кількість детектованих мішеней, використовують дорогий фермент - термостабільну ДНК-лігазу;

ПЦР із детекцією у режимі реального часу (XVI) виявляє наявність тільки найпоширеніших мутацій у досліджуваному фрагменті генома, але не дозволяє точно ідентифікувати нуклеотидну заміну й при цьому є досить дорогим для рутинного аналізу;

Метод резонансного переносу енергії на флуорофор (XVIII) має два серйозні недоліки: 1) здатний визначати обмежену кількість мутацій і 2) не здатний диференціювати функціонально значимі мутації від мутацій, які фенотипічно не проявляються;

Методи ПЦР і літування на олігонуклеотидних мікрочіпах (XIX) вимагають подальшого вдоскона-

лювання й складні для виконання в практичних лабораторіях.

Всі перераховані вище методи визначення мікобактерій туберкульозного комплексу, які ґрунтуються на ампліфікації IS-елемента (XX), білка теплового шоку (XX), гена рибосомного спейсера (XXI), а також методи автоматизованої ПЦР (XXII), лігазної ланцюгової реакції (XXIII) і ПЦР із детекцією у режимі реального часу (XXIV) здатні виявити присутність у досліджуваному зразку збудника туберкульозу, але не визначити чутливість останніх до антимікобактеріальних препаратів.

Переваги способу виявлення штамів мікобактерій туберкульозного комплексу, стійких до рифампіцину й ізоніазиду, на мініатюрних біологічних чіпах.

Спосіб виявлення в клінічних зразках штамів мікобактерій туберкульозного комплексу, стійких до рифампіцину й ізоніазиду, на мініатюрних біологічних чіпах вигідно відрізняється від відомих з рівня техніки методів можливістю ідентифікації збудника безпосередньо в клінічному матеріалі з одночасним визначенням стійкості до двох антимікобактеріальних препаратів першої черги; можливістю встановлення типу мутації, що визначає резистентність, а також низькою собівартістю, коротким проміжком часу, необхідного для одержання результату. Метод не вимагає дорогого устаткування й висококваліфікованого персоналу. Дані, отримані за допомогою методу гібридизації, можуть бути використані для визначення терапевтичної дози лікарського препарату й епідеміологічного генотипування.

У своєму першому аспекті даний винахід забезпечує прискорений спосіб одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу в клінічному матеріалі й визначення їхньої стійкості до рифампіцину й ізоніазиду на підставі ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, що приводять до стійкості мікроорганізмів до рифампіцину й ізоніазиду, з використанням мініатюрного біочіпа. Спосіб заснований на двохстадійній мультиплексній ПЦР із одержанням одноланцюгових флуоресцентно мічених фрагментів ДНК із наступною гібридизацією цих фрагментів на чіпі, що містить набір диференціюючих олігонуклеотидів. Спосіб передбачає наступні стадії:

(А) - мультиплексну ампліфікацію фрагментів генів *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, мобільного елемента IS6110 з використанням набору пар специфічних праймерів для першої стадії ПЦР;

(Б) - мультиплексну ампліфікацію фрагментів генів *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, мобільного елемента IS6110 з використанням як матриці продукту ПЦР, отриманого на стадії (А), і набору пар специфічних праймерів для другої стадії ПЦР, причому один праймер у кожній парі праймерів є флуоресцентно міченим, з одержанням переважно одноланцюгових флуоресцентно мічених фрагментів;

(В) - забезпечення біочіпа для одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій, що приводять до стійкості до рифампіцину й ізоніазиду, який є підкладкою з гелевими елементами, у кожному з яких іммобілізований унікальний олігонуклеотидний

зонд, який має послідовність, обрану із групи, яка включає послідовності: а) відповідні до послідовності фрагмента гена *groV* дикого типу; б) відповідні до послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *groV*, який приводить до стійкості мікроорганізмів до рифампіцину; в) комплементарного до послідовностей, охарактеризованих в а) і б); г) відповідні до послідовності фрагмента гена *katG* дикого типу; д) відповідні до послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *katG*, який приводить до стійкості мікроорганізмів до ізоніазиду; е) комплементарного до послідовностей, охарактеризованих у г) і д); ж) відповідні до послідовності фрагмента гена *inhA* дикого типу; з) відповідні до послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *inhA*, який приводить до стійкості мікроорганізмів до ізоніазиду; і) комплементарного до послідовностей, охарактеризованих у ж) і з); к) відповідні до послідовності фрагмента гена *ahpC* дикого типу; л) відповідні до послідовності фрагмента мутантного варіанта гена *ahpC*, який приводить до стійкості мікроорганізмів до ізоніазиду; м) комплементарного до послідовностей, охарактеризованих у к) і л); н) відповідні до послідовності фрагмента мобільного елемента IS6110; о) комплементарні до послідовності, охарактеризованої в н);

(Г) - гібридизацію ампліфікованих мічених продуктів, отриманих на стадії (Б), на біочіпі в умовах, що забезпечують розрізнення в один нуклеотид між утвореними в результаті гібридизації довершеними й недовершеними дуплексами;

(Д) - реєстрацію й інтерпретацію результатів гібридизації.

В одному зі своїх втілень спосіб характеризується тим, що на першій стадії мультиплексної ПЦР (А) використовують набір пар специфічних праймерів, послідовності яких представлені SEQ ID NO: 70, 71, 74, 75, 77, 78, 80, 81, 83, 84.

У ще одному із втілень спосіб характеризується тим, що на другій стадії мультиплексної ПЦР (Б) використовують набір пар специфічних праймерів, послідовності яких представлені SEQ ID NO: 72, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 82, 83, 85.

У наступному втіленні спосіб характеризується тим, що на другій стадії мультиплексної ПЦР (Б) з метою одержання переважно одноланцюгових флуоресцентно мічених фрагментів для всіх використовуваних пар праймерів флуоресцентно мічений праймер використовують у молярному надлишку відносно іншого праймеру, який утворює ту ж пару.

У наступному втіленні спосіб характеризується тим, що ампліфікацію фрагментів генів і мобільного елемента IS6110 проводять, використовуючи безпосередньо матеріал клінічного зразка (мокротиння, ексудат, змив, бронхо-альвеолярний лаваж) або попередньо вирощену культуру мікроорганізмів.

У ще одному із втілень спосіб характеризується тим, що біочіп містить набір іммобілізованих олігонуклеотидів, послідовності яких представлені SEQ ID NO: 1-69.

У наступному втіленні спосіб характеризується тим, що з метою забезпечення розрізнення в один

нуклеотид між довершеними й недовершеними дуплексами, які утворюються в результаті гібридизації, використовують гібридизаційний буфер, який дозволяє проводити гібридизацію в розширеному інтервалі температур.

В одному із втілень спосіб характеризується тим, що реєстрацію результатів на стадії (Д) проводять за допомогою портативного аналізатора флуоресценції й програмного забезпечення, що дозволяє використовувати програмну обробку інтенсивностей сигналів з наступною інтерпретацією результатів.

У ще одному із втілень спосіб характеризується тим, що інтерпретацію зареєстрованих результатів на стадії (Д) виконують шляхом порівняння інтенсивності флуоресценції сигналів комірок, у яких утворилися довершені й недовершені гібридизаційні дуплекси.

Нарешті в ще одному із втілень спосіб характеризується тим, що інтерпретовані результати можуть бути застосовані для підтвердження клінічного діагнозу захворювання на туберкульоз і з метою епідеміологічного генотипування, використовуючи як маркер наявність тієї або іншої мутації.

У своєму наступному аспекті даний винахід забезпечує набір специфічних пар праймерів для здійснення способу, який є першим аспектом даного винаходу, одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, що приводять до їх стійкості до рифампіцину й ізоніазиду, у клінічних зразках, причому послідовності праймерів представлені SEQ ID NO: 70-85.

У ще одному аспекті даний винахід відноситься до біочіпу, що його використовують у способі, який є першим аспектом даного винаходу, одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, що приводять до стійкості до рифампіцину й ізоніазиду, у клінічних зразках, де біочіп є підкладкою з гелевими елементами, у кожному з яких іммобілізований унікальний олігонуклеотидний зонд, причому послідовності зондів представлені SEQ ID NO: 1-69.

Нарешті, ще одним аспектом даного винаходу є набір олігонуклеотидних зондів, які мають послідовності SEQ ID NO: 1-69, який використовують для одержання біочіпа, що його використовують в способі одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й ідентифікації мутацій ДНК мікобактерій, що приводять до стійкості до рифампіцину й ізоніазиду, у клінічних зразках, що є першим аспектом даного винаходу.

Інші аспекти даного винаходу стануть зрозумілими із прикладених фігур, докладного опису й формули винаходу.

Для більш ясного розуміння сутності заявленого винаходу, а також для демонстрації його характерних рис і переваг далі приводиться докладний опис винаходу з посиланнями на фігури креслень, на яких

Фіг.1. представляє схему розміщення дискримінуючих олігонуклеотидів на біочіпі.

Фіг.2. представляє результати гібридизації зразка ДНК *M. tuberculosis* дикого типу.

Фіг.3. представляє результати гібридизації зразка ДНК *M. tuberculosis*, що містить мутації, які приводять до амінокислотних заміни Ser531>Leu у гені *groB* і Ser315>Thr у гені *katG*.

Фіг.4. представляє результати гібридизації зразка ДНК *M. tuberculosis*, що містить мутації, які приводять до амінокислотної заміни Asp516>Val у гені *groB* і нуклеотидної заміни C>T15 у промоторній області гена *inhA*.

Фіг.5. представляє результати гібридизації зразка ДНК *M. bovis* BCG, яка не містить заміни у генах *groB* і *katG*, і регуляторних областях генів *inhA* і *ahpC*.

Фіг.6. представляє результати гібридизації зразка ДНК *M. avium* S58.

Завдання даного винаходу полягає у створенні прискореного способу виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу в клінічному зразку з одночасним визначенням стійкості мікобактерій до рифампіцину й ізоніазиду, за допомогою виявлення мінорного поліморфізму (крапкових нуклеотидних заміни, делецій, інсерцій) ДНК мікобактерій, що приводить до виникнення резистентності.

У заявленому методі запропоноване використання: мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції для одночасної ампліфікації послідовностей мобільного елемента IS 6110, генів *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, одержання із напрацьованих продуктів одноланцюгових флуоресцентно мічених фрагментів зазначених генів, при цьому як вихідний зразок може бути використаний клінічний матеріал, лізат клітинної культури, інші фізіологічні рідини. Заявлений спосіб також передбачає використання оригінального олігонуклеотидного біочіпа з іммобілізованими специфічними зондами, процедури гібридизації, реєстрації й інтерпретації результатів.

Принципова схема виявлення рифампіцин- і ізоніазид-стійких штамів мікобактерій туберкульозного комплексу на біочіпі.

Клінічний зразок (у випадку легеневої форми захворювання - мокротиння) піддають деконтамінації й лізису клітин з метою забезпечення доступу до геномної ДНК. Одним із придатних способів є розрідження в лужному середовищі у присутності N-ацетил-L-цистеїну й кип'ятіння з детергентом для забезпечення доступу до ДНК і деконтамінації зразка. Для цих цілей також можуть бути використані інші способи, відомі фахівцям у даній галузі, такі як руйнування клітин за допомогою ультразвуку (Padilla E, Gonzalez V, Manterola JM, et al. Evaluation of two different cell lysis methods for releasing mycobacterial nucleic acids in the INNO-LiPA mycobacteria test. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003 May;46(1): 19-23), лізис за допомогою гуанідину тиоціанату - саркозину (Kotlowski R., Martin A., Ablordey A. et al. One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish. *J Med Microbiol.* 2004 Sep; 53(Pt9): 927-33) і т.д.

Специфічну ампліфікацію фрагментів функціонально значимих генів виконують на першій стадії за допомогою мультиплексної ПЦР. На другому етапі одержують переважно одноланцюгові флуо-

ресцентно мічені продукти методом асиметричної мультиплексної ПЦР із використанням праймерів, які містять на 5'-кінці флуоресцентний барвник.

Праймери для проведення першої стадії ампліфікації вибирають таким чином, щоб вони фланкували регіон гена або регуляторної області, де знаходяться мутації, які найчастіше зустрічаються, і які що приводять до стійкості мікроорганізму до хіміопрепаратів. Використовуючи спеціалізоване програмне забезпечення, наприклад Oligo v.6.3 (Molecular Biology Insights Inc., США) або Fast PCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) або інші комерційно доступні програми, або програми, вільно доступні в мережі Internet, розраховують температури плавлення праймерів і, варіюючи їхню довжину, домагаються того, щоб розкид температур відпалу праймерів усередині набору не перевищував 3-4°C. При підборі праймерів уникають таких послідовностей, які здатні формувати вторинні структури типу шпильки з високими температурами плавлення. При виборі праймерів для мультиплексної ПЦР уникають таких послідовностей, які утворюють між собою дуплекси, що складаються більш ніж із трьох-п'яти нуклеотидів. Кожний обраний праймер повинен мати унікальну специфічність відносно аналізованої ділянки послідовності нуклеїнових кислот генома мікобактерій туберкульозного комплексу. Специфічність праймерів перевіряється за допомогою програмного забезпечення, яке використовує пошук у базах нуклеотидних послідовностей за алгоритмом BLAST (наприклад, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Праймери для одночасної ампліфікації декількох ділянок генома вибирають при можливості таким чином, щоб довжини ампліфікованих фрагментів різнилися на 30-50 пар основ (п.о), що дозволяє візуально контролювати наявність/відсутність специфічної смуги, яка відповідає продукту ампліфікації, електрофорезом в 2% агарозному гелі.

Праймери для проведення другої стадії ампліфікації вибирають із урахуванням вимог, викладених вище, з тією відмінністю, що принаймні один із праймерів обирається усередині ПЦР-фрагмента, що його одержують на першій стадії, яка підвищує специфічність реакції. Праймери вибирають таким чином, щоб розмір ампліфікованих фрагментів на другій стадії становила 70-400 п.о. Більша довжина ПЦР-продуктів, отриманих на другій стадії, утруднює ефективну дифузю аналізованих фрагментів генома в гелевих елементах біочіпа при гібридизації, що в кінцевому підсумку може привести до зменшення кількості гібридизаційних дуплексів, що утворилися і, як наслідок, падіння флуоресцентного сигналу в комітках. При підборі праймерів варто враховувати той факт, що на виході реакції виходять переважно одноланцюгові флуоресцентно мічені продукти, комплементарні до олігонуклеотидів, іммобілізованих на біочіпі. Тому в кожній парі праймер, який містить флуоресцентну мітку і який застосовується у надлишку («ведучий праймер»), обирається з того ланцюга, послідовність якого комплементарна до послідовностей іммобілізованих у комітках біочіпа олігонуклеотидів. Тобто, у випадку, якщо олі-

гонуклеотиди для іммобілізації обрані зі значення ланцюга, для формування гібридаційних дуплексів в комірках біочіпа необхідна переважна ампліфікація антизначення ланцюга, тим самим «ведучий праймер» обирається з ланцюга, комплементарного до послідовності гена (антизначення ланцюг), і навпаки.

Як флуоресцентний барвник може бути використаний будь-який флуоресцентний барвник, який може бути хімічно приєднаний до 5'-кінця олігонуклеотидного праймера і який не буде істотно перешкоджати проходженню полімеразної ланцюгової реакції. Спектр таких барвників добре відомий фахівцям в даній галузі техніки й включає, наприклад, такі барвники флуоресцеїнового (TAMRA[®], ROX[®], JOE[®]), родамінового (Texas Red[®]), поліметинового (Cy3[®], Cy5[®], Cy5.5[®], Cy7[®]) рядів (Ranasinghe R. and Brown T. Fluorescence based strategies for genetic analysis. Chem. Commun., 2005, 5487-5502). Флуоресцентні барвники комерційно доступні, зокрема виробництва фірми Molecular Probes, США. Найкращими є барвники, спектр збудження яких лежить у довгохвильовій (червоній) області спектра, що дозволяє використовувати для збудження недорогі джерела збудливого випромінювання типу напівпровідникових лазерів.

Флуоресцентний барвник може бути приєднаний до 5'-кінця праймера як безпосередньо, так і через проміжний спейсер, наприклад, 5'-Amino-Modifier фірми Glen Research. Для флуоресцентного мічення праймера флуоресцентний барвник використовують у вигляді реакційноздатної похідної, наприклад, сукцинімідного ефіру. Ковалентне приєднання флуоресцентного барвника може здійснюватися в ручному режимі після закінчення синтезу праймера й відділення його у вільному вигляді від твердої фази (CPG), на якій проводився синтез. Для очищення флуоресцентно міченого праймера від барвника, що не вступив в реакцію та інших побічних продуктів реакції використовують високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ).

При виборі дискримінуючих олігонуклеотидів для іммобілізації на біочіпі з урахуванням розміру й складності аналізованої послідовності й, зокрема, наявності повторів і протяжних гомополімерних послідовностей визначають довжину дискримінуючих олігонуклеотидів, яка забезпечує їх специфічність відносно аналізованої послідовності. Для кожної позиції, для якої відомі мутації, поліморфізм або алельні варіанти, підбирають набір специфічних дискримінуючих олігонуклеотидів, здатний виявляти відомі заміни, делеції й інсерції. Використовуючи програмне забезпечення, наприклад Oligo v.6.3 (Molecular Biology Insights Inc., США), розраховують температури плавлення олігонуклеотидів і, варіюючи їхню довжину, домагаються того, щоб розкид температур плавлення олігонуклеотидів становив не більше 2-3°C. Уникають таких олігонуклеотидів, які здатні формувати вторинні структури типу шпильки з високими температурами плавлення. Положення тих варіабельних нуклеотидів, визначення яких проводять, та інших нуклеотидних перебудов обирають при

можливості не далі 1-4 нуклеотида від середини відповідного дискримінуючого олігонуклеотида.

Дискримінуючі олігонуклеотиди іммобілізують у гелевих елементах, які наносяться на матрицю у вигляді краплин діаметром від 80 до 300 мкм з періодом 150-500 мкм, без використання спеціальних пристосувань, наприклад, кварцових масок. Як матриця може використовуватися як скляна підкладка (предметне або покривне скло), так і більш доступні матеріали, такі як пластик. Для іммобілізації олігонуклеотидів у біочіпах використовуються їх спільна полімеризація з основними компонентами гелю. У результаті цієї одностадійної реакції молекули, які іммобілізуються незворотно, ковалентно приєднуються до тих або інших мономерів зростаючого полімерного ланцюга й рівномірно розподіляються в повному об'ємі гелю з високим виходом (порядку 50% для олігонуклеотидів) (Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I. et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. Anal Biochem 2004; 325: 92-106). Концентрація іммобілізованих олігонуклеотидних зондів може бути оцінена зафарбовуванням гелевих елементів біочіпа барвником з низькою специфічністю до нуклеотидної послідовності ДНК (А.Л. Міхейкін, А.В. Чудінов, А.И. Ярошук, А.Ю. Рубіна, С.В. Паньков, А.С. Крилов, А.С. Заседаєлев, А.Д. Мірзабеков. Барвник з низькою специфічністю до нуклеотидної послідовності ДНК: застосування для оцінки кількості олігонуклеотидів, іммобілізованих в комірках біологічних мікрочіпів. Молекулярна біологія 2003; 37(6): 1061-70).

ПЦР-продукти, отримані на другій стадії ампліфікації, гібридизують на диференціюючому біочіпі з іммобілізованими олігонуклеотидами, комплементарними до послідовностей досліджуваних на предмет наявності мутацій генів. Гібридизацію проводять у розчині, який містить буферний компонент для підтримки рН, сіль для створення іонної сили й хаотропний (дестабілізуючий водневі зв'язки) агент, у герметичній гібридаційній камері за температури, яка залежить від температури плавлення іммобілізованих на мікрочіпі дискримінуючих олігонуклеотидів. Як дестабілізуючі водневі зв'язки агенти можуть бути використані, наприклад, гуанідин тіоціанат, сечовина або формамід. Вибір оптимальної температури гібридизації проводять із урахуванням зручності практичного застосування системи. Дискримінуючі олігонуклеотиди, заявлені в даному винаході, мають температуру плавлення в інтервалі від 42 до 44°C, що дозволяє проводити гібридизацію при 37°C з використанням хаотропного агента. Температура 37°C зручна тим, що більшість клінічних лабораторій оснащені термостатами, які підтримують цю температуру. У випадку, якщо розроблюваний метод може бути орієнтований на можливість застосування системи в польових умовах, інтервал використовуваних температур гібридизації може бути розширений до 20-37°C, з відповідною зміною іонної сили гібридаційного буфера від 0,3 до 1M (Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S. et al., Species-level identification of orthopoxviruses with an

oligonucleotide microchip. J Clin Microbiol. 2002 Mar; 40 (3) :753-7).

Досліджувані фрагменти ДНК утворюють довершені гібридизаційні дуплекси тільки з відповідними (повністю комплементарними) олігонуклеотидами. З усіма іншими олігонуклеотидами досліджувані фрагменти ДНК дають недовершений дуплекс. Дискримінацію довершених і недовершених дуплексів виконують шляхом порівняння інтенсивностей флуоресценції комірок, у яких утворилися дуплекси. Інтенсивність сигналу в комірці, у якій утворився довершений гібридизаційний дуплекс ($I_{\text{дов}}$) вища, ніж у такій, де утворився недовершений дуплекс ($I_{\text{недов}}$). Проведення гібридизації за оптимальних умов (температура, підібрана концентрація хаотропного агента й іонна сила гібридизаційного буферу) дозволяє досягти співвідношення $I_{\text{дов}}/I_{\text{недов}} \geq 2$ між двома комірками, які містять зонди, що належать одній групі, і різняться на один нуклеотид.

Використовуючи схему розташування олігонуклеотидів на біочіпі, визначають мутації, властиві досліджуваній послідовності ДНК, і роблять висновок про стійкість (або чутливість) досліджуваного зразка до рифампіцину й/або ізоніазиду.

Інтенсивності флуоресцентних сигналів в комірках, які належать одній групі, порівнюють між собою. Максимальний сигнал флуоресценції свідчить про утворення довершеного гібридизаційного дуплекса в комірці, де даний сигнал зареєстрований. Якщо максимальний сигнал зареєстрований в комірці, яка відповідає ДНК без мутацій (тобто, тій, що належить мікроорганізму, чутливому до лікарського препарату), то вважають, що за даною амінокислотою позицією (групою комірок) досліджуваний зразок мутацій не має. Якщо максимальний сигнал зареєстрований в комірці, яка відповідає ДНК із мутацією (мутаціями) (тобто, тій, що належить мікроорганізму, стійкому до лікарського препарату), то вважають, що за даною амінокислотою позицією (групою комірок) досліджуваний зразок має амінокислотну заміну, що приводить до виникнення резистентності. Досліджуваний зразок ДНК визнається таким, що належить до чутливого штаму мікобактерій, якщо за кожною амінокислотою позицією (групою комірок) зразок охарактеризований як чутливий. Досліджуваний зразок ДНК визнається таким, що належить до стійкого штаму мікобактерій, якщо, як мінімум, за однією з амінокислотних позицій (групі комірок) зразок охарактеризований як такий, що має мутацію, яка приводить до виникнення резистентності. Для таких зразків додатково з'ясовують тип препарату, до якого виявлена стійкість, установивши групу, за якою зразок віднесений до резистентного типу.

Окрему групу із двох комірок утворює система для виявлення ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу. Інтерпретація результату в даній системі ґрунтується на реєстрації більш інтенсивного флуоресцентного сигналу в детектуючих комірках відносно комірок порівняння. Як комірки порівняння використовуються комірки гелю, які не містять іммобілізованих олігонуклеотидів. Якщо в детектуючих комірках спостерігаються більш інтенсивні сигнали, то робиться висновок, що в досліджува-

ному зразку виявлена ДНК, яка належить мікобактеріям туберкульозного комплексу.

Далі винахід буде проілюстровано прикладами, які покликанні забезпечити краще розуміння сутності заявленого винаходу, але не повинні розглядатися як обмежуючі даний винахід.

Приклади.

Приклад 1. Біочіп для виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу й визначення їх чутливості до рифампіцину й ізоніазиду.

1. Олігонуклеотиди для іммобілізації на біочіпі й праймери для ампліфікації були синтезовані на автоматичному синтезаторі 394 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, США) і містили спейсер з вільної аміногрупою 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 (Glen Research, США) для наступної іммобілізації в гелі або 5'-Amino-Modifier C6 (Glen Research, США) для введення флуоресцентної мітки, відповідно. Введення індодикарбоціанінової флуоресцентної мітки («Биочип-ИМБ», Росія) здійснювали відповідно до рекомендацій виробника. Виготовлення біочіпів проводили відповідно до процедури, описаної раніше (Rubina AY, Pan'kov SV, Dementieva EI et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. Anal Biochem 2004; 325: 92-106). Біочіпи містили напівсферичні комірки діаметром 100мкм і були віддалені одні від одних на відстань 300мкм. Рівномірність розміщення комірок і їх діаметр оцінювали за допомогою програмного забезпечення 'Тест-чип' («Биочип-ИМБ», Росія). Контроль якості мікрочіпів виконували вимірюванням концентрацій іммобілізованих олігонуклеотидів. Біочіпи забарвлювали флуоресцентним барвником ImD-310, концентрацію іммобілізованих зондів оцінювали так, як це було описано раніше (А.Л. Міхейкін, А.В. Чудінов, А.І. Ярощук, А.Ю. Рубіна, С.В. Паньков, А.С. Крилов, А.С. Заседаєлев, А.Д. Мірзабеков. Барвник з низькою специфічністю до нуклеотидної послідовності ДНК: застосування для оцінки кількості олігонуклеотидів, іммобілізованих в комірках біологічних мікрочіпів. Молекулярна біологія 2003; 37(6): 1061-70).

Структура біочіпа

Біочіп містить 69 іммобілізованих олігонуклеотидів, список яких представлений у таблиці 1, три маркерні точки для правильного позиціонування (захоплення зображення), що виконується комп'ютерною програмою, і 7 резервних комірок порожнього гелю. Розташування іммобілізованих на мікрочіпі олігонуклеотидів показано на Фіг.1.

Сірим кольором на Фіг.1 позначені гелеві комірки, які містять олігонуклеотиди (Таблиця 1, SEQ ID NO 1-69), здатні формувати довершений гібридизаційний дуплекс із ДНК, що не має мутацій (тобто із ДНК дикого типу (WT)), у позиціях, які відповідають наступним амінокислотним залишкам або нуклеотидам у промоторній області генів:

rpoB: (Gly/Thr)WT507(A1); Met515(B1); Ser522(C1); Leu533(D1); Asp516(A3); His(B3, C3); Ser531(D3); Leu511(E3); Gln513 (A8); Ser512 (E8); katG: Ser315(EI,FI); Trp328 (GI); Ile335 (G5); inhA: inhAw_G24(G8); inhAw_AT8 (H8); inhAw_C15(H5);

ahpC: ahpCw_G6(H1); ahpCw_C10(I1);
ahpCw_G9(I4); ahpCw_C12 (I6).

Білим кольором на Фіг.1 позначені гелеві комірки, які містять олігонуклеотиди, що формують недовершені гібридаційні дуплекси із ДНК дикого типу, у позиціях, які відповідають наступним амінокислотним залишкам або нуклеотидам у промоторній області генів:

rpoB: WT507(A2); Ile515 (B2); Leu522 (C2); Pro533 (D2); VA1516 (A4); Tyr516 (A5); Gly516 (A6); Glu516 (A7); Asp526 (B4); Leu526 (B5); Gln526 (B6); Cys526 (B7); Tyr526 (C4); Asn526 (C5); Arg526 (C6); Pro526 (C7); Leu531 (D4); Trp531 (D5); Cys531 (D6); Gln531 (D7); Pro511 (E4); Arg511 (E5); Thr512 (E7); Arg512 (E6); Leu513 (B8); Lys513 (C8); Gly513(D8).

Таблиця 1. Перелік послідовностей олігонуклеотидів, іммобілізованих на біочіпі.

SEQ ID NO:	Оліго-нуклеотид*	Позиція амінокислоти/ нуклеотида	Заміна амінокислоти	Заміна нуклеотида	Послідовність 5'→3'	Положення олігонуклеотида в послідовності гена
					Послідовність гена <i>rpoB</i> (Genbank Acc.No L27989)	<i>rpoB</i> / Acc.No L27989
1	A1	507	WT	-	TGG CTG GTG CCG AAG A	2370-2353
2	A2	507	DEL	GGCACC	CTC AGC TGG CTG AAG AA	2376-2352
3	E3	511	Leu (WT)	CTG	TTG GCT CAG CTG GCT G	2380-2364
4	E4	511	Leu>Pro	CTG>CCG	TTG GCT CGG CTG GCT	2380-2364
5	E5	511	Leu>Arg	CTG>CGG	TTG GCT CCG CTG GCT	2380-2364
6	E8	512	Ser (WT)	AGC	AAT TGG CTC AGC TGG C	2383-2365
7	E7	512	Ser>Thr	AGC>ACC	AAT TGG GTC AGC TGG	2383-2365
8	E6	512	Ser>Arg	AGC>CGC	AAT TGG CGC AGC TG	2383-2367
9	A8	513	Gln (WT)	CAA	TCC ATG AAT TGG CTC AGC T	2386-2368
10	B8	513	Gln>Leu	CAA>CTA	CAT GAA TAG GCT CAG CT	2386-2368
11	C8	513	Gln>Lys	CAA>AAA	CAT GAA TTT GCT CAG CT	2386-2368
12	D8	513	Gln>Pro	CAA>CCA	CAT GAA TGG GCT CAG CT	2386-2368
13	B1	515	Met (WT)	ATG	TTC TGG TCC ATG AAT TGG	2396-2374
14	B2	515	Met>Ile	ATG>ATA	GTT CTG GTC TAT GAA TTG G	2396-2374
15	A3	516	Asp (WT)	GAC	TT GTT CTG GTC CAT GAA T	2397-2376
16	A4	516	Asp>Val	GAC>GTC	TT GTT CTG GAC CAT GAA T	2397-2376
17	A5	516	Asp>Tyr	GAC>TAC	TT GTT CTG GTA CAT GAA T	2397-2376
18	A6	516	Asp>Gly	GAC>GGC	TT GTT CTG GCC CAT GAA T	2397-2376
19	A7	516	Asp>Glu	GAC>GAG	TT GTT CTG CTC CAT GAA T	2397-2376
20	C1	522	Ser (WT)	TCG	T CAA CCC CGA CAG CG	2414-2398
21	C2	522	Ser>Leu	TCG>TTG	T CAA CCC CAA CAG CG	2414-2398
22	B3,C3	526	His (WT)	CAC	G GCG CTT GTG GGT CAA C	2424-2408
23	B4	526	His>Asp	CAC>GAC	G GCG CTT GTC GGT CAA C	2424-2408
24	B5	526	His>Leu	CAC>CTC	G GCG CTT GAG GGT CAA C	2424-2408
25	B6	526	His>Gln	CAC>CAA	G GCG CTT TTG GGT CAA C	2424-2408
26	B7	526	His>Cys	CAC>TGC	G GCG CTT GCA GGT CAA C	2424-2408
27	C4	526	His>Tyr	CAC>TAC	G GCG CTT GTA GGT CAA C	2424-2408
28	C5	526	His>Asn	CAC>AAC	G GCG CTT GTT GGT CAA C	2424-2408
29	C6	526	His>Arg	CAC>CGC	G GCG CTT GCG GGT CAA C	2424-2408
30	C7	526	His>Pro	CAC>CCC	G GCG CTT GGG GGT CAA C	2424-2408
31	D3	531	Ser (WT)	TCG	CAG CGC CGA CAG TCG	2438-2424
32	D4	531	Ser>Leu	TCG>TTG	C CAG CGC CAA CAG TCG	2439-2424
33	D5	531	Ser>Trp	TCG>TGG	CAG CGC CCA CAG TCG	2438-2424
34	D6	531	Ser>Cys	TCG>TGT	CAG CGC ACA CAG TCG	2438-2424
35	D7	531	Ser>Gln	TCG>CAG	CAG CGC CTG CAG TCG	2438-2424
36	D1	533	Leu (WT)	CTG	TG CCC CAG CGC CGA CAG	2443-2427
37	D2	533	Leu>Pro	CTG>CCG	TG CCC CGG CGC CGA CAG	2443-2427

38	E1, F1	315	Ser (WT)	AGC	CG ATC ACC AGC GGC AT	1004-1019
39	E2	315	Ser>Thr ₁	ACC	CG ATC ACC AC GGC AT	1004-1019
40	F2	315	Ser>Thr ₂	ACA	CG ATC ACC ACA GGC ATC	1004-1020
41	F3	315	Ser>Asn	AAC	G ATC ACC AAC GGC ATC	1005-1020
42	F4	315	Ser>Ile	ATC	G ATC ACC ATC GGC ATC	1005-1020
43	F5	315	Ser>Arg ₁	CGC	G ATC ACC CGC GGC AT	1005-1020
44	F6	315	Ser>Arg ₂	AGA	ATC ACC AGA GGC ATC G	1006-1021
45	F7	315	Ser>Gly	GGC	G ATC ACC GGC GGC AT	1005-1019
46	G1	328	Trp (WT)	TGG	CG AAA TGG GAC AAC A	1046-1060
47	G2	328	Trp>Gly	GGG	CG AAA GGG GAC AAC A	1046-1060
48	G3	328	Trp>Leu	TTG	CG AAA TTG GAC AAC AG	1046-1060
49	G4	328	Trp>Cys	TGC	CG AAA TGC GAC AAC A	1046-1060
50	G5	335	Ile (WT)	ATC	TC CTC GAG ATC CTG TAC G	1064-1081
51	G6	335	Ile>Val	GTC	TC CTC GAG GTC CTG TAC G	1064-1081
					Послідовність гена <i>inhA</i> (Genbank Acc.No AY192027)	<i>inhA</i> / Acc.No AY192027
52	G8	24	-	G (WT)	CCG GCC GCG GCG	164-175
53	G7	24	-	G>T	CCG GCC TCG GCG	164-175
54	H8	8	-	T (WT)	GAT AGG TTG TCG GGG	180-194
55	H7	8	-	T>A	GAT AGG ATG TCG GGG	180-194
56	H6	8	-	T>G	GAT AGG GTG TCG GGG	180-194
57	H5	15	-	C (WT)	CGG CGA GAC GAT AGG	171-185
58	H4	15	-	C>T	CGG CGA GAT GAT AGG	171-181
59	H3	16	-	C>G	GG CGA GGC GAT AGG	172-185
					Послідовність гена <i>ahpC</i> (Genbank Acc.No U16243)	<i>ahpC</i> / Acc.No U16243
60	H1	6	-	G (WT)	GCA CGA TGG AAT GTC GC	680-696
61	H2	6	-	G>A	GCA CGA TAG AAT GTC GCA	679-696
62	I1	10	-	C (WT)	TCA CGG CAC GAT GGA A	686-701
63	I2	10	-	C>T	TCA CGG CAT GAT GGA A	686-701
64	I3	10	-	C>A	TCA CGG CAA GAT GGA A	686-701
65	I4	9	-	G (WT)	CAC GGC ACG ATG GAA T	685-700
66	I5	9	-	G>A	CAC GGC ACA ATG GAA T	685-700
67	I6	12	-	C (WT)	CT TCA CGG CAC GAT GG	688-703
68	I7	12	-	C>T	ACT TCA CGG TAC GAT GGA	687-704
					Послідовність елемента IS6110 (Genbank Acc.No AF189827)	IS6110/ Acc.No AF189827
69	F8, I8	-	-	WT	CCG GAG CTG CGT GAG CG	1359-1375

* Позиції олигонуклеотидів наведені відповідно до їх положення на **Фіг. 1.**

katG: Thr315₁ (E2); Thr315₂ (F2); Asn315 (F3); Ile315 (F4); Arg315₁ (F5); Arg315₂ (F6); Gly315 (F7); Gly328 (G2); Leu328 (G3); Cys328 (G4); Val335 (G6);

inhA: inhA_T24 (G7); inhA_A8 (H7); inhA_G8 (H6); inhA_T15 (H4); inhA_G16 (H3);

ahpC: ahpC_A6 (H2); ahpC_T10 (12); ahpC_A10 (13); ahpC_A9 (15); ahpC_T12 (17).

Комірки F8 і 18 містять олигонуклеотид, комплексований до фрагмента послідовності інсерційного елемента IS6110, який, як правило, є присутнім у ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу.

Приклад 2. Обробка клінічного зразка

1. Клінічний зразок (мокротиння, екссудат, змивки, бронхо-альвеолярний лаваж) змішували в співвідношенні 1:1 за об'ємом із свіжеприготованим 0,5% розчином N-ацетил-L- цистеїну (NALC) в 2% NaOH. Зразок ретельно перемішували на вортексі й витримували за кімнатної температури протягом 20хв. До зразка додавали фосфатний буфер рН6,8 у співвідношенні 1:5 за об'ємом й центрифугували протягом 30хв. при 3000об./хв. При використанні спинномозкової рідини проводили попереднє центрифугування протягом 10хв. при 10000об./хв. При аналізі крові попередньо виділяли лімфоцитарну фракцію за загальноприйнятою

методикою з використанням фіколу. Подальша обробка зразків проводилася однаково.

2. Осад клітин суспендували в 1,5мл ТЕ буфера (10мм Трис-НСІ, 1мм ЕДТА), рН8,0, і осаджували при 3000об./хв. протягом 30хв. Відмивання повторювали ще раз.

3. До отриманого осаду додавали 30мкл ТЕ буфера, рН8,0, який містив 1% (об./об.) Тритон Х-100, і витримували в сухому термостаті при 95°C протягом 30хв.

4. Зразок центрифугували при 10000об./хв протягом 10хв., надосадову рідину (3мкл) використовували для проведення ПЦР.

Приклад 3. Ампліфікація фрагментів мобільного елемента IS6110, генів *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*; одержання одноланцюгових флуоресцентно мічених фрагментів методом мультиплексної ПЦР.

На першій стадії проводили мультиплексну ампліфікацію фрагментів генів *groB* (212п.о.), *katG* (166п.о.), *inhA* (133п.о.), *ahpC* (126п.о.) і інсерційного елемента IS6110 (309п.о.).

В 25мкл ПЦР-суміші вносили 3мкл зразка, отриманого в п.4 Приклада 2.

Склад ПЦР-суміші:

- 1X ПЦР-буфер: 10мМ КС1, 10мМ Трис-НСІ (рН8,3) (Сілекс, Росія);

- 1,5мМ MgCl₂;

- 200мкМ кожного dATP, dCTP, dGTP, dUTP (Сілекс);

- Суміш праймерів (послідовності представлені в Таблиці 2) у наступній концентрації: p105f, p293r, *katG_f*, *katG_r1*, *IS_f*, *IS_r1*; *inhA_f*, *inhA_r1*, *ahpC_f*, *ahpC_r1* - 100нМ;

- 5од. термостабільної Taq ДНК-полімерази (Сілекс);

- 0,5од. урацил-ДНК-глікозилази (Сілекс).

Ампліфікацію проводили на програмувальному термостаті MiniCycler (MJ Research, США) з наступним режимом: 95°C - 30с, 67°C - 30с, 72°C - 30с; 36 циклів (у першому циклі час денатурації збільшували до 5хв., в останньому - час добудовування до 5хв.).

1мкл реакційної суміші, отриманої після першої стадії ПЦР, використовували як матрицю при проведенні другої стадії.

Другу стадію ПЦР проводили в із праймерами, специфічними до фрагмента гена *groB* (126п.о.), *katG* (140п.о.), *inhA* (93п.о.), *ahpC* (96п.о.), і IS6110 (110п.о.).

Склад ПЦР-Суміші (50мкл):

- 1X ПЦР - буфер: 10мМ КС1, 10мМ Трис-НСІ (рН 8,3) (Сілекс, Росія);

- 1,5мМ MgCl₂;

- 200мкМ кожного dNTP (Сілекс);

- Суміш праймерів (послідовності представлені в Таблиці 2) у наступній концентрації: p1272f/p1398r, 100нМ; *katG_f*/*katG_r2**, 100нМ; *inhA_f*/*inhA_r2**, 100нМ; *ahpC_f*/*ahpC_r2**, 100нМ; *IS_f*/*IS_r2**, 100нМ;

- 10од. термостабільної Taq ДНК-полімерази (Сілекс).

5'-кінець праймерів, відзначених индексом*, містив лінкер C₆ аміномодифікатор (Glen Research Corp., США), до аміногрупи якого було приєднано індокарбоціаніновий барвник («Биочип-ИМБ», Росія).

Ампліфікацію проводили на програмувальному термостаті MiniCycler (MJ Research, США) з наступним режимом: 95°C - 30с, 65°C - 30с, 72°C - 20с; 46 циклів (у першому циклі час денатурації збільшували до 5хв., в останньому - час добудовування до 5хв.). 12мкл отриманого продукту використовувалися в гібридизації на біочіпі.

Приклад 4. Гібридизація ампліфікованих мічених продуктів на біочіпі

До 12мкл реакційної суміші, отриманої після другої стадії ПЦР, яка містила переважно одноланцюгові флуоресцентно мічені фрагменти ДНК, що відповідали п'яти аналізованим фрагментам, додавали концентрований розчин гібридизаційного буфера так, щоб кінцева концентрація гуанідину тіоціанату становила 1М, HEPES - 50мМ, рН7,5, ЕДТА - 5мМ. Отриману суміш (28мкл) поміщували в гібридизаційну камеру мікрочіпа. Камери були виготовлені ТОВ «Биочип-ИМБ». Гібридизацію проводили при 37°C протягом 6-12 годин. По закінченні гібридизації мікрочіп тричі промивали дистильованою водою при 37°C.

Таблиця 2. Перелік послідовностей праймерів, використаних у двостадійній ПЦР для ампліфікації фрагментів генів *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* і фрагмента елемента IS 6110.

SEQ ID No:	Назва	Послідовність 5'→3'	Положення праймера в послідовності гена	Ген/ GenBank Acc. No
70	p105f	CGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTG	2288-2315	<i>groB</i> / L27989
71	p293r	AGTGAGACGGGTGCACGTCGCGGACCT	2476-2503	<i>groB</i> / L27989
72	p1272f*	CGCCGCGATCAAGGAGTTCT	2336-2355	<i>groB</i> / L27989
73	p1398r	TCACGTGACAGACCGCCGGG	2442-2461	<i>groB</i> / L27989
74	<i>katG_f</i>	TGGAAGAGCTCGTATGGCACCAGAAC	967-993	<i>katG</i> / U06262
75	<i>katG_r1</i>	CGGTGTATTGCCAAGCGCCAGCAG	1109-1132	<i>katG</i> / U06262
76	<i>katG_r2*</i>	GCTCTCCGTCAGCTCCCACTCGTAGCC	2990-3016	<i>katG</i> / U06262
77	<i>inhA_f</i>	CCGGAATCGCAGCCACGTTACGC	118-141	<i>inhA</i> /AY192027
78	<i>inhA_r1</i>	GGTAACCAGGACTGAACGGGATACGAA	230-256	<i>inhA</i> /AY192027
79	<i>inhA_r2*</i>	GGCCCTTCAGTGGCTGTGGCAG	198-220	<i>inhA</i> /AY192027

80	ahpC_f	ATGGTGTGATATATCACCTTTGCCTGACAGC	706-736	ahpC/ U16243
81	ahpC_r1	GGAATTGATCGCCAATGGTTAGCAGTGG	611-638	ahpC/ U16243
82	ahpC_r2*	TGACTCTCCTCATCATCAAAGCGGACA	641-667	ahpC/ U16243
83	IS_f	AGGATGGGGTCATGTCAGGTGGTTCATCGA	1318-1347	IS6110/ AF189827
84	IS_r1	GCGAAGAAAGCCGACGCGGTCTTTAAATC	1598-1627	IS6110/ AF189827
85	IS_r2*	CGCTGCCACTCCGAATCGTGC	1409-1430	IS6110/ AF189827

*5'- кінець праймерів містив лінкер C₆ aminomodifier (Glen Research Corp., США), до аміногрупи якого було приєднано індодикарбоціаніновий барвник IMD-504 («Биочип-ИМБ», Росія).

Приклад 5. Реєстрація й інтерпретація результатів гібридизації

Реєстрація флуоресцентного зображення біочіпа виконувалася на портативному флуоресцентному аналізаторі (ТОВ «Биочип-ИМБ», Росія) з використанням програмного забезпечення ImageWare®, розробленого тією ж компанією.

Інтерпретацію результатів проводили в такий спосіб. Гелеві комірки, які містять олігонуклеотиди, об'єднані в 22 групи (розмежовані на Фіг.1 товстими лініями) таким чином, що порівняння інтенсивностей флуоресцентних сигналів комірок усередині кожної групи дозволяє зробити висновок про наявність/відсутність мутації (мінорного поліморфізму), що приводить до заміни одного амінокислотного залишку або делеції, або заміни нуклеотида в промоторній області генів inhA і ahpC.

Приклад 6. Визначення в клінічному зразку мікобактерій туберкульозного комплексу, чутливих до рифампіцину й ізоніазиду (ДНК дикого типу), методом гібридизації на біочіпі.

Зразок мокротиння, отриманий від пацієнта, з підтвердженою мікроскопією наявністю кислотостійких бактерій (БК+), був розділений на 2 частини, одна із яких після деконтамінації (N-ацетил-L-цистеїн і NaOH) і нейтралізації була посіяна на середовище Левенштейна-Йенсена. Зразок інкубували при 37°C протягом 6 тижнів із щотижневою перевіркою утворення бактеріальних колоній. При виявленні колоній присутність кислотостійких бактерій у зразку виявляли мікроскопією з фарбуванням за Цілем-Нільсеном. Ідентифікацію мікобактерій туберкульозного комплексу проводили за результатами біохімічних тестів (Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology. A guide for level III laboratory. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1985). Тести на стійкість до ліків проводили методом пропорцій на середовищах Левенштейна-Йенсена, які містять рифампіцин і ізоніазид у концентраціях 40мг/л і 0,2мг/л, відповідно. Ізолят вважався стійким, якщо на середовищі із препаратом виростили колонії, які становили більше 1% від числа тих колоній, що виростили на середовищі без препарату.

Друга частина зразка мокротиння використовувалась для аналізу способом запропонованим винаходом, як описано в Прикладах 2-5.

На Фіг.2 представлена картина гібридизації зразка ДНК, виділеного із чутливого до рифампіцину й ізоніазиду штаму мікобактерій туберкульозного комплексу.

Відповідно до запропонованого алгоритму інтерпретації результатів, комірки з олігонуклеоти-

дами, комплементарними до ДНК дикого типу, мають більшу інтенсивність флуоресцентного сигналу, ніж інші комірки всередині кожної групи. Таким чином, ДНК досліджуваного об'єкта утворює довші гібридизаційні дуплекси з олігонуклеотидами, комплементарними до послідовності ДНК дикого типу (чутливого до рифампіцину й ізоніазиду штаму мікобактерій туберкульозного комплексу встановлюється шляхом порівняння інтенсивності флуоресцентного сигналу в комірках з іммобілізованим олігонуклеотидом на IS6110 (F8, 18) і в елементах порожнього гелю, які виконують роль негативного контролю.

Із цього роблять висновок, що у вивченому клінічному зразку присутні мікобактерії туберкульозного комплексу, причому стійких до рифампіцину й ізоніазиду мікобактерій не виявлено.

Методом культивування на твердих середовищах і біохімічними тестами була підтверджена наявність *M. tuberculosis* у зразку мокротиння. Ріст колоній на середовищах з хіміопрепаратом був відсутній. Таким чином, культуральний спосіб зафіксував наявність у клінічному зразку *M. tuberculosis* дикого типу, що повністю збігається з результатами, отриманими способом даного винаходу.

Приклад 7. Визначення в клінічному зразку мікобактерій туберкульозного комплексу, резистентних до рифампіцину й ізоніазиду (ДНК, що містить мутації), методом гібридизації на біочіпі.

Зразок мокротиння, отриманий від пацієнта, з підтвердженою мікроскопією наявністю кислотостійких бактерій (БК+), був розділений на 2 частини, одна із яких після деконтамінації (N-ацетил-L-цистеїн і NaOH) і нейтралізації була посіяна на середовище Левенштейна-Йенсена. Зразок інкубували при 37°C протягом 6 тижнів із щотижневою перевіркою утворення бактеріальних колоній. При виявленні колоній присутність кислотостійких бактерій у зразку виявляли мікроскопією з фарбуванням за Цілем-Нільсеном. Ідентифікацію мікобактерій туберкульозного комплексу проводили за результатами біохімічних тестів (Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology. A guide for level III laboratory. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1985). Тести на стійкість до ліків проводили методом пропорцій на середовищах Левенштейна-Йенсена, що містять рифампіцин і ізоніазид у концентраціях 40мг/л і 0,2мг/л, відповідно. Ізолят вважався стійким, якщо на середовищі із препаратом виростили колонії, які ста-

новили більше 1% від числа тих колоній, що вирости на середовищі без препарату.

Друга частина зразка мокротиння використовувалась для аналізу способом запропонованим винаходом, як описано в Прикладах 2-5.

На Фіг.3 представлена картина гібридизації зразка ДНК, виділеного з резистентного до рифампіцину й ізоніазиду штаму мікобактерій туберкульозного комплексу.

У кожній із груп елементів біочіпа інтенсивність флуоресцентного сигналу в комірці з олігонуклеотидом, комплементарним до ДНК дикого типу, вища інтенсивності сигналу інших комірок. Виключення становлять групи елементів D3-D7 і E1, E2, F1-F7 (Фіг.3).

Максимальну інтенсивність флуоресценції всередині групи D3-D7 має елемент D4. Отже, ДНК досліджуваного об'єкта має точкову нуклеотидну заміну А>Т у положенні 2431 гена *groB* (Genbank Ace.No L27989), що приводить до заміни амінокислоти Ser на Leu у позиції №531 і веде до виникнення резистентності досліджуваного штаму до рифампіцину.

Максимальну інтенсивність флуоресценції всередині групи E1, E2, F1-F7 має елемент E2. У такий спосіб визначається наявність у досліджуваній ДНК нуклеотидної заміни G на C у положенні 1013 гена *katG* (Genbank Ace.No U06262), що приводить до заміни амінокислоти Ser 315 на Thr у позиції №315 і веде до виникнення резистентності досліджуваного штаму до ізоніазиду.

Приналежність даного штаму до мікобактерій туберкульозного комплексу встановлюється шляхом порівняння інтенсивності флуоресцентного сигналу в комірках з іммобілізованим олігонуклеотидом на IS6110 (F8, I8) і в елементах порожнього гелю, які виконують роль негативного контролю.

Таким чином, робиться висновок, що у вивченому клінічному зразку виявлені мікобактерії туберкульозного комплексу, резистентні до рифампіцину й ізоніазиду. Резистентність до рифампіцину обумовлена заміною амінокислоти Ser на Leu у позиції №531 гена *groB*. Стійкість до ізоніазиду визначається мутацією Ser315>Leu у гені *katG*.

Методом культивування на твердих середовищах і біохімічними тестами була підтверджена наявність *M. tuberculosis* у зразку мокротиння. Стійкий ріст колоній на середовищах з рифампіцином та ізоніазидом підтвердив наявність у зразку *M. tuberculosis*, стійкого до вищевказаних препаратів, що повністю збігається з результатами, отриманими способом запропонованим даним винаходом.

Приклад 8. Визначення в клінічному зразку мікобактерій туберкульозного комплексу, резистентних до рифампіцину й ізоніазиду (ДНК, що містить мутації), методом гібридизації на біочіпі.

Зразок мокротиння, отриманий від пацієнта, з підтвердженою мікроскопією наявністю кислотостійких бактерій (БК+), був розділений на 2 частини, одна із яких після деконтамінації (N-ацетил-L-цистеїн і NaOH) і нейтралізації була посіяна на середовище Левенштейна-Йенсена. Зразок інкубували при 37°C протягом 6 тижнів із щотижневою перевіркою утворення бактеріальних колоній. При

виявленні колоній присутність кислотостійких бактерій у зразку виявляли мікроскопією з фарбуванням за Цілем-Нільсеном. Ідентифікацію мікобактерій туберкульозного комплексу проводили за результатами біохімічних тестів (Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology. A guide for level III laboratory. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1985). Тести на стійкість до ліків проводили методом пропорцій на середовищах Левенштейна-Йенсена, що містять рифампіцин і ізоніазид у концентраціях 40мг/л і 0,2мг/л, відповідно. Ізолят уважався стійким, якщо на середовищі із препаратом виростили колонії, які становили більше 1% від числа тих колоній, що виростили на середовищі без препарату.

Друга частина зразка мокротиння використовувалась для аналізу способом запропонованим винаходом, як описано в Прикладах 2-5.

На Фіг.4 представлена картина гібридизації зразка ДНК, виділеного з резистентного до рифампіцину й ізоніазиду штаму мікобактерій туберкульозного комплексу.

У кожній із груп елементів біочіпа інтенсивність флуоресцентного сигналу в комірці з олігонуклеотидом, комплементарним до ДНК дикого типу, вище інтенсивності сигналу інших комірок. Виключення становлять групи елементів A3-A7 і H3-H5 (Фіг.4).

Максимальну інтенсивність флуоресценції усередині групи A3-A7 має елемент A4. Отже, ДНК досліджуваного об'єкта має точкову нуклеотидну заміну OG у положенні 2384 гена *groB* (Genbank Ace.No L27989), що приводить до заміни амінокислоти Asp на Val у позиції №516 і веде до виникнення резистентності досліджуваного штаму до рифампіцину.

Максимальну інтенсивність флуоресценції усередині групи H3-H5 має елемент H4. Отже, ДНК досліджуваного об'єкта має нуклеотидну заміну C>T у положенні -15 відносно сайту ініціації трансляції в промоторній області гена *inhA*.

Приналежність даного штаму до мікобактерій туберкульозного комплексу встановлюється шляхом порівняння інтенсивності флуоресцентного сигналу в комірках з іммобілізованим олігонуклеотидом на IS6110 (F8, I8) і в елементах порожнього гелю, які виконують роль негативного контролю.

У такий спосіб робиться висновок, що у дослідному клінічному зразку виявлені мікобактерії туберкульозного комплексу, резистентні до рифампіцину й ізоніазиду. Резистентність до рифампіцину обумовлена заміною амінокислоти Asp на Val у позиції №516 гена *groB*. Стійкість до ізоніазиду визначається нуклеотидними замінами C>T (-15) у промоторній області гена *inhA*.

Методом культивування на твердих середовищах і біохімічними тестами була підтверджена наявність *M. tuberculosis* у зразку мокротиння. Стійкий ріст колоній на середовищах з рифампіцином і ізоніазидом підтвердив наявність у зразку *M. tuberculosis*, стійкого до вищевказаних препаратів, що повністю збігається з результатами, отриманими способом запропонованим даним винаходом.

Приклад 9. Виявлення ДНК, виділеної зі штаму *M. bovis* BCG, чутливого до рифампіцину й ізоніазиду, методом гібридизації на біочіпі.

Культура охарактеризованого штаму *M. bovis* BCG, який належить до мікобактерій туберкульозного комплексу, була проаналізована способом запропонованим даним винаходом, як описано в Прикладах 2-5.

На Фіг.5 представлена картина гібридизації зразка ДНК, виділеного із чутливого до рифампіцину й ізоніазиду штаму мікобактерій туберкульозного комплексу.

Відповідно до запропонованого алгоритму інтерпретації результатів, комірки з олігонуклеотидами, комплементарними до ДНК дикого типу, мають більшу інтенсивність флуоресцентного сигналу, ніж інші комірки всередині кожної групи. Таким чином, ДНК досліджуваного об'єкта утворює довершені гібридизаційні дуплекси з олігонуклеотидами, комплементарними до послідовності ДНК дикого типу (чутливого до рифампіцину й ізоніазиду штаму мікобактерій туберкульозного комплексу). Належність даного штаму до мікобактерій туберкульозного комплексу встановлюється шляхом порівняння інтенсивності флуоресцентного сигналу в комірках з іммобілізованим олігонуклеотидом на IS6110 (F8, I8) і в елементах порожнього гелю, що виконують роль негативного контролю.

Із цього можна зробити висновок, що аналізована ДНК відноситься до мікобактерій туберкульозного комплексу, чутливих до рифампіцину й ізоніазиду. При цьому гібридизаційна картина ДНК штаму *M. bovis* BCG збігається з гібридизаційною картиною штаму *M. tuberculosis* дикого типу.

Приклад 10. Аналіз ДНК, виділеної зі штаму *M. avium* S58 методом гібридизації на біочіпі.

Культура охарактеризованого штаму *M. avium* S58, який не належить до мікобактерій туберкульозного комплексу, була проаналізована способом запропонованим даним винаходом, як описано в Прикладах 2-5.

На Фіг.6 представлена картина гібридизації зразка ДНК, виділеного зі штаму, що не належить до мікобактерій туберкульозного комплексу.

Відповідно до запропонованого алгоритму інтерпретації результатів, належність аналізованого штаму до мікобактерій туберкульозного комплексу встановлюється шляхом порівняння інтенсивності флуоресцентного сигналу в комірках з іммобілізованим олігонуклеотидом на IS6110 (F8, I8) і в елементах порожнього гелю, які виконують роль негативного контролю. Як видно з Фіг.6, в отриманій гібридизаційній картині сигнали в комірках F8 і I8 відсутні. Це означає, що геном досліджуваного мікроорганізму не містить інсерційного елемента IS6110. Отже, аналізована ДНК виділена з мікроорганізму, який не належить до мікобактерій туберкульозного комплексу, а отже, аналіз стійкості до ліків не має сенсу.

Таким чином, представлений винахід дозволяє в короткий термін визначати стійкі до рифампіцину й ізоніазиду форми мікобактерій туберкульозу, безпосередньо використовуючи матеріал клінічного зразка. Спосіб даного винаходу вигідно відрізняється від існуючих на даний час аналогів простотою виконання й низькою собівартістю. Оптимізована двостадійна мультиплексна ПЦР із використанням оригінального набору праймерів дозволяє досягти високої чутливості методу (не менше 500 геном-еквівалентів мішені на зразок). Застосування біочіпа, який містить оригінальний набір диференціюючих олігонуклеотидів, дозволяє також виконувати типування (маркування) мікобактерій туберкульозу на генотипічному рівні.

Хоча найкращі втілення даного винаходу та їхні переваги було докладно описано вище, фахівець у даній галузі зможе внести різні зміни, доповнення або, навпаки, щось опустити, не виходячи при цьому за рамки даного винаходу, які визначаються прикладеною нижче формулою винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Інститут молекулярної біології ім. В.А. Енгельгардта Російської Академії Наук

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences

<120> Спосіб одночасного виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу та ідентифікації мутацій в днк мікобактерій, що призводять до стійкості мікроорганізмів до рифампіцину та ізоніазиду, на біологічних мікрочіпах, набір праймерів, біочіп і набір олігонуклеотидних зондів, що застосовуються у способі

<160> 85

<170> Patentln version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213 > Mycob acterium tub erculo sis

<400> 1

tggtgtgtgc cgaaga

16

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

ctcagctggc tgaagaa

17

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 3

ttggctcagc tggctg

16

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 4

ttggctcggc tggct

15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 5

ttggctccgc tggct

15

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

35	92720	36
<400> 6 aattggctca gctggc	16	
<210> 7		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 7 aattgggtca gctgg	15	
<210> 8		
<211> 14		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 8 aattggcgca gctg	14	
<210> 9		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 9 tccatgaatt ggctcagct	19	
<210> 10		
<211> 17		
<212> DNA		

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 10
catgaatagg ctcagct

17

<210> 11

<211> 17.

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 11
catgaatttg ctcagct

17

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 12
catgaatggg ctcagct

17

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 13
ttctggtcca tgaattgg

18

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 14

gttctggtct atgaattgg

19

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 15

ttgttctggt ccatgaat

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 16

ttgttctgga ccatgaat

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 17

41	92720	42
ttgttctggt acatgaat	18	
<210> 18		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 18 ttgttctggc ccatgaat	18	
<210> 19		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 19 ttgttctgct ccatgaat	18	
<210> 20		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 20 tcaaccccgga cagcg	15	
<210> 21		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		

<400> 21
tcaaccccaa cagcg

15

<210> 22

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 22
ggcgcttggtg ggtcaac

17

<210> 23

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 23
ggcgcttggtc ggtcaac

17

<210> 24

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 24
ggcgcttgag ggtcaac

17

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 25

ggcgcttttg ggtcaac

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 26

ggcgcttgca ggtcaac

17

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 27

ggcgcttgta ggtcaac

17

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 28

ggcgcttggt ggtcaac

17

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 29

ggcgcttgcg ggtcaac

17

<210> 30

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 30

ggcgcttggg ggtcaac

17

<210> 31

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 31

cagcgccgac agtcg

15

<210> 32

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 32
ccagcgccaa cagtcg

16

<210> 33

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 33
cagcgccac agtcg

15

<210> 34

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 34
cagcgcacac agtcg

15

<210> 35

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 35
cagcgctgc agtcg

15

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 36
tgccccagcg ccgacag

17

<210> 37

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 37
tgccccggcg ccgacag

17

<210> 38

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 38
cgatcaccag cggcat

16

<210> 39

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 39
cgatcaccac ggcat

15

<210> 40

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 40

cgatcaccac aggcac

17

<210> 41

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 41

gatcaccaac ggcac

16

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 42

gatcaccac ggcac

16

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 43

55	92720	56
gatcacccgc ggc	15	
<210> 44		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 44		
atcaccagag gcatcg	16	
<210> 45		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 45		
gatcacccgc ggc	15	
<210> 46		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 46		
cgaaatggga caaca	15	
<210> 47		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		

57	92720	58
<400> 47 cgaaagggga caaca	15	
<210> 48		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 48 cgaaattgga caacag	16	
<210> 49		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 49 cgaaatgcga caaca	15	
<210> 50		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 50 tctcgagat cctgtacg	18	
<210> 51		
<211> 18		

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 51

tcctcgaggt cctgtacg

18

<210> 52

<211> 12

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 52

ccggccgcgg cg

12

<210> 53

<211> 12

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 53

ccggcctcgg cg

12

<210> 54

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 54

gataggttgt cggggg

15

<210> 55

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 55

gataggatgt cgggg

15

<210> 56

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 56

gatagggtgt cgggg

15

<210> 57

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 57

cggcgagacg atagg

15

<210> 58

<211> 15

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

63	92720	64
<400> 58 cggcgagatg atagg	15	
<210> 59		
<211> 14		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 59 ggcgaggcga tagg	14	
<210> 60		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 60 gcacgatgga atgtcgc	17	
<210> 61		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 61 gcacgataga atgtcgca	18	
<210> 62		
<211> 16		
<212> DNA		

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 62
tcacggcacg atggaa

16

<210> 63

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 63
tcacggcatg atggaa

16

<210> 64

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 64
tcacggcaag atggaa

16

<210> 65

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 65
cacggcacga tggaat

16

<210> 66

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 66
cacggcacia tggaat

16

<210> 67

<211> 16

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 67
cttcacggca cgatgg

16

<210> 68

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 68
acttcacggt acgatgga

18

<210> 69

<211> 17

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 69

69	92720	70
ccggagctgc gtgagcg	17	
<210> 70		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 70		
cgtggaggcg atcacaccgc agacgttg	28	
<210> 71		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 71		
agtgagacgg gtgcacgtcg cggacct	27	
<210> 72		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		
<400> 72		
cgccgcgatc aaggagtct	20	
<210> 73		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Mycobacterium tuberculosis		

<210> 81

<211> 28

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 81

ggaattgatc gccaatgggt agcagtgg

28

<210> 82

<211> 27

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 82

tgactctcct catcatcaaa gcggaca

27

<210> 83

<211> 30

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 83

aggatgggggt catgtcaggt gggtcatcga

30

<210> 84

<211> 30

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 84

gcgaagaaag ccgacgcggt ctttaaatc

30

<210> 85

<211> 22

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 85

cgctgcccac tccgaatcgt gc

22

A									
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	Del 507		Val 516	Tyr 516	Gly 516	Glu 516			A
	Ile 515		Asp 526	Leu 526	Gln 526	Cys 526		Leu 513	B
	Leu 522		Tyr 526	Asn 526	Arg 526	Pro 526		Lys 513	C
	Pro 533		Leu 531	Trp 531	Cys 531	Gln 531		Gly 513	D
	Thr 315 ₁		Pro 511	Arg 511	Arg 512	Thr 512			E
	Thr 315 ₂	Asn 315	Ile 315	Arg 315 ₁	Arg 315 ₂	Gly 315			F
	Gly 328	Leu 328	Cys 328		Val 335	InhA (T24)			G
	ahpC (A6)	InhA (G16)	InhA (T15)		InhA (G8)	InhA (A8)			H
	ahpC (T10)	ahpC (A10)		ahpC (A9)		ahpC (T12)			I
	R	R	R	R	R	R	R		J

Fig. 1

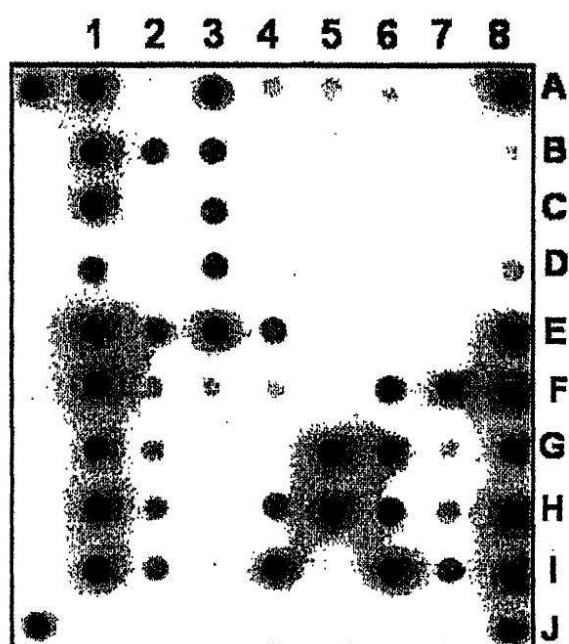


Fig. 2

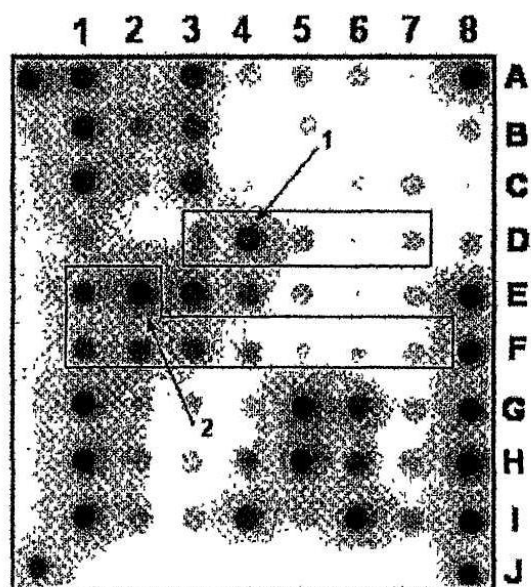


Fig. 3

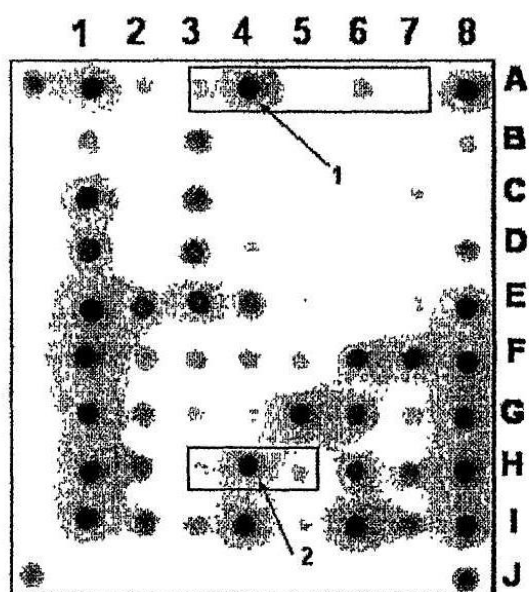


Fig. 4

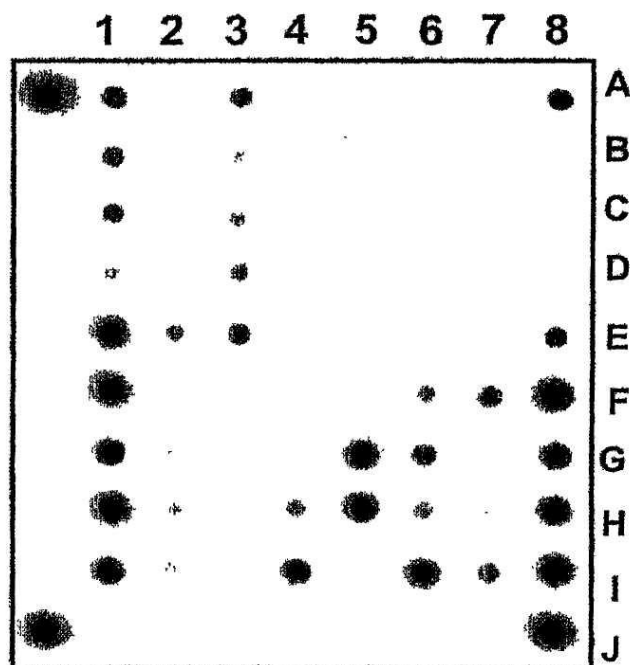
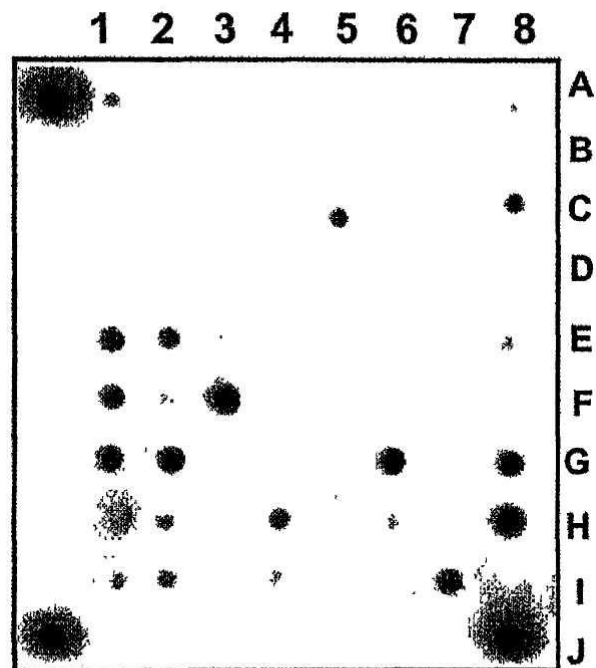


Fig. 5



Фіг. 6