



(51) МПК
C12N 15/11 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21), (22) Заявка: 2004120771/13, 19.09.2002

(30) Приоритет: 08.12.2001 KR PCT/KR01/02133
 01.05.2002 KR PCT/KR02/00816

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2006 Бюл. № 01

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную
 фазу: 08.07.2004

(86) Заявка PCT:
 KR 02/01781 (19.09.2002)

(87) Публикация PCT:
 WO 03/050305 (19.06.2003)

Адрес для переписки:
 129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры", пат.пов. Е.Е. Назиной

(71) Заявитель(и):
 СИДЖИН, ИНК. (KR)

(72) Автор(ы):
 ЧУН Дзонг-Йоон (KR)

(74) Патентный поверенный:
 Назина Елена Евгеньевна

(54) **ПРАЙМЕР, РЕГУЛИРУЮЩИЙ ОТЖИГ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Формула изобретения

1. Регулирующий отжиг, праймер для повышения специфичности отжига при амплификации нуклеиновой кислоты, предусматривающий (а) 3'-концевой участок, содержащий гибридизующуюся нуклеотидную последовательность в основном комплементарную сайту в матричной нуклеиновой кислоте для гибридизации с ней; (b) 5'-концевой участок, содержащий заранее выбранную произвольную нуклеотидную последовательность, и (с) регуляторный участок, расположенный между 3'-концевым участком и 5'-концевым участком, содержащим по меньшей мере два универсальных основания или неотличающихся аналогов основания, посредством чего указанной регуляторный участок способен регулировать отжигающийся участок указанного праймера в зависимости от температуры отжига.

2. Регулирующий отжиг, праймер по п.1, где указанная заранее выбранная произвольная нуклеотидная последовательность указанного 5'-концевого участка является в основном некомплементарной любому сайту в указанной матричной нуклеиновой кислоте.

3. Регулирующий отжиг, праймер по п.1, где указанная нуклеиновая кислота-мишень представляет гДНК, кДНК или мРНК.

4. Регулирующий отжиг, праймер по п.3, где указанная гДНК или кДНК является одноцепочечной или двухцепочечной ДНК.

5. Регулирующий отжиг, праймер по п.1, где амплификацию указанной нуклеиновой кислоты проводят при первой и второй температурах отжига.

6. Регулирующий отжиг праймер по п.5, где указанная первая температура отжига при

указанной амплификации нуклеиновой кислоты аналогична или ниже указанной второй температуры отжига.

7. Регулирующий отжиг, праймер по п.5, где 3'-концевой участок принимает участие в отжиге при указанной первой температуре отжига, и указанный 5'-концевой участок служит в качестве сайта праймирования при указанной второй температуре отжига.

8. Регулирующий отжиг, праймер по п.5, где указанный регуляторный участок способен ограничивать указанный участок отжига указанного праймера указанным 3'-концевым участком при указанной первой температуре отжига.

9. Регулирующий отжиг, праймер по п.5, где указанная первая температура отжига находится в пределах примерно от 30 до 68°C.

10. Регулирующий отжиг, праймер по п.5, где указанная вторая температура отжига находится в пределах примерно от 50 до 72°C.

11. Регулирующий отжиг, праймер по п.1, где указанный регулирующий отжиг праймер содержит общую формулу 5'-X_p-Y_q-Z_r-3', где X_p представляет 5'-концевой участок, содержащий заранее выбранную произвольную нуклеотидную последовательность, в основном не комплементарную любому сайту в матричной нуклеиновой кислоте; Y_q представляет регуляторный участок, включающий по меньшей мере два универсальных основания или неотличающихся аналога основания; Z_r представляет 3'-концевой участок, содержащий гибридизующуюся нуклеотидную последовательность, в основном комплементарную сайту в матричной нуклеиновой кислоте для гибридизации с ней, где p, q и r представляют число нуклеотидов; и где X, Y и Z являются дезоксирибонуклеотидом или рибонуклеотидом.

12. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где указанное универсальное основание или неотличающийся аналог основания способны спариваться с каждым природным основанием ДНК/РНК с небольшим различием между указанными природными основаниями ДНК/РНК.

13. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где указанное универсальное основание или неотличающийся аналог основания выбраны из группы, состоящей из дезоксиинозина, инозина, 7-деаза-2'-дезоксиинозина, 2-аза-2'-дезоксиинозина, 2'-ОМе-инозина, 2'-F-инозина, дезокси-3-нитропиррола, 3-нитропиррола, 2'-ОМе-3-нитропиррола, 2'-F-3-нитропиррола, 1-(2'-дезокси-бета-D-рибофуранозил)-3-нитропиррола, дезокси-5-нитроиндола, 5-нитроиндола, 2'-ОМе-5-нитроиндола, 2'-F-5-нитроиндола, дезокси-4-нитробензимидазола, 4-нитробензимидазола, дезокси-4-аминобензимидазола, 4-аминобензимидазола, дезоксинебуларина, 2'-F-небуларина, 2'-F-4-нитробензимидазола, PNA-5-интроиндола, PNA-небуларина, PNA-инозина, PNA-4-нитробензимидазола, PNA-3-нитропиррола, морфолино-5-нитроиндола, морфолинонебуларина, морфолиноинозина, морфолино-4-нитробензимидазола, морфолино-3-ниропиррола, фосфорамидат-5-нитроиндола, фосфорамидатнебуларина, фосфорамидатинозина, фосфорамидат-4-нитробензимидазола, фосфорамидатинозина, фосфорамидат-4-нитробензимидазола, фосфорамидат-3-нитропиррола, 2'-О-метоксиэтилинозина, 2'-метоксиэтилнебуларина, 2'-О-метоксиэтил-5-нитроиндола, 2'-О-метоксиэтил-4-нитробензимидазола, 2'-О-метоксиэтил-3-нитропиррола и их комбинаций.

14. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где указанное универсальное основание или неотличающийся аналог основания представляют дезоксиинозин, 1-(2'-дезокси-бета-D-рибофуранозил)-3-нитропиррол или 5-нитроиндол.

15. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где указанный регуляторный участок содержит смежные нуклеотиды, имеющие универсальное основание или неотличающийся аналог основания.

16. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где указанный дезоксирибонуклеотид представляет природный dNMP, модифицированный нуклеотид или неприродный нуклеотид.

17. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где p представляет целое число в пределах от 15 до 60.

18. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где q равно по меньшей мере 3.

19. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где q равно по меньшей мере 4.
20. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где q представляет целое число в пределах от 2 до 15.
21. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где r представляет целое число в пределах от 6 до 50.
22. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где p представляет целое число в пределах от 15 до 60, q представляет целое число от 2 до 15, и r представляет целое число от 6 до 30.
23. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где X_p содержит последовательность универсального праймера.
24. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где X_p содержит последовательность или последовательности, узнаваемые рестриктазой или рестриктазами.
25. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где X_p содержит по меньшей мере один нуклеотид с меткой для детектирования или выделения.
26. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r представляет нуклеотидную последовательность, которая гибридизуется с полиаденозином поли(А)-хвостом мРНК.
27. Регулирующий отжиг, праймер по п.26, где Z_r содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов дезокситимидина.
28. Регулирующий отжиг, праймер по п.26, где Z_r содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов дезокситимидина, имеющих 3'-V на их конце; где V выбран из группы, состоящей из дезоксиаденозина, дезоксицитидина и дезоксигуанозина.
29. Регулирующий отжиг, праймер по п.26, где Z_r содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов дезокситимидина, имеющих 3'-NV на их 3'-конце; где V выбран из группы, состоящей из дезоксиаденозина, дезоксицитидина и дезоксигуанозина, и N выбран из группы, состоящей из дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксицитидина и дезоксигуанозина.
30. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r представляет нуклеотидную последовательность, в основном комплементарную последовательности-мишени в матричной нуклеиновой кислоте.
31. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r представляет случайную нуклеотидную последовательность.
32. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r представляет нуклеотидную последовательность, в основном комплементарную согласованной последовательности, обнаруженной в семействе генов.
33. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r представляет вырожденную нуклеотидную последовательность, выбранную из множества комбинаций нуклеотидов, кодирующих заранее определенную аминокислотную последовательность.
34. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r содержит по меньшей мере один рибонуклеотид.
35. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r содержит по меньшей мере один нуклеотид, комплементарный аллельному сайту.
36. Регулирующий отжиг, праймер по п.11, где Z_r содержит по меньшей мере одно ошибочное спаривание нуклеотидов с нуклеиновой кислотой-мишенью для мутагенеза.
37. Набор, содержащий праймер или группу праймеров по одному из пп.1-36.
38. Набор по п.37, где набор дополнительно содержит праймер или пару праймеров, имеющих нуклеотидную последовательность, соответствующую указанному 5'-концевому участку праймера, регулирующего отжиг, по одному из пп.1-36.
39. Способ амплификации нуклеиновокислотной последовательности нуклеиновой кислоты из ДНК или смеси нуклеиновых кислот, где указанный способ предусматривает проведение реакции амплификации с использованием праймеров, отличающийся тем, что по меньшей мере один праймер содержит такую же структуру, как праймер из любого одного по пп.1-25.
40. Способ по п.39, где указанный способ проводят с использованием двухстадийных амплификаций, который содержит

(а) проведение первой стадии амплификации указанной последовательности нуклеиновой кислоты при первой температуре отжига, предусматривающей по меньшей мере два цикла отжига праймера, наращивания праймера и денатурации, с использованием пары праймеров из любого одного по пп.1-25, каждый содержащий в его 3'-концевом участке гибридизующуюся последовательность, в основном комплементарной области указанной нуклеиновокислотной последовательности для гибридизации с ней, в условиях, при которых праймер отжигается с областью нуклеиновокислотной последовательности, посредством чего образуется продукт амплификации указанной нуклеиновокислотной последовательности; и

(b) проведение второй стадии амплификации указанного продукта амплификации, полученного на стадии (а), при второй температуре отжига, которая представляет условия высокой жесткости, предусматривающей по меньшей мере один цикл отжига праймера, наращивания праймера и денатурации, с использованием тех же праймеров, что использовались на стадии (а), или пары праймеров, каждый включающий заранее выбранную произвольную нуклеотидную последовательность, соответствующую каждому 5'-концевому участку праймеров, использованных на стадии (а), в условиях, при которых каждый праймер отжигается соответственно с 3'- и 5'-концами указанного продукта амплификации, посредством чего продукт амплификации амплифицируется повторно.

41. Способ избирательной амплификации нуклеиновокислотной последовательности-мишени из ДНК или смеси нуклеиновых кислот, где указанный способ предусматривает проведение реакции амплификации с использованием праймеров, отличающийся тем, что по меньшей мере один праймер содержит такую же структуру, как праймер из любого одного по пп.1-25.

42. Способ по п.41, где данный способ проводят с использованием двухстадийных амплификаций, который предусматривает

(а) проведение первой стадии амплификации указанной нуклеиновокислотной последовательности-мишени при первой температуре отжига, предусматривающей, по меньшей мере, два цикла отжига праймера, наращивания праймера и денатурации, с использованием пары праймеров любого одного по пп.1-25, каждый содержащий в его 3'-концевом участке гибридизующуюся последовательность, в основном комплементарную области указанной нуклеиновокислотной последовательности для гибридизации с ней, в условиях, при которых праймер отжигается с нуклеотидной последовательностью-мишенью посредством чего образуется продукт амплификации указанной нуклеотидной последовательности-мишени; и

(b) проведение второй стадии амплификации указанного продукта амплификации, полученного на стадии (а), при второй температуре отжига, которая представляет условия высокой жесткости, предусматривающей по меньшей мере один цикл отжига праймера, наращивания праймера и денатурации, с использованием тех же праймеров, что использовались на стадии (а), или пары праймеров, каждый включающий заранее выбранную произвольную нуклеотидную последовательность, соответствующую каждому 5'-концевому участку указанных праймеров, использованных на стадии (а), в условиях, при которых каждый праймер отжигается соответственно с 3'- и 5'-концами указанного продукта амплификации, посредством чего продукты амплификации амплифицируются повторно.

43. Способ избирательной амплификации нуклеиновокислотной последовательности-мишени из мРНК, где указанный способ предусматривает обратное транскрибирование указанной мРНК и проведение реакции амплификации с использованием праймеров, отличающийся тем, что по меньшей мере один праймер содержит такую же структуру, как праймер из любого одного по пп.1-25.

44. Способ по п.43, где способ проводят с использованием двухстадийных амплификаций, который предусматривает

(а) контактирование указанной мРНК с олигонуклеотидным dT-праймером, который гибридизуется с поли(А)-хвостом мРНК в условиях, достаточных для того, чтобы имел место направляемый матрицей ферментативный синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты;

(b) обратное транскрибирование указанной мРНК, с которой гибридизуется олигонуклеотидный dT-праймер с получением первой цепи ДНК, которая комплементарна мРНК, с которой гибридизуется олигонуклеотидный dT-праймер;

(c) проведение первой стадии амплификации указанной нуклеиновокислотной последовательности-мишени из указанной первой цепи ДНК, полученной на стадии (b), при первой температуре отжига, предусматривающей по меньшей мере два цикла отжига праймера, наращивания праймера и денатурации, с использованием пары праймеров из любого одного по пп.1-25, каждый содержащий в его 3'-концевом участке гибридизующуюся последовательность, в основном комплементарную области указанной нуклеиновокислотной последовательности-мишени для гибридизации с ней, в условиях, при которых каждый праймер отжигается с его нуклеотидной последовательностью-мишенью, посредством чего образуется продукт амплификации указанной нуклеиновокислотной последовательности-мишени; и

(d) проведение второй стадии амплификации указанного продукта амплификации, полученного на стадии (c), при второй температуре отжига, которая представляет условия высокой жесткости, предусматривающей по меньшей мере один цикл отжига праймера, наращивания праймера и денатурации, с использованием тех же праймеров, что использовались на стадии (c), или пары праймеров, каждый включающий заранее выбранную произвольную нуклеотидную последовательность, соответствующую каждому 5'-концевому участку праймеров, использованных на стадии (c), в условиях, при которых каждый праймер отжигается соответственно с 3'- и 5'-концами указанного продукта амплификации, посредством чего указанный продукт амплификации амплифицируется повторно.

45. Способ детектирования ДНК, комплементарной дифференциально экспрессированной мРНК в двух или более пробах нуклеиновых кислот, где указанный способ предусматривает обратное транскрибирование указанной мРНК и проведение реакции амплификации с использованием праймеров, отличающийся тем, что по меньшей мере один праймер содержит такую же структуру, как праймер из любого одного по пп.1-25.

46. Способ по п.45, где указанный способ проводят с использованием двухстадийных амплификаций, который предусматривает

(a) обеспечение первой пробы нуклеиновых кислот, представляющих первую популяцию транскриптов мРНК, и второй пробы нуклеиновых кислот, представляющих вторую популяцию транскриптов мРНК;

(b) раздельное контактирование каждой указанной первой пробы нуклеиновых кислот и указанной второй пробы нуклеиновых кислот с первым праймером из любого одного по пп.1-29, в котором 3'-концевой участок указанного первого праймера содержит гибридизующуюся нуклеотидную последовательность, в основном комплементарную первому сайту в указанной дифференциально экспрессированной мРНК для гибридизации с ней, в условиях, достаточных для того, чтобы имел место направляемый матрицей ферментативный синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты;

(c) обратное транскрибирование указанной дифференциально экспрессированной мРНК, с которой гибридизуется первый праймер с получением первой популяции первых цепей кДНК, которые комплементарны указанной дифференциально экспрессированной мРНК в указанной первой пробе нуклеиновой кислоты, с которой гибридизуется указанный первый праймер, и второй популяции первых цепей кДНК, которые комплементарны указанной дифференциально экспрессированной мРНК в указанной второй пробе нуклеиновой кислоты, с которой гибридизуется первый праймер;

(d) очистку и количественно определение указанной первой и второй популяций первых цепей кДНК;

(e) проведение первой стадии амплификации каждой указанной первой и второй популяций первых цепей кДНК, полученных на стадии (d), при первой температуре отжига, предусматривающей по меньшей мере один цикл отжига праймера, наращивания праймера и денатурации с использованием второго праймера из любого одного по пп.1-25, имеющего в его 3'-концевом участке гибридизующуюся последовательность, в основном

комплементарную второму сайту в указанной первой и второй популяциях первых цепей кДНК, в условиях, при которых указанный второй праймер отжигается с указанным вторым сайтом в каждой популяции первых цепей кДНК, посредством чего образуется первая и вторая популяции вторых цепей кДНК;

(f) проведение второй стадии амплификации каждой второй цепи кДНК, полученной на стадии (e), при второй температуре отжига, которая является условиями высокой жесткости, предусматривающей по меньшей мере два цикла отжига праймера, наращивания праймера и денатурации с использованием тех же первого и второго праймеров, что использовались соответственно на стадиях (b) и (e), или пару праймеров, каждый включающий заранее выбранную произвольную нуклеотидную последовательность, соответствующую 5'-концевому участку указанных первого и второго праймеров, использованных соответственно на стадиях (b) и (e), в условиях, при которых каждый праймер отжигается соответственно с 3'- и 5'-концевыми последовательностями каждой второй цепи кДНК, посредством чего образуются продукты амплификации указанных вторых цепей кДНК и

(g) сравнение наличия или уровня дискретных продуктов амплификации в указанной первой и второй популяциях продуктов амплификации, полученных на стадии (f).

47. Способ по пп. 40, 42 или 44, где указанная пара праймеров, использованная в указанной амплификации первой стадии, представляет комбинацию праймера, регулирующего отжиг, выбранного из праймеров по пп.1-25, и обычного праймера.

48. Набор для амплификации нуклеиновой кислоты, который содержит регулирующий отжиг праймер или группу праймеров, регулирующих отжиг по пп.39 или 40.

49. Набор для избирательной амплификации нуклеиновокислотной последовательности-мишени из ДНК, который содержит регулирующий отжиг праймер или группу праймеров, регулирующих отжиг по пп.41 или 42.

50. Набор для избирательной амплификации нуклеиновокислотной последовательности-мишени из мРНК, который содержит регулирующий отжиг праймер или группу праймеров, регулирующих отжиг по пп.43 или 44.

51. Набор для детектирования ДНК, комплементарной дифференциально экспрессированным мРНК, который содержит регулирующий отжиг праймер или группу праймеров, регулирующих отжиг по одному из пп. 45 или 46.