



(12) **ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(15) Информация об исправлении
**Версия исправления: 1 (W1 A1)
исправления в описании**

(48) Дата публикации исправления
2019.11.27, Бюллетень №11'2019

(43) Дата публикации заявки
2019.09.30

(22) Дата подачи заявки
2017.10.16

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2018.01)

(54) **АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ И ЗАМЕЩЕНИЯ ЦЕПИ**

(31) 1617491.4

(32) 2016.10.14

(33) GB

(86) PCT/GB2017/053128

(87) WO 2018/069737 2018.04.19

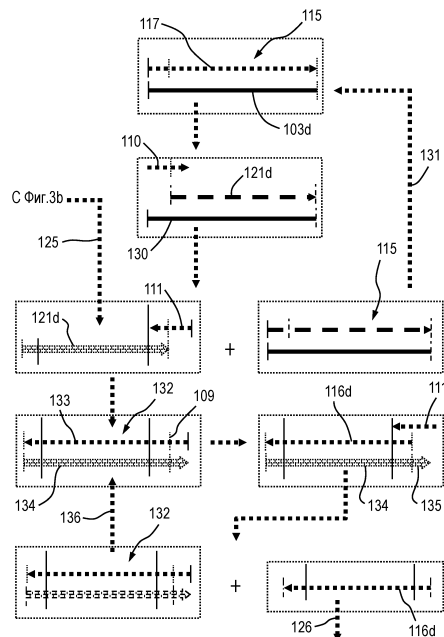
(71) Заявитель:
РЕВОЛЮДЖЕН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Патсос Георгиос, Минтер Стефен
Джон (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Представлен способ амплификации последовательности нуклеиновой кислоты. Способ включает предоставление смеси для амплификации, содержащей экзонуклеазу, способную к расщеплению цепи двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты от 5'-конца к 3'-концу, полимеразу с замещением цепи, двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую и вторую цепи нуклеиновой кислоты, первый праймер нуклеиновой кислоты и нуклеотиды по ситуации для обеспечения амплификации первой последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей амплификации. Способ дополнительно включает проведение реакции амплификации в условиях, допускающих расщепление, экзонуклеазное расщепление и полимеризацию с замещением цепи, тем самым получая смесь продуктов, содержащую

амплифицированное количество указанной первой последовательности нуклеиновой кислоты. Также представлен способ определения присутствия или количества целевой последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце с использованием двухцепочечного зонда, имеющего флуорофор на одной цепи и его гаситель на другой, и с использованием денатурации и повторной гибридизации для того, чтобы обнаруживать мишень.



**АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ И
ЗАМЕЩЕНИЯ ЦЕПИ**

Настоящее изобретение относится к амплификации нуклеиновых кислот и имеет конкретное (но не обязательно исключительное) применение в получении амплифицированных количеств конкретной целевой последовательности для обнаружения в целях медицинских диагностических процедур.

Многие медицинские состояния отличаются присутствием (в организме пациента) нуклеиновой кислоты, имеющей конкретную нуклеотидную последовательность. Последовательность нуклеиновой кислоты, например, может представлять собой ту, которая присутствует в патогенных бактериях, вирусе или другом микроорганизме, который «вторгся» в организм пациента и который отвечает за болезнь пациента. Во многих таких случаях присутствие микроорганизма в организме пациента можно диагностировать посредством анализа образца, такого как ткань, кровь, моча, мокрота и т. п. от пациента, на присутствие (в образце) последовательности нуклеиновой кислоты, которая характеризует микроорганизм. Однако, во многих случаях, количество характеристической последовательности нуклеиновой кислоты в образце очень низко и находится ниже предела обнаружения. По существу, процедуры амплификации используют для увеличения количества характеристической последовательности (или ее характеристического варианта, например, последовательности ДНК, полученной из характеристической последовательности рРНК) для целей обнаружения.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ амплификации последовательности нуклеиновой кислоты, который включает:

(а) предоставление смеси для амплификации, которая содержит:

(i) экзонуклеазу, способную вызывать расщепление цепи двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, причем расщепление происходит от 5'-конца цепи к 3'-концу,

(ii) полимеразу с замещением цепи,
(iii) двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую и вторую цепи нуклеиновой кислоты, гибридизованные друг с другом, указанная первая цепь содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую амплификации и имеющую первую 5'-концевую область, которая вдали от ее 5'-конца, имеет нуклеотидную последовательность, устойчивую к расщеплению (в условиях способа) экзонуклеазой, как определено в (i),

(iv) первый праймер нуклеиновой кислоты, имеющий ту же нуклеотидную последовательность, что и указанная первая концевая область первой нуклеиновой кислоты, и содержащий ту же устойчивую к расщеплению область, и

(v) нуклеотиды по ситуации для обеспечения амплификации первой последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей амплификации;

и

(b) осуществление реакции амплификации в условиях, допускающих расщепление, экзонуклеазное расщепление и полимеризацию с замещением цепи, тем самым получая смесь продуктов, содержащую амплифицированное количество указанной первой последовательности нуклеиновой кислоты.

Способ амплификации по первому аспекту настоящего изобретения основан на комбинации определенного числа признаков. В частности, в способе используют взаимосвязанную комбинацию (a) первого праймера нуклеиновой кислоты, имеющую устойчивую к расщеплению область вдали от ее 5'-конца, и (b) двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей первую и вторую цепи нуклеиновой кислоты, гибридизованные друг с другом, первая цепь содержит последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую амплификации. Комбинация является такой, что первая цепь нуклеиновой кислоты имеет, идущую от ее 5'-конца, 5'-концевую область с той же нуклеотидной последовательностью, что и первый праймер, содержащий устойчивую к расщеплению последовательность.

В способе амплификации, экзонуклеаза расщепляет 5'-концевую область первой цепи до устойчивой к расщеплению области, но не

через нее, в 5'-концевой области цепи. Как результат, обнажают 3'-конец второй цепи, который предоставляет участок для гибридизации первого праймера, который, при гибридизации с 3'-концом второй цепи, замещает нерасщепленную часть 5'-концевой области первой цепи. Затем первый праймер продлевают под действием полимеразы с замещением цепи, чтобы получить копию первой цепи. Затем 5'-концевую область вновь синтезированной первой цепи можно расщеплять (экзонуклеазой), и описанный процесс фактически повторяет сам себя.

Способ амплификации по изобретению предпочтительно представляет собой тот, который проводят в изотермических условиях, например, при температуре от 45°C до 55°C. По существу, полимеразой с замещением цепи является та, которая способна копировать матричную цепь в изотермических условиях. Аналогичным образом, экзонуклеазой является та, которая способна вызывать расщепление при предпочтительных изотермических условиях. Предпочтительные полимеразы с замещением цепи для использования в изобретении представляют собой те, которые не обладают 3'-экзонуклеазной активностью. Полимераза с замещением цепи может представлять собой таковую серии Bst, хотя существуют другие возможности, как рассмотрено далее. Экзонуклеаза предпочтительно представляет собой ту, которая распознает тупой конец двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. Особенно предпочтительно, чтобы экзонуклеаза представляла собой λ -экзонуклеазу, которая постепенно разрушает одну цепь двухцепочечной ДНК в 5' и 3' направлении в следующем порядке предпочтения по конфигурации концов двухцепочечной структуры, а именно с 5'-вырезом > тупой >> 5'-свисающий с 10× предпочтением фосфорилированных концов вместо гидроксильных.

В одном из вариантов осуществления изобретения вторая цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты может быть «нормальной» в том отношении, что она не имеет устойчивой к расщеплению области. Процесс в соответствии с этим вариантом осуществления описан далее более подробно со ссылкой на фиг. 1. В этом варианте осуществления изобретения, предпочтительно,

чтобы 5'-конец первой цепи и 3'-конец второй цепи вместе предоставляли тупой конец для двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, предпочтительно, чтобы 5'-конец первой цепи имел 5'-фосфатную группу, а экзонуклеаза представляла собой ту, которая, в смеси для амплификации, предпочтительно расщепляет цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, которая имеет фосфатную (PO₄) группу на ее 5'-конце, причем расщепление происходит от этого конца цепи к ее 3'-концу, чтобы высвободить 3'-конец второй цепи для гибридизации праймера с ним. В таком варианте осуществления предпочтительно экзонуклеаза представляет собой λ-экзонуклеазу.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, в способе используют второй праймер нуклеиновой кислоты, имеющий (подобно первому праймеру) устойчивую к расщеплению область вдали от его 5'-конца. Кроме того, в этом варианте осуществления вторая цепь имеет 5'-концевую область, идущую от его 5'-конца, с той же нуклеотидной последовательностью, что и второй праймер (включая устойчивую к расщеплению последовательность). Этот вариант осуществления описан далее более подробно со ссылкой на фиг. 3 на чертежах. В этом варианте осуществления предпочтительно, чтобы двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты имела тупые концы. Предпочтительно также 5'-концы каждой из первой и второй цепей имеют 5'-фосфатную группу, а экзонуклеаза представляет собой ту, которая, в смеси для амплификации, предпочтительно расщепляет цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, которая имеет фосфатную (PO₄) группу на ее 5'-конце, причем расщепление происходит от этого конца цепи к ее 3'-концу. Предпочтительно экзонуклеаза представляет собой λ-экзонуклеаз.

Для всех вариантов осуществления изобретения двухцепочечную молекулу ДНК, содержащую последовательность (и), подлежащую амплификации, можно синтезировать из встречаемой в природе цепи нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, представляющую интерес. Встречаемая в природе цепь, например, может представлять собой ту, которая присутствует в бактериях

или вирусе. Встречаемая в природе цепь может представлять собой, например, цепь рРНК. Процедура получения конструкции двухцепочечной нуклеиновой кислоты для использования в способе по изобретению из цепи рРНК описана далее со ссылкой на фиг. 5 на чертежах. Альтернативно, встречаемая в природе цепь может представлять собой цепь ДНК. В этом случае, двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, подлежащую амплификации в соответствии со способом по изобретению, можно получать из денатурированной геномной или плазмидной ДНК (см., например, описание далее в отношении фиг. 6).

Для всех вариантов осуществления изобретения, предпочтительно первый праймер (и также второй праймер, если используют) содержит от 20 до 30 нуклеотидов. Соответственно, 5'-концевая область первой цепи (и, если используют, 5'-концевая область второй цепи) имеет длину от 20 до 30 нуклеотидов.

Устойчивая к расщеплению область первого праймера (и второго праймера, если используют) предпочтительно предусмотрено приблизительно посередине вдоль длины праймера. Таким образом, в случае, когда праймер содержит 20 нуклеотидов, устойчивая к расщеплению область предпочтительно начинается приблизительно за 8-10 нуклеотидов от 5'-конца праймера. В случае, когда праймер содержит 30 нуклеотидов, устойчивая к расщеплению область предпочтительно начинается приблизительно за 13-15 нуклеотидов от 5'-конца.

Устойчивые к расщеплению области можно предоставлять с помощью по меньшей мере одного нуклеотида, который устойчив к расщеплению экзонуклеазой. Предпочтительно устойчивая к расщеплению область содержит непрерывную последовательность из множества (например, от 3 до 6) модифицированных нуклеотидов. Модифицированные нуклеотиды, например, могут представлять собой фосфотиоатные нуклеотиды (т. е. нуклеотиды, в которых не мостиковый атом кислорода заменяют на серу).

Как указано, предпочтительно устойчивая к расщеплению область (например, содержащая непрерывную последовательность из 3-6 модифицированных нуклеотидов) присутствует приблизительно посередине вдоль 1' праймера (и также 2', если используют). В

таких случаях, особенно предпочтительно полимеразы с замещением цепи представляет собой ту, которая не обладает 3'-экзонуклеазной активностью. Однако авторы изобретения не исключают возможность, что устойчивая к расщеплению область идет до 3'-конца или праймера, и в этом случае можно использовать полимеразу с замещением цепи с 3'-экзонуклеазной активностью (например, phi29).

Аmplифицированные последовательности, получаемые в соответствии со способом по изобретению, например, могут иметь длину от 50 до 150 оснований на цепь.

Способ по изобретению дополнительно может включать стадию обнаружения амплифицированной последовательности. В предпочтительном варианте осуществления изобретения обнаружение выполняют посредством стадий:

(i) предоставления, в смеси продуктов, репортерной комбинации нуклеиновой кислоты, которая содержит (a) репортерную цепь, имеющую флуоресцентный репортерный фрагмент, связанный с ней, репортерная цепь способна к гибридизации с амплифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей обнаружению, и (b) цепь гасителя, способную к гибридизации с репортерной цепью и имеющую фрагмент гасителя, который гасит флуоресценцию флуоресцентного репортерного фрагмента,

(ii) проведения денатурации смеси продуктов и последующего создания условий повторной гибридизации, и

(iii) обнаружения присутствия флуоресцентного репортерного фрагмента.

На стадии 2(ii) этого способа обнаружения, смесь продуктов подвергают последовательно денатурации и затем условиям повторной гибридизации. В условиях денатурации репортерная цепь и цепь гасителя представляют собой отдельные цепи в смеси продуктов. В условиях повторной гибридизации репортерная цепь способна к гибридизации с амплифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты, а не с цепью гасителя. Таким образом, флуоресценция после стадии повторной гибридизации подтверждает присутствие амплифицированной последовательности. В целом, цепь

гасителя должна присутствовать в молярном избытке по сравнению с репортерной цепью. Молярное соотношение цепи гасителя и репортерной цепи может составлять, например, (1,3-1,5); 1. Варианты осуществления этого способа обнаружения описаны более полно далее в сочетании с фиг. 7.

Способ по изобретению можно применять в частности, но никаким образом не исключительно, для того, чтобы подтверждать присутствие конкретной целевой последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце, например, ткани, крови, моче, мокроте и т. д. Целевая нуклеиновая кислота, например, может представлять собой ту, которая присутствует в патогенных бактериях, которые присутствуют в образце ткани и которые отвечают за болезнь пациента. Как изложено выше и как описано более подробно далее, рРНК, экстрагированную из образца, можно использовать для того, чтобы получать кДНК, содержащую первую и вторую цепи нуклеиновой кислоты, гибридизованные друг с другом, указанная первая цепь содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, подтверждающую присутствие целевой последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце и имеющую первую 5'-концевую область, которая удалена от ее 5'-конца, которая имеет нуклеотидную последовательность, устойчивую к расщеплению. Затем кДНК можно амплифицировать с использованием процедур, описанных более полно выше.

Это ведет ко второму аспекту изобретения, в соответствии с которым предоставлен способ определения присутствия или иного для целевой последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце, способ включает стадии:

(а) обработки биологического образца для того, чтобы получать из него производный образец и в таких условиях, что если целевая нуклеиновая кислота присутствует в биологическом образце, в производном образце создают двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую и вторую цепи нуклеиновой кислоты, гибридизованные друг с другом, указанная первая цепь, содержащая первую последовательность нуклеиновой кислоты, подтверждающую присутствие целевой последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце и имеющую первую 5'-

концевую область, которая удалена от ее 5'-конца, имеет нуклеотидную последовательность, устойчивую к расщеплению;

(b) получения композиции для амплификации, которая содержит:

(i) экзонуклеазу, способную вызывать расщепление цепи двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, причем расщепление происходит от 5'-конца цепи к 3'-концу,

(ii) полимеразу с замещением цепи,

(iii) производный образец

(iv) первый праймер нуклеиновой кислоты, имеющий ту же нуклеотидную последовательность, что и указанная первая концевая область первой нуклеиновой кислоты, если присутствует в производном образце, и содержащий ту же устойчивую к расщеплению область, и

(v) нуклеотиды по ситуации для обеспечения амплификации первой последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей амплификации; и

(c) анализа присутствия первой нуклеиновой кислоты в смеси продуктов.

Все признаки первого аспекта изобретения, как описано выше, применимы *mutatis mutandis* к способу по второму аспекту изобретения.

Производный образец, например, может содержать кДНК, полученную из рРНК, экстрагированную из биологического образца.

Изобретение дополнительно описано, только в качестве примера, со ссылкой на сопроводительные рисунки, где:

фиг. 1 схематически иллюстрирует один из вариантов осуществления способа амплификации в соответствии с изобретением для того, чтобы иллюстрировать его основную идею;

фиг. 2 схематически иллюстрирует праймер для использования в способе с фиг. 1;

фиг. 3а-с иллюстрируют дополнительный вариант осуществления способа амплификации в соответствии с изобретением;

фиг. 4 схематически иллюстрирует прямой и обратный праймеры для использования в способе, проиллюстрированном на фиг. 3;

фиг. 5 иллюстрирует получение, из рРНК двухцепочечной

молекулы нуклеиновой кислоты для амплификации в соответствии с процедурой, изображенной на фиг. 3;

на фиг. 6 изображено получение, из геномной или плазмидной ДНК, двухцепочечной молекулы ДНК для амплификации в соответствии с процедурой, описанной на фиг. 3;

фиг. 7 иллюстрирует вариант осуществления процедуры для обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты;

на фиг. 8 представлена последовательность двухцепочечной молекулы ДНК, синтезированной в соответствии с процедурой из примера 1;

фиг. 9 иллюстрирует результаты из примера 1;

Фиг. 10 иллюстрирует результаты из примера 2; и

Фиг. 11 иллюстрирует результаты из примера 3.

Сначала ссылка дана на фиг. 1, которая служит для того, чтобы иллюстрировать основную идею способа амплификации в соответствии с изобретением, как применяют в одном из его вариантов осуществления. На фиг. 1 представлена двухцепочечная молекула ДНК 1, имеющая смысловую и антисмысловую цепи 2 и 3, соответственно. Для целей способа, представленного на фиг. 1, смысловая цепь 2 содержит последовательность, подлежащую амплификации. Способ с фиг. 1 служит для линейной амплификации этой последовательности.

Как показано на фиг. 1, смысловая цепь 2 и антисмысловая цепь 3 гибридизованы друг с другом и имеют равную длину, в соответствии с чем молекула нуклеиновой кислоты 1 имеет тупые концы. Для целей объяснения, смысловую цепь 2 считают имеющую 5'-концевую область, обозначаемую как 4. Эта концевая область 4 идет от 5'-конца смысловой цепи 2 до точки, представленной линией 5 (в положении, значимость которого будет понятна из последующего описания). Концевая область, например, может составлять от 10 до 15 нуклеотидов в длину. На ее 5'-конце, смысловая цепь 2 фосфорилирована, как показано, фосфатной группой (PO_4), четко изображенной на фиг. 1. Между ее концами, 5'-концевая область 4 смысловой цепи 2 имеет устойчивую к расщеплению область, обозначенную линией 6. Эта устойчивая к расщеплению область 6 может содержать фосфотиоатные (PS)

нуклеотиды (т. е. нуклеотиды, имеющие один из не мостиковых атомов кислорода, замещенных атомом серы). Несмотря на то, что обозначено только одной линией, устойчивая к расщеплению область 6 в целом содержит несколько (например, три) непрерывных модифицированных нуклеотидов (например, фосфотиоатных нуклеотидов). Устойчивая к расщеплению область 6 может быть расположена приблизительно посередине вдоль концевой области 4.

Теперь, обращаясь к антисмысловой цепи 3, она представляет собой «простую» цепь в том отношении, что она не содержит устойчивую к расщеплению область. Дополнительно, 5'-конец антисмысловой цепи 3 гидроксильирован (а не фосфорилирован, как в случае смысловой цепи 2).

Далее дана ссылка на фиг. 2, на которой показан праймер 10 для использования в способе с фиг. 1. Праймер 10 имеет ту же длину и имеет идентичную последовательность с 5'-концевой областью 4 смысловой цепи 2. Следовательно, праймер 10 имеет фосфатную группу (PO_4) на его 5'-конце и такую же устойчивую к расщеплению область между его концами. Для удобства, устойчивая к расщеплению область праймера 10 представлена номером позиции 6 (т. е. тем же номером позиции, который идентифицирует устойчивую к расщеплению область смысловой цепи 2). Таким образом, вкратце, праймер 10 фактически идентичен 5'-концевой области смысловой цепи 2.

Для того чтобы осуществлять способ с фиг. 1, получают смесь для амплификации, которая содержит двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты 1, праймер 10, dNTP, λ -экзонуклеазу, полимеразу с замещением цепи (например, BST 3.0) и буферы по ситуации.

На начальной стадии реакции, λ -экзонуклеаза расщепляет 5'-концевую область 4 смысловой цепи 2 вплоть до устойчивой к расщеплению области 6 (но не дальше нее). Это обусловлено «способностью» λ -экзонуклеазы расщеплять одну цепь двухцепочечной ДНК в направлении 5'-3' в следующем порядке предпочтения для конфигурации концов двухцепочечной структуры, а именно с 5'-вырезом > тупой >> 5'-свисающий с 10× предпочтением

фосфорилированных концов вместо гидроксильированных. Однако λ -экзонуклеаза не способна вызывать разрушение смысловой цепи 2 сквозь ее устойчивую к расщеплению область б. Для удобства, частично расщепленная смысловая цепь представлена номером позиции 2d. Это расщепление делает антисмысловую цепь 3 одноцепочечной с ее 3'-конца по области, в которой теперь расщепленная часть смысловой цепи 2 была ранее гибридной. Это четко изображено на стадии (ii) на фиг. 1 - см. левый конец антисмысловой цепи 3, который изображает освобожденную (т. е. одноцепочечную) 3'-концевую область антисмысловой цепи 3 с номером позиции 12.

Освобожденная 3'-концевая область антисмысловой цепи 3 образует свисающий конец 12, который представляет мишень для гибридизации праймера 10 (см. стадию (iii) на фиг. 1). Полимераза с замещением цепи достраивает гибридный праймер 10 для того, чтобы формировать новую смысловую цепь 2 (с использованием антисмысловой цепи 3 в качестве матрицы), тем самым замещая частично расщепленную смысловую цепь 2d и восстанавливая полноразмерную новую смысловую цепь 2, гибридную с антисмысловой цепью 3 (см. стадию (iv) на фиг. 1).

Следует принимать во внимание, что (поскольку праймер 10 имеет точно ту же последовательность (и длину), что и концевая область 4 смысловой цепи 2, представленная на стадии (i) на фиг. 1) двухцепочечная молекула 1, изображенная в качестве результата стадии (iv) на фиг. 1, идентична той, что показана на стадии (i). Следовательно продукт стадии (iv) на фиг. 1 эффективно повторно используется на стадии (i) и способ непрерывно повторяется для того, чтобы представлять дополнительные замещенные цепи 2d, в соответствии с чем происходит амплификация последовательности смысловой цепи 2.

В целях простоты, на фиг. 1 представлен поэтапный механизм, в котором «завершение» каждой стадии происходит до начала следующей стадии. Таким образом, например, при переходе от стадии (iii) к стадии (iv), на фиг. 1 показано, что достраивание

праймера 10 для того, чтобы формировать новую смысловую цепь 2, выполнено прежде, чем двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты 1, вновь сформированная на стадии (iv), подвергается какому-либо расщеплению λ -эксонуклеазой. Однако авторы изобретения не исключают возможность того, что праймер 10 не будет полностью достроен для того, чтобы получать полную смысловую цепь 2, прежде, чем начнется расщепление (λ -эксонуклеазой) вновь формируемой цепи 2.

Также возможно, что поскольку целевая молекула более не является полностью двухцепочечной, цепь с 5'-концевым вырезом будет диссоциировать от антисмысловой цепи, что будет освобождать антисмысловую последовательность большей длины, которая исходно λ -эксонуклеаза/освобожденная последовательность. Несмотря на то, что это не может быть доказано, это можно предполагать, принимая во внимание, что мишень фермента не является полностью двухцепочечной и реакция способа по изобретению может иметь место при относительно повышенных температурах (например, от 45 до 55°C), которые в теории могут вызывать дополнительную диссоциацию.

Далее дана ссылка на фиг. 3, которая иллюстрирует второй вариант осуществления способа амплификации в соответствии с изобретением. Способ с фиг. 3 ведет к экспоненциальной амплификации. Для удобства, фиг. 3 разделена на фиг. 3(a), 3(b) и 3(c) для того, чтобы содействовать объяснению изобретения. Сначала со ссылкой на фиг. 3(a), представлена двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты 101, состоящая из гибридизованных смысловой и антисмысловой цепей 102 и 103, соответственно. Как и в случае двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты 1, описанной выше со ссылкой на фиг. 1, смысловая и антисмысловая цепи молекулы нуклеиновой кислоты 101 имеют одну и ту же длину, в соответствии с чем молекула 101 имеет тупые концы. Смысловая цепь 102 схожа со смысловой цепью 2 (молекулы нуклеиновой кислоты 1) в том отношении, что она имеет 5'-концевую область 104, которая идет от фосфорилированного 5'-конца смысловой цепи 102 до точки, изображенной линией 105. Между ее концами (и

приблизительно посередине нее) 5'-концевая область 104 имеет устойчивую к расщеплению область 106, сформированную из модифицированных олигонуклеотидов, например, фосфотиоатных нуклеотидов.

Молекула нуклеиновой кислоты 101 отличается от молекулы нуклеиновой кислоты 1 в том отношении, что (как изображено на фиг. 3а) антисмысловая цепь 103 имеет 5'-концевую область 107, идущую от 5'-конца цепи 103 (на котором находится фосфатная группа (PO₄)) к положению, обозначенному линией 108. Между ее концами, 5'-концевая область 107 (антисмысловой цепи 103) содержит устойчивую к расщеплению область, изображенную линией 109. Эта устойчивая к расщеплению область может (как описано для другой устойчивой к расщеплению области) содержать модифицированные олигонуклеотиды, например, фосфотиоатные нуклеотиды.

Реакцию с фиг. 3 проводят с использованием праймеров 110 и 111, как изображено на фиг. 4. Праймер 110 имеет последовательность, соответствующую таковой в 5'-концевой области 104 смысловой цепи 102, тогда как праймер 111 имеет последовательность, соответствующую таковой в 5'-концевой области 107 антисмысловой цепи 103. По существу, оба праймера 110 и 111 имеют (между их концами) устойчивые к расщеплению области, которые идентифицируют (на фиг. 4) номерами позиций 106 и 109, соответственно.

Для того чтобы осуществлять реакцию с фиг. 3, получают смесь для амплификации, которая содержит двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты 101, праймеры 110 и 111, λ-экзонуклеазу, полимеразу с замещением цепи, dNTP и буферы по ситуации. Реакция протекает при частичном расщеплении λ-экзонуклеазой цепей 102 и 103 с соответствующих их 5'-концов вплоть до устойчивых к расщеплению областей 106 и 109 (но не дальше них), чтобы получать частично расщепленные цепи, обозначаемые как 102d и 103d. Это действие ведет к двухцепочечной молекуле, в которой освобожденные 3'-концы смысловой и антисмысловой цепи образуют свисающие концы 113 и 112, соответственно.

На следующей стадии способа, праймер 110 гибридизуется со свисающим концом 112 и праймер 111 гибридизуется со свисающим концом 113. Дотраивание гибридизованных праймеров 110 и 111 посредством полимеразы, расщепляющей цепь, ведет к образованию двух двухцепочечных молекул, обозначаемых 114 и 115. Двухцепочечный продукт 114 содержит остаток 102d смысловой цепи 102, гибридизованный с новой цепью 116, создаваемой посредством дотраивания праймера 111. Продукт в рамке 6 содержит остаток 103d антисмысловой цепи 103, гибридизованный с новой цепью 117, созданной из праймера 110.

Дальнейший процессинг двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты 114 показан на фиг. 3b и дальнейший процессинг двухцепочечной молекулы 117 показан на фиг. 3c.

Сначала со ссылкой на фиг. 3b, цепь 116 подвергается расщеплению λ -экзонуклеазой с ее 5'-конца с образованием продукта, где остаток цепи 116 показан как 116d и 3'-конец цепи 102d образует свисающий конец 118, с которым может гибридизоваться праймер 111.

Затем происходит дотраивание праймера 111 с сопутствующим замещением цепи 116d. Имеют место два продукта на этом этапе. Один представляет собой двухцепочечную молекулу 114 (получаемую посредством дотраивания праймера 111 с использованием цепь 102d в качестве матрицы). Затем эта двухцепочечная молекула эффективно повторно используется в процессе с фиг. 3b, как показано стрелкой 119. Другой продукт этой реакции представляет собой замещенную цепь 116d, которая затем гибридизуется с праймером 110. Впоследствии происходит дотраивание праймера 110 с использованием цепи 116d в качестве матрицы. Это дотраивание происходит слева направо, как видно на фиг. 3b. Также происходит дотраивание цепи 116d (справа налево на фиг. 3b) с использованием праймера 110 в качестве матрицы. Получаемый продукт представляет собой двухцепочечную молекулу, изображенную как 120, которая показана состоящей из гибридизованных цепей 121 (сформирована посредством дотраивания праймера 110) и 122 (сформирована посредством дотраивания цепи 116d).

Затем цепь 121 двухцепочечной молекулы 120 подвергают расщеплению (под действием λ -экзонуклеазы) с ее 5'-конца вплоть до устойчивой к расщеплению области 106 (но не дальше нее), чтобы предоставлять цепь 121d и обнажать 3'-конец цепи 122 в виде свисающего конца 123. Как изображено на фиг. 3b, праймер 110 способен к гибридизации со свисающим концом 123 и достраиванию с использованием цепи 122 в качестве матрицы, с замещением цепи 121d. Продукты этой стадии представляют собой, прежде всего, двухцепочечную молекулу 120 и замещенную цепь 121d. Первая (т. е. двухцепочечная молекула 120) эффективно повторно используется, как изображено стрелкой 124, а последняя (т. е. цепь 121d) показана ассоциированной со стрелкой 125, которая (как описано ниже) ведет в часть схемы, представленную на фиг. 3c. Также на фиг. 3b представлена стрелка 126, которая предназначена для того, чтобы изображать цепь 116d (также создаваемую в схеме, представленной на фиг. 3c - см. далее), вводимую в схему реакции с фиг. 3b. Дополнительное описание этого аспекта процесса амплификации приведено далее.

Далее дана ссылка на фиг. 3c, которая фактически описывает процессинг двухцепочечной молекулы 115 (см. фиг. 3a), в некоторой мере схожий с процессингом двухцепочечной молекулы 114, описанным полностью выше в отношении схемы реакции с фиг. 3b.

Таким образом, цепь 117 подвергают расщеплению λ -экзонуклеазой с ее 5'-конца, чтобы получать частично расщепленную цепь, которая идентична цепи 121d, описанной выше в отношении фиг. 3b. Получаемый двухцепочечный продукт содержит цепь 121d, гибридизованную с цепью 103d, причем последняя имеет свисающий конец 130, с которым может гибридизоваться праймер 110.

Далее праймер 110 достраивают с сопутствующим замещением цепи 121d. Имеют место два продукта этого этапа. Один представляет собой двухцепочечную молекулу 115 (получаемую посредством достраивания праймера 110 с использованием цепи 103d в качестве матрицы). Затем эта двухцепочечная молекула

эффективно повторно используется в процессе с фиг. 3с, как изображено стрелкой 131. Другой продукт реакции представляет собой замещенную цепь 121d, которая далее гибридизуется с праймером 111. Впоследствии праймер 111 достраивают с использованием цепи 121d в качестве матрицы. Это достраивание происходит справа налево, как видно на фиг. 3с. Также цепь 121d достраивают (идет слева направо на фиг. 3с) с использованием праймера 111 в качестве матрицы. Получаемый продукт представляет собой двухцепочечную молекулу, обозначенную как 132, которая показана состоящей из гибридизованных цепей 133 (образована посредством достраивания праймера 111) и 134 (образована посредством достраивания цепи 121d).

Затем цепь 133 двухцепочечной молекулы 132 подвергают расщеплению (под действием λ -эксонуклеазы) с ее 5'-конца вплоть до устойчивой к расщеплению области 109 (но не дальше нее), чтобы предоставлять частично расщепленную цепь, которая идентична цепи 116d, полученной на фиг. 3b (см. выше), и обнажать 3'-конец цепи 134 в качестве свисающего конца 135. Как изображено на фиг. 3с, праймер 111 способен к гибридизации со свисающим концом 135 и достраиванию с использованием цепи 134 в качестве матрицы, с замещением цепи 116d. Продукты этой стадии представляют собой, прежде всего, двухцепочечную молекулу 132 и замещенную цепь 116d. Первая (т. е. двухцепочечная молекула 132) эффективно повторно используется, как изображено стрелкой 136, а последняя (т. е. цепь 116d) показана ассоциированной со стрелкой 126, которая (как описано ниже) ведет в часть схемы, представленной на фиг. 3b. Также на фиг. 3с показана стрелка 125, которая предназначена для того, чтобы изображать цепь 121d (созданную в схеме, представленной на фиг. 3b), вводимую в схему реакции с фиг. 3с. Дополнительное описание этого аспекта процесса амплификации приведено далее.

Из вышеуказанного описания следует принимать во внимание, что в процедуре с фиг. 3b создают одноцепочечную молекулу 121d, которую также создают в схеме реакции с фиг. 3с. Таким образом на фиг. 3b представлена одноцепочечная молекула 121d, которая

«перешла» в схему реакции с фиг. 3с, как изображено стрелкой 125. Аналогичным образом, фиг. 3с ведет к получению одноцепочечной молекулы 116d, которую также создают в схеме реакции с фиг. 3b. Таким образом, на фиг. 3с представлена одноцепочечная молекула 116d, которая «перешла» в схему реакции с фиг. 3b, как изображено стрелкой 126.

Обобщенная процедура, описанная со ссылкой на фиг. 3а-с, ведет к продукту амплифицированной нуклеиновой кислоты (по сравнению с количеством исходной нуклеиновой кислоты 101, присутствующим в образце).

Далее дана ссылка на фиг. 5, на которой представлен один из вариантов осуществления процедуры для получения, из цепи рРНК 301, двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты 101 того типа, который представлен на фиг. 3(а). Как показано в рамке 1 с фиг. 5, проиллюстрированную реакцию выполняют с использованием праймеров 110 и 111 (см. фиг. 3(а) и фиг. 4). Праймер 111 способен к гибридизации с цепью рРНК 301 и праймер 110 может гибридизоваться с кДНК, получаемой из цепи рРНК 301. В реакционную смесь для получения кДНК входит фермент обратная транскриптаза (RT), который обладает активностью РНКазы Н, а также dNTP и буферы по ситуации. Реакцию проводят в условиях термоциклера.

В способе праймер 111 гибридизуется с РНК цепью 301, а фермент RT синтезирует комплементарную ДНК (кДНК) 302 посредством достраивания праймера 111 (см. рамки 2 и 3 с фиг. 5). Когда фермент RT достиг конца РНК матричной цепи 301, фермент RT меняет направление (как представлено стрелкой 303) и расщепляет рРНК матрицу 301 в качестве результата активности фермента РНКазы Н (см. рамку 3). На следующей стадии, как показано в рамке 4, праймер 110 распознает последовательность кДНК и гибридизуется с ней. Достраивание праймера 110 полимеразой с замещением цепи ведет к двухцепочечной конструкции 304, представленной в рамке 5, которая содержит цепь нуклеиновой кислоты 102 (см. фиг. 3(а)), гибридизованную с цепью кДНК 302. Двухцепочечная конструкция 304 содержит последовательность ампликона, представляющую интерес, плюс 3' кДНК свисающий конец

305. Затем добавляют два фермента, используемые для реакции, описанной на фиг. 3 (т. е. λ -экзонуклеазу и фермент с замещением цепи, такой как BST 3.0). При рассмотрении механизма, описанного со ссылкой на фиг. 3, следует принимать во внимание, что расщепление 5'-конца цепи кДНК 302 (до устойчивой к расщеплению область 109) делает возможной гибридизацию праймера 111 с освобожденным 3'-концом цепи 102, и достраивание праймера 111 ведет к получению двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты 101 с замещением цепи кДНК 302 (см. рамку 6). Затем синтезированную конструкцию нуклеиновой кислоты 101 подвергают амплификации таким образом, который полностью описан выше в отношении фиг. 3.

Маловероятно, что высвобожденная цепь кДНК будет играть дальнейшую роль в реакции LEA, поскольку, даже несмотря на то, что праймер, такой как 110, будет гибридизоваться, его полимеризация не создаст тупой конец на его 5'-конце, поскольку он будет иметь вырез (свисающий конец на 3'-конце длинной кДНК матрицы).

Далее дана ссылка на фиг. 6, на которой представлен один из вариантов осуществления процедуры для получения, из одноцепочечной ДНК 350 (полученной, например, посредством денатурации геномной или плазмидной ДНК), двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты для использования в процедуре амплификации по изобретению. В схеме с фиг. 6 используют три праймера 351, 352 и 353 (изображены пунктирными линиями, длинными штриховыми и пунктирными линиями и средними штриховыми линиями, соответственно. Примером длинной штриховой и пунктирной линии представляет собой линию непосредственно под словом «Праймеры» на фиг. 6, обозначенную номером позиции 352. Пример пунктирной линии представлен в средней из трех линий под словом «Праймеры» на фиг. 6, обозначенной номером позиции 351. Нижняя линия под словом «Праймеры» на фиг. 6 представляет собой среднюю штриховую линию, обозначенную номером позиции 353). Оба праймера 351 (пунктирная линия) и 353 (средняя штриховая линия) имеют устойчивые к расщеплению области частично вдоль соответствующих

им длин.

Два обратных праймера 351 и 352 (пунктирная и длинная штриховая и пунктирная линия) гибридизуются с цепью 350 и полимеризуются для получения синтетических цепей 354 и 355, соответственно (пунктирная и длинная штриховая и пунктирная линия). Синтетическая цепь 355 (длинная штриховая и пунктирная линия) замещает синтетическую цепь 354 (пунктирная линия), предоставляя таким образом матрицу для праймера 353 (средняя штриховая линия), подлежащего достраиванию для того, чтобы получать синтетическую цепь 356, которая тем самым образует двухцепочечную молекулу 357. Эта двухцепочечная молекула 357 будет мишенью для λ -экзонуклеазы, которая будет расщеплять чувствительную к нуклеазе часть синтетической цепи 354 (пунктирная линия). Это будет освобождать последовательность на 3'-конце матричной цепи 356 (средняя штриховая линия) будет позволять праймеру 351 (пунктирная линия) гибридизоваться и полимеризоваться, создавая ампликон как на конечной стадии с фиг. 5. Затем этот ампликон может вступать в процесс амплификации. Ту же систему можно использовать для рРНК мишени также для того, чтобы избегать использования фермента обратной транскриптазы (RT). Например, два обратных праймера 351 и 352 можно добавлять прямо в РНК и, поскольку полимеразы BST 3.0 обладает действием обратной транскрипции, то она может продуцировать две цепи, причем цепь 355 (длинная штриховая и пунктирная линия) замещает цепь 354 (пунктирная линия). Следовательно, когда цепь 354 (пунктирная линия) замещают, она может действовать в качестве матрицы для праймера 353 (средняя штриховая линия). В этом случае активность РНКазы и фермента RT более не необходима для того, чтобы расщеплять РНК матрицу для того, чтобы освобождать цепь кДНК.

Далее дана ссылка на фиг. 7, которая иллюстрирует один из вариантов осуществления способа обнаружения присутствия двухцепочечных ампликонов, получаемых в соответствии со способом, описанным выше в отношении фиг. 3.

На фиг. 7 ампликоны, получаемые способом с фиг. 3,

изображены под номером позиции 401 и показаны состоящими из гибридизованных цепей 402 и 403 (показаны пунктирными линиями). В конце процедуры амплификации в смесь продуктов добавляют конструкцию двухцепочечного репортера нуклеиновой кислоты 404, состоящую из последовательностей нуклеиновой кислоты 405 (показана штриховой и пунктирной линией) и 406 (показана сплошной линией), гибридизованных друг с другом. Последовательности 405 и 406 способны к гибридизации с последовательностями 402 и 403 ампликона 401, соответственно.

Как показано на фиг. 7, на 5'-конце последовательности 405 предусмотрена молекула Су5, тогда как на 3'-конце последовательности 406 предусмотрена молекула ВНQ2, которая гасит флуоресценцию репортера Су5. (Следует принимать во внимание, что можно использовать другие гасимые флуоресцентные комбинации).

Как показано на фиг. 7, репортерная конструкция 404 имеет один тупой конец, предусмотренный на 5'- и 3'-концах последовательностей 405 и 406, соответственно, и 3'-конец последовательности 405 предусматривает свисающий конец. В качестве примера, последовательность 405 может иметь длину 55 н., тогда как последовательность 406 может иметь длину 35 н. Преимущества этой компоновки рассмотрены далее.

Репортерную конструкцию 404 добавляют в продукт реакции амплификации и в смеси повышают температуру (например, до точки кипения), для того, чтобы денатурировать и двухцепочечные ампликоны 401 и двухцепочечные репортерные конструкции 404. Затем смесь оставляют остывать (например, до комнатной температуры) с тем, чтобы последовательности 405 могли гибридизоваться с последовательностями 402, тогда как последовательности 406 могут гибридизоваться с последовательностями 403. Следует принимать во внимание, что в двухцепочечных конструкциях, содержащих последовательность 405, гибридизованную с последовательностью 402, Су5 более не гасят и, следовательно, он способен обеспечивать флуоресцентный сигнал для того, чтобы подтверждать присутствие амплифицированного продукта. Следует принимать во внимание, что возможны другие

продукты гибридизации (например, последовательности 402 и 403 могут повторно гибридизоваться вместе, подобно последовательностям 405 и 406), но это представляет собой гибридизацию последовательностей 402 и 405, которые важны для целей обнаружения.

Преимущество процедуры обнаружения, представленной на фиг. 7, состоит в том, что, в отличие от молекулярных маяков, которые содержат распознающую последовательность от 20 до 30 н., распознающая последовательность, предусмотренная цепью 405 (в репортерной конструкции 404) может быть настолько длинной, насколько позволяет синтез. Дополнительное преимущество процедуры, представленной на фиг. 7, относительно молекулярных маяков, состоит в том, что петлевая область молекулярного маяка не имеет конкурентного олигонуклеотида (т. е. последовательности 406), как в дуплексе 404. Это также делает систему более точной. Более конкретно, репортерная последовательность 404 термодинамически более вероятно гибридизуется с правильной, а не с неправильной последовательностью анализируемого вещества. Это обусловлено тем, что репортерная последовательность 405 (при ее предполагаемой длине 55 н.) предпочтительно будет гибридизоваться с последовательностью той же длины в цепи анализируемого вещества, а не с (более короткой) цепью 405 (предположительно составляющей 35 н.). Энергетические требования для полных 55 н. последовательности 405, подлежащей гибридизации, вместо 35 н. (часть последовательности 405, которая гибридизуется с последовательностью 406), способствуют гибридизации последовательности 405 с последовательностью анализируемого вещества 402, а не с последовательностью 406. С другой стороны, если целевая последовательность не присутствует в смеси для амплификации, то 35 н. гомология между последовательностями 405 и 406 способствует гибридизации этих двух последовательностей, вместо «случайного связывания» между неспецифическим анализируемым веществом и последовательностью 406.

Изобретение проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

Пример

Общее

Этот пример демонстрирует обнаружение *Neisseria Gonorrhoeae* (NG) с использованием процедур в соответствии с настоящим изобретением. Более конкретно, пример демонстрирует получение двухцепочечной молекулы ДНК из экстракта рРНК клеток NG с использованием процедуры в соответствии с фиг. 5, амплификации молекулы ДНК с использованием процедуры в соответствии с фиг. 3 и обнаружения с использованием процедуры в соответствии с фиг. 7. Для того чтобы иллюстрировать специфичность и чувствительность, создание, амплификацию и обнаружение молекулы ДНК осуществляли в сравнении с фоновым избытком рРНК из *Escherichia Coli* (EC).

Двухцепочечная молекула ДНК (полученная из рРНК, экстрагированной из NG) показана на фиг. 8 и обозначена номером 601. Для сравнения с фиг. 3, две цепи молекулы ДНК 601 обозначены как 102 (SEQ ID № 5) и 103.

В таблице 1 представлены олигонуклеотидные последовательности, используемые в этом примере. В качестве объяснения, последовательность «прямого праймера» соответствует праймеру 110 на фиг. 3 и «обратный праймер» соответствует праймеру 111 на фиг. 2. «Репортер анализа» соответствует последовательности 405 на фиг. 7 и «гаситель анализа» соответствует последовательности 406 (на фиг. 7).

Таблица 1

Таблица последовательностей олигонуклеотидов и ампликонов				
Название олигонуклеотида	FW	RV	Репортер	Гаситель
Задача	Прямой праймер (SEQ ID № 1)	Обратный праймер (SEQ ID № 2)	Репортер анализа (SEQ ID № 3)	Гаситель анализа (SEQ ID № 4)
Последовательность	PO ₄ -5'- GAACGCTGGCG*G*С *АТГСТТТАСАС-3'	PO ₄ -5'- CCCGGTACGТТС* С*G*АТАТГТТАС ТСАСС-3	5'-СУ5- GCAAGTCGGACGGCAGC ACAGGGAAGCTTGCTTC TCGGGTGGCGAGTGGCG AACG-3'	5'- AGAAGCAAGCTTCC СТGTGCTGCCGTCC GACTTGC-BHQ2- 3'

Модификации	Фосфорилирование на 5'-конце, 3 PS линкера (*) в середине последовательно	Фосфорилирование на 5'-конце, 3 PS линкера (*) в середине последовательно	Молекула Cy5 на 5'-конце	Молекула BHQ2 на 3'-конце
-------------	---------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------	--------------------------	---------------------------

Для целей этого примера, рРНК экстрагировали из 100×10^6 клеток NG (определяли по общему числу жизнеспособных (TVC)), используя процедуру, описанную заявке на патент Соединенного королевства № 1609115.9, чтобы получать 200 мкл элюата (элюирующий буфер (EB): 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,5 mM EDTA). Ту же процедуру использовали для получения 200 мкл элюата 100×10^6 клеток ЕС (определяли по измерениям оптической плотности (od)).

Для целей этого примера допускают, что всю рРНК как из клеток NG, так и из клеток ЕС собирают в элюате (т. е. эффективность экстрагирования 100%).

Процедура

РНК, полученную из 1×10^6 клеток ЕС, смешивали с РНК, полученной из 250, 500, 1000 и 2000 клеток NG, и объем довели до 100 мкл. Подробно, 2 мкл из 200 мкл элюата, экстрагированного из 100×10^6 клеток ЕС содержат РНК, полученную из 1×10^6 клеток ЕС (на основе вышеприведенного предположения, т. е. эффективности экстрагирования 100%). 2 мкл аликвоты элюата ЕС смешивали отдельно с 2 мкл аликвотами разведений 1/4000, 1/2000, 1/1000 и 1/500 из 200 мкл элюата РНК NG (разведений, содержащих РНК из 250, 500, 1000 и 2000 клеток NG, соответственно, которую экстрагировали из исходного материала 100×10^6 клеток NG, также предполагая эффективность экстрагирования 100%). Конечный объем довели до 100 мкл в H_2O , содержащей конечные концентрации 50 мкМ для каждого из двух праймеров (FW и RV), 0,2 mM dNTP, 4 mM $MgSO_4$, 20 mM Tris-HCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 150 mM KCl, 0,1% Tween 20, pH 8,8 при 25°C плюс 0,3 мкл (4,5 Ед) обратной транскриптазы Warm Start (New England Biolabs, M0380).

Включали два условия отрицательного контроля, одно с 2 мкл EB и одно условие только с 2 мкл РНК ЕС (фоновый контроль 1×10^6

ЕС). Каждое условие имело три повторения.

Образцы оставляли при 48°C на 10 мин, после чего 5 мкл смеси ферментов: [1 мкл (8 Ед) ДНК полимеразы BST 3.0 (New England Biolabs, M0374) плюс 0,3 мкл (1,5 Ед) λ -экзонуклеазы (New England Biolabs, M0262) плюс 3,7 мкл H₂O] добавляли в каждый образец и конечную смесь оставляли снова для того, чтобы инкубировать при 48°C в течение 10 мин.

После конца этой инкубации 10 мкл аналитической смеси: [олигонуклеотид репортера (1 мкл, 10 пмоль) плюс олигонуклеотид гасителя (1,4 мкл, 14 пмоль), доводили до 10 мкл в H₂O, содержащей 15,2 мМ Tris-HCl, 7,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 114 мМ KCl, 0,076% Tween 20, pH 8,8 при 25°C] добавляли в каждое повторение. Конечную смесь инкубировали при 95°C в течение 5 мин, затем оставляли при комнатной температуре на 2 мин, переносили в черные поликарбонатные лунки и выполняли измерения относительных единиц флуоресценции (RFU) на флуоресцентном считывателе планшетов 3× раз для каждого образца.

Значения для 3 считывания усредняли для каждого повторения и эти усредненные считывания использовали для статистического анализа. Этот эксперимент проводили независимо 9 раз. Однофакторный дисперсионный анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным дисперсионным анализом, используя критерий Стьюдента для одной выборки. Специфический сигнал NG в сравнении с неспецифическим сигналом 10⁶ ЕС значим для всех точек титрования NG (***) $p \leq 0,001$). Точки данных представляют собой средние для 9 отдельных экспериментов, которые проводили в трех повторениях, \pm SEM (фиг. 9a). На фиг. 9b представлены все средние после вычитания EB фонового флуоресцентного контроля.

На фиг. 9a представлен результат анализа через 30 минут после поступления очищенной РНК в процесс. Точки данных относительных единиц флуоресценции (RFU) представляют собой средние для 9 независимых экспериментов, которые проводили в трех повторениях, \pm SEM. Образцы представляли собой EB

(отрицательный фоновый флуоресцентный контроль), РНК из 1 миллиона неспецифических бактерий *Escherichia coli* (ЕС) и 1 миллиона ЕС с добавлением РНК из 250, 500, 1000 и 2000 специфических бактерий *Neisseria gonorrhoea* (NG). Однофакторный дисперсионный анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным дисперсионным анализом, используя критерий Стьюдента для одной выборки. Специфический сигнал NG в сравнении с неспецифическим сигналом ЕС значим для всех точек титрования NG (** $p \leq 0,001$).

На фиг. 9b представлен чистый сигнал средних после вычитания среднего ЕВ отрицательного фонового контроля из средних всех других образцов в RFU.

Пример 2

В этом примере приведено сравнение способа амплификации по настоящему изобретению с ПЦР.

200 мкл элюата, содержащего рРНК, экстрагированную из 100×10^6 клеток NG, получали как описано в примере 1.

(10 мкл экстракта, соответствующего 5 миллионам клеток NG (предполагают эффективность экстрагирования 100%) обрабатывали с использованием 2 Ед ДНКазы I (New England Biolabs, #M0303) в 1x буфере для ДНКазы I (10 мМ Tris-HCl, 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ CaCl₂, pH 7,6 при 25°C) в течение 30 минут при 37°C и денатурировали фермент при 75°C в течение 10 минут. Это выполняли для того, чтобы обеспечивать отсутствие следов ДНК в экстракте РНК, которые могут влиять на результат ПЦР (ПЦР позволяет амплифицировать ген 16S, а также кДНК, созданную из рРНК 16S)

Снова предполагая эффективность экстрагирования 100%, аликвоты экстракта РНК, обработанного ДНКазой I, разводили водой для того, чтобы получать образцы, представляющие 1000000, 200000, 100000, 50000 и 25000 клеток NG. Затем эти образцы доводили вплоть до конечного объема 100 мкл в H₂O, содержащей конечные концентрации 50 мкМ для каждого из двух праймеров (FW и RV - см. таблицу 1), 0,2 мМ dNTP, 4 мМ MgSO₄, 20 мМ Tris-HCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 150 мМ KCl, 0,1% Tween 20, pH 8,8 при 25°C плюс 0,3 мкл (4,5 Ед) обратной транскриптазы Warm Start (New England

Biolabs, M0380). Образец отрицательного фонового флуоресцентного контроля получали схожим образом из 1 мкл элюирующего буфера (ЕВ), используемого для процедуры экстрагирования РНК.

Использовали 1 мкл аликвоту каждого кДНК-содержащего образца, а также ЕВ, как описано ниже, для целей (а) реакций амплификации в соответствии с изобретением и (b) амплификации посредством ПЦР.

Для процедуры амплификации в соответствии с изобретением 1 мкл аликвоты доводили до конечного объема 100 мкл в H₂O, содержащей: конечные концентрации 1,2 мкМ для каждого из двух праймеров (FW и RV), 0,2 мМ dNTP, 4 мМ MgSO₄, 20 мМ Tris-HCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 150 мМ KCl, 0,1% Tween 20, pH 8,8 при 25°C, 8 Ед ДНК полимеразы BST 3.0 плюс 1,5 Ед λ-экзонуклеазы. Полученные таким образом образцы, следовательно, представляли 10000, 20000, 1000, 500 и 250 клеток NG. Все образцы получали (и тестировали) в двух повторениях. Реакцию амплификации проводили при 48°C в течение 10 минут и смесь продуктов оставляли на льду до анализа.

Для реакции ПЦР, 1 мкл кДНК-содержащие образцы (или ЕВ контроль) разводили до конечного объема 100 мкл в H₂O, содержащей: 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, pH 8,3 при 25°C, 2,5 Ед полимеразы Taq (New England Biolabs, #0273), 1,2 мкМ для каждого из двух праймеров (FW и RV) и 0,2 мМ dNTP. Протокол ПЦР амплификации осуществляли с использованием 13 циклов, каждый состоял из денатурации при 95°C, отжига при 57°C и полимеризации при 68°C, по 30 с для каждой температуры (зарегистрированное общее время 33 минуты). Смесь продуктов оставляли на льду до анализа.

Смеси продуктов, полученные с использованием (а) способа амплификации по изобретению и (b) амплификации посредством ПЦР, анализировали образом, аналогичным описанному выше в примере 1. Результаты приведены на фиг. 10(a) и (b).

На фиг. 10(a) приведены усредненные общие относительные единицы флуоресценции (RFU) ± стандартное отклонение (StDev) для различных амплифицированных образцов (и ЕВ контроля) с использованием как (а) способа по настоящему изобретению, так и

(b) амплификации посредством ПЦР. Точки данных представляют собой усредненное для результатов анализа (на дублированных образцах) с использованием двух процедур амплификации. На фиг. 10(b) представлены чистые значения RFU, вычисленные посредством вычитания усредненного для EB отрицательного контроля из всех усредненных для образцов.

Результаты на фиг. 10(a) и 10(b) показывают, что способ амплификации по настоящему изобретению давал результаты, очень схожие с ПЦР способом амплификации. Предполагая эффективность ПЦР 100%, степень амплификации для 13 циклов составляет 1 к 8192 (2^{13}). Следовательно, способ по настоящему изобретению давал степень амплификации приблизительно 10^4 в течение 10 минут изотермальной амплификации, по сравнению со схожим результатом, полученным после 33 минут реакции ПЦР (которая требовала циклического изменения температуры).

Пример 3

В этом примере демонстрируют эффект буфера, оказываемый на выход амплификации.

Используя процедуру, описанную в примере 1, экстракт РНК получали из осадка экстракта (осадок исходного материала 100×10^6 клеток *Neisseria gonorrhoeae* (NG), выращенных в лаборатории, который элюировали с использованием того же элюирующего буфера (EB), который используют в примере 1 (рН 9).

2 мкл аликвоты разведений элюатов в EB, соответствующих всего 1000 клеток NG, или 2 мкл EB добавляли в 81,3 мкл H_2O или EB или 10 мМ Tris-HCl рН 8, 0,5 мМ EDTA («EB рН 8») в двух повторениях (остальной объем до 100 мкл представлял собой H_2O с ферментом обратной транскрипции и составляющими LEA, включая Tris-HCl, в концентрированном формате, который при разведении до конечного объема 100 мкл составлял 20 мМ, обеспечивая значение рН 8,8.

(Следовательно, при добавлении 81,3 мкл EB или «EB рН 8» в реакцию добавляли дополнительные 8,13 мМ Tris-HCl, делая конечную концентрацию Tris-HCl равной 28,13 мМ). Обратную транскрипцию, амплификацию и анализ проводили, как в примере 1

(с использованием 4,5 Ед обратной транскриптазы Warm Start, 8 Ед ДНК полимеразы BST 3.0 и 1.5 Ед λ -экзонуклеазы).

Результаты приведены на фиг. 11(a) и (b).

На фиг. 11(a) точки данных представляют собой усредненное для результатов анализа ампликонов в двух повторениях со StDev. Матрицы представляли собой отрицательный контроль (без РНК, 2 мкл EB pH 9) и РНК, полученную из 1000 клеток *Neisseria gonorrhoea* (NG), выращенных в лаборатории, в смеси с водой, EB (pH 9) или EB (pH 8). RFU означает относительные единицы флуоресценции.

На фиг. 11(b) точки данных представляют собой чистые значения RFU, вычисленные посредством вычитания усредненного для EB отрицательного контроля из всех усредненных для образцов, что показывает, что EB (pH 8) обеспечивает оптимальный LEA выход чистых значений RFU для чистых значений RFU для H₂O, EB и 10 мМ Tris-HCl pH 8, 0,5 мМ EDTA смеси, которые составляли 1626, 1788 и 3269, соответственно, таким образом демонстрируя преимущество использования EB pH 8 в качестве элюирующего буфера в протоколе экстрагирования РНК.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Revolugen Limited

<120> АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ И ЗАМЕЩЕНИЯ ЦЕПИ

<130> PM343734WO

<150> GB1617491.4

<151> 2016-10-14

<160> 5

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> FW прямой праймер

<220>

<221> смешанные различия

<222> (1)..(1)

<223> Фосфорилирование на 5'-конце

<220>

<221> модифицированное основание

<222> (11)..(13)

<223> фосфоротиоатные (PS) нуклеотиды

<400> 1
gaacgctggc ggcgatgcttt acac 24

<210> 2

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> RV обратный праймер

<220>

<221> смешанные различия

<222> (1)..(1)

<223> Фосфорилирование на 5'-конце

<220>

<221> модифицированное основание

<222> (12)..(14)

<223> фосфоротиоатные (PS) нуклеотиды

<400> 2
cccggtagct tccgatatgt tactcacc 28

<210> 3

<211> 55

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> аналитический репортерный олигонуклеотид

 <220>
 <221> смешанные различия
 <222> (1)..(1)
 <223> молекула Су5 на 5'-конце

 <400> 3
 gcaagtcgga cggcagcaca gggaagcttg cttctcgggt ggcgagtggc gaacg 55

 <210> 4
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> аналитический гасящий олигонуклеотид

 <220>
 <221> смешанные различия
 <222> (35)..(35)
 <223> молекула ВНQ2 на 3'-конце

 <400> 4
 agaagcaagc ttcctgtgс tgccgtccga cttgc 35

 <210> 5
 <211> 109
 <212> ДНК
 <213> Neisseria gonorrhoeae

 <400> 5
 gaacgctggc ggcатgcttt acacatgcaa gtcggacggc agcacagggа agcttgcttc 60
 tcgggtggcg agtggcgaac gggtgagtaa catatcggaа cgtaccggg 109

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ амплификации последовательности нуклеиновой кислоты, включающий:

(a) предоставление смеси для амплификации, которая содержит:

(i) экзонуклеазу, способную вызывать расщепление цепи двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, причем расщепление происходит от 5'-конца цепи к 3'-концу,

(ii) полимеразу с замещением цепи,

(iii) двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую и вторую цепи нуклеиновой кислоты, гибридизованные друг с другом, указанная первая цепь, содержащая первую последовательность нуклеиновой кислоты, подлежащую амплификации, и имеющая первую 5'-концевую область, которая удалена от ее 5'-конца, имеет нуклеотидную последовательность, устойчивую к расщеплению (в условиях способа) посредством экзонуклеазы как определено в (i),

(iv) первый праймер нуклеиновой кислоты, имеющий ту же нуклеотидную последовательность, что и указанная первая концевая область первой нуклеиновой кислоты, и содержащий ту же устойчивую к расщеплению область, и

(v) нуклеотиды по ситуации для обеспечения амплификации первой последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей амплификации;

и

(b) проведение реакции амплификации в условиях, допускающих расщепление, экзонуклеазное расщепление и полимеризацию с замещением цепи, тем самым получая смесь продуктов, содержащую амплифицированное количество указанной первой последовательности нуклеиновой кислоты.

2. Способ по п. 1, где 5'-конец первой цепи и 3'-конец второй цепи вместе дают тупой конец для двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты.

3. Способ по п. 2, где 5'-конец первой цепи имеет 5'-фосфатную группу, а экзонуклеаза представляет собой ту, которая в смеси для амплификации предпочтительно расщепляет цепь

двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, которая имеет фосфатную (PO_4) группу на ее 5'-конце, причем расщепление происходит от этого конца цепи к ее 3'-концу.

4. Способ по п. 3, где экзонуклеаза представляет собой λ -экзонуклеазу.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области и первого праймера содержит по меньшей мере один фосфотиоатный нуклеотид.

6. Способ по п. 5, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области и первого праймера содержит непрерывную последовательность из множества фосфотиоатных нуклеотидов.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где устойчивая к расщеплению область первой концевой области находится между ее концами и, соответственно, устойчивая к расщеплению область первого праймера находится между его концами.

8. Способ по п. 1, где вторая цепь нуклеиновой кислоты имеет вторую 5'-концевую область, которая удалена от ее 5'-конца, имеет нуклеотидную последовательность, устойчивую к расщеплению (в условиях способа) посредством экзонуклеазы как определено в (i), и смесь для амплификации содержит второй праймер, идентичный указанной второй концевой области второй цепи нуклеиновой кислоты.

9. Способ по п. 8, где двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты имеет тупые концы.

10. Способ по п. 9, где 5'-концы каждой из первой и второй цепей имеют 5'-фосфатную группу, а экзонуклеаза представляет собой ту, которая в смеси для амплификации предпочтительно расщепляет цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, которая имеет фосфатную (PO_4) группу на ее 5'-конце, причем расщепление происходит от этого конца цепи к ее 3'-концу.

11. Способ по п. 10, где экзонуклеаза представляет собой λ -экзонуклеазу.

12. Способ по любому из пп. 8-11, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области, первого праймера,

второй концевой области и второго праймера содержит по меньшей мере один фосфотиоатный нуклеотид.

13. Способ по п. 12, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области, первого праймера, второй концевой области и второго праймера содержит непрерывную последовательность из множества фосфотиоатных нуклеотидов.

14. Способ по любому из пп. 8-13, где устойчивые к расщеплению области первой концевой области и второй концевой области находятся между их концами и, соответственно, устойчивые к расщеплению области первого праймера и второго праймера находятся между их концами.

15. Способ по любому из пп. 1-14, дополнительно включающий обнаружение амплифицированной последовательности.

16. Способ по п. 15, где обнаружение проводят посредством стадий:

(i) предоставления в смеси продуктов репортерной комбинации нуклеиновой кислоты, которая содержит (a) репортерную цепь, имеющую флуоресцентный репортерный фрагмент, связанный с ней, репортерная цепь способна к гибридизации с амплифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей обнаружению, и (b) цепь гасителя, способную к гибридизации с репортерной цепью и имеющую фрагмент гасителя, который гасит флуоресценцию флуоресцентного репортерного фрагмента,

(ii) проведения денатурации смеси продуктов и последующего создания условий повторной гибридизации и

(iii) обнаружения присутствия флуоресцентного репортерного фрагмента.

17. Способ по п. 16, когда непосредственно или опосредованно зависит от любого из пп. 8-15 для амплификации последовательности нуклеиновой кислоты в *Neisseria Gonorrhoeae*, где двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты имеет последовательности оснований, представленные на фиг. 8,

первый праймер имеет последовательность оснований:

5'-GAACGCTGGCGGCATGCTTTACAC-3',

второй праймер имеет последовательность оснований:

5'-CCCGGTACGTTCCGATATGTTACTCACC-3',

репортерная цепь имеет последовательность оснований:
5'CY5GCAAGTCGGACGGCAGCACAGGGAAGCTTGCTTCTCGGGTGGCGAGTGGCGAACG-3'

и

цепь гасителя имеет последовательность оснований:

5'-AGAAGCAAGCTTCCCTGTGCTGCCGTCCGACTTGC-3'.

18. Способ определения присутствия или иного для целевой последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце, способ включает стадии:

(a) обработки биологического образца для того, чтобы получать из него производный образец, и в таких условиях, что если целевая нуклеиновая кислота присутствует в биологическом образце, в производном образце создают двухцепочечную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую и вторую цепи нуклеиновой кислоты, гибридизованные друг с другом, указанная первая цепь, содержащая первую последовательность нуклеиновой кислоты, подтверждающую присутствие целевой последовательности нуклеиновой кислоты в биологическом образце и имеющую первую 5'-концевую область, которая удалена от ее 5'-конца, имеет нуклеотидную последовательность, устойчивую к расщеплению;

(b) получения композиции для амплификации, которая содержит:

(i) экзонуклеазу, способную вызывать расщепление цепи двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, причем расщепление происходит от 5'-конца цепи к 3'-концу,

(ii) полимеразу с замещением цепи,

(iii) производный образец

(iv) первый праймер нуклеиновой кислоты, имеющий ту же нуклеотидную последовательность, что и указанная первая концевая область первой нуклеиновой кислоты, если присутствует в производном образце, и содержащий ту же устойчивую к расщеплению область, и

(v) нуклеотиды по ситуации для обеспечения амплификации первой последовательности нуклеиновой кислоты, подлежащей амплификации; и

(c) анализа присутствия первой нуклеиновой кислоты в смеси продуктов.

19. Способ по п. 18, где 5'-конец первой цепи и 3'-конец второй цепи вместе дают тупой конец для двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты.

20. Способ по п. 19, где 5'-конец первой цепи имеет 5'-фосфатную группу, а экзонуклеаза представляет собой ту, которая в смеси для амплификации предпочтительно расщепляет цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, которая имеет фосфатную (PO₄) группу на ее 5'-конце, причем расщепление происходит от этого конца цепи к ее 3'-концу.

21. Способ по п. 20, где экзонуклеаза представляет собой λ-экзонуклеазу.

22. Способ по любому из пп. 18-21, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области и первого праймера содержит по меньшей мере один фосфотиоатный нуклеотид.

23. Способ по п. 22, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области и первого праймера содержит непрерывную последовательность из множества фосфотиоатных нуклеотидов.

24. Способ по любому из пп. 18-23, где устойчивая к расщеплению область первой концевой области находится между ее концами и, соответственно, устойчивая к расщеплению область первого праймера находится между его концами.

25. Способ по п. 18, где вторая цепь нуклеиновой кислоты имеет вторую 5'-концевую область, которая удалена от ее 5'-конца, имеет нуклеотидную последовательность, устойчивую к расщеплению (в условиях способа) посредством экзонуклеазы, как определено в (i), а смесь для амплификации содержит второй праймер, идентичный указанной второй концевой области второй цепи нуклеиновой кислоты.

26. Способ по п. 25, где двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты имеет тупые концы.

27. Способ по п. 26, где 5'-концы каждой из первой и второй цепей имеют 5'-фосфатную группу, а экзонуклеаза представляет собой ту, которая в смеси для амплификации предпочтительно расщепляет цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты,

которая имеет фосфатную (PO_4) группу на ее 5'-конце, причем расщепление происходит от этого конца цепи к ее 3'-концу.

28. Способ по п. 27, где экзонуклеаза представляет собой λ -экзонуклеазу.

29. Способ по любому из пп. 25-28, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области, первого праймера, второй концевой области и второго праймера содержит по меньшей мере один фосфотиоатный нуклеотид.

30. Способ по п. 29, где каждая устойчивая к расщеплению область первой концевой области, первого праймера, второй концевой области и второго праймера содержит непрерывную последовательность из множества фосфотиоатных нуклеотидов.

31. Способ по любому из пп. 25-30, где устойчивые к расщеплению области первой концевой области и второй концевой области находятся между их концами и, соответственно, устойчивые к расщеплению области первого праймера и второго праймера находятся между их концами.

32. Способ по любому из пп. 18-31, где обнаружение выполняют посредством стадий:

(i) предоставления в смеси продуктов репортерной конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит (a) репортерную цепь, имеющую флуоресцентный репортерный фрагмент, связанный с ней, репортерная цепь способна к гибридизации с амплифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей обнаружению, и (b) цепь гасителя, гибридизованную с репортерной цепью и имеющую фрагмент гасителя, который гасит флуоресценцию флуоресцентного репортерного фрагмента,

(ii) проведения денатурации смеси продуктов и последующего создания условий повторной гибридизации и

(iii) обнаружения присутствия флуоресцентного репортерного фрагмента.

33. Способ по п. 32, когда непосредственно или опосредованно зависит от любого из пп. 25-31, для обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты в *Neisseria Gonorrhoeae*, где двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, если

присутствует, имеет последовательности оснований, представленные на фиг. 8,

первый праймер имеет последовательность оснований:

5'-GAACGCTGGCGGCATGCTTTACAC-3',

второй праймер имеет последовательность оснований:

5'-CCCGGTACGTTCCGATATGTTACTCACCC-3',

репортерная цепь имеет последовательность оснований:

5'CY5GCAAGTCGGACGGCAGCACAGGGAAGCTTGCTTCTCGGGTGGCGAGTGGCGAACG-3'

и

цепь гасителя имеет последовательность оснований:

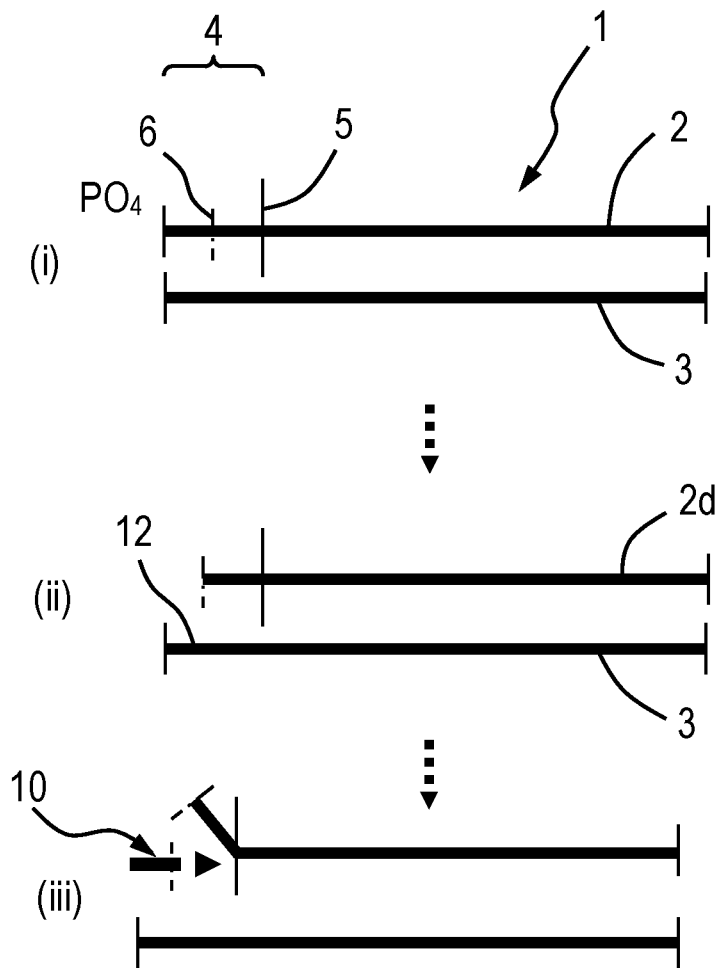
5'-AGAAGCAAGCTTCCCTGTGCTGCCGTCCGACTTGC-3'.

34. Способ обнаружения нуклеиновой кислоты в образце, подлежащем анализу, способ включает стадии:

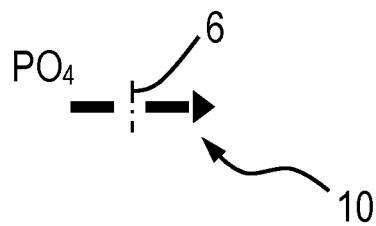
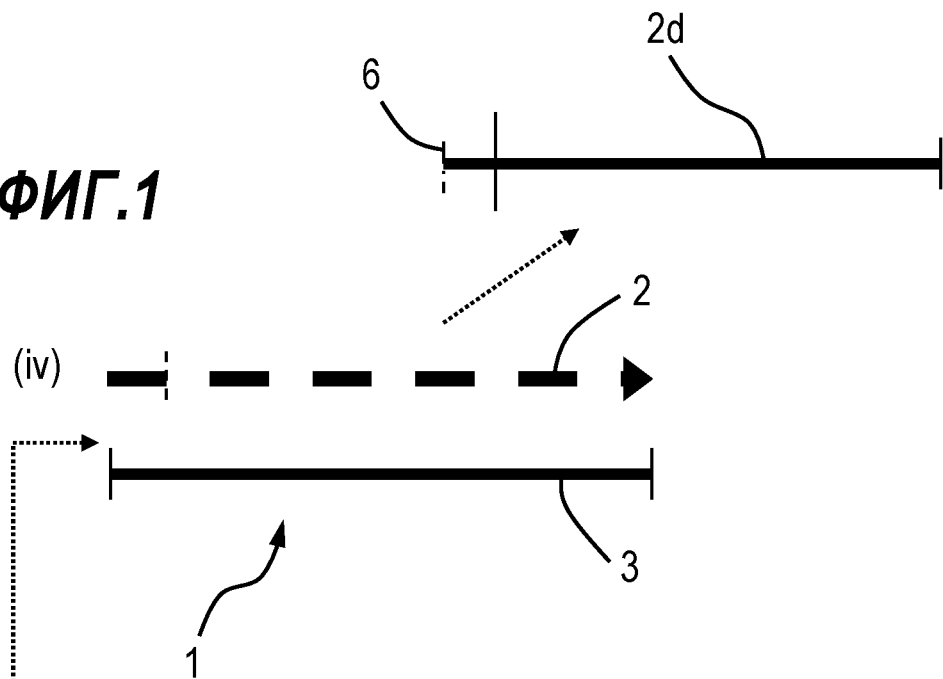
(i) предоставления в образце репортерной комбинации нуклеиновой кислоты, которая содержит (a) репортерную цепь, имеющую флуоресцентный репортерный фрагмент, связанный с ней, репортерная цепь способна к гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей обнаружению, и (b) гаситель, способный к гибридизации цепей с репортерной цепью и имеющий фрагмент гасителя, который гасит флуоресценцию флуоресцентного репортерного фрагмента,

(ii) проведения денатурации смеси и последующего создания условий повторной гибридизации и

(iii) обнаружения присутствия флуоресцентного репортерного фрагмента.

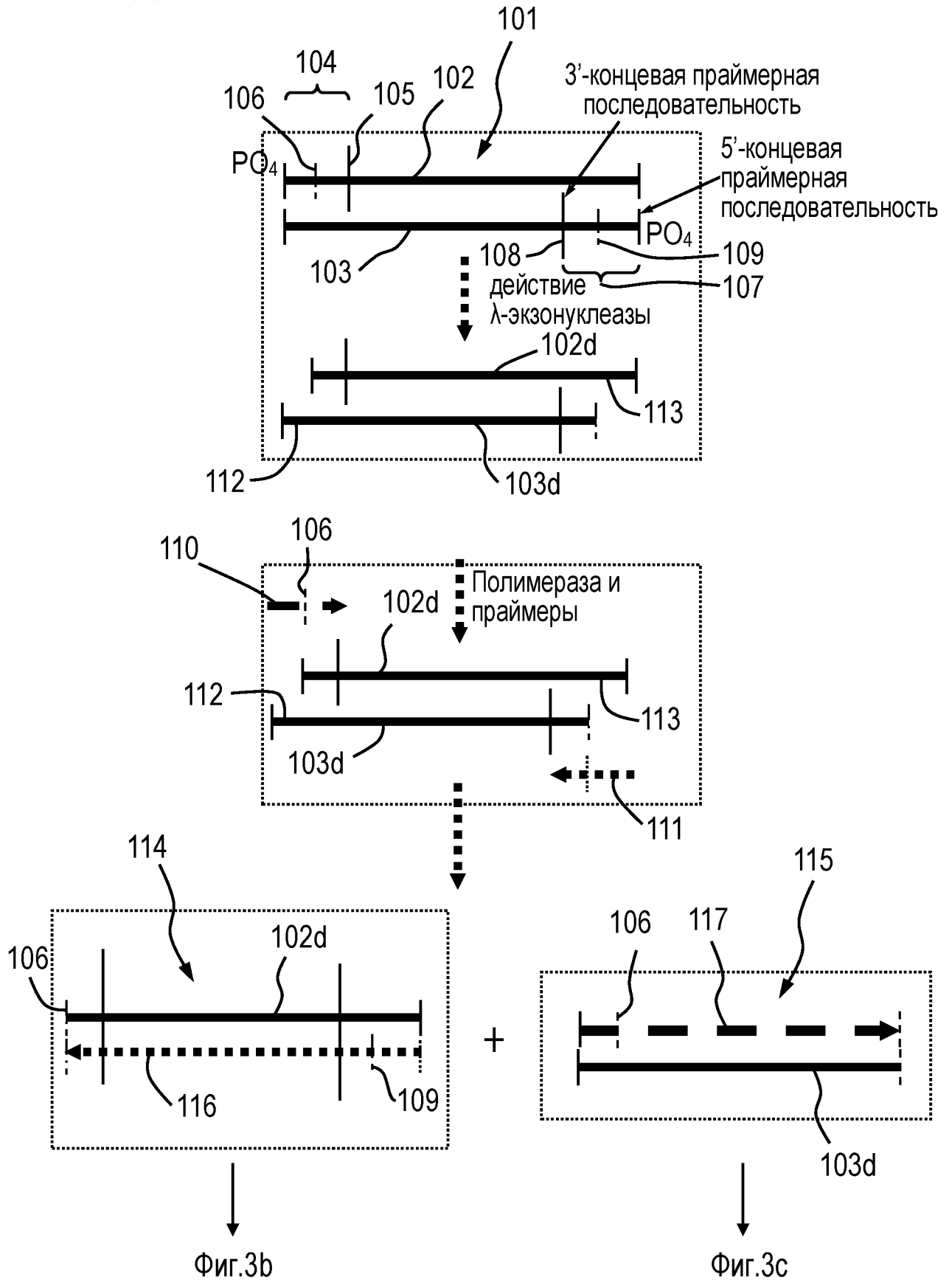


ФИГ.1

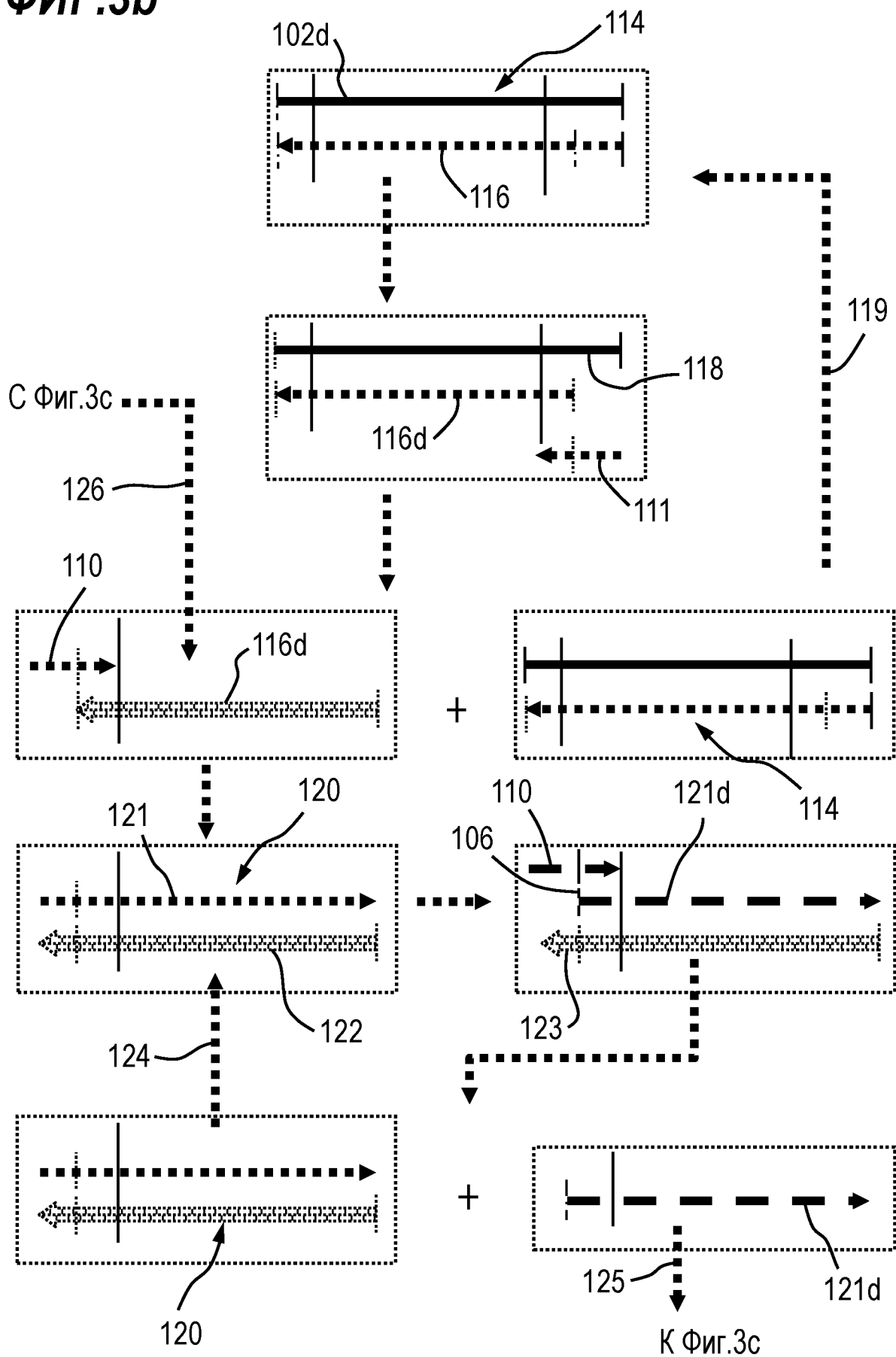


ФИГ.2

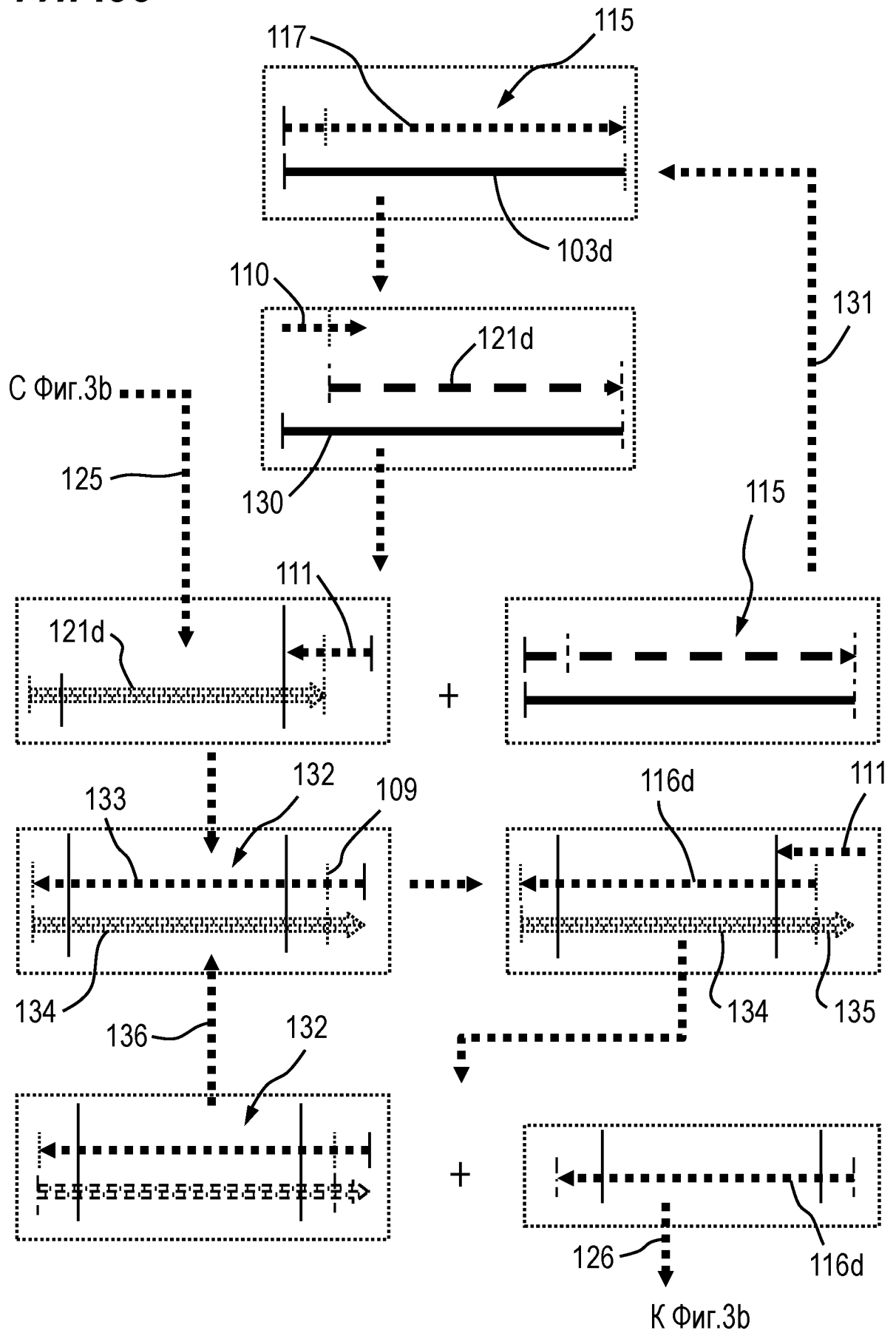
ФИГ.3а

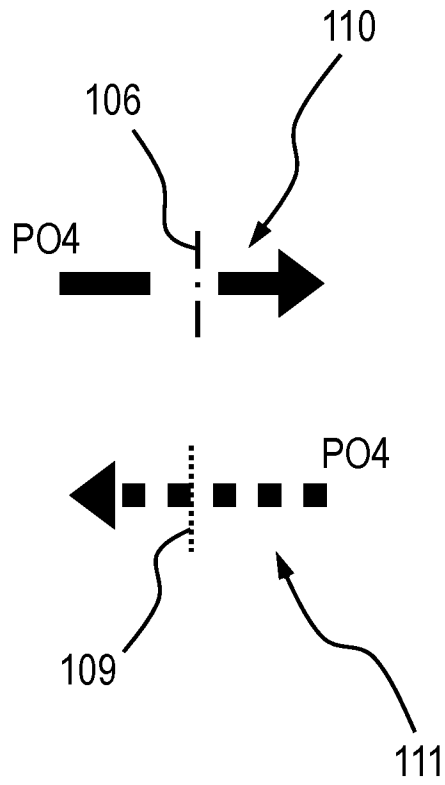


ФИГ.3b

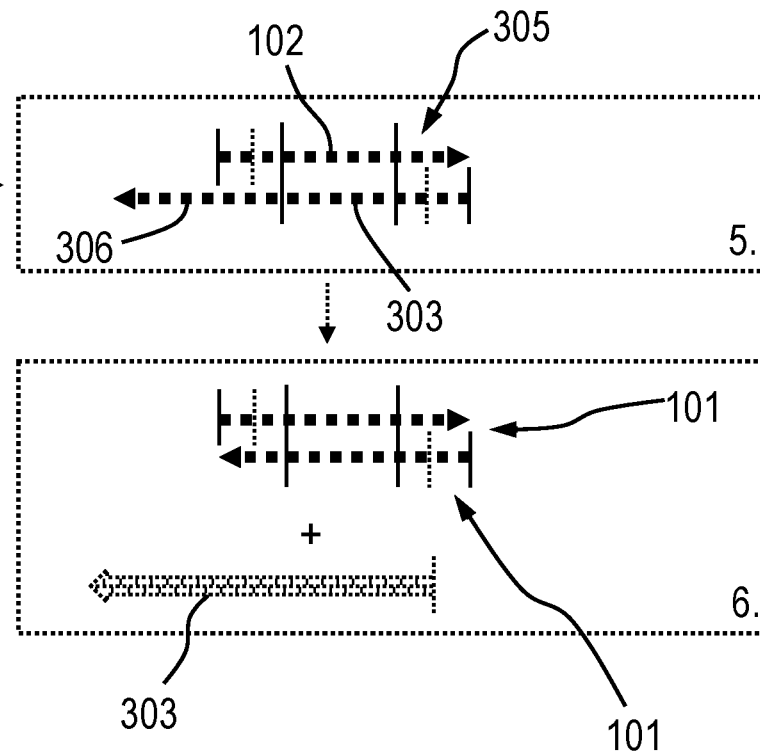
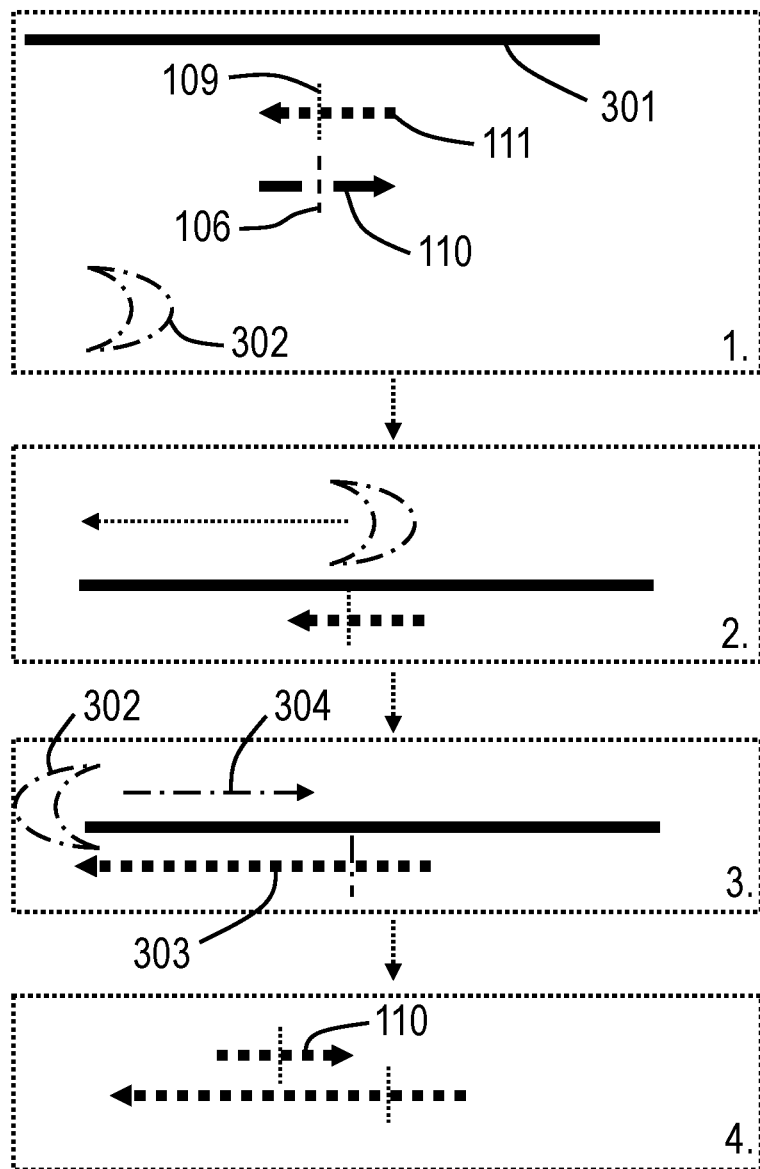


ФИГ.3с

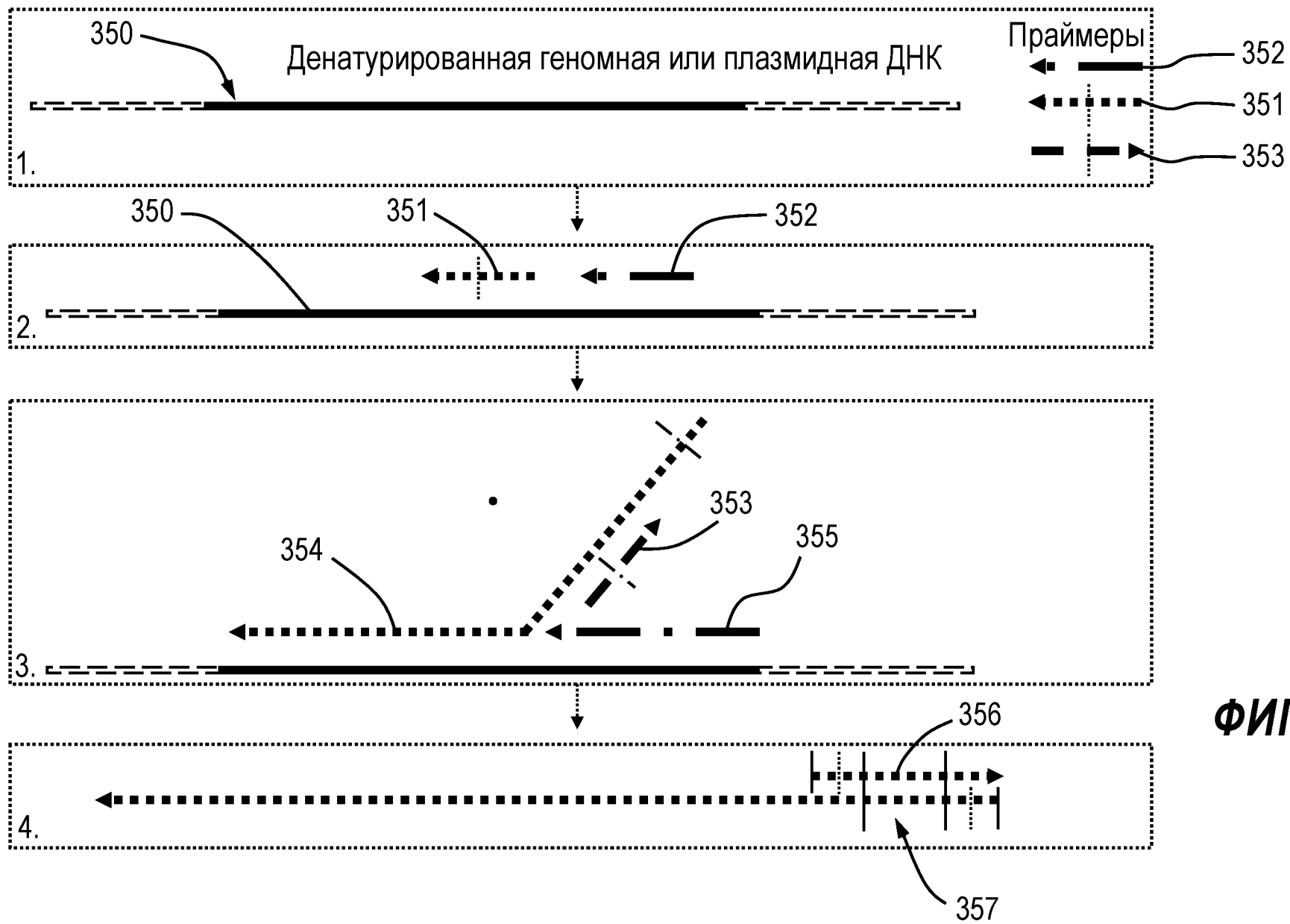




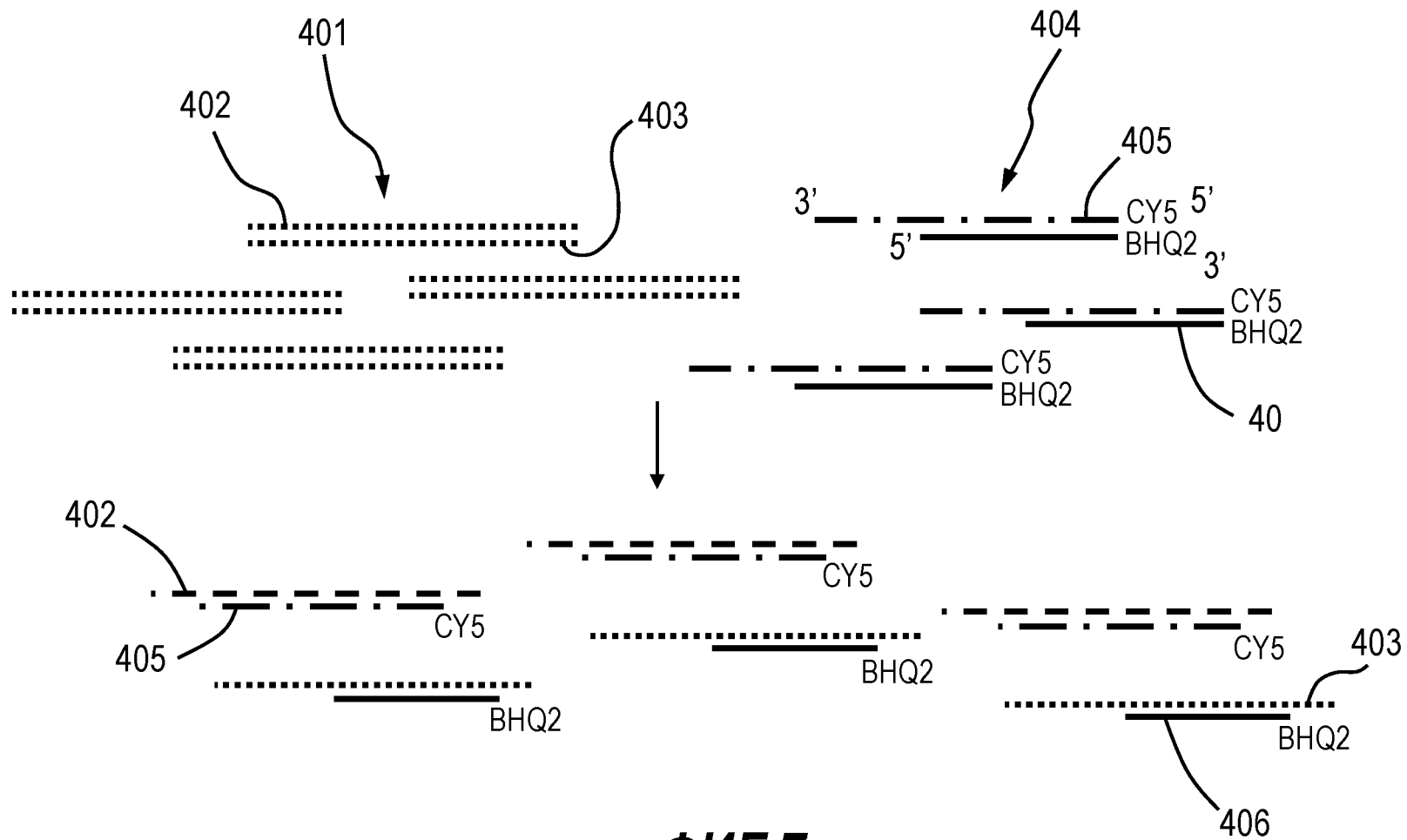
ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6

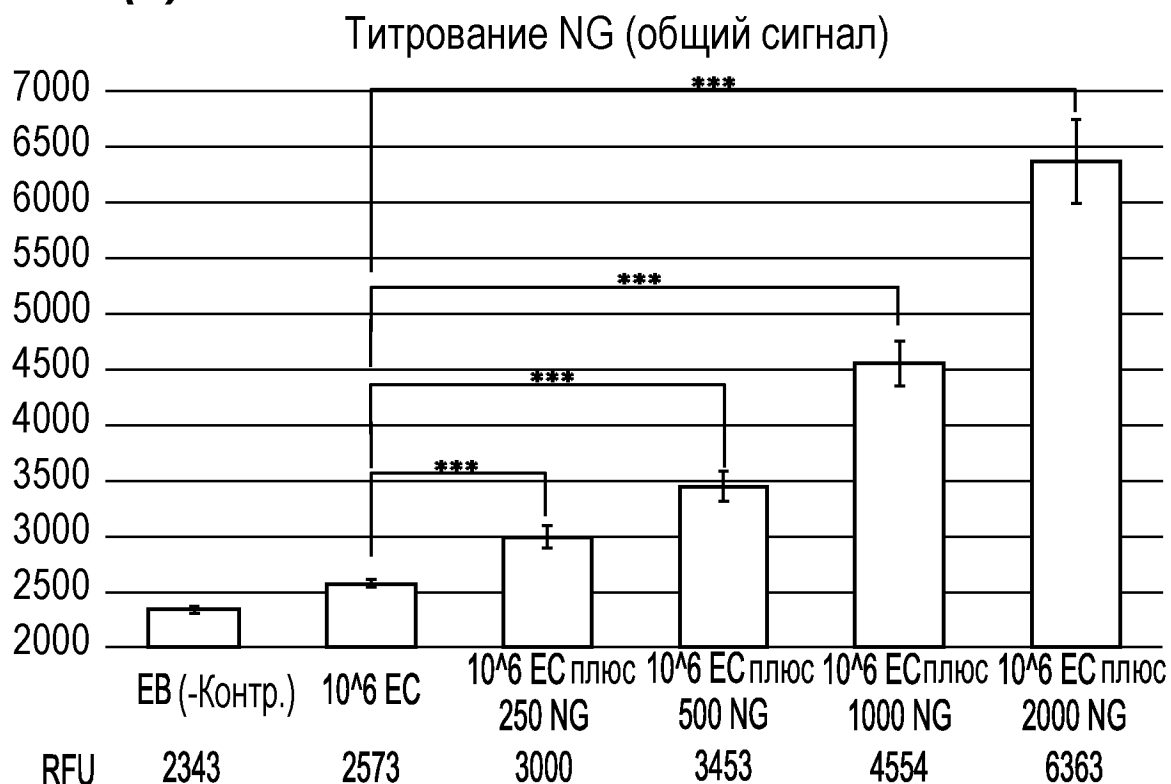
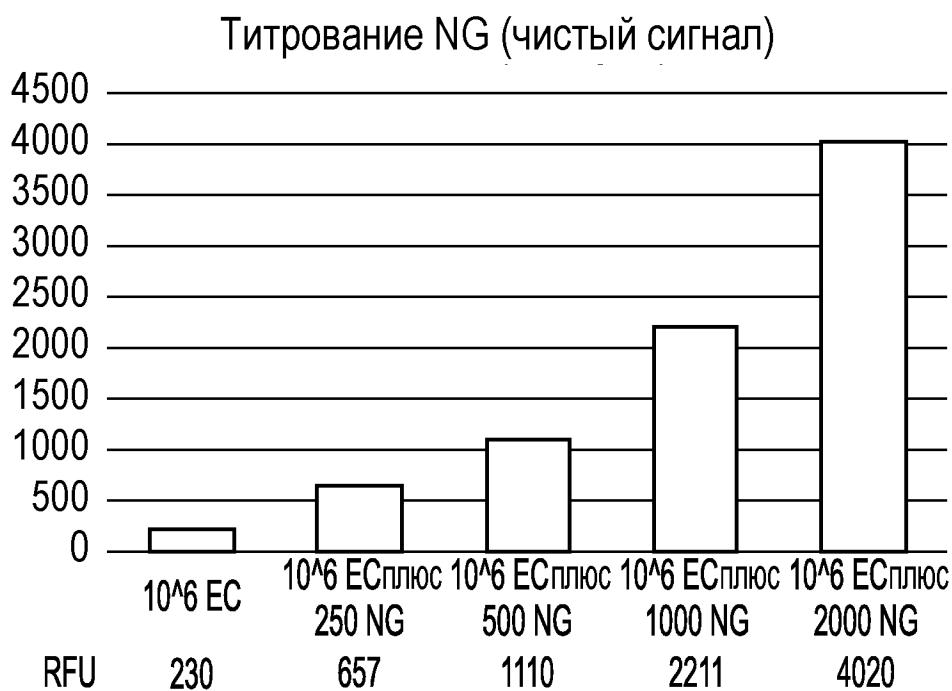


ФИГ.7

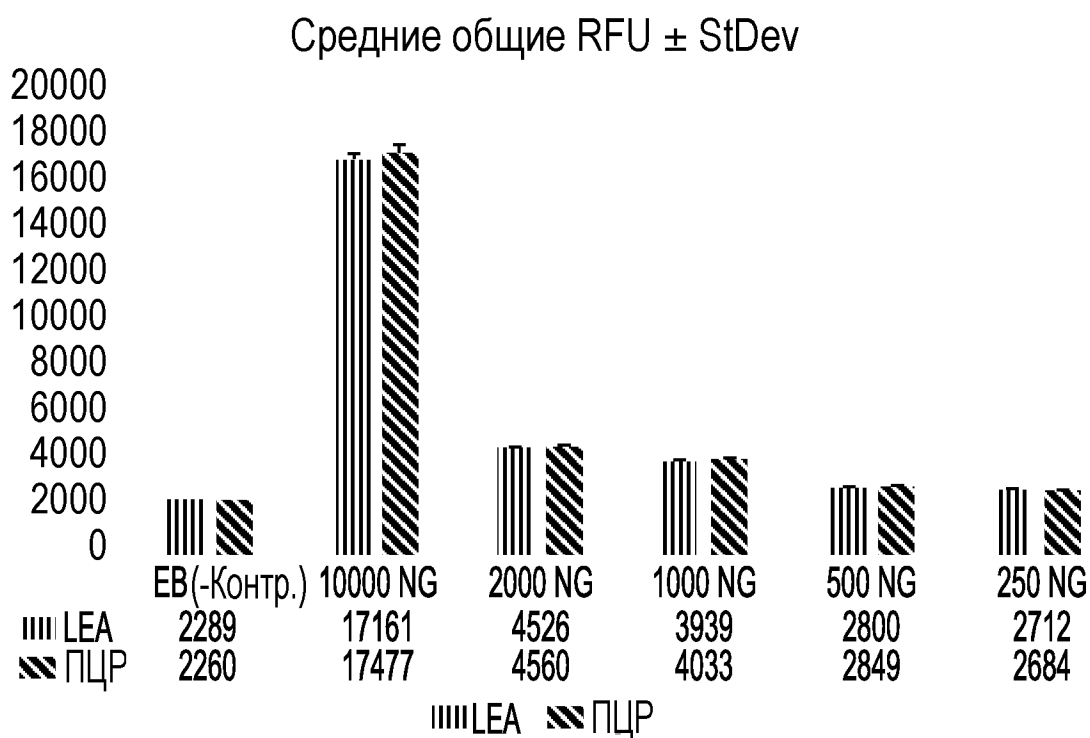


9/12

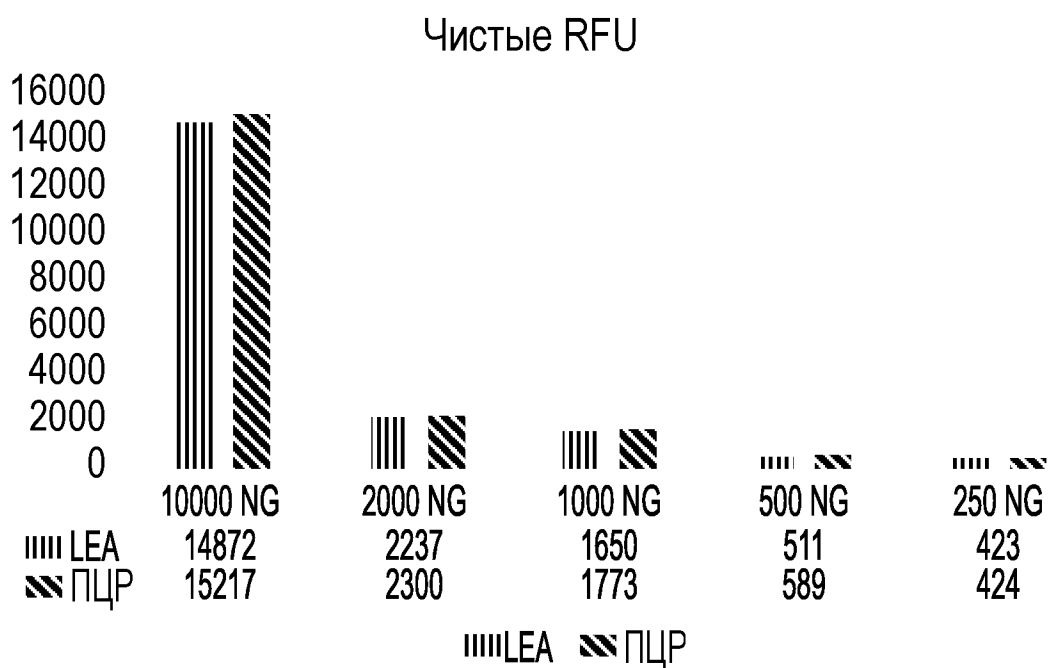
ФИГ.8

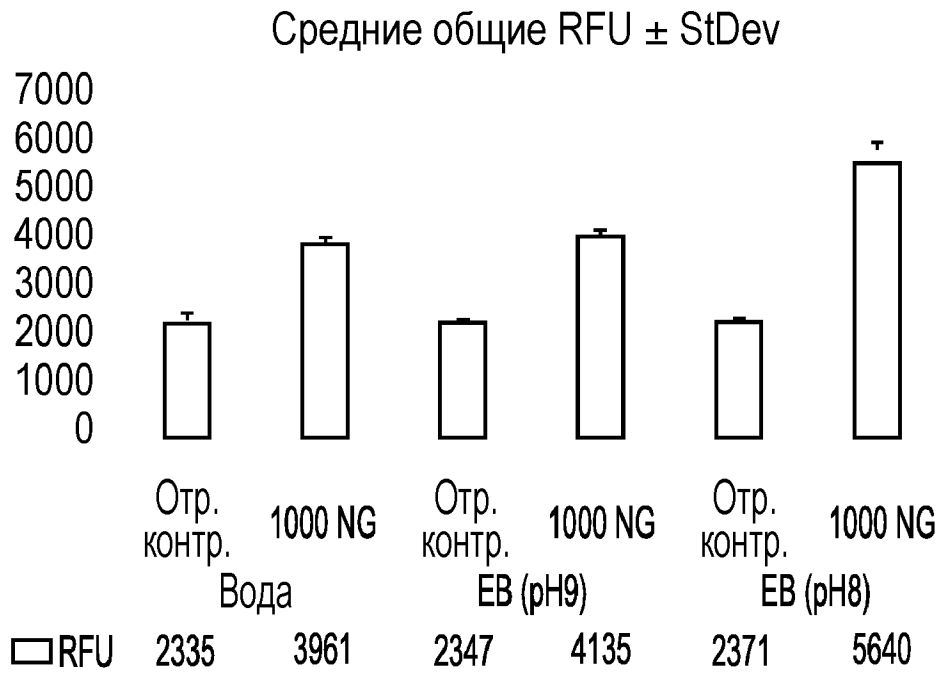
ФИГ.9(a)**ФИГ.9(b)**

ФИГ.10(a)



ФИГ.10(b)



ФИГ.11(a)**ФИГ.11(b)**