



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.19

(21) Номер заявки
201891704

(22) Дата подачи заявки
2017.02.03

(51) Int. Cl. *C12Q 1/48* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

(31) 2016103685

(32) 2016.02.05

(33) RU

(43) 2018.12.28

(86) PCT/RU2017/050004

(87) WO 2017/135850 2017.08.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"БИОМАРКЕР-РУ" (RU)

(72) Изобретатель:
Мельников Анатолий Александрович
(RU)

(74) Представитель:
Котлов Д.В. (RU)

(56) XIA P. et al. Simultaneous quantitative assessment of circulating cell-free mitochondrial and nuclear DNA by multiplex real-time PCR. *Genetics and Molecular Biology*, 2009, 32, 1, pp.20-24
BOEL DE PAEPE. Mitochondrial Markers for Cancer: Relevance to Diagnosis, Therapy, and Prognosis and General Understanding of Malignant Disease Mechanisms, *ISRN Pathology*, 2012, Article ID 217162, 15 pages, doi: 10.5402/2012/217162

US-A1-5972615

RU-C2-2523589

БЕЛОВ Ю.В. и др. Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, *Научное приборостроение*, 2011, том 21, No.1, с. 44-49

(57) Изобретение относится к медицине, более конкретно к лабораторной диагностике, и касается способа для диагностики онкологических заболеваний. Получают образец плазмы крови у человека, затем проводят изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот плазмы крови. Далее осуществляют очистку нуклеиновых кислот из реакционной смеси и проводят количественный анализ нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Определяют коэффициент К в пробах:

$$K = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3},$$

$$\text{где } C_1 = \frac{Ct \text{ для гена, кодирующего фермент гликолиза}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_2 = \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_3 = \frac{Ct \text{ для гена M6PRB}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

Ct - величина порогового цикла полимеразной цепной реакции. Далее сравнивают коэффициент К с референсным значением и диагностируют онкологическое заболевание, при значении коэффициента К менее референсного значения. Изобретение позволяет проводить малоинвазивную диагностику онкологических заболеваний с высокой чувствительностью на любых стадиях заболевания, в том числе на ранних стадиях, при которых клинические симптомы отсутствуют.

Изобретение относится к медицине, более конкретно к лабораторной диагностике, и может быть использовано для диагностики онкологических заболеваний.

В крови человека имеются нуклеиновые кислоты (НК), не связанные с клетками и свободно циркулирующие в кровотоке. Эти НК появляются в результате гибели (распада) клеток, связанной с непрерывной заменой старых клеток на новые во всех органах. В плазме здорового человека концентрация свободно циркулирующей ДНК (сцДНК) около 6 нг/мл. Некоторые заболевания сопровождаются повышенной гибелью клеток и, как следствие, повышенной концентрацией сцДНК в плазме больных. Примерами таких заболеваний являются прежде всего онкологические заболевания, а также некоторые заболевания печени, в частности гепатоз [Зайратьянц О.В. и др. "Патологическая анатомия", Гл.1, Повреждение и гибель клеток и тканей. 2012, 960 стр.].

Рост злокачественной опухоли зачастую сопровождается повышенной гибелью клеток. Опухолевые клетки гибнут преимущественно путем некроза, в меньшей степени путем апоптоза; продукты клеточного распада попадают в кровеносные сосуды. Поэтому у большинства онкологических больных концентрация сцДНК в плазме крови повышена по сравнению с таковой у здоровых индивидуумов. Доказано, что сцДНК онкологических больных произошла из опухолевых клеток [Huang Z.H. et al. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2006, 243:64-70] и, более того, эта сцДНК при определенных условиях может индуцировать онкогенную трансформацию здоровых клеток [Garcia-Olmo D.C. et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* 2010, 70:560-567].

Энергетический метаболизм раковых клеток отличается от метаболизма здоровых клеток. В раковых клетках наблюдается увеличение анаэробного гликолиза, также как число копий митохондриальной ДНК (мтДНК) изменяется при различных формах рака (8). Увеличенное число копий мтДНК было найдено при раке предстательной железы и яичников, эндометриальном раке, карциноме щитовидной железы, некоторых формах лейкемии, карциноме толстого кишечника, раке головного мозга, шеи и других формах рака. И наоборот, уменьшенное число копий мтДНК было найдено при раке желудка, карциноме печени, раке молочной железы и других формах рака. Многие факторы, такие как возраст, оксидативный стресс, тканевая специфичность и степень развития опухоли влияют на количество копий мтДНК [Meng S. et al. Mitochondrial DNA copy number alteration in human cancers. *NAJ Med Sci.* 2013, 6(1):22-25. DOI: 10.7156/najms.2013.0601022].

Известны способ диагностики онкологических заболеваний и набор для его осуществления от компании Mitomics Inc. [www.mitomicsinc.com], основанные на анализе структуры мтДНК, ее мутаций, в том числе делеций. Наиболее разработанным тестом у компании Mitomics Inc. является тест на рак предстательной железы (Prostate Core Mitomics TEST, PCMT). Чувствительность теста составляет 85%, специфичность 92%. Недостатки метода: инвазивность, для анализа используется материал биопсии предстательной железы, а это болезненная процедура. Для получения указанных параметров чувствительности и специфичности требуются неоднократные биопсии. Компания продолжает работать над применением метода для диагностики других форм рака.

В литературе много работ по анализу содержания тотальной сцДНК, отдельных генов, мтДНК в плазме и сыворотке крови [Mehra N. et al. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007, 13:421-426; Xia P. et al. (2009) Simultaneous quantitative assessment of circulating cell-free mitochondrial and nuclear DNA by multiplex real-time PCR. *Gen. Mol. Biology*, 32, 1, 20-24; <http://core-genomics.blogspot.ru/2014/12/extracting-cell-free-dna-from-plasma.html>; PLoS One. (2014) Mar 3; 9(3):e87838. doi: 10.1371/journal.pone.0087838. eCollection 2014]. В работе Xia P. et al. анализировали геномную и мтДНК у здоровых доноров. Главным недостатком вышеуказанной и аналогичных работ является выделение ДНК из плазмы крови. С тех пор как появились биохимические методы выделения нуклеиновых кислот, исследователям известно, что при выделении происходит потеря части ДНК и изменение соотношения генов. В компании Core Genomics сравнили киты разных фирм и определили, что потери составляют до 40% [<http://core-genomics.blogspot.ru/2014/12/extracting-cell-free-dna-from-plasma.html>]. Предпринимаются попытки оценивать содержание сцДНК у пациентов без предварительной амплификации [PLoS One. (2014) Mar 3;9(3):e87838. doi: 10.1371/journal.pone.0087838. eCollection 2014]. Но невозможно диагностировать заболевания только по количеству ДНК или определенного гена, так как концентрация ДНК в плазме крови у здоровых пациентов по данным этой работы варьирует в пределах 1.6-23.7 нг/мл, а у больных - в пределах 5.1-183 нг/мл.

Задачей настоящего изобретения является создание способа диагностики онкологических заболеваний на основании количественного анализа свободно циркулирующих нуклеиновых кислот в плазме крови без их предварительного выделения.

Задача решена созданием способа диагностики онкологического заболевания, включающего:

- а) получение образца плазмы крови у человека;
- б) изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот плазмы крови, которая проводится без предварительного выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови и проводится в одной пробирке с

плазмой крови, причем нуклеиновые кислоты плазмы крови включают геномную ДНК, митохондриальную ДНК, информационную РНК, транспортные РНК, микроРНК, нуклеиновые кислоты экзосом;

в) очистку нуклеиновых кислот из реакционной смеси, полученной по пункту б);

г) проведение количественного анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и определение коэффициента K_v в пробах:

$$K = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3},$$

$$\text{где } C_1 = \frac{Ct \text{ для гена, кодирующего фермент гликолиза}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_2 = \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_3 = \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

Ct - величина порогового цикла полимеразной цепной реакции;

д) сравнение коэффициента K с референсным значением;

е) диагностику заболевания при значении коэффициента K менее референсного значения, где референсное значение определяется как среднее значение коэффициента K , полученное при массовом обследовании населения.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что онкологическое заболевание выбрано из группы, включающей рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак поджелудочной железы, рак тимуса, рак предстательной железы, рак яичников, глиома мозга.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что заболеванием является рак молочной железы, а референсное значение равно 2.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что фрагмент митохондриальной ДНК выбран из группы митохондриальных генов, включающей ген транспортной РНК, ген 12S рРНК, ген 16S рРНК, ген субъединицы NADH-дегидрогеназы, ген субъединицы цитохромоксидазы, ген субъединицы АТФ-синтазы и ген цитохром С редуктазы.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что изотермическая амплификация нуклеиновых кислот плазмы крови проводится с использованием ДНК полимеразы phi29.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот плазмы крови проводят с использованием белка, связывающегося с одонитевой ДНК, трегалозы, случайных праймеров, детергента, дезоксинуклеозидтрифосфатов, хлористого магния.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что случайные праймеры представляют собой Random-7 thio.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот плазмы крови останавливают путем добавления в реакционную смесь этилендиаминтетраацетата.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что после остановки изотермической амплификации нуклеиновых кислот плазмы крови проводят выделение ДНК.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что выделение ДНК осуществляют следующим образом: добавляют в реакционную смесь протеиназу К, инкубируют реакционную смесь в течение 15 мин при температуре 55°C, обрабатывают реакционную смесь реагентом DNAzol® BD, осаждают ДНК изопропанолом и промывают ДНК этанолом.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что выделенную ДНК растворяют в ТЕ буфере и определяют ее концентрацию.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что ген, кодирующий фермент гликолиза, представляет собой ген, кодирующий пируваткиназу.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для гена пируваткиназы определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:1, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:2, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:3.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для гена пируваткиназы определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и

олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:1, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:2, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:3.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для фрагмента 12-й хромосомы NC_018923.2 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:4, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:5, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:6.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для фрагмента 12-й хромосомы NC_018923.2 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:4, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:5, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:6.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для гена M6PRBP определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:7, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:8, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:9.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для гена M6PRBP определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:7, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:8, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:9.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что митохондриальный ген представляет собой ген COX1.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для гена COX1 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:10, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:11, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что Ct для гена COX1 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:10, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:11, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:12.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что олигонуклеотидный зонд для детекции на 5'-конце содержит флуоресцентный краситель, на 3'-конце содержит гаситель флуоресценции.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что флуоресцентный краситель выбран из группы: JOE, FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5, HEX.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что гаситель флуоресценции выбран из группы: BHQ1, BHQ2, BHQ3, RTQ.

В частном случае выполнения способ диагностики онкологического заболевания характеризуется тем, что

$$K = \frac{\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для гена COX1}}}{3}.$$

Способ по изобретению обеспечивает достижение технического результата - диагностику заболевания, сопровождающегося повышенной гибелью клеток; диагностика при этом малоинвазивная, обладает высокой чувствительностью на любых стадиях заболевания, в том числе на ранних стадиях, при которых клинические симптомы отсутствуют. Кроме того, способ и набор по изобретению могут быть использованы:

при дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных опухолей, в том числе и на ранних стадиях, при которых ещё нет клинических симптомов;

для контроля качества проводимого лечения заболеваний, при которых происходит повышенная гибель клеток (мониторинг эффективности лечения);

при проведении клинических испытаний новых лекарственных препаратов;
для первичного скрининга пациентов на наличие заболеваний, сопровождающихся повышенной гибелью клеток в организме и появлении нуклеиновых кислот в плазме крови человека.

В настоящем изобретении использованы следующие термины и определения.

Нуклеиновые кислоты (НК) - к ним относится ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), РНК (рибонуклеиновая кислота), иРНК (информационная РНК, матричная РНК, мРНК), миРНК (микро РНК), тРНК (транспортная РНК), полинуклеотиды из органелл клетки: ядра, митохондрии, цитоплазмы клеток, экзосом, плазмы крови или олигонуклеотиды, синтезированные *in vitro*. Данный термин может означать как один вид НК, так и смесь различных видов НК, при этом в зависимости от контекста специалисту в данной области техники ясен смысл данного термина.

Гликолиз - метаболический путь, в котором глюкоза превращается до пирувата с помощью десяти ферментов: гексокиназа, фосфоглюкозо изомеразы, фосфофруктокиназа, фруктобифосфатадолаза, триозофосфат изомеразы, глицеральдегидфосфат дегидрогеназа, фосфоглицерат киназа, фосфоглицератмутаза, эндолаза и пируваткиназа.

Коэффициент К - соотношение C_t или среднее из соотношений C_t между фрагментами геномной ДНК и фрагментом митохондриальной ДНК, определяется следующим образом:

$$K = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3},$$

$$\text{где } C_1 = \frac{C_t \text{ для гена, кодирующего фермент гликолиза}}{C_t \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_2 = \frac{C_t \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{C_t \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_3 = \frac{C_t \text{ для гена M6PRB}}{C_t \text{ для митохондриального гена}},$$

фрагмент 12-й хромосомы - chr12 (43119006-43120809), NC_018923.2, (SEQ ID NO:13).

Автором настоящего изобретения экспериментально установлено, что у больных с заболеваниями, сопровождающимися повышенной гибелью клеток, коэффициент $K < 2.0$. У здоровых доноров крови коэффициент $K \geq 2.0$. В настоящее время исключений из данной закономерности пока не обнаружено. Поэтому автором настоящего изобретения данный коэффициент был назван "коэффициентом здоровья" (K_3).

C_t - аналитический сигнал, пороговый цикл, при котором величина цикла амплификации, на котором флуоресценция от расщепления олигонуклеотидного зонда для детекции превысила значение фоновой флуоресценции.

Референсное значение лабораторного показателя, в данном случае коэффициента К - среднее значение лабораторного показателя, в данном случае коэффициента К, полученное при массовом обследовании здорового населения.

Набор реагентов для осуществления способа - набор реагентов может представлять собой как "полный набор", так и "неполный набор". "Полный набор" представляет собой полный набор реагентов, необходимый для осуществления стадий способа по изобретению: получения образца плазмы крови у человека, изотермической амплификации нуклеиновых кислот плазмы крови, очистки нуклеиновых кислот из реакционной смеси, проведения количественного анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Реагенты, необходимые для осуществления каждой из стадий способа, известны специалисту в данной области техники. Реагенты для изотермической амплификации включают ДНК полимеразу *phi29*, белок, связывающийся с одностречевой ДНК, трегалозу, случайные праймеры, детергент, дезоксинуклеозидтрифосфаты, хлористый магний. Реагенты для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени включают олигонуклеотидные праймеры, олигонуклеотидные зонды для детекции, термостабильную ДНК-полимеразу, буферный раствор для полимеразной цепной реакции, дезоксинуклеозидтрифосфаты. Термостабильная ДНК-полимераза может представлять собой Taq-, Tth-, Tub-, Bst-, Vent-, Pfu-полимеразу или другую известную из уровня техники термостабильную ДНК-полимеразу. Например, может быть использована SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами. "Неполный набор" представляет собой набор реагентов, не включающий по меньшей мере один ингредиент полного набора, но включающий по меньшей мере две пары подходящих олигонуклеотидных праймеров и два подходящих олигонуклеотидных зонда для детекции.

Случайный праймер - олигонуклеотидный праймер (затравка), нуклеотидная последовательность которого выбрана случайно; используется для амплификации фрагментов нуклеиновых кислот с неизвестной последовательностью нуклеотидов. Могут использоваться следующие синонимы: рассеянный праймер, рэндом(ный) праймер [от англ. random primer], неспецифический праймер. Случайные праймеры могут быть модифицированными, например могут быть использованы случайные праймеры длиной 7 нуклеотидов, с 3'-S-S модификацией Random-7 thio Syntol (Синтол).

Автор настоящего изобретения назвал способ диагностики заболевания, сопровождающегося повышенной гибелью клеток: "АРНА" (Analysis Ratio Nucleic Acid, анализ соотношения нуклеиновых кислот).

Способ по изобретению состоит из шести последовательных стадий: получение образца плазмы крови у человека; изотермическая амплификация нуклеиновых кислот плазмы крови; очистка нуклеиновых кислот из реакционной смеси, полученной на предыдущей стадии; проведение количественного анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и определение коэффициента К в пробах; сравнение коэффициента К с референсным значением; и собственно диагностика заболевания, сопровождающегося повышенной гибелью клеток, если значение коэффициента К составляет менее референсного значения.

Стадия 1. Получение образца (пробы) плазмы крови у человека. Для анализа используется плазма крови человека. Кровь может быть отобрана как из вены, так и из пальца: требуется всего несколько капель крови, которые отбираются в пробирку с консервантом (например, ЭДТА, с концентрацией 10 мМ, или гепарином). Для предотвращения распада клеток пробирка с кровью до центрифугирования хранится при 4°C, и плазма должна быть получена из крови не позднее одного часа. Центрифугирование клеток крови проводится при 1 000 g в течение 10 мин. Аккуратно отбирается верхний слой, не касаясь интерфазы. Нарушение описанной процедуры приводит к распаду клеток крови в процессе выделения плазмы и ошибкам в анализе. До анализа плазма хранится в замороженном виде до 1 месяца при -20°C, до года при -80°C.

Стадия 2. Изотермическая амплификация нуклеиновых кислот плазмы крови. Данная амплификация осуществляется ДНК-полимеразой бактериофага phi29 без предварительного выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови и происходит в одной пробирке, что является одним из существенных признаков изобретения. Принципиально важно, что для синтеза в пробирке берутся нуклеиновые кислоты, имеющиеся в плазме на момент отбора крови у пациента, без искажений, которые происходят при биохимических методах выделения нуклеиновых кислот. Известно, что при использовании ионообменных колонок фрагменты нуклеиновых кислот связываются по-разному в зависимости от G-C состава. Также искажения происходят на стадии осаждения нуклеиновых кислот, так как короткие фрагменты нуклеиновых кислот (15-100 нуклеотидов) осаждаются спиртами с меньшим выходом. Фрагменты нуклеиновых кислот от 7 нуклеотидов и больше выполняют функцию праймирования в реакции амплификации. Эти параметры становятся существенными при работе с малыми количествами нуклеиновых кислот, 1 нг и меньше.

Амплификация нуклеиновых кислот осуществляется ДНК-полимеразой phi29 (NEB, cat.№ M0269L) в присутствии белка, связывающегося с однострочной ДНК (NEB, SSB protein cat.№ M0249S), трегалозы, случайных праймеров (представляющих собой модифицированные олигонуклеотиды длиной 7 нуклеотидов, с 3'-S-S модификацией Random-7 thio Syntol (Синтол)), устойчивых к экзонуклеазе, детергента (например, полиэтиленгликоль 8%, но можно использовать и другой подходящий детергент), дезокси-нуклеозидтрифосфатов (дНТФ, dNTP), хлористого магния и нуклеиновых кислот плазмы крови человека (табл. 1) и продолжается 16 ч при 30°C.

Таблица 1. Состав инкубационной смеси для синтеза ДНК.

Компонент	Объем
10 x буфер	10 мкл
1.35 мМ трегалоза	28 мкл
25 мМ дНТФ	10 мкл
Случайные праймеры, 0.5 мМ	3 мкл
10 мг/мл БСА	2 мкл
0.1 М ДТТ	1 мкл
Детергент (полиэтиленгликоль 50%)	8 мкл
Плазма крови	10 мкл
Белок SSB	1 мкл / 20 нг
Phi29 ДНК-полимераза	5 мкл/ 500 ед
Вода	до 100 мкл

Для денатурации нуклеиновых кислот приготовленная смесь инкубируется 2 мин при 95°C, затем пробирки переносятся в лед, добавляется ДНК-полимераза с белком SSB, и инкубация продолжается 16 ч при 30°C. В табл. 1 приведены оптимальные концентрации компонентов, которых достаточно для синтеза ДНК до 10 мкг. Увеличение концентрации фермента ДНК-полимеразы phi29, дНТФ и случайных праймеров способно увеличить выход ДНК, но синтезируемого количества ДНК достаточно для анализа

и большего количества не требуется.

Стадия 3. Очистка нуклеиновых кислот из реакционной смеси. Третья стадия заключается в остановке синтеза и очистке ДНК. Для остановки синтеза добавляется ЭДТА до 10 мМ, протеиназа К до 100 мкг/мл для расщепления всех белков в реакционной смеси и производится инкубирование при 55°C в течение 15 мин.

Дальнейшая очистка производится двумя объемами реагента DNAzol® BD (MRC, cat.№ DN129), осаждением 1,2 объемами изопропанола, дополнительной промывкой осадка 80% этанолом с последующим растворением в ТЕ буфере и определением концентрации ДНК. Концентрация ДНК определяется на флуориметре с флуоресцентной краской Hoechst или на спектрофотометре по оптической плотности при 260/280 нм.

Стадия 4. Проведение количественного анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и определение коэффициента К в пробах. Для проведения количественного анализа нуклеиновых кислот методом ПЦР в режиме реального времени (кПЦР, qPCR, real-time PCR) используется ДНК, полученная на стадии 3. Количественный анализ методом ПЦР проводится согласно стандартному протоколу компании Синтол (Syntol, кат.№ M-428). Детекция осуществляется с использованием зондов TaqMan, зонды подбираются в соответствии с рекомендациями компании Biosearch Technologies Inc. Состав реакционной смеси приведен в табл. 2, последовательности олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидных зондов для детекции приведены в табл. 3. Специалисту понятно, что данный набор олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидных зондов для детекции (количество и последовательности) является неограничивающим примером настоящей группы изобретений. Количество ДНК, равное 50 нг, является оптимальным для соотношений реагентов, указанных в табл. 2. Содержание ДНК, используемое в реакции, можно варьировать от нескольких нг до 0.5 мкг.

Таблица 2. Состав инкубационной смеси для количественного анализа методом ПЦР.

Компонент	Объем
10 x буфер	2.5 мкл
Хлористый магний, 25 мМ	2.5 мкл
дНТР, 2 мМ	2.5 мкл
Олигонуклеотидные праймеры, 10 пкмоль/мкл каждого	1 мкл
Олигонуклеотидный зонд для детекции, 10 пкмоль/мкл	0.5 мкл
SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами	0.1 мкл
ДНК	1-10 мкл
Вода	до 25 мкл

Таблица 3. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидных зондов для детекции.

Номер	Фрагмент ДНК	Функция	Последовательность*
SEQ ID NO:1	ген PKLR пируваткиназа, фермент гликолиза	праймер	GTCAGGGCTGCTCTGGGT
SEQ ID NO:2		праймер	TCACGCCTTCGTGGTTCTC
SEQ ID NO:3		зонд	5'FAM-CCGGAAGGACACGGCATCAAGA-3'BHQ1
SEQ ID NO:4	фрагмент 12-ой хромосомы NC_018923.2	праймер	TGCCGTCAACTCTCCAGTAAAC
SEQ ID NO:5		праймер	CCTGCAGCTGGCTTCTCAAAG
SEQ ID NO:6	chr12 (43119006-43120809)	зонд	5'FAM-CGCTCTCTGTTGCTGCCAGGAA-3'BHQ1
SEQ ID NO:7	ген M6PRBP	праймер	CGGTCACTACGGACTTTGTC
SEQ ID NO:8		праймер	ACCAAGGAGCTTGTGTCGTCTAAG
SEQ ID NO:9		зонд	5'FAM-TGTCCTTGGCGCTAGACACCA-3'BHQ1
SEQ ID NO:10		праймер	CAAACCACAAAGACATTGGAACACT
SEQ ID NO:11	ген COX1 митохондри- альный ген	праймер	CAGCTCGGCTCGAATAAGGA
SEQ ID NO:12		зонд	5'FAM-ATTTCGGCGCATGAGCTGGAGTC-3'BHQ1

* для зондов дополнительно приведены флуоресцентный краситель и гаситель флуоресценции.

Схема кПЦР следующая:

95°C / 5 мин + (95°C / 15 с + 62°C / 20 с + 72°C / 45 с) x 40 циклов.

На основании полученных значений C_t определяется коэффициент K_v в пробах:

$$K = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3},$$

$$\text{где } C_1 = \frac{C_t \text{ для гена, кодирующего фермент гликолиза}}{C_t \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_2 = \frac{C_t \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{C_t \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_3 = \frac{C_t \text{ для гена M6PRB}}{C_t \text{ для митохондриального гена}}.$$

Стадии 5 и 6. Сравнение коэффициента K с референсным значением и диагностика заболевания, сопровождающегося повышенной гибелью клеток, при значении коэффициента K менее референсного значения.

Диагностика заболевания, сопровождающегося повышенной гибелью клеток - рака молочной железы

Вышеописанным способом по изобретению были проанализированы образцы (пробы) плазмы крови, отобранные у здоровых доноров и больных раком молочной железы. Пробы были получены из Онкоцентра им. Блохина (г. Москва). Возраст женщин варьировался от 29 до 79 лет. Как видно из приведенных в табл. 4 данных, способ по изобретению и набор для его осуществления позволяют достоверно различать плазму здоровых доноров от плазмы больных раком молочной железы, независимо от стадии заболевания. Чувствительность метода достаточна для обнаружения заболевания и на 1-й стадии.

$$\text{Коэффициент } K = \frac{\frac{C_t \text{ для гена пируваткиназы}}{C_t \text{ для гена COX1}} + \frac{C_t \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{C_t \text{ для гена COX1}} + \frac{C_t \text{ для гена M6PRB}}{C_t \text{ для гена COX1}}}{3}$$

у больных варьируется от 1.2 до 1.6. В пробах BC24 и BC35 коэффициент равняется 1.9, у этих больных кровь для анализа взята после хирургической операции. Все здоровые доноры имеют коэффициент больше или равный 2.0. ($K \geq 2.0$). Точность метода составляет ± 0.1 . Подсчитана математическая ошибка

анализа ρ (ρ_0), для большинства проб она варьируется в интервале 1/10000 до 1/1000, что показывает надёжность метода. Возможно использование других статистических методов для обработки полученных данных.

Таблица 4.

$$\text{Значения } K = \frac{\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для гена COX1}}}{3}$$

и ρ для здоровых доноров и больных раком молочной железы.

	Здоровые Доноры	K	ρ	Больные раком молочной железы	K	ρ	Стадия заболевания
1	Д1	3,9	1,63E-04	BC2	1,5	4,00E-04	1
2	Д2	2,2	1,19E-03	BC4	1,6	4,00E-04	1
3	Д3	3,7	1,63E-04	BC5	1,5	4,00E-04	1
4	Д4	5,0	1,63E-04	BC6	1,5	4,00E-04	1
5	Д5	4,2	1,63E-04	BC7	1,6	4,00E-04	1
6	Д6	3,3	1,63E-04	BC1	1,5	4,00E-04	2A
7	Д7	3,2	1,63E-04	BC8	1,6	4,00E-04	2A
8	Д8	3,2	1,63E-04	BC9	1,6	2,74E-03	2A
9	Д9	2,4	1,63E-04	BC12	1,5	4,00E-04	2A
10	Д10	2,5	1,19E-03	BC13	1,6	2,74E-03	2A
11	Д11	2,3	1,63E-04	BC10	1,6	5,55E-03	2A
12	Д12	3,4	1,63E-04	BC11	1,2	4,00E-04	2A
13	Д13	2,5	1,63E-04	BC14	1,4	4,00E-04	2A
14	Д14	2,2	1,19E-03	BC25	1,4	4,00E-04	2A
15	Д15	3,0	1,63E-04	BC3	1,3	4,00E-04	3B
16	Д16	2,3	1,63E-04	BC15	1,4	4,00E-04	3
17	Д17	2,9	1,63E-04	BC36	1,6	4,00E-04	До операции
18	Д18	2,7	1,63E-04	BC37	1,5	4,00E-04	До операции
19	Д19	3,0	1,63E-04	BC38	1,5	4,00E-04	До операции
20	Д20	2,6	4,76E-03	BC39	1,6	4,00E-04	До операции
21	Д21	2,2	1,19E-03	BC16	1,6	2,74E-03	До операции
22	Д22	3,0	1,63E-04	BC20	1,3	4,00E-04	После операции
23	Д24	3,7	1,63E-04	BC24	1,9	3,70E-02	После операции + химиотерапия
24	Д27	2,9	1,63E-04	BC29	1,5	4,00E-04	После операции - 2A
25	Дп1	2,2	1,63E-04	BC32	1,6	4,00E-04	После операции
26	Дп2	2,0	1,63E-04	BC34	1,6	4,00E-04	После операции - 2A
27	Дп3	2,3	1,63E-04	BC35	1,9	4,00E-04	После операции - 2B
28	Дп4	2,4	1,63E-04				
29	Дп6	2,7	1,63E-04				

Для всех проб, приведенных в табл. 4, были определены также коэффициенты

$$\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}}, \quad \frac{\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для гена COX1}}}{2} \text{ и}$$

$$\frac{\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для гена COX1}}}{2}.$$

При этом, что примечательно, закономерность осталась прежней: у больных раком молочной железы коэффициенты K всегда составляли менее 2,0, у здоровых доноров крови коэффициенты K всегда составляли более 2,0 или были равны 2,0.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что способ и набор по изобретению позволяют обнаруживать заболевание, сопровождающееся повышенной гибелью клеток - рак молочной железы, с чувствительностью >97% на всех стадиях развития болезни (0 ошибок при выборке 27 истинно положительных образцов).

Диагностика заболевания, сопровождающегося повышенной гибелью клеток-гепатоза, и мониторинг эффективности лечения

Вышеописанным способом по изобретению был проанализирован образец (проба) плазмы крови, взятой из пальца у добровольца М-33, не имеющего клинических проявлений какого-либо заболевания. Неожиданно анализ крови добровольца показал

$$K = \frac{\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для гена COX1}}}{3} = 1.3.$$

Два повторных анализа показали тот же результат. В одной из клиник врачи диагностировали гепатоз печени у данного добровольца и рекомендовали ему лечение. Спустя два месяца после начала лечения анализ крови показал эффективность лечения и возвращение коэффициента в норму (K=2.5) (см. табл. 5).

Таблица 5. Изменение коэффициента

$$K = \frac{\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для гена COX1}}}{3}$$

при лечении больного гепатозом.

Дата	K	Примечания
23 мая 2014	1,3	
26 мая 2014	1,4	
26 мая 2014	1,3	Постановка диагноза – гепатоз печени
13 февраля 2015	1,3	Начало лечения
6 апреля 2015	1,6	
13 апреля 2015	2,5	

Этот пример демонстрирует возможность применения способа и набора по изобретению для диагностики заболевания, сопровождающегося повышенной гибелью клеток - гепатоза, на начальных стадиях, при которых отсутствуют клинические проявления, а также для мониторинга эффективности лечения.

Перечень последовательностей

<110> ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «БИОМАРКЕР-РУ» OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTYU «BIOMARKER-RU»		
<120> СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩЕГОСЯ ПОВЫШЕННОЙ ГИБЕЛЬЮ КЛЕТОК, И НАБОР ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ		
<130> 46602		
<150> RU2016103685		
<151> 2016-02-05		
<160> 13		
<210> 1		
<211> 18		
<212> ДНК		
<213> <i>Homo Sapiens</i>		
<400> 1		
gtcagggctg ctctgggt	18	
<210> 2		
<211> 19		
<212> ДНК		
<213> <i>Homo Sapiens</i>		
<400> 2		
tcacgccttc gtggttctc	19	
<210> 3		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> <i>Homo Sapiens</i>		
<400> 3		
ccggaaggac acggcatcaa ga	22	

<210> 4

<211> 22

<212> ДНК

<213> *Homo Sapiens*

<400> 4

tgccgtcaac tctccagtaa ac

22

<210> 5

<211> 21

<212> ДНК

<213> *Homo Sapiens*

<400> 5

cctgcagctg gcttctcaaa g

21

<210> 6

<211> 22

<212> ДНК

<213> *Homo Sapiens*

<400> 6

cgctctctgt tgctgccagg aa

22

<210> 7

<211> 20

<212> ДНК

<213> *Homo Sapiens*

<400> 7

cggtcactac ggactttgtc

20

<210> 8

<211> 24

<212> ДНК

<213> *Homo Sapiens*

<400> 8

accaaggagc ttgtgcgtc taag	24
<210> 9	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> <i>Homo Sapiens</i>	
<400> 9	
tgctcttggc gctagacacc a	21
<210> 10	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> <i>Homo Sapiens</i>	
<400> 10	
caaaccacaa agacattgga acact	25
<210> 11	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> <i>Homo Sapiens</i>	
<400> 11	
cagctcggct cgaataagga	20
<210> 12	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> <i>Homo Sapiens</i>	
<400> 12	
attcggcgca tgagctggag tc	22
<210> 13	
<211> 1804	
<212> ДНК	
<213> <i>Homo Sapiens</i>	

<400> 13

aatgaaatga atgacaaagt cccctaaaat aactatcagg gtctctccc tccacagtgg	60
aggagcccct ctctgtctca tgcttctctg acatggctcg cacatgctgc tggttgggtg	120
tgaagtagt atcctaggca gaagagtga ttgacaact tatatgttt caagtgttt	180
aaagtataaa ccacttagc gatggatctt ggaatgggtg aaattgtgt ttgtgaaata	240
agcactta ttaagattg aaatacccac aggaataact gagcctataa aatatgaaaa	300
ttcacatcaa cctgtaatga taaacatata tgaagtacac aacctgtaa gataagagta	360
tatcacatca acctgtaatg ataaaagtat atgaagtaca caaagcatg acttgagttt	420
acaagacttg tccagagagc acagaaaac acgtgctact gggttaattca gacaaatagc	480
tttgcttg ccttaattac ctacaatt caggactgag ctgggccatt ttaactgaa	540
tataattagg gtggttccct ttggtgtgt ggacctgggt atataatatg ttgtattca	600
attcctataa ttacaggca tatgagcagg cttaatattg taaagcagga tatggttct	660
ggaggatgcc agcatccacc cactaattga cctgctaaga accagcagca acatgctctc	720
cagttgtgtg ctggaggctg aattacaata aatacccaca tgagtgtctt atttagattt	780
gtccgattaa aaaaactcat gtacaaagct gatgagacct atgttagttg caggttaata	840
cttgctgatt tctgcccgc aactctccag taaacaagaa cgaaggcatg gccaggcgct	900
ctctgttct gccaggaagg gaggcttga gaagccagct gcagggcagg ggcattggcca	960
ggagcatgg tctggagcc agataattg gttgcactc ttgtttgga tacttctct	1020
cccttgacct tctgtcact atggaagcta gaccacagtt ttctcatcg caaaatagag	1080
gcaatgatgt ggttctcaca gatggtgtg agatacaagg cggcaagggt tgagactgct	1140
ccctataatt aagtcgttg catagaggaa aagactgggt ttgcaatcc cttactagg	1200
cagcatctg gtgggaattc tgagaaagga ccagtgagc ctatggccag tctctccaa	1260
ctgggatgg tgttagatt ccaaacaag agccagtggg cagcagaaaa gcaaagcact	1320
ggttctgac tgaggggcca ttgggcccc cgtgggagac agatcttaa taatgtttt	1380
aatgacagtt cctttcaat gtgggggaag tctgtactga gagaaactcg atgcctctgg	1440
cctcggggcg cagaattacc atgtatctt taatctcaag gaataaggag ctttagttca	1500
caacaaccct gtgcatctg tctaggcctc ctgctacact gtgttcaggt aatcacatca	1560
aatggagaaa tcagatagtt tctggctgat tcaaatgtc ctggctgaga ggcagaggag	1620
atgtcaacag agattcagg ctcatggaaa aacgctcagg tccagcttca tctgctgtt	1680
ccattcta t cagagaggtc ctctgtgggt cgtaagacaa gaaactagggt gtttaaagg	1740
ccctcaggaa ccagggacca aaatctggat ctgaggagca aaatgcttaa acaagctctg tctg	1804

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики онкологического заболевания, включающий:

- а) получение образца плазмы крови у человека;
- б) изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот плазмы крови, которая проводится без предварительного выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови и проводится в одной пробирке с плазмой крови, причем нуклеиновые кислоты плазмы крови включают геномную ДНК, митохондриальную ДНК, информационную РНК, транспортные РНК, микроРНК, нуклеиновые кислоты экзосом;
- в) очистку нуклеиновых кислот из реакционной смеси, полученной по пункту б);
- г) проведение количественного анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и определение коэффициента К в пробах:

$$K = \frac{C_1 + C_2 + C_3}{3},$$

$$\text{где } C_1 = \frac{Ct \text{ для гена, кодирующего фермент гликолиза}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_2 = \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

$$C_3 = \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для митохондриального гена}},$$

Ct - величина порогового цикла полимеразной цепной реакции;

- д) сравнение коэффициента К с референсным значением;
- е) диагностику заболевания при значении коэффициента К менее референсного значения, где референсное значение определяется как среднее значение коэффициента К, полученное при массовом обследовании населения.

2. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, где онкологическое заболевание выбрано из группы, включающей рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак поджелудочной железы, рак тимуса, рак предстательной железы, рак яичников, глиома мозга.

3. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, где заболеванием является рак молочной железы, а референсное значение равно 2.

4. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, где фрагмент митохондриальной ДНК выбран из группы митохондриальных генов, включающей ген транспортной РНК, ген 12S рРНК, ген 16S рРНК, ген субъединицы NADH-дегидрогеназы, ген субъединицы цитохромоксидазы, ген субъединицы АТФ-синтазы и ген цитохром С редуктазы.

5. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что изотермическая амплификация нуклеиновых кислот плазмы крови проводится с использованием ДНК полимеры phi29.

6. Способ диагностики онкологического заболевания по п.5, характеризующийся тем, что изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот плазмы крови проводят с использованием белка, связывающегося с одонитовой ДНК, трегалозы, случайных праймеров, детергента, дезоксинуклеозидтрифосфатов, хлористого магния.

7. Способ диагностики онкологического заболевания по п.6, характеризующийся тем, что случайные праймеры представляют собой Random-7 thio.

8. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что изотермическую амплификацию нуклеиновых кислот плазмы крови останавливают путем добавления в реакционную смесь этилендиаминтетраацетата.

9. Способ диагностики онкологического заболевания по п.8, характеризующийся тем, что после останковки изотермической амплификации нуклеиновых кислот плазмы крови проводят выделение ДНК.

10. Способ диагностики онкологического заболевания по п.9, характеризующийся тем, что выделение ДНК осуществляют следующим образом: добавляют в реакционную смесь протеиназу К, инкубируют реакционную смесь в течение 15 мин при температуре 55°C, обрабатывают реакционную смесь реагентом DNAzol® BD, осаждают ДНК изопропанолом и промывают ДНК этанолом.

11. Способ диагностики онкологического заболевания по п.10, характеризующийся тем, что выделенную ДНК растворяют в ТЕ буфере и определяют ее концентрацию.

12. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что ген, кодирующий фермент гликолиза, представляет собой ген, кодирующий пируваткиназу.

13. Способ диагностики онкологического заболевания по п.12, характеризующийся тем, что Ct для гена пируваткиназы определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:1, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:2, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:3.

ре на 90% последовательности SEQ ID NO:3.

14. Способ диагностики онкологического заболевания по п.13, характеризующийся тем, что Ct для гена пируваткиназы определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:1, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:2, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:3.

15. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что Ct для фрагмента 12-й хромосомы NC_018923.2 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:4, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:5, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:6.

16. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что Ct для фрагмента 12-й хромосомы NC_018923.2 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:4, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:5, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:6.

17. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что Ct для гена M6PRBP определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:7, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:8, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:9.

18. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что Ct для гена M6PRBP определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:7, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:8, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:9.

19. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, характеризующийся тем, что митохондриальный ген представляет собой ген COX1.

20. Способ диагностики онкологического заболевания по п.19, характеризующийся тем, что Ct для гена COX1 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:10, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:11, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность, гомологичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO:12.

21. Способ диагностики онкологического заболевания по п.20, характеризующийся тем, что Ct для гена COX1 определяют с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и олигонуклеотидного зонда для детекции, при этом один олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:10, второй олигонуклеотидный праймер имеет последовательность SEQ ID NO:11, олигонуклеотидный зонд для детекции имеет последовательность SEQ ID NO:12.

22. Способ диагностики онкологического заболевания по любому из пп.13-18, 20, 21, характеризующийся тем, что олигонуклеотидный зонд для детекции на 5'-конце содержит флуоресцентный краситель, на 3'-конце содержит гаситель флуоресценции.

23. Способ диагностики онкологического заболевания по п.22, характеризующийся тем, что указанный флуоресцентный краситель выбран из группы: JOE, FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5, HEX.

24. Способ диагностики онкологического заболевания по п.22, характеризующийся тем, что указанный гаситель флуоресценции выбран из группы: BHQ1, BHQ2, BHQ3, RTQ.

25. Способ диагностики онкологического заболевания по п.1, где

$$K = \frac{\frac{Ct \text{ для гена пируваткиназы}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для фрагмента 12-ой хромосомы NC_018923.2}}{Ct \text{ для гена COX1}} + \frac{Ct \text{ для гена M6PRBP}}{Ct \text{ для гена COX1}}}{3}.$$



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2