

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038921**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2021.11.10**

(21) Номер заявки

**201792405**

(22) Дата подачи заявки

**2016.05.18**(51) Int. Cl. **C12Q 1/68** (2006.01)**(54) ОБНАРУЖЕНИЕ ЦЕЛЕВОЙ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ВАРИАНТОВ**(31) **1550629-8**(32) **2015.05.18**(33) **SE**(43) **2018.07.31**(86) **PCT/EP2016/061121**(87) **WO 2016/184902 2016.11.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**САГА ДИАГНОСТИКС АБ (SE)**

(72) Изобретатель:

**Саал Лао Хаямидзу, Джордж Энтони Майлз (SE)**

(74) Представитель:

**Осипов К.В., Хмара М.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев А.С., Липатова И.И., Новоселова С.В., Дощечкина В.В. (RU)**(56) **US-A1-2012164652**

ZHOU W. ET AL.: "Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers", THE LANCET, THE LANCET PUBLISHING GROUP, GB, vol. 359, no. 9302, 19 January 2002 (2002-01-19), pages 219-225, XP004791874, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/50140-6736(02)07448-2 the whole document

LAURA MIOTKE ET AL.: "High Sensitivity Detection and Quantitation of DNA Copy Number

and Single Nucleotide Variants with Single Color Droplet Digital PCR", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 86, no. 5, 4 March 2014 (2014-03-04), pages 2618-2624, XP055109915, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac403843j the whole document

CHANG HSUEH-WEI ET AL.: "Digital single-nucleotide polymorphism analysis for allelic imbalance", METHODS IN MOLECULAR MEDICINE, vol. 103, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 137-141, XP009175591, ISSN: 1543-1894 the whole document

Guanshan Zhu ET AL.: "Highly Sensitive Droplet Digital PCR Method for Detection of EGFR-Activating Mutations in Plasma CelleFree DNA from Patients with Advanced NoneSmall Cell Lung Cancer", J Mol Diagn, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 265-272, XP055288095, Retrieved from the Internet: URL: [http://ac.els-cdn.com/S1525157815000392/1-s2.0-S1525157815000392-main.pdf?\\_tid=c2677f64-48da-11e6-b82e-00000aab0f6b&acdnat=1468401688\\_18c97cef9c3e2bf5261a21f4224849aa](http://ac.els-cdn.com/S1525157815000392/1-s2.0-S1525157815000392-main.pdf?_tid=c2677f64-48da-11e6-b82e-00000aab0f6b&acdnat=1468401688_18c97cef9c3e2bf5261a21f4224849aa) the whole document

SANCHEZ J. AQUILES ET AL.: "Two-temperature LATE-PCR endpoint genotyping", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 4 December 2006 (2006-12-04), page 44, XP021023580, ISSN: 1472-6750, DOI: 10.1186/1472-6750-6-44 the whole document

**WO-A1-03054233**

(57) Изобретение относится к высокочувствительным и специфическим способам обнаружения нуклеиновых кислот, которые, например, пригодны для обнаружения редких мутаций или для обнаружения малораспространенных вариантов в последовательностях нуклеиновых кислот. Способы включают асимметричную инкрементную полимеразную реакцию (АИПР) с последующей экспоненциальной полимеразной цепной реакцией (ЭПЦР).

**B1****038921****038921****B1**

### Область техники

Данное изобретение относится к области способов обнаружения нуклеиновых кислот. Способы по изобретению являются высокочувствительными и специфическими и, таким образом, пригодны, например, для обнаружения редких мутаций или для обнаружения редко встречающихся вариантов в последовательностях нуклеиновых кислот.

### Уровень техники

Обнаружение нуклеиновых кислот, присутствующих в очень малых количествах и/или с низкой частотой, желательно для многих сфер применения. Обнаружение мутаций гена, например, существенно для множества заболеваний, таких как цистозифроз, серповидно-клеточная анемия и раковые заболевания. Все шире признается, что необходимы исключительно чувствительные и специфические способы обнаружения мутаций, в частности, для образцов с низким уровнем на входе, таких как циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК) и анализ отдельных клеток. Существующие на сегодняшний день традиционные способы страдают рядом недостатков, включая требование большого количества ДНК во входящих образцах, высокую стоимость анализа образца, сложные и трудоемкие рабочие процессы, недостаточную чувствительность и/или специфичность, а также неспособность обнаруживать мутантные последовательности ДНК с низкой распространенностью на фоне высокой распространенности нормальной последовательности дикого типа (так называемая фракция мутантного аллеля, ФМА). Почти все способы обнаружения мутаций основаны на амплификации ДНК с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) для экспоненциального копирования представляющих интерес областей целевой ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Если целью является провести различие между нормальной последовательностью дикого типа и вариантом (мутантной) последовательностью, которая может отличаться всего лишь одним нуклеотидным основанием, точность действия фермента ДНК-полимеразы может налагать значительные ограничения на способность различать (влияя на большинство показателей эффективности обнаружения мутаций). Каждому полимеразному ферменту присуща некоторая частота ошибок встраивания основания для каждой возможной неправильной замены основания, обычно в диапазоне от 0,5 до 300 ошибок на миллион пар амплифицированных оснований (т.е. от  $5 \times 10^{-7}$  до  $3 \times 10^{-4}$ ). Для многих сфер применения такие ошибки встраивания полимеразой одного основания являются допустимыми. Например, если доступно огромное количество ДНК, а ФМА является умеренной или высокой, например  $>10$ -20%, может быть достаточно обычной ПЦР. Однако в случае применения, связанного с обнаружением редко встречающихся вариантов, существует потребность в сверхчувствительных способах обнаружения, которые позволяли бы отличить истинно положительную мутацию от ложноположительной, связанной с ошибкой полимеразы. Тесты на обнаружение мутаций в данное время имеют предел обнаружения 10-20% ФМА (секвенирование Sanger), 5-10% ФМА (пиросеквенирование), 1-5% ФМА (секвенирование следующего поколения) и 0,1% ФМА (цифровая ПЦР, COLD-ПЦР, ультра-глубокое секвенирование следующего поколения).

Цифровая ПЦР представляет собой способ, при котором реакционную смесь ПЦР разделяют на множество индивидуальных реакционных смесей меньшего размера, таким образом, что каждая часть реакционной смеси содержит от нуля до очень небольшого количества молекул с целевой последовательностью. Разделение всех молекул является случайным и описывается распределением Пуассона. Деление на части преобразует ситуацию чрезвычайно низкой относительной распространенности редкого варианта последовательности среди обилия последовательности дикого типа в ситуацию, когда в большинстве частей будет содержаться только последовательность дикого типа, а в некоторых частях редкий вариант будет присутствовать с очень высокой относительной встречаемостью по сравнению с последовательностью дикого типа. Результатом является повышение чувствительности для обнаружения редких вариантов последовательности путем разбавления последовательности дикого типа в каждой части. Тем не менее, ошибка полимеразы по-прежнему представляет собой существенную проблему, даже для цифровой ПЦР, при которой могут возникать ложноположительные результаты, что отрицательно влияет на различающую способность и пределы обнаружения.

Различные способы обогащения и обнаружения минорных аллелей и мутаций на основе ПЦР описаны, например, Milbury et al., Clin Chem. 2009 Apr; 55(4): 632-640, однако ни один из этих способов не является чрезвычайно высокочувствительным и простым в исполнении.

### Краткое описание сущности изобретения

Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в чрезвычайно высокочувствительных способах обнаружения редко встречающихся нуклеиновых кислот с очень низкой частотой ложноположительных результатов.

Авторы изобретения обнаружили, что в способах с применением стандартной ПЦР частота ошибок ДНК-полимеразы создает барьер для производительности, связанный с пределом обнаружения, поскольку по мере экспоненциальной амплификации ДНК до количеств, измеряемых миллиардами копий, во многие копии ДНК случайно вводятся ошибки, включая ложную генерацию представляющих интерес вариантов последовательности, причем эти ошибки копируются и амплифицируются.

Кроме того, максимально достижимая чувствительность в анализе методом стандартной цифровой ПЦР ограничена точностью полимеразного фермента, применяемого в реакции. Если последователь-

ность дикого типа неправильно копируется полимеразой, то может возникнуть копия, несущая ложную мутантную последовательность, и результат такой реакции будет считан как положительный для целевой мутантной последовательности. В зависимости от того, сколько циклов ПЦР выполняется и на каком цикле вводится ложная мутантная последовательность, сигнал может быть неотличим от истинно положительного сигнала, и таким образом он будет считан как ложноположительный. Если указанное событие ошибки полимеразы происходит в позднем цикле ПЦР, истинно положительные сигналы уже сделают "рывок на старте" относительно потенциальных ложноположительных сигналов, и может существовать возможность провести различие между истинно положительными и ложноположительными сигналами.

Способы по изобретению надежно дают истинно положительные реакции, обладая преимуществом согласованного сигнала по сравнению с любыми потенциальными ложноположительными реакциями.

Таким образом, в изобретении предлагается способ, который способен противодействовать последствиям ошибок полимеразы, чтобы повысить производительность анализа, по меньшей мере, на порядок. Способы по изобретению позволяют достичь чрезвычайно высокой чувствительности и специфичности, просты в исполнении и относительно недорогие.

В данном изобретении предлагаются чрезвычайно высокочувствительные способы обнаружения редко встречающихся нуклеиновых кислот с очень низкой частотой ложноположительных результатов. Способы по изобретению обычно состоят из стадии асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР) с применением высокой температуры отжига, за которой следует более традиционная стадия симметричной ПЦР с применением более низкой температуры отжига, причем обе проводятся в условиях разделенных реакционных смесей, таких как цифровая капельная ПЦР.

Способы амплификации нуклеиновых кислот с применением анализов на основе ПЦР с применением праймеров с различными температурами плавления ( $T_{пл}$ ) известны из уровня техники. Например, в WO 2006/094360 описана одна ПЦР с закрытой трубкой, в которой выполняются две последовательные симметричные ПЦР. В первом раунде нуклеиновая кислота в представляющем интерес локусе специфически амплифицируется с применением меченых локус-специфических праймеров, подходящих для выполнения исчерпывающей ПЦР. Во втором раунде продукт амплификации первого раунда амплифицируют с применением меченых праймеров с более низкой  $T_{пл}$ , чем у меченых локус-специфических праймеров.

Благодаря высокой чувствительности и специфичности способы по изобретению пригодны для обнаружения редко встречающихся последовательностей нуклеиновых кислот. В частности, эти способы пригодны для обнаружения редких одноосновных вариантов среди большого количества аллеля дикого типа и пригодны даже в случаях образцов с низким уровнем на входе, как это может быть в случае циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) в плазме крови пациента.

Способы по изобретению обычно состоят из стадии асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР), за которой следует более традиционная стадия симметричной ПЦР. На стадии АИПР в общем случае копируется только одна нить последовательности целевой нуклеиновой кислоты, что приводит к появлению множества матриц для традиционной симметричной ПЦР. Таким образом, если обычная ПЦР в принципе является экспоненциальной амплификацией, то АИПР в принципе является линейной амплификацией. Для амплификации любой заданной целевой последовательности конструируются, по меньшей мере, два праймера, фланкирующие представляющую интерес последовательность, таким образом, что один праймер (в данном документе носит название "праймер-Н") имеет очень высокую температуру плавления ( $T_{пл}$ ), а другой праймер с противоположной нитью и ориентацией, имеет гораздо меньшую  $T_{пл}$  ("праймер-Л"). Две стадии (АИПР и ПЦР) отличаются условиями термоденатурации и праймерами, которые функционально активны в ходе каждой стадии.

На стадии АИПР целевая однонитевая последовательность копируется полимеразой, которая праймируется с применением олигонуклеотидного праймера-Н, комплементарного одному концу целевой последовательности, представляющей интерес, причем за термический цикл синтезируется только одна копия (например, последовательность, комплементарная матричной). Обычно это достигается путем термической денатурации: 1) до температуры денатурации ДНК с образованием однонитевых молекул; 2) до температуры, позволяющей отжиг праймера-Н для праймирования однонаправленного копирования целевой последовательности, представляющей интерес, с помощью ДНК-полимеразы, притом, что эта температура, не позволяет отжиг праймера-Л; 3) до температуры, позволяющей элонгировать синтезированную ДНК-полимеразой нить, но при которой праймер-Л все еще не может отжигаться; 4) повторения стадий 1-3 по мере необходимости в повторяющихся циклах, с одной дополнительной комплементарной копией, синтезирующейся за цикл, которая праймируется и удлиняется из праймера-Н. Синтезированная копия представляет собой комплемент Ватсона-Крика к однонитевой последовательности, к которой отжигается праймер-Н, и, следовательно, каждая синтезированная копия не становится матрицей для дальнейшей амплификации во время любых термических циклов стадии АИПР. От нескольких до очень многих раундов АИПР с копированием только в одном направлении выполняются путем денатурации в описанных выше термических условиях, причем только однонаправленный праймер-Н способен отжигать и удлиняться для синтеза нити нуклеиновой кислоты. Следовательно, из каждой оригинальной одноните-

вой матрицы в каждом термическом цикле генерируется одна комплементарная целевая последовательность, таким образом, что, например, после того, как выполняется количество  $X$  асимметричных циклов, будут существовать  $X$  новых комплементарных молекул ДНК в конце стадии для каждого количества  $Y$  односторонних исходных матричных молекул в части (общее количество новых комплементарных молекул ДНК в части реакционной смеси, таким образом, будет составлять  $X \times Y$ ). Например, после 64 циклов с одной-единственной односторонней целевой матрицей в части реакционной смеси будет присутствовать одна односторонняя матрица плюс  $1 \times 64 = 64$  комплементарных копии в части. С очень большой вероятностью подавляющее большинство этих новых молекул будет точной комплементарной копией исходной матричной молекулы, поскольку частота ошибок полимеразы низкая (от 0,5 до 300 ошибок на миллион амплифицированных пар оснований), а синтезируется только, например, 64 копии длиной от нескольких десятков до нескольких тысяч пар оснований каждая. Даже в том случае, если происходит ошибка полимеразы во время одного из этих циклов АИПР в части реакционной смеси, которая содержала только одну молекулу целевой последовательности дикого типа и 0 мутантных целевых последовательностей, в начале одного из этих циклов АИПР из 64 новых молекул ДНК, только 1 была бы мутантной среди 63 немутантных. Указанная целевая последовательность, возникшая в результате ошибки, была бы потенциально проблематичной, если бы она возникла точно в том положении последовательности, которое представляет наибольший интерес, но она не может создать проблему, если она возникла в другом положении. И наоборот, в истинно положительной части реакционной смеси, которая начиналась с 1 данной мутантной молекулы целевой последовательности и 0 целевых последовательностей дикого типа, присутствовали бы 64 новых мутанта, содержащих молекулы ДНК, в том числе чрезвычайно редко, на 63 новых мутанта, присутствовала бы 1 ложная молекула дикого типа. Таким образом, в реакции цифровой ПНР истинно положительные части реакционной смеси будут содержать от 62 до 64 дополнительных целевых мутантных молекул по сравнению с редко встречающейся частью реакционной смеси, которая теперь содержит ложноположительную мутантную последовательность из-за ошибки полимеразы. После этой стадии АИПР начинается традиционная стадия симметричной ПЦР, и истинно положительные части реакционной смеси будут содержать эквивалент приблизительно  $\log_2(X)$  циклов "рывок на старте" в показателях молекулярных копий по сравнению с ложноположительными частями реакционной смеси. Другими словами, в приведенном выше примере с  $X = 64$  асимметричных цикла истинно положительные части реакционной смеси будут содержать приблизительно  $\log_2(64) = 6$  циклов "рывка на старте".

В системе цифровой ПЦР с применением флуоресцентных зондов с гашением, комплементарных целевой последовательности, представляющей интерес, которые отжигают свою целевую последовательность и чей флуорофор расщепляется и, таким образом, не гасится экзонуклеазной активностью полимеразы, при этом высвобождаемые флуорофоры накапливаются в части реакционной смеси и усиливают ее флуоресцентный сигнал. Обычная ПЦР продолжается до тех пор, пока истинно положительный сигнал не станет заметным, тогда как ложноположительный сигнал по-прежнему отстает на некоторое количество циклов. Предусмотрен порог для разделения двух сигналов. Дополнительно можно применять другие способы обнаружения продукта обычной ПЦР.

На фиг. 1 представлен обзор способа согласно одному варианту реализации изобретения.

Один из способов достигнуть однонаправленного копирования только одной матричной нити в ходе асимметричной стадии, избегая копирования в противоположном направлении (противоположная нить), заключается в том, чтобы вводить только один праймер на стадии АИПР и добавлять второй праймер в начале стадии симметричной ПЦР. Однако большинство основанных на разделении способов цифровой ПЦР в данное время не позволяет добавлять реагенты после разделения, например, трудно добавить реагенты в реакционные капли в цифровой капельной ПЦР (цкПЦР).

В одном варианте реализации данного изобретения предлагается способ разработки анализа с конструированием праймеров, которые позволяют проводить АИПР при наличии в реакционной смеси обоих праймеров путем применения пар праймеров со значительно отличающейся температурой плавления. Праймер с высокой  $T_{пл}$  (праймер-Н) конструируется для одной нити на конце целевой последовательности, представляющей интерес, а праймер с низкой  $T_{пл}$  (праймер-Л) конструируется для другой нити на другом конце целевой последовательности, представляющей интерес. Кроме того, способы включают средства для обнаружения конкретных аллелей. Указанными средствами могут быть, например, аллель-специфические зонды, расположенные над вариантным основанием. Стадию АИПР проводят при очень высокой температуре, при которой праймер-Н с высокой  $T_{пл}$  способен эффективно отжигать, а праймер-Л с низкой  $T_{пл}$  не способен. Стадию обычной симметричной ПЦР проводят при более низкой температуре, при которой праймер-Л с низкой  $T_{пл}$  и праймер-Н с высокой  $T_{пл}$  способны эффективно связываться с конкретной матрицей. Если в системе применяются аллель-специфические зонды, то они предпочтительно сконструированы таким образом, чтобы связывание происходило при или ниже низкой температуры отжига.  $T_{пл}$  праймеров и, следовательно, активность в ходе двух стадий можно регулировать с помощью длины праймера, введением сконструированных рассогласований в последовательность праймера и/или модификацией праймеров (например, с применением вариантных нуклеотидов, таких как запертая нуклеиновая кислота [ЗНК], или других олигонуклеотидных модификаций, таких как добавление

агента связывания с малой бороздкой [СМБ]). Крайне важно, чтобы активность праймера-L подавлялась во время стадии асимметричной АИПР, потому что всякий раз, когда происходит связывание и элонгацию праймера с низкой  $T_{пл}$ , происходит симметричное копирование обеих нитей, что увеличивает количество субстрата для потенциальных ошибок полимеразы, которые затем будут распространяться в ходе каждого последующего цикла. Из-за этого предпочтительной схемой анализа с точки зрения избегания ложноположительных результатов является схема с большой разницей между температурой отжига асимметричной стадии и температурой плавления праймера с низкой  $T_{пл}$ .

Таким образом, в одном аспекте изобретения предлагаются способы обнаружения присутствия последовательности целевой нуклеиновой кислоты или обнаружения присутствия варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты в образце, причем способы включают стадии:

- a) обеспечение образца, содержащего матричные нуклеиновые кислоты
- b) обеспечение набора праймеров, содержащего, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-L, и при этом температура плавления праймера-Н, по меньшей мере на 15°C выше, чем температура плавления праймера-L, и при этом праймер-L содержит последовательность, комплементарную фрагменту продукта элонгации праймера-Н,
- c) обеспечение полимеразы нуклеиновой кислоты, обладающей полимеразной активностью при температуре элонгации,
- d) получение разделенных реакционных смесей ПЦР, каждая из которых содержит часть образца, набор праймеров, полимеразу нуклеиновой кислоты, реагенты для ПЦР и необязательно детекторные реагенты,
- e) проведение асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР), включающей стадии:
  - i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы
  - ii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, что позволяет отжигать праймер-Н, но не праймер-L,
  - iii) необязательная инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре элонгации,
  - iv) необязательное повторение стадий i-iii,
  - v) с амплификацией таким образом только одной нити последовательности целевой нуклеиновой кислоты;
- f) проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающей стадии:
  - 1) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы,
  - 2) инкубация ПЦР при низкой температуре отжига, что позволяет отжигать как праймер-Н, так и праймер-L,
  - 3) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию всех отоженных праймеров,
  - 4) необязательное повторение стадий ii-iv,
  - 5) с амплификацией таким образом обеих нитей последовательности целевой нуклеиновой кислоты и получением продукта ПЦР;
- g) обнаружение присутствия в продукте ПЦР последовательности целевой нуклеиновой кислоты или варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлен обзор способа ИДСПУК. На фиг. 1А проиллюстрирована ситуация, когда присутствует мутантная матрица. В ходе стадии АИПР генерируются комплементарные копии мутантных последовательностей. Температура поддерживается достаточно высокой, чтобы праймер-L и зонды не отжигались. На симметричной стадии мутантная ДНК экспоненциально амплифицируется. На фиг. 1В проиллюстрирована ситуация, когда присутствует матрица дикого типа, но возникает ошибка полимеразы. В ходе АИПР генерируется несколько копий последовательности дикого типа и только одна копия ошибочной мутантной последовательности. Температура поддерживается достаточно высокой, чтобы праймер-L и зонды не отжигались. На симметричной стадии ДНК дикого типа и ошибочная мутантная ДНК экспоненциально амплифицируются, однако, поскольку в начале экспоненциальной фазы присутствовало намного больше копий ДНК дикого типа, количество ДНК дикого типа значительно превосходит количество мутантной ДНК.

На фиг. 2 проиллюстрированы два конкретных примера схемы анализа для двух целевых последовательностей, представляющих интерес, обе в онкогене RPS3CA: вариант H1047R, расположенный на кодоне 3140 с заменой нуклеотида А на G (верхняя панель), и вариант E542K, расположенный на кодоне 1624 с заменой нуклеотида G на А (нижняя панель).

На фиг. 3 представлены графики цифровой капельной ПНР. На фигуре проиллюстрирован сигнал мутантной ДНК, полученный в результате анализов мутации PrimePCR™ (левая панель) и ИДСПУК (правая панель) для варианта RPS3CA H1047R (верхняя панель) и варианта RPS3CA E542K (нижняя панель). Капельки (ось X) обозначаются как точки соответственно их интенсивности флуоресценции (ось

У). Необходимо отметить отсутствие ложноположительных капелек в лунках отрицательного контроля при применении способа ИДСПУК (представлены в прямоугольниках в верхнем правом углу каждой диаграммы) по сравнению с анализом мутации PrimePCR™.

На фиг. 4 проиллюстрирована экспериментальная схема анализа - схема анализа, направленного на РПС3СА с.3140А>G (H1047R) с альтернативными версиями Праймера-Н (бета 1 и бета 2). Праймер-Н бета 1 короче и, следовательно, имеет более низкую температуру плавления, чем Праймер-Н бета 2. Зонды, применяемые в этом анализе, представляют собой обычные зонды TaqMan® СМБ (Applied Biosystems), содержащие 5' репортерный краситель (FAM или HEX), 3' нефлуоресцентный гаситель и 3' агент связывания с малой бороздкой, присоединенный к молекуле гасителя.

На фиг. 5 проиллюстрированы графики мутантного (специфического) сигнала, демонстрирующие влияние АИПР на ложноположительный сигнал. Применялась экспериментальная схема анализа, проиллюстрированная на фиг. 4, включающая праймер-Н бета 1 или бета 2 вместе с праймером-L, причем специфический для мутаций и специфический для дикого типа зонды (см. фиг. 4) вводили в реакцию с применением содержащей положительную мутацию матричной ДНК (не показан; все анализы выявляли мутацию) и матрицы дикого типа без АИПР (А), с АИПР при более низкой (67°C) температуре (В) и с АИПР при более высокой (74°C) температуре (С). Панели D, E и F иллюстрируют мутантный (специфический) сигнал и отсутствие ложноположительных сигналов при применении различных температур отжига АИПР и температур симметричного отжига; (D) анализ ИДСПУК для мутации РПС3СА E542K. В этом примере АИПР проводили с температурой отжига 75°C и симметричной стадией с температурой отжига 46°C; (E) анализ ИДСПУК для мутации E545K в РПС3СА. В этом примере АИПР запускается с температурой отжига 75°C и симметричной стадией с применением температуры отжига 46°C; (F) анализ ИДСПУК для мутации NRAS Q61R, включающий АИПР с применением температуры отжига 73°C и симметричной стадии с применением температуры отжига 48°C.

На фиг. 6 проиллюстрирован пример сравнения предела обнаружения - представлена частота мутантного аллеля по данным измерения с помощью анализов мутации PrimePCR™ (левая панель) и ИДСПУК (правая панель) для варианта РПС3СА H1047R (верхняя панель и нижняя панель) и варианта РПС3СА E542K (средняя панель). Верхняя и средняя панели демонстрируют результаты анализов с применением матричной ДНК, содержащей 0, 0,01, 0,1 и 1% мутантной ДНК (остальное - дикий тип), тогда как нижняя панель иллюстрирует результаты анализов с применением матричной ДНК, содержащей 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10% мутантной ДНК. Ложноположительные сигналы в анализе мутации PrimePCR™ показывают, что результатам для 0,01% ФМА нельзя доверять (перекрываются с отрицательным контролем), и, следовательно, нижний предел обнаружения составляет 0,1%. Напротив, в анализе ИДСПУК результат для 0,01% ФМА является надежным, и даже при 0,001% результаты являются надежными. Нижний предел обнаружения еще предстоит полностью протестировать, но, скорее всего, в зависимости от анализа он будет значительно ниже чем 0,001%.

На фиг. 7 проиллюстрированы схема анализа (А) и результаты (В) для способа по изобретению с применением модифицированного рассогласованием праймера-L, направленного на мутацию KRAS G13D.

## Подробное описание сущности изобретения

### Определения

**Амплификация:** амплификация нуклеиновой кислоты представляет собой генерацию копий указанной нуклеиновой кислоты. Термин "пара праймеров, способных амплифицировать целевую нуклеиновую кислоту" означает в данном документе, что при введении указанной пары праймеров в реакцию ПЦР вместе с целевой нуклеиновой кислотой, нуклеотидами и полимеразой нуклеиновой кислоты, указанная ПЦР будет приводить к образованию целевой нуклеиновой кислоты.

**Около:** Термин "около" в данном документе означает  $\pm 10\%$ , предпочтительно  $\pm 5\%$ , например, до  $\pm 1\%$ .

**Температура денатурации:** температура денатурации представляет собой температуру, позволяющую денатурировать все молекулы ДНК в образце и/или в реакционных смесях ПЦР и/или АИПР с получением в результате денатурации одонитевых молекул. Температура денатурации предпочтительно является достаточно низкой, чтобы гарантировать, что полимеразы нуклеиновой кислоты не будут необратимо денатурированы. Обычно температура денатурации представляет собой температуру в диапазоне от 90 до 99°C, например, в диапазоне от 92 до 97°C, например, в диапазоне от 94 до 95°C.

**Температура элонгации:** температура элонгации представляет собой температуру, при которой возможна ферментная активность полимеразы нуклеиновой кислоты. Обычно полимеразы нуклеиновой кислоты проявляет активность в диапазоне температур, и, таким образом, температура элонгации может быть любой температурой в этом диапазоне. Большинству полимераз нуклеиновых кислот свойственна оптимальная температура, тем не менее, они сохраняют активность при других температурах, отличающихся от оптимальной. В таких случаях температура элонгации может быть любой температурой, при которой полимеразы нуклеиновой кислоты проявляет активность, даже если указанная температура не является оптимальной температурой. Выражение "полимераза нуклеиновой кислоты проявляет полиме-

разную активность при температуре элонгации" в данном документе означает, что полимеразы нуклеиновой кислоты способна катализировать синтез новой нити нуклеиновой кислоты, комплементарной матричной нити, при температуре элонгации. В некоторых вариантах реализации изобретения температура элонгации близка к температуре плавления праймера-Н. Таким образом, может быть выбрана полимеразы нуклеиновой кислоты, которая проявляет полимеразную активность при температуре около температуры плавления праймера-Н, и/или праймер-Н может быть сконструирован таким образом, чтобы его температура плавления была близка к температуре элонгации. Термин "близкая температура", используемый в этой связи, может означать, например, нахождение в пределах  $\pm 5^\circ\text{C}$ , например  $\pm 2^\circ\text{C}$ , например  $\pm 1^\circ\text{C}$  от указанной температуры. Обычно температура элонгации составляет от  $65$  до  $80^\circ\text{C}$ , например, в диапазоне от  $68$  до  $75^\circ\text{C}$ .

Температура плавления: температура плавления праймера представляет собой температуру, при которой 50% праймера образует стабильную двойную спираль с комплементарной ему последовательностью, а остальные 50% разделяются на одонитевые молекулы. Температура плавления может дополнительно обозначаться как  $T_{пл}$ . Предпочтительно  $T_{пл}$  в данном документе вычисляют с применением метода ближайшего соседа на основе способа, описанного в Breslauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986), с применением показателя концентрации соли 50 мМ и концентрации праймера 900 нМ. Например, указанный метод реализован в программном обеспечении "Multiple Primer Analyzer" производства Life Technologies/Thermo Fisher Scientific Inc.

Термин "пара праймеров, способных амплифицировать целевую нуклеиновую кислоту" в данном документе означает, что при введении указанной пары праймеров в реакцию ПНР вместе с целевой нуклеиновой кислотой, нуклеотидами, полимеразой нуклеиновой кислоты и другими реагентами для ПЦР, то указанная ПЦР будет приводить к образованию целевой нуклеиновой кислоты. Один праймер из пары праймеров будет прямым праймером, тогда как другой будет обратным праймером. Если праймер-Н является прямым праймером, то праймер-Л предпочтительно представляет собой обратный праймер и наоборот.

Реагенты для ПЦР: реагенты для ПЦР представляют собой реагенты, которые добавляют к реакционной смеси ПЦР в дополнение к полимеразе нуклеиновой кислоты, образцу и набору праймеров. Реагенты для ПЦР, по меньшей мере, содержат нуклеотиды. В дополнение, реагенты для ПЦР могут содержать другие соединения, такие как соль(и) и буферное(ые) вещество(а).

Праймер-Н и праймер-Л: праймер-Н представляет собой праймер с высокой температурой плавления, тогда как праймер-Л представляет собой праймер с низкой температурой плавления.

Набор праймеров: набор праймеров содержит два или более разных праймеров. Набор праймеров содержит, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать целевую нуклеиновую кислоту. Кроме того, набор праймеров по изобретению содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-Л. Таким образом, в вариантах реализации изобретения, в которых набор праймеров содержит только два разных праймера, набор праймеров содержит праймер-Н и праймер-Л, причем праймер-Н и праймер-Л способны амплифицировать целевую нуклеиновую кислоту.

Целевая нуклеиновая кислота: любая последовательность нуклеиновой кислоты, присутствие которой желательно обнаружить. Целевая нуклеиновая кислота может представлять собой, например, последовательность нуклеиновой кислоты, связанную с клиническим состоянием.

#### **Способ обнаружения варианта последовательности или целевой нуклеиновой кислоты**

Данное изобретение относится к способам обнаружения присутствия варианта последовательности в целевой нуклеиновой кислоте в образце.

Такие способы могут быть пригодны для обнаружения присутствия варианта последовательности в образце, который может содержать смесь целевых нуклеиновых кислот, где только часть целевых нуклеиновых кислот может содержать вариант последовательности. В частности, способы пригодны для обнаружения присутствия варианта последовательности в образце, содержащем целевые нуклеиновые кислоты, из которых только незначительная часть потенциально может содержать вариант последовательности.

Указанный вариант последовательности может представлять собой любой вариант последовательности, который желательно обнаружить. Например, вариант последовательности может быть связан с клиническим состоянием, описанным более подробно ниже в разделе "Способ прогнозирования наличия клинического состояния". В частности, вариант последовательности может представлять собой любой из вариантов последовательности, описанных ниже в разделе "Вариант последовательности и последовательность целевой нуклеиновой кислоты".

Образец может быть любым образцом, в котором желательно обнаружить присутствие указанного варианта последовательности. Например, если вариант последовательности указывает на клиническое состояние, то образец может быть образцом из организма индивидуума, подверженного риску развития указанного клинического состояния.

В данном изобретении также предлагаются способы обнаружения присутствия последовательности целевой нуклеиновой кислоты в образце.

Такие способы могут быть пригодны для обнаружения того, присутствует ли в образце последова-

тельность целевой нуклеиновой кислоты. Указанный образец может содержать смесь матричных нуклеиновых кислот, потенциально содержащих последовательность целевой нуклеиновой кислоты. В частности, способы пригодны для обнаружения присутствия последовательности целевой нуклеиновой кислоты в образце, который потенциально может содержать очень низкий уровень указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

Указанная последовательность целевой нуклеиновой кислоты может быть любой последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, которую желательно обнаружить. Например, присутствие последовательности целевой нуклеиновой кислоты может быть связано с клиническим состоянием, описанным в данном документе более подробно ниже в разделе "Способ прогнозирования наличия клинического состояния". В частности, последовательность целевой нуклеиновой кислоты может быть любой из последовательностей целевой нуклеиновой кислоты, описанных ниже в разделе "Вариант последовательности и последовательность целевой нуклеиновой кислоты".

Образец может быть любым образцом, для которого желательно определить, присутствует ли в нем указанная последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Например, если последовательность целевой нуклеиновой кислоты указывает на клиническое состояние, то образец может быть образцом из организма индивидуума, подверженного риску развития указанного клинического состояния.

Способы обнаружения присутствия последовательности целевой нуклеиновой кислоты или присутствия варианта нуклеиновой кислоты в образце в целом включают следующие стадии:

- a) обеспечение образца, содержащего матричные нуклеиновые кислоты,
- b) обеспечение набора праймеров, который может быть, например, любым из наборов праймеров, описанных ниже в разделе "Набор праймеров",
- c) обеспечение полимеразы нуклеиновой кислоты, проявляющей полимеразную активность при температуре элонгации, которая, например, может представлять собой любую из полимераз нуклеиновых кислот, описанных ниже в разделе "Реагенты для ПЦР",
- d) получение разделенных реакционных смесей ПЦР, например, как описано ниже в разделе "Разделенные реакционные смеси ПЦР",
- e) проведение асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР), например, как описано ниже в разделе "Асимметричная инкрементная полимеразная реакция",
- f) проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), предпочтительно экспоненциальной реакции ПЦР, описанной ниже в разделе "Экспоненциальная ПЦР",
- g) обнаружение присутствия в продукте ПЦР последовательности целевой нуклеиновой кислоты или варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты, причем указанное обнаружение может быть выполнено, например, как описано ниже в разделе "Обнаружение".

Каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР должна содержать, по меньшей мере, часть образца, набор праймеров и набор реагентов для ПЦР, достаточный для проведения реакции ПЦР. Специалистам в данной области техники хорошо известны способы и реагенты, пригодные для проведения реакции ПЦР. Например, каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР может содержать любую из полимераз нуклеиновой кислоты и реагенты для ПЦР, описанные ниже в разделе "реагенты для ПЦР".

В зависимости от способа определения того, содержит ли продукт ПЦР вариант последовательности, каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР может дополнительно содержать детекторные реагенты, такие как любой из детекторных реагентов, описанных ниже в разделе "Обнаружение".

Способы по изобретению пригодны, например, для сфер применения, которые требуют с высокой эффективностью различать любые две последовательности, отличающиеся количеством нуклеотидов. Например, способы по изобретению пригодны для сфер применения, которые требуют с высокой эффективностью различать любые две последовательности, отличающиеся только одним или более нуклеотидными основаниями и, при этом, присущая полимеразе частота ошибок при встраивании основания может приводить к ложноположительным целевым последовательностям, представляющим интерес. В способах может применяться различение однонуклеотидных вариантов на основе зондов, например, как описано в данном документе ниже в разделе "Обнаружение" или различение на основе праймеров. Этот способ может быть применен к любому типу немодифицированных или модифицированных последовательностей дезоксирибонуклеиновой или рибонуклеиновой кислоты (ДНК/РНК), представляющих интерес, в любом организме и любой длины, размером от нескольких десятков нуклеотидов до многих сотен и тысяч нуклеотидов. Способ можно применять с немодифицированными или модифицированными праймерами, с немодифицированными или модифицированными зондами или без них. Способ можно выполнять в мультиплексном режиме со многими одновременными запросами для нескольких целевых последовательностей, представляющих интерес.

В общем, способам по изобретению присущ очень низкий предел обнаружения. Это позволяет обнаруживать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, потенциально присутствующую с очень низкими уровнями, и/или обнаруживать присутствие варианта последовательностей, потенциально присутствующих с очень низкими уровнями в смесях, содержащих другие последовательности целевой нуклеиновой кислоты. В общем, большая разница между температурой плавления праймера-Н и праймера-Л может обеспечивать очень низкий предел обнаружения. Полезные температуры плавления праймера-Н и

праймера-L описаны ниже. Кроме того, большая разница между применяемой высокой температурой отжига и низкой температурой отжига может обеспечивать очень низкий предел обнаружения. Подходящие высокие и низкие температуры отжига описаны ниже.

Предел обнаружения может быть определен различными способами. Например, предел обнаружения может быть определен путем определения минимальной фракции мутантного аллеля (ФМА), которая может быть надежно дифференцирована от отрицательного контроля, содержащего только матрицу дикого типа. Фракция мутантного аллеля представляет собой долю обнаруженных мутантных аллелей по сравнению с общим количеством аллелей (дикого типа плюс мутантных). Теоретически ФМА должна быть равна нулю, если матрица на входе представляет собой только дикий тип, однако из-за ложноположительных результатов фракция может быть больше нуля. Ложноположительные результаты приводят к повышению предела обнаружения для способа, поскольку истинно положительную ФМА с очень низким уровнем невозможно отличить от обнаруженной истинно отрицательной ФМА с очень низким уровнем. Предпочтительно способам по изобретению свойственен предел обнаружения ФМА ниже 0,01%, например, он может быть ниже 0,001%. ФМА можно определить, например, как описано ниже в примере 1.

#### **Набор компонентов**

В данном изобретении также предлагается набор компонентов, содержащий:

- а) набор праймеров, который, например, может быть любым из наборов праймеров, описанных ниже в разделе "Набор праймеров",
- б) детекторный зонд, способный гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, причем указанный зонд связан, по меньшей мере, с одним флуорофором и, по меньшей мере, с одним гасителем, и, при этом, указанный детекторный зонд, например, может быть любым из детекторных зондов, описанных ниже в разделе "Обнаружение",
- с) полимеразу нуклеиновой кислоты, которая, например, может представлять собой любую из полимераз нуклеиновой кислоты, описанных ниже в разделе "реагенты для ПЦР";
- д) реагенты для ПЦР, которые, например, могут быть любыми из реагентов, описанных ниже в разделе "реагенты для ПЦР";
- е) реагенты для приготовления капель, содержащих разделенные реакционные смеси ПЦР, которые могут быть, например, любыми из реагентов, описанных ниже в разделе "Разделенные реакционные смеси ПЦР".

Набор компонентов особенно пригоден для реализации способов по изобретению.

#### **Вариант последовательности и последовательность целевой нуклеиновой кислоты**

Как описано выше, способы по изобретению пригодны для обнаружения присутствия варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

Часто указанный вариант последовательности может быть мутантной последовательностью. Таким образом, последовательность целевой нуклеиновой кислоты может быть последовательностью нуклеиновой кислоты, которая может присутствовать как последовательность дикого типа или как мутантная последовательность.

Кроме того, вариант последовательности может представлять собой полиморфизм, и, следовательно, последовательность целевой нуклеиновой кислоты может присутствовать в виде различных полиморфов. Чтобы упростить обсуждение, наиболее часто встречающаяся последовательность целевой нуклеиновой кислоты в данном документе также носит название "последовательности дикого типа", хотя, строго говоря, вариант последовательности в некоторых случаях может считаться последовательностью дикого типа.

Таким образом, способы по изобретению могут быть способами для обнаружения присутствия варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты, причем указанная последовательность целевой нуклеиновой кислоты потенциально может присутствовать в виде последовательности дикого типа или может содержать вариант последовательности.

Вариант последовательности может отличаться от последовательности дикого типа заменой(ами), делецией(ями) и/или инсерцией(ями). Может быть предпочтительным, чтобы как последовательность дикого типа, так и вариант последовательности могли быть амплифицированы в реакции ПЦР с помощью пары праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Соответственно, может быть предпочтительным, чтобы последовательность дикого типа и вариант последовательности мало отличались друг от друга по длине. Вариант последовательности может, например, отличаться от последовательности дикого типа инсерцией в диапазоне от 1 до 1000 нуклеотидов, например, в диапазоне от 1 до 100 нуклеотидов, например, в диапазоне от 1 до 50 нуклеотидов, например, в диапазоне от 1 до 10 нуклеотидов, например, в диапазоне от 1 до 5 нуклеотидов, такой как инсерция 1 нуклеотида. Аналогично, вариант последовательности может отличаться от последовательности дикого типа, например, делецией в диапазоне от 1 до 1000 нуклеотидов, например, в диапазоне от 1 до 100 нуклеотидов, например, в диапазоне от 1 до 50 нуклеотидов, такой как делеция 1 нуклеотида. Вариант последовательности может также отличаться от последовательности дикого типа заменой, например, заменой в диапазоне от 1 до 1000 нуклеотидов, такой как замена в диапазоне от 1 до 100 нук-

леотидов, например, в диапазоне от 1 до 50 нуклеотидов, такой как замена в диапазоне от 1 до 10 нуклеотидов, например в диапазоне от 1 до 5, нуклеотидов, такой как замена 1 нуклеотида.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретения вариант последовательности может отличаться от последовательности дикого типа только одним нуклеотидом, например, делецией, inserцией или заменой 1 нуклеотида. Таким образом, вариант последовательности может быть однонуклеотидным вариантом или однонуклеотидной мутацией. Кроме того, вариант последовательности может быть полиморфизмом, таким как однонуклеотидный полиморфизм.

Как объясняется выше, может быть предпочтительным, чтобы как последовательность дикого типа, так и вариант последовательности могли быть амплифицированы в реакции ПЦР с применением пары праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Указанная пара праймеров состоит из прямого праймера и обратного праймера. Предпочтительно, прямой праймер содержит или даже состоит из последовательности, идентичной части целевой последовательности, которая присутствует как в целевой последовательности дикого типа, так и в целевой последовательности, содержащей вариант последовательности. Кроме того, прямой праймер может содержать или даже состоять из последовательности, идентичной части целевой последовательности, за исключением нескольких рассогласований, например, за исключением 10 рассогласований, таких как до 5 рассогласований, например, до 2 рассогласований. Аналогичным образом, обратный праймер предпочтительно содержит или даже состоит из последовательности, комплементарной части целевой последовательности, которая присутствует как в целевой последовательности дикого типа, так и в целевой последовательности, содержащей вариант последовательности. Кроме того, обратный праймер может содержать или даже состоять из последовательности, комплементарной части целевой последовательности, ожидаемой для нескольких рассогласований, например, за исключением 10 рассогласований, таких как до 5 рассогласований, например, до 2 рассогласований. Праймеры могут содержать рассогласования по разным причинам, например, чтобы достичь подходящей T<sub>пл</sub> праймера. Таким образом, способы по изобретению будут приводить к амплификации как целевой последовательности дикого типа, так и целевой последовательности, содержащей вариант последовательности. Таким образом, продукт ПЦР может содержать как последовательность целевой нуклеиновой кислоты, содержащую вариант последовательности, так и последовательность целевой нуклеиновой кислоты, не содержащую варианта последовательности.

В дальнейшем присутствие варианта последовательности может быть определено любым способом, доступным квалифицированному специалисту, например, как описано ниже в разделе "Обнаружение".

Как описано выше, способы по изобретению могут быть применены для различения двух в высокой степени сходных последовательностей и, таким образом, для обнаружения присутствия варианта последовательности, сходного с последовательностью дикого типа.

Может быть много разных причин, почему желательно обнаружить данный вариант последовательности. Например, вариант последовательности может быть связан с клиническим состоянием или с риском развития клинического состояния. Кроме того, вариант последовательности может обеспечивать фингерпринт или, по меньшей мере, способствовать идентификации фингерпринта индивидуума, тем самым помогая идентифицировать индивидуума. Это может иметь судебное применение.

Однако способы по изобретению также могут быть применены просто для обнаружения присутствия заданной последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Указанной последовательностью целевой нуклеиновой кислоты может быть любая последовательность нуклеиновой кислоты, которую желательно обнаружить. Например, может быть желательно обнаружить присутствие нуклеиновых кислот чужеродного патогена. Обычно последовательность целевой нуклеиновой кислоты предпочтительно является подходящей в качестве матрицы для полимераз нуклеиновой кислоты.

#### **Набор праймеров**

Способы, описанные в данном документе, включают применение набора праймеров. Набор праймеров содержит, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-L.

В рамках изобретения указано, что праймер-Н и праймер-L могут составлять пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения набор праймеров может состоять из праймера-Н и праймера-L.

В некоторых вариантах реализации изобретения разделенные реакционные смеси ПНР содержат только следующие нуклеиновые кислоты: нуклеиновые кислоты, присутствующие в образце, праймер-Н, праймер-L, свободные нуклеотиды и необязательно один или более детекторных зондов.

Однако пара праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, может отличаться от праймера-Н и праймера-L. Кроме того, в изобретение включен сценарий, когда праймер-L вместе с праймером, который не является праймером-Н, представляет собой пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

Пара праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, состоит из двух праймеров, которые можно обозначить как прямой праймер и обратный праймер. Предпочтительно прямой праймер способен отжигать комплементарную нить последовательности целевой нуклеиновой кислоты на 5'-конце или вблизи 5'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Предпочтительно прямой праймер содержит последовательность, идентичную 5'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Прямой праймер может даже быть образован последовательностью, идентичной 5'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. В том случае, если прямой праймер содержит последовательность, не идентичную последовательности целевой нуклеиновой кислоты, предпочтительно, чтобы 3'-конец праймера был образован последовательностью, идентичной последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Обратный праймер предпочтительно способен отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты на 3'-конце или вблизи 3'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Предпочтительно обратный праймер содержит последовательность, комплементарную 3'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Обратный праймер может даже быть образован последовательностью, комплементарной 3'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. В том случае, если обратный праймер содержит последовательность, не комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты, предпочтительно, чтобы 5'-конец праймера был образован последовательностью, комплементарной последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

Предусматривается, что прямой праймер может быть праймером-Н, а обратный праймер может быть праймером-Л.

Также предусматривается, что прямой праймер может быть праймером-Н, а обратный праймер может быть праймером, который не является ни праймером-Н, ни праймером-Л.

Также предусматривается, что прямой праймер может быть праймером-Л, а обратный праймер может быть праймером-Н.

Также предусматривается, что прямой праймер может быть праймером-Л, а обратный праймер может быть праймером, который не является ни праймером-Н, ни праймером-Л.

В вариантах реализации изобретения, в которых прямой праймер представляет собой праймер-Н, может быть предпочтительным, чтобы реакционные смеси ПЦР содержали только обратные праймеры с температурой плавления по меньшей мере на 10°C ниже, предпочтительно по меньшей мере на 15°C ниже, например, по меньшей мере на 20°C ниже, например, по меньшей мере на 25°C ниже, например, по меньшей мере на 30°C, например, в диапазоне от 15 до 50°C, например, в диапазоне от 15 до 40°C ниже, чем температура плавления праймера-Н. В вариантах реализации изобретения, в которых набор праймеров содержит несколько пар праймеров, состоящих из праймера-Н и обратного праймера, каждый обратный праймер предпочтительно имеет указанную выше температуру плавления относительно праймера-Н из пары праймеров.

В вариантах реализации изобретения, в которых обратный праймер представляет собой праймер-Н, может быть предпочтительным, чтобы реакционные смеси ПЦР содержали прямые праймеры с температурой плавления, которая по меньшей мере на 10°C ниже, предпочтительно по меньшей мере на 15°C ниже, например, по меньшей мере на 20°C ниже, например, по меньшей мере на 25°C ниже, например, по меньшей мере на 30°C, например, в диапазоне от 15 до 50°C ниже, например, в диапазоне от 15 до 40°C ниже, чем температура плавления праймера-Н. В вариантах реализации изобретения, в которых набор праймеров содержит несколько пар праймеров, состоящих из праймера-Н и прямого праймера, каждый прямой праймер предпочтительно имеет указанную выше температуру плавления относительно праймера-Н из пары праймеров.

Праймеры могут быть любыми олигонуклеотидами или нуклеиновой кислотой, которые способны выполнять роль точки начала синтеза ДНК в подходящих условиях. Такие условия могут включать условия АИПР или ПЦР, которые описаны в данном документе ниже в разделе "Асимметричная инкрементная полимеразная цепная реакция" или "Экспоненциальная ПЦР".

В некоторых случаях в праймер может быть введена обнаруживаемая метка. В некоторых случаях праймер не содержит обнаруживаемой метки.

Длина праймеров может зависеть от последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Как поясняется в другом месте данного документа, температура плавления праймера-Н значительно выше температуры плавления праймера-Л. Если набор праймеров содержит больше праймеров, чем праймер-Н и праймер-Л, то оставшиеся праймеры предпочтительно сконструированы таким образом, чтобы их температура плавления была сходна с температурой плавления праймера-Л или ниже температуры плавления праймера-Л. Однако в соответствии с изобретением набор праймеров может содержать более одного праймера-Н. В таких случаях предпочтительно, чтобы любой праймер, который вместе с любым из праймеров-Н способен амплифицировать целевую нуклеиновую кислоту, имел температуру плавления, аналогичную температуре плавления праймера-Л, или ниже, чем температура плавления праймера-Л.

Таким образом, набор праймеров предпочтительно содержит праймер-Н и праймер-Л, причем температура плавления праймера-Н, по меньшей мере, на 10°C выше температуры плавления всех других праймеров в наборе праймеров. Например, температура плавления праймера-Н может быть по меньшей

мере на 12°C, например, по меньшей мере на 14°C, например по меньшей мере на 16°C, например по меньшей мере на 18°C, например по меньшей мере на 20°C выше температуры плавления всех других праймеров в наборе праймеров. Температура плавления праймера-Н может быть еще более высокой, например, температура плавления по меньшей мере на 25°C выше, например по меньшей мере на 30°C выше, например, температура плавления, которая в диапазоне от 15 до 50°C, например, в диапазоне от 15 до 40°C выше, чем температура плавления всех других праймеров в наборе праймеров. Если разделенные реакционные смеси ПНР дополнительно содержат один или более зондов, то температура плавления таких зондов также может быть по меньшей мере на 10°C, например по меньшей мере на 12°C, например по меньшей мере на 14°C, например по меньшей мере на 16°C, например по меньшей мере на 18°C, например по меньшей мере на 20°C ниже температуры плавления праймера-Н. Однако зонды могут иметь и более высокую температуру плавления.

В одном варианте реализации изобретения праймер-Н является единственным праймером в наборе праймеров с температурой плавления по меньшей мере на 10°C выше, чем температура плавления праймера-Л. В указанном варианте реализации изобретения температура плавления всех других праймеров не более чем на 10°C выше температуры плавления праймера-Л. Например, температура плавления всех праймеров, кроме праймера-Н, может находиться в диапазоне  $\pm 10^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Л, например, в диапазоне  $\pm 8^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Л, например, в диапазоне  $\pm 6^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Л, например, в диапазоне  $\pm 4^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Л. Если разделенные реакционные смеси ПЦР дополнительно содержат один или более зондов, то температура плавления указанных зондов также может находиться в диапазоне  $\pm 10^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Л, например, в диапазоне  $\pm 8^\circ\text{C}$  температуры плавления праймера-Л, например, в диапазоне  $\pm 6^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Л, например, в диапазоне  $\pm 4^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Л. Однако изобретение также предусматривает, что зонды имеют более высокую температуру плавления, например, температуру плавления на 20°C выше, чем температура плавления праймера-Л.

В одном варианте реализации изобретения набор праймеров предпочтительно не содержит праймеров:

а) с температурой плавления, которая находится в диапазоне  $\pm 15^\circ\text{C}$ , предпочтительно в диапазоне  $\pm 20^\circ\text{C}$ , например, в диапазоне  $\pm 25^\circ\text{C}$ , например, в диапазоне от  $\pm 10^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Н, например, в диапазоне  $\pm 8^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Н, например, в диапазоне  $\pm 6^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Н, например, в диапазоне  $\pm 4^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Н; а также

б) которые вместе с праймером-Н могут образовывать пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

В одном варианте реализации изобретения все праймеры в наборе праймеров, которые вместе с праймером-Н могут образовывать пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, предпочтительно имеют температуру плавления, которая по меньшей мере на 10°C, предпочтительно по меньшей мере на 15°C, например, по меньшей мере на 20°C, например, по меньшей мере на 25°C, например, по меньшей мере на 30°C, например, в диапазоне от 15 до 50°C, например, в диапазоне от 15 до 40°C ниже, чем температура плавления праймера-Н.

Таким образом набор праймеров предпочтительно содержит праймер-Н и праймер-Л, причем температура плавления праймера-Н, по меньшей мере на 10°C выше температуры плавления всех других праймеров в наборе праймеров. Например, температура плавления праймера-Н может быть по меньшей мере на 12°C, например, по меньшей мере на 14°C, например, по меньшей мере на 16°C, например, по меньшей мере на 18°C, например, по меньшей мере на 20°C выше температуры плавления всех других праймеров в наборе праймеров. Если разделенные реакционные смеси ПНР дополнительно содержат один или более зондов, то температура плавления таких зондов может быть, по меньшей мере, на 10°C, например, по меньшей мере на 12°C, например, по меньшей мере на 14°C, например, по меньшей мере на 16°C, например, по меньшей мере на 18°C, например, по меньшей мере на 20°C ниже, например, в диапазоне от 20 до 45°C ниже, чем температура плавления праймера-Н. Однако изобретение также предусматривает, что зонды могут иметь более высокую температуру плавления, даже температуру плавления, аналогичную температуре плавления праймера-Н.

Квалифицированный специалист в данной области техники сможет сконструировать праймеры с соответствующей температурой плавления. В общем, температура плавления праймера может зависеть от длины праймера, последовательности праймера, а также от присутствия нуклеотидных аналогов. Существуют некоторые ограничения в отношении последовательности праймера, поскольку он должен быть способен отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты и/или комплементарную последовательность. Таким образом, в рамках ограничения в отношении последовательности квалифицированный специалист в данной области техники может сконструировать праймер с желаемой температурой плавления путем регулирования длины праймера. Температура плавления ( $T_{пл}$ ) может быть определена, как описано выше в разделе "Определение".

Кроме того, температура плавления может зависеть от присутствия нуклеотидных аналогов, и, та-

ким образом, праймеры с соответствующей температурой плавления могут быть сконструированы путем создания праймеров, содержащих один или более нуклеотидных аналогов. Температура плавления дополнительно может зависеть от наличия рассогласований нуклеотидов с целевой нуклеиновой кислотой и, таким образом, праймеры с соответствующей температурой плавления могут быть сконструированы с одним или более рассогласованиями нуклеотидов.

Праймеры могут обладать дополнительными признаками, которые позволяют обнаружить или иммобилизовать праймер, но не изменяют основное свойство праймера (например, выполнять роль точки начала синтеза ДНК). Например, праймеры могут содержать дополнительную последовательность нуклеиновой кислоты на 5'-конце, которая не гибридизуется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты или последовательностью, комплементарной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, но которая облегчает клонирование или обнаружение амплифицированного продукта. Например, дополнительная последовательность может содержать сайт расщепления рестрикционным ферментом и/или сайт распознавания. Участок праймера, в достаточной степени комплементарный матрице для гибридизации, может упоминаться в данном документе как участок гибридизации. Кроме того, праймеры могут быть связаны с метками, например, флуоресцентными, функциональными или связывающимися метками. Указанные метки могут быть связаны с их концами, сахарами или нуклеотидными основаниями. Дополнительно, праймеры могут содержать рассогласования на 3'-конце в конструкциях, где праймер различает последовательности целевых нуклеиновых кислот дикого типа и варианты последовательностей, чтобы уменьшить или погасить элонгацию нежелательной матричной последовательности.

Праймер может быть однонитевой ДНК перед связыванием с матричной нуклеиновой кислотой. В некоторых случаях праймер первоначально содержит двухнитевую последовательность, например, праймер может образовывать петлю шпильки. Таким образом, праймер в общем представляет собой полинуклеотид или олигонуклеотид, и часто праймеры представляют собой ДНК. Однако праймеры в соответствии с изобретением могут содержать один или более нуклеотидных аналогов, а также содержать рибонуклеиновую кислоту (РНК).

Нуклеотидные аналоги хорошо известны из уровня техники, и праймеры и зонды по изобретению могут содержать любой пригодный нуклеотидный аналог. Нуклеотидные аналоги могут быть, например, нуклеотидными аналогами с модифицированными сахарными группами, нуклеотидными аналогами в форме запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК), нуклеотидными аналогами в форме пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК), нуклеотидными аналогами в форме гликолевой нуклеиновой кислоты (ГНК), нуклеотидными аналогами в форме треозонуклеиновой кислоты (ТНК), бициклическими и трициклическими нуклеозидными аналогами, фосфономоноэфирными нуклеиновыми кислотами, содержащими фосфорную группу в основной цепи, или полициклическими гетероциклическими соединениями, которые могут быть применены вместо одного или более фрагментов встречающихся в природе гетероциклических оснований.

В другом варианте реализации изобретения праймер или зонд, применяемый в способах и композициях, описанных в данном документе, может содержать один или более универсальных нуклеозидов. Неограничивающими примерами универсальных нуклеозидов являются 5-нитроиндол и инозин.

Праймеры могут быть сконструированы в соответствии с известными параметрами для предотвращения вторичных структур и самогибридизации.

Праймеры коммерчески доступны от ряда поставщиков и могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, клонирование соответствующих последовательностей и прямой химический синтез с применением способов, хорошо известных из уровня техники (Narang et al., *Methods Enzymol.* 68:90 (1979); Brown et al., *Methods Enzymol.* 68:109 (1979)).

#### **Праймер-Н и праймер-Л**

Способы и наборы по изобретению включают применение набора праймеров, содержащего праймер-Н и праймер-Л, причем температура плавления праймера-Н, по меньшей мере, на 10°C, предпочтительно, по меньшей мере, на 15°C выше, чем температура плавления праймера-Л, и, при этом, праймер-Л содержит последовательность, комплементарную продукту элонгации праймера-Н. Набор праймеров может содержать другие праймеры, например, как описано выше в разделе "Набор праймеров", однако набор праймеров может также состоять из праймера-Н и праймера-Л, и, при этом, праймер-Н и праймер-Л способны специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

Праймер-Н предпочтительно сконструирован в виде праймера для амплификации целевой последовательности или последовательности, комплементарной целевой последовательности. Таким образом, праймер-Н предпочтительно способен отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты или последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Например, праймер-Н может быть способен отжигать нить, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты, на 5'-конце или вблизи 5'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты, или праймер-Н может быть способен отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты на 3'-конце или вблизи 3'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, праймер-Н может содержать последовательность, идентичную 5'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Праймер-Н может даже быть образован последовательностью, идентичной 5'-концу последова-

тельности целевой нуклеиновой кислоты. Кроме того, праймер-Н может содержать последовательность, идентичную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, праймер-Н может содержать последовательность, комплементарную 3'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Праймер-Н может даже быть образован последовательностью, комплементарной 3'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

Аналогично, праймер-Л предпочтительно сконструирован в виде праймера для амплификации целевой последовательности или последовательности, комплементарной целевой последовательности. Если праймер-Н предназначен для амплификации целевой последовательности, то праймер-Л предпочтительно предназначен для амплификации последовательности, комплементарной целевой последовательности, и наоборот. Таким образом, праймер-Л предпочтительно способен отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты или последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Если праймер-Н способен отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, то праймер-Л предпочтительно способен отжигать последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и наоборот. Например, праймер-Л может быть способен отжигать нить, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты, на 5'-конце или вблизи 5'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты, или праймер-Л может быть способным отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты на 3'-конце или вблизи 3'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, праймер-Л может содержать последовательность, идентичную 5'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Праймер-Л может даже быть образован последовательностью, идентичной 5'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Кроме того, праймер-Л может содержать последовательность, идентичную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, праймер-Л может содержать последовательность, комплементарную 3'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Праймер-Л может даже быть образован последовательностью, комплементарной 3'-концу последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

В одном варианте реализации изобретения праймер-Н содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, которая идентична последовательности на 5'-конце последовательности целевой нуклеиновой кислоты, а праймер-Л содержит или образован последовательностью, идентичной комплементарной последовательности 3'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

В другом варианте реализации изобретения праймер-Л содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, которая идентична последовательности на 5'-конце последовательности целевой нуклеиновой кислоты, а праймер-Н содержит или образован последовательностью, идентичной комплементарной последовательности 3'-конца последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

В еще одном варианте реализации изобретения праймер-Л состоит из двух частей, причем одна часть является комплементарной или идентичной фрагменту последовательности целевой нуклеиновой кислоты, а другая часть не является комплементарной или идентичной последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Такие праймеры дополнительно могут упоминаться в данном документе как "модифицированный рассогласованный праймер-Л". Указанная часть, комплементарная или идентичная фрагменту последовательности целевой нуклеиновой кислоты, может иметь очень низкую температуру плавления и может упоминаться как "часть праймера-Л без рассогласований". Длина части праймера-Л без рассогласований может обычно находиться в диапазоне от 7 до 15 нуклеотидов, например, в диапазоне от 7 до 12 нуклеотидов. Указанная часть, которая не является комплементарной или идентичной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, может содержать случайную последовательность и может упоминаться как "рассогласованная часть праймера-Л". Длина рассогласованной части праймера-Л обычно может составлять от 2 до 8 нуклеотидов, например, в диапазоне от 2 до 6 нуклеотидов, но может составлять 1 нуклеотид или > 8 нуклеотидов. В частности, это может иметь место в вариантах реализации изобретения, включающих стадию низкотемпературной ПЦР, как описано выше в разделе "Низкотемпературная ПЦР". Например, на 3'-конце указанного праймера-Л может находиться основание, которое варьирует между истинной последовательностью целевой нуклеиновой кислоты и в высокой степени гомологичной нецелевой. Рассогласованная часть после встраивания в синтезируемые нуклеиновые кислоты и последующего синтеза 2-й комплементарной нити может стать подходящим участком гибридизации.

Праймер-Н и праймер-Л сконструированы таким образом, чтобы иметь такую температуру плавления, как указано в данном документе. Квалифицированный специалист сможет сконструировать праймер-Н и праймер-Л таким образом, чтобы получить желаемую температуру плавления, регулируя последовательность праймеров, длину праймеров и, необязательно, путем введения нуклеотидных аналогов, как описано выше в разделе "Набор праймеров".

Праймер-Н сконструирован таким образом, что температура отжига праймера-Н значительно выше, чем температура отжига праймера-Л, например, по меньшей мере на 10°C выше. Таким образом, температура плавления праймера-Н может быть по меньшей мере на 12°C выше, например, по меньшей мере на 15°C выше, предпочтительно, по меньшей мере на 14°C выше, еще более предпочтительно по меньшей мере на 16°C выше, но более предпочтительно на 18°C выше, например, по меньшей мере на 20°C

выше, например, в диапазоне от 15 до 50°C, например, в диапазоне от 15 до 40°C, например, в диапазоне от 15 до 25°C выше чем температура плавления праймера-L. В некоторых вариантах реализации изобретения температура плавления праймера-Н предпочтительно по меньшей мере на 30° выше, например, в диапазоне от 30 до 50.

В общем, предпочтительно, чтобы температура плавления праймера-Н была как можно выше, но не выше, чем самая высокая функциональная температура элонгации, по меньшей мере, одной полимеразы нуклеиновой кислоты. Указанная температура элонгации не должна быть оптимальной температурой для указанной полимеразы нуклеиновой кислоты, но предпочтительно, по меньшей мере, одна полимеразы нуклеиновой кислоты проявляет активность при температуре плавления праймера-Н. Таким образом, температура плавления праймера-Н может приближаться или даже превышать 80°C.

Праймер-Н может содержать один или более нуклеотидных аналогов, например, любой из нуклеотидных аналогов, описанных выше в разделе "Набор праймеров". Встраивание некоторых нуклеотидных аналогов может повысить температуру плавления, и, соответственно, праймер-Н может, в частности, содержать нуклеотидные аналоги, причем встраивание указанных нуклеотидных аналогов повышает температуру плавления праймера. Таким образом, праймер-Н может содержать один или более из ЗНК, ПНК, ГНК и/или ТНК. Например, праймер-Н может содержать от 1 до 20, например, в диапазоне от 1 до 15, например, в диапазоне от 5 до 10 нуклеотидных аналогов, например, ЗНК.

Поскольку также предпочтительно, чтобы температура плавления праймера-L была достаточно высокой, чтобы обеспечить специфический отжиг праймера-L к последовательности целевой нуклеиновой кислоты/последовательности, комплементарной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, а температура плавления праймера-Н должна быть значительно выше, чем температура плавления праймера-Н, то часто температура плавления праймера-Н составляет по меньшей мере 60°C. Кроме того, температура плавления праймера-Н может часто составлять по меньшей мере 70°C. Температура плавления праймера-Н может, например, находиться в диапазоне от 60 до 90°C, например, в диапазоне от 60 до 85°C, например, в диапазоне от 70 до 85°C, например, в диапазоне от 70 до 80°C.

Температура плавления праймера-L предпочтительно является достаточно высокой, чтобы обеспечить специфический отжиг праймера-L к последовательности целевой нуклеиновой кислоты/последовательности, комплементарной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, но также значительно ниже температуры плавления праймера-Н. Часто температура плавления праймера-L находится в диапазоне от 30 до 55°C, например, в диапазоне от 35 до 55°C, предпочтительно в диапазоне от 40 до 50°C.

### Реагенты для ПЦР

Способы по изобретению включают стадии проведения ПЦР. Квалифицированному специалисту хорошо известно, как проводить ПЦР и какие реагенты могут быть пригодны для проведения ПЦР. Такие реагенты упоминаются в данном документе как реагенты для ПЦР. Набор компонентов по изобретению также включает реагенты для ПЦР.

Для большинства целей реагенты для ПЦР содержат нуклеотиды. Таким образом, реагенты для ПЦР могут содержать дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), в частности все четыре встречающихся в природе дезоксирибонуклеозидтрифосфата (dNTP).

Реагенты для ПЦР часто содержат молекулы дезоксирибонуклеозидтрифосфата, включая все из dATP, dCTP, dGTP, dTTP. В некоторых случаях добавляют dUTP.

Кроме того, реагенты для ПЦР могут содержать соединения, способствующие проявлению активности полимеразы нуклеиновой кислоты. Таким образом, реагент для ПЦР может содержать двухвалентный катион, например, ионы магния. Указанные ионы магния могут быть добавлены в форме, например, хлорида магния или ацетата магния (MgCl<sub>2</sub>) или сульфата магния.

Реагенты ПЦР могут также содержать одно или более из следующего:

неспецифические блокирующие агенты, такие как альбумин телячьей сыворотки (АТС) или желатин из телячьей кожи, бета-лактоглобулин, казеин, сухое молоко или другие широко применяемые блокирующие агенты,

неспецифические фоновые/блокирующие нуклеиновые кислоты (например, ДНК спермы лосося),

биоконсерванты (например, азид натрия),

усилители ПЦР (например, бетаин, трегалоза и т.д.),

ингибиторы (например, ингибиторы РНКазы).

Реагент для ПЦР может также содержать другие добавки, например, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, бетаина (моно)гидрат (N,N,N-триметилглицин = [карбоксиметил]триметиламмоний), трегалозу, 7-деаза-2'-дезоксигуанозинтрифосфат (dC7GTP или 7-деаза-2'-dGTP), формамид (метанамид), тетраэтиламмония хлорид (TMAX), другие производные тетраалкиламмония (например, тетраэтиламмония хлорид (ТЭА-С1) и тетрапропиламмония хлорид (ТПрА-С1), неионный детергент (например, Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40 (NP-40)) или PREXCEL-Q.

Реагенты для ПЦР могут содержать буферный агент.

В некоторых случаях к водной фазе добавляют неионный блок-сополимер этиленоксида/пропиленоксида в концентрации около 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0%. Широко приме-

няемые биосурфактанты включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как Pluronic F-68, Tetronics, Zonyl FSN. Pluronic F-68 может присутствовать в концентрации около 0,5% мас./об.

В некоторых случаях сульфат магния может быть заменен хлоридом магния в аналогичных концентрациях. Для буферизации раствора существует широкий спектр взаимозаменяемых, обычных коммерческих буферов для ПЦР от разных поставщиков.

Способы по изобретению также включают применение полимеразы нуклеиновой кислоты, а набор компонентов по изобретению также включает полимеразу нуклеиновой кислоты. Указанной полимеразой нуклеиновой кислоты может быть любая полимеразы нуклеиновой кислоты, такая как ДНК-полимераза. Полимераза нуклеиновой кислоты должна проявлять активность при температуре элонгации.

В некоторых вариантах реализации изобретения полимеразы нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК-полимеразу с 5'-3'-эксонуклеазной активностью. Это может, в частности, иметь место в вариантах реализации изобретения, в которых способы или наборы включают применение детекторного зонда, такого как детекторный зонд Taqman.

Можно применять любую ДНК-полимеразу, например, ДНК-полимеразу с 5'-3'-эксонуклеазной активностью, которая катализирует элонгацию праймера. Например, можно применять термостабильную ДНК-полимеразу.

В одном варианте реализации изобретения полимеразы нуклеиновой кислоты представляет собой полимеразу Taq.

### **Разделение реакционных смесей ПЦР**

Способы по изобретению в целом включают стадию получения разделенных реакционных смесей ПЦР. Затем разделенные реакционные смеси ПЦР можно обрабатывать на стадии АИПР, за которой следует одна или более ПЦР, как описано в данном документе. Подготовка разделенных реакционных смесей ПЦР включает деление образца на несколько меньших частей, каждая из которых содержит набор праймеров, полимеразу нуклеиновой кислоты, реагенты для ПЦР и необязательно детекторные реагенты.

Разделенные реакционные смеси ПЦР могут быть получены несколькими различными способами. В общем, это включает разделение реакционных смесей ПЦР на физически и пространственно разделенные отсеки. Указанные отсеки могут быть получены несколькими способами, например, реакционные смеси ПЦР могут быть распределены в различные емкости. Кроме того, разделенные реакционные смеси ПЦР могут быть получены путем распределения реакционной смеси ПЦР в лунки планшетов для микротитрования. Разделенные реакционные смеси ПЦР также могут быть получены путем распределения реакционной смеси ПЦР в микролунки, микрожидкостные камеры, капилляры, дисперсионную фазу эмульсии, камеру (например, камеру в массиве миниатюрных камер), капли или на связывающей нуклеиновую кислоту поверхности. Разделенные реакционные смеси ПЦР также могут быть получены путем распределения реакционной смеси ПЦР на отдельные пятна на твердой подложке.

Предпочтительно, реакционные смеси ПЦР делят таким образом, чтобы каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР содержала только небольшое количество матричных нуклеиновых кислот, содержащих последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Поскольку образцы обычно делят случайным образом на разделенные реакционные смеси ПЦР, возможно, что некоторые реакционные смеси будут содержать больше матричных нуклеиновых кислот, содержащих последовательность целевой нуклеиновой кислоты, чем другие. Фактически, некоторые из разделенных реакционных смесей ПЦР могут не содержать матричных нуклеиновых кислот, содержащих последовательность целевой нуклеиновой кислоты, тогда как другие могут содержать несколько копий. Если копии матричной нуклеиновой кислоты распределены случайным образом среди частей, то некоторые части не должны содержать копий, другие будут содержать только одну копию, а если количество частей достаточно большое, то остальные должны содержать две копии, три копии и даже большее количество копий. Вероятность нахождения ровно 0, 1, 2, 3 и более копий в части на основе заданной средней концентрации матричной нуклеиновой кислоты в частях описывается распределением Пуассона. Некоторые образцы не будут содержать матричных нуклеиновых кислот, содержащих целевую последовательность, и в таком варианте реализации изобретения ни одна из разделенных реакционных смесей ПЦР не будет содержать матричных нуклеиновых кислот, содержащих целевую последовательность.

В одном варианте реализации изобретения разделенные реакционные смеси ПЦР будут, как правило, содержать не более чем 10, например, не более чем 5 матричных нуклеиновых кислот, содержащих последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

Один из в высокой степени подходящих способов получения разделенных реакционных смесей ПЦР заключается в получении замкнутых реакционных капель, причем каждая капля содержит разделенную реакционную смесь ПЦР. Таким образом, разделенные реакционные смеси ПЦР могут содержаться в каплях, полученных с применением генератора капель.

Размер таких капель может варьировать, но разделенные реакционные смеси ПЦР могут, например, содержаться каждая в капле объемом в диапазоне от 1 до 10000 пл, например около 1000 пл.

Капли, применяемые в данном изобретении, могут включать эмульсионные композиции (или смеси двух или более несмешивающихся жидкостей), например, как описано в патенте США № 7622280 или

как описано в приведенных ниже примерах. Капли могут генерироваться устройствами, описанными в WO/2010/036352. Термин "эмульсия" в данном документе может относиться к смеси несмешивающихся жидкостей (таких как масло и вода). Эмульсии масляной фазы и/или вода-в-масле позволяют проводить разделение реакционных смесей в водных каплях. Эмульсии могут содержать водные капли в непрерывной масляной фазе. Эмульсии, предлагаемые в данном документе, могут быть эмульсиями масло-в-воде, в которых капли являются каплями масла в непрерывной водной фазе. Капли, применяемые в данном документе, обычно предназначены для предотвращения смешивания между отсеками, причем каждый отсек защищает его содержимое от испарения и слияния с содержимым других отсеков.

Капли могут быть получены со средним диаметром около, менее чем около или более чем около или по меньшей мере около 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 300, 400 или 500 мкм. Средний диаметр капель может составлять от около 0,001 до около 500, от около 0,01 до около 500, от около 0,1 до около 500, от около 0,1 до около 100, от около 0,01 до около 100 или от около 1 до около 100 мкм. Известно, что микрожидкостные способы получения эмульсионных капель с применением микроканального поперечного потока или физического перемешивания дают монодисперсные или полидисперсные эмульсии. Капли могут быть монодисперсными каплями. Капли могут генерироваться таким образом, чтобы размер капель не отклонялся более чем на плюс или минус 5 % от среднего размера капель. В некоторых случаях капли генерируются таким образом, что размер капель не отклоняется более чем на плюс или минус 2% от среднего размера капель. Генератор капель может генерировать популяцию капель из одного образца, в которой размер ни одной из капель не отклоняется более чем на плюс или минус около 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% или 10% от среднего размера общей популяции капель.

Более высокая механическая стабильность может быть подходящей для микрожидкостных манипуляций и обработки с высоким сдвигом жидкой среды (например, в микрожидкостных капиллярах или с поворотом траектории движения жидкости на 90 градусов, например, клапаны). Предварительно и впоследствии термически обработанные капли или капсулы могут быть механически устойчивыми к стандартным манипуляциям с пипеткой и центрифугированию.

Капли могут быть полидисперсными или монодисперсными, образующимися при перемешивании, с помощью ультразвука или микрожидкостным методом при пропускании сквозь T-образный канал или другими средствами, хорошо известными из уровня техники.

Капля может быть образована путем пропускания масляной фазы сквозь водный образец. Водная фаза может содержать буферный раствор и реагенты для реакции ПЦР, включая нуклеотиды, праймеры, флуоресцентный(е) детекторный(е) зонд(ы), матричные нуклеиновые кислоты, фермент ДНК-полимеразы и, возможно, фермент обратной транскриптазы.

Водная фаза обычно содержит образец, реагенты для ПЦР, полимеразу нуклеиновой кислоты, набор праймеров и, необязательно, детекторные реагенты.

Масляная фаза может содержать фторированное базовое масло, которое может быть дополнительно стабилизировано путем сочетания с фторированным поверхностно-активным веществом, таким как перфторированный простой полиэфир. В некоторых случаях базовое масло может быть одним или более из HFE 7500, FC-40, FC-43, FC-70 или другого широко применяемого фторированного масла. В некоторых случаях анионным поверхностно-активным веществом является Ammonium Krytox (Krytox-AM), аммониевая соль Krytox FSH, или морфолиновое производное Krytox-FSH.

Масляная фаза может дополнительно содержать добавку для регулирования свойств масла, таких как давление паров или вязкость или поверхностное натяжение. Неограничивающие примеры включают перфтороктанол и 1H,1H,2H,2H-перфтордеканол.

Эмульсию можно составить для получения высокомонодисперсных капель с жидкоподобной межфазной пленкой, которая может быть преобразована путем нагревания в микрокапсулы с твердоподобной межфазной пленкой; такие микрокапсулы могут вести себя как биореакторы, способные удерживать содержимое в ходе реакции, такой как АИПР или ПЦР амплификация. Преобразование в форму микрокапсул может происходить при нагревании. Например, такое преобразование может происходить при температуре выше 50, 60, 70, 80, 90 или 95°C. В некоторых случаях такое нагревание осуществляют с помощью амплификатора. В процессе нагревания можно использовать наполнитель для жидкости или минерального масла, чтобы предотвратить испарение. Биосовместимые капсулы могут быть устойчивыми к слиянию и/или флокуляции в широком диапазоне термической и механической обработки.

В некоторых случаях каплю генерируют с применением коммерчески доступного генератора капель, такого как генератор капель Bio-Rad QX100™. АИПР и ПЦР могут быть выполнены с применением коммерчески доступного устройства, а капли могут быть проанализированы с применением коммерчески доступного считывателя капель, такого как генератор, например, Bio-Rad QX100™ Droplet Reader.

#### **Асимметричная инкрементная полимеразная реакция**

Способы по изобретению включают стадию асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР). Важно, чтобы АИПР выполнялась до любых стадий экспоненциальной ПЦР. Соответственно, в

общем стадию е) проводят до стадии f). АИПР включает стадии:

- i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы,
- ii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, что позволяет отжигать праймер-Н, но не праймер-Л,
- iii) необязательная инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре элонгации,
- iv) необязательное повторение стадий i-iii.

В общем, АИПР представляет собой асимметричную реакцию, приводящую к амплификации только одной нити последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, реакционная смесь ПЦР предпочтительно не содержит другого праймера, который вместе с праймером-Н способен амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, притом, что температура плавления указанного другого праймера была бы аналогичной или выше температуры плавления праймера-Н. В вариантах реализации изобретения, в которых набор праймеров содержит несколько праймеров-Н, предпочтительно, чтобы реакционная смесь ПЦР не содержала других праймеров, которые вместе с любым из праймеров-Н способны амплифицировать любую из последовательностей целевой нуклеиновой кислоты, притом, что температура плавления указанных других праймеров была бы аналогичной или превышающей температуру плавления праймера-Н. Предпочтительные значения температуры плавления праймеров описаны в разделах "Набор праймеров" и "Праймер-Л и Праймер-Н". Таким образом, при высокой температуре отжига только праймер-Н будет отжигаться, что приведет к полимеризации только из праймера-Н. Таким образом, множественные раунды АИПР приводят к амплификации только одной нити последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и, таким образом, АИПР, в принципе, представляет собой линейную амплификацию.

Часто полимеразы нуклеиновой кислоты проявляют элонгазную активность при высокой температуре отжига. В таких вариантах реализации изобретения высокую температуру отжига можно также считать температурой элонгации, даже если высокая температура отжига не является оптимальной температурой для полимеразы нуклеиновой кислоты. Таким образом, АИПР может включать только две повторяющиеся стадии, т.е., стадию денатурации путем инкубации при температуре денатурации и комбинированную стадию отжига и элонгации праймера-Н путем инкубации при высокой температуре отжига. В указанных вариантах реализации изобретения праймер-Н предпочтительно сконструирован таким образом, чтобы его температура плавления была температурой, при которой полимеразы нуклеиновой кислоты проявляет достаточную активность для каталитической элонгации праймера-Н.

Соответственно, АИПР на стадии е) может включать стадии:

- i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы,
- ii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, что позволяет отжигать праймер-Н, но не праймер-Л, причем высокая температура отжига также является температурой элонгации, что позволяет элонгацию отожженного праймера-Н,
- iii) повторение стадий i-ii.

В других вариантах реализации изобретения температура плавления праймера-Н отличается от температуры элонгации. В таких вариантах реализации изобретения АИПР на стадии е) может включать стадии:

- i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы,
- ii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, что позволяет отжигать праймер-Н, но не праймер-Л,
- iii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию отожженного праймера-Н,
- iv) повторение стадий i-iii.

Стадия i инкубации разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации выполняется достаточно долго, чтобы денатурировать ДНК до одонитевых молекул. Стадия i может выполняться в течение более длительного времени в течение первого цикла АИПР, чем в последующих циклах. Квалифицированный специалист сможет выбрать подходящую длительность инкубации при температуре денатурации. В первом цикле инкубация при температуре денатурации может длиться, например, от 0,5 до 10 мин (например, для ДНК-полимераз с горячим стартом), тогда как в следующих циклах инкубация при температуре денатурации, например, может длиться от 0,1 до 2 мин.

Аналогичным образом, квалифицированный специалист сможет выбрать подходящую длительность инкубации при высокой температуре отжига/температуре элонгации. В последнем цикле инкубация при температуре элонгации может длиться дольше, чем в других циклах, например, в диапазоне от 0,5 до 10 мин, тогда как в других циклах инкубация при температуре элонгации, например, может длиться от 0,1 до 2 мин. Как указано выше, высокая температура отжига может быть такой же, как температура элонгации. В вариантах реализации изобретения, в которых высокая температура отжига отличается от температуры элонгации, инкубация при температуре отжига может длиться, например, от 0,1 до 2

мин.

Стадии i-ii можно повторять подходящее количество раз. В общем, стадии i-ii повторяют столько раз, сколько будет достаточно для обеспечения очень низкого уровня или отсутствия ложноположительных сигналов. Например, стадии i-ii можно повторять от 8 до 256 раз, предпочтительно, в диапазоне от 16 до 128 раз, например, в диапазоне от 32 до 128 раз, например, около 64 раз, например, 64 раза.

В вариантах реализации изобретения, в которых высокая температура отжига и температура элонгации отличаются друг от друга, стадии i-iii можно повторять от 8 до 256 раз, предпочтительно в диапазоне от 16 до 128 раз, например, в диапазоне от 32 до 128 раз, например, около 64 раз, например, 64 раза.

Предпочтительно, чтобы во время АИПР происходило только инкрементное копирование. Другими словами, предпочтительно только одна нить целевой нуклеиновой кислоты служит матрицей для копирования во время АИПР. Если праймер-Н отжигает последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты, то во время АИПР предпочтительно синтезируется только нить, содержащая последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Поскольку АИПР является однонаправленной, указанные нити могут иметь разную длину, но предпочтительно они содержат, по меньшей мере, последовательность целевой нуклеиновой кислоты. В этом варианте реализации изобретения последовательность, комплементарная последовательности целевой нуклеиновой кислоты, предпочтительно не синтезируется во время стадии АИПР. Аналогично, если праймер-Н отжигает последовательность целевой нуклеиновой кислоты, то во время АИПР предпочтительно синтезируется только нить, содержащая последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Поскольку АИПР является однонаправленной, указанные нити могут иметь разную длину, но они предпочтительно содержат, по меньшей мере, последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. В этом варианте реализации изобретения последовательность целевой нуклеиновой кислоты предпочтительно не амплифицируется во время АИПР.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретения на стадии e) происходит элонгация праймера-Н, но при отсутствии обнаружимой элонгации праймера-L. Например, стадия e) может привести к элонгации праймера-Н, но при отсутствии элонгации праймера-L.

В одном варианте реализации изобретения стадия e) приводит к элонгации праймера-Н, но без обнаружимой элонгации любого другого праймера. Например, стадия e) может приводить к элонгации праймера-Н, но без элонгации какого-либо другого праймера.

Высокая температура отжига выбирается таким образом, чтобы обеспечить отжиг праймера-Н, но не праймера-L. Соответственно, предпочтительно высокая температура отжига значительно выше, чем температура плавления праймера-L. Таким образом, высокая температура отжига на стадии e) может быть по меньшей мере на 10°C выше, предпочтительно по меньшей мере на 15°C выше, например, по меньшей мере на 20°C, например, по меньшей мере на 25°C выше, чем температура плавления праймера-L.

Например, высокую температуру отжига можно установить на уровне около температуры плавления праймера-Н. Однако она может быть несколько ниже.

#### **Низкотемпературная ПЦР**

В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают стадию низкотемпературной ПЦР, которая выполняется после завершения АИПР и перед экспоненциальной ПЦР.

В таких вариантах реализации изобретения праймер-L обычно представляет собой модифицированный рассогласованием праймер-L, как описано в данном документе выше.

Это может быть, в частности, применительно к сложным мишеням (например, мишень с высокой степени гомологичной последовательностью в другом месте генома, такая как псевдоген), причем указанный модифицированный рассогласованием праймер-L может позволить использование более короткого праймера-L, с большей степенью специфичности в отношении истинной мишени.

Низкотемпературная ПЦР обычно включает стадии:

- 1) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы,
- 2) инкубация ПЦР с очень низкой температурой отжига, что позволяет отжигать как праймер-Н, так и часть праймера-L без рассогласований,
- 3) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию всех отоженных праймеров,
- 4) необязательное повторение стадий 1)-3), с получением таким образом продукта ПНР.

Эта стадия позволит амплифицировать продукт, который содержит рассогласованную часть праймера-L. Когда будет доступно достаточное количество указанного продукта, может быть проведена обычная экспоненциальная ПЦР с применением низкой температуры отжига, которая, например, может быть приблизительно равна температуре плавления праймера-L.

В общем, очень низкая температура отжига ниже, чем низкая температура отжига. Как правило, очень низкая температура отжига по меньшей мере на 5°C, предпочтительно по меньшей мере на 10°C, более предпочтительно по меньшей мере на 15°C, например, по меньшей мере на 20°C ниже, чем низкая температура отжига. Например, очень низкая температура отжига находится в диапазоне от 5 до 30°C

ниже, чем низкая температура отжига, например, очень низкая температура отжига может находиться в диапазоне от 20 до 25°C ниже, чем низкая температура отжига. Таким образом, очень низкая температура отжига может быть по меньшей мере на 20°C ниже, например, по меньшей мере на 25°C, например, по меньшей мере на 30°C, например, по меньшей мере на 35°C ниже, чем температура плавления праймера-Н.

Как правило, стадии 1)-3) могут повторяться более одного раза, например, в диапазоне от 1 до 40. Например, стадии 1)-3) повторяются от 2 до 10 раз, например, от 4 до 6 раз. Часто предпочтительно, чтобы общее число циклов ПЦР, выполняемых в ходе низкотемпературной ПЦР и экспоненциальной ПЦР, находилось в диапазоне от 20 до 40, например в диапазоне от 20 до 30. Таким образом, в зависимости от того, сколько раз повторяют стадии I-III экспоненциальной ПЦР, стадии 1)-3) низкотемпературной ПЦР могут повторяться до достижения общего количества циклов в диапазоне от 20 до 40, например в диапазоне от 20 до 30.

### Экспоненциальная ПЦР

Способы по изобретению включают стадию проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Чтобы отличить эту стадию от АИПР, ее также можно назвать "экспоненциальной ПЦР". В способах по изобретению полимеразную цепную реакцию проводят после АИПР. Экспоненциальная ПЦР, как правило, может включать стадии:

- i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы,
- ii) инкубация ПЦР с низкой температурой отжига, что позволяет отжигать как праймер-Н, так и праймер-L,
- iii) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию всех отоженных праймеров,
- iv) необязательное повторение стадий I-III с получением таким образом продукта ПНР.

Инкубация при низкой температуре отжига предпочтительно позволяет отжигать оба праймера из пары праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Соответственно, экспоненциальная ПЦР приведет к амплификации обеих нитей последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Теоретически указанная амплификация будет экспоненциальной и, следовательно, может называться "экспоненциальной ПЦР", хотя на практике она может не быть полностью экспоненциальной.

Экспоненциальная ПЦР может быть проведена любым способом, например, любым обычным способом проведения ПЦР, известным специалисту из уровня техники.

Стадию i) инкубации разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации проводят достаточно долго, чтобы денатурировать ДНК на одонитевые молекулы. Стадия i) может выполняться в течение более длительного периода времени в ходе первого цикла ПЦР, чем в более поздних циклах. Квалифицированный специалист сможет выбрать подходящую длительность инкубации при температуре денатурации. В первом цикле инкубация при температуре денатурации может составлять, например, от 0,5 до 10 мин, тогда как в следующих циклах инкубация при температуре денатурации, например, может составлять от 0,1 до 2 мин.

Аналогично, квалифицированный специалист сможет выбрать подходящую длительность инкубации при низкой температуре отжига. Например, длительность инкубации при низкой температуре отжига может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 2 мин.

Аналогичным образом, квалифицированный специалист сможет выбрать подходящую длительность инкубации при температуре элонгации. В последнем цикле инкубация при температуре элонгации может длиться дольше, чем в других циклах, например, в диапазоне от 0,5 до 10 мин, тогда как в других циклах длительность инкубации при температуре элонгации, например, может находиться в диапазоне от 0,1 до 2 мин.

Стадии I-III могут повторяться подходящее количество раз. В общем, предпочтительным будет не повторять стадии I-III слишком много раз, чтобы уменьшить риск ложноположительных сигналов. Например, стадия f) может включать повторяющиеся стадии i-iii в диапазоне от 15 до 60 повторений, предпочтительно в диапазоне от 20 до 40 повторений, например, в диапазоне от 20 до 30 повторений, например, в диапазоне от 25 до 30 повторений.

В вариантах реализации изобретения, в которых набор праймеров содержит дополнительные праймеры, кроме праймера-Н и праймера-L, указанные дополнительные праймеры в некоторых вариантах реализации изобретения также могут отжигать свою матрицу при низкой температуре отжига.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретения стадия f) приводит к элонгации праймера-Н и праймера-L. В другом варианте реализации изобретения стадия f) приводит к элонгации всех праймеров из набора праймеров.

Низкую температуру отжига выбирают таким образом, чтобы праймер-L мог отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, низкая температура отжига может быть, например, установлена приблизительно равной температуре плавления праймера-L. Однако она может быть несколько ниже.

Примеры методик ПЦР, которые могут быть применены для экспоненциальной ПЦР, включают, но не ограничиваясь этим, количественную ПЦР, количественную флуоресцентную ПЦР (КФ-ПЦР), мультиплексную флуоресцентную ПЦР (МФ-ПЦР), ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), ПЦР в одной ячейке, ПЦР с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), ПЦР-ПДРФ/ОТ-ПЦР-ПДРФ, ПЦР с горячим стартом, вложенную ПЦР, полони-ПЦР *in situ*, амплификацию по типу "катящегося кольца" (АКК) *in situ*, цифровую ПЦР (цПЦР), цифровую капельную ПЦР (цкПЦР), мостиковую ПЦР, пикотитровальную ПЦР и эмульсионную ПЦР.

### Обнаружение

Способы по изобретению в целом включают стадию обнаружения присутствия в продукте ПЦР варианта последовательности и/или последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Указанное обнаружение может быть выполнено любым подходящим способом, известным квалифицированному специалисту. Например, из уровня техники известны многочисленные подходящие способы обнаружения, которые могут быть применены со способами по изобретению.

В одном варианте реализации изобретения указанное обнаружение включает присутствие в разделенных реакционных смесях ПЦР детекторного реагента. Указанный детекторный реагент может быть любым детекторным реагентом, например, он может представлять собой соединение, содержащее обнаружимую метку, причем указанная обнаружимая метка, например, может представлять собой краситель, радиоактивность, флуорофор, тяжелый металл или любую другую обнаружимую метку.

Часто детекторный реагент содержит флуоресцентное соединение.

В одном варианте реализации изобретения детекторный реагент содержит или состоит из детекторных зондов. Детекторные зонды предпочтительно содержат или состоят из нуклеотидных олигомеров или полимеров, которые необязательно могут содержать нуклеотидные аналоги, такие как любой из нуклеотидных аналогов, описанных выше в разделе "Набор праймеров". Часто детекторный зонд может представлять собой олигомер ДНК. Как правило, детекторный зонд связан с обнаружимой меткой, например, ковалентной связью. Обнаружимая метка может быть любой из вышеупомянутых обнаружимых меток, но часто она представляет собой флуорофор. Зонд предпочтительно не способен специфически амплифицировать целевую нуклеиновую кислоту вместе с праймером-Н. Например, если праймер-Н содержит последовательность, идентичную фрагменту целевой последовательности, то зонд(ы) может содержать последовательность, идентичную другому фрагменту целевой последовательности. Если праймер-Н содержит последовательность, комплементарную фрагменту целевой последовательности, то зонд(ы) может содержать последовательность, комплементарную другому фрагменту целевой последовательности.

Детекторный зонд обычно способен специфически связываться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты. Например, детекторный зонд может быть способен специфически связываться с целевой нуклеиновой кислотой, содержащей вариант последовательности. Таким образом, детекторный зонд может быть способен отжигать последовательность целевой нуклеиновой кислоты или последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, детекторный зонд может содержать последовательность, идентичную фрагменту последовательности целевой нуклеиновой кислоты, или последовательность, комплементарную последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Обычно детекторный зонд предпочтительно содержит последовательность, отличающуюся от последовательности любого праймера из набора праймеров.

Детекторный(ые) зонд(ы) рассчитан на соответствующую температуру плавления. В одном варианте реализации изобретения температура плавления, по меньшей мере, одного детекторного зонда значительно ниже, чем температура плавления праймера-Н. Например, температура плавления всех детекторных зондов значительно ниже температуры плавления праймера-Н. Таким образом, температура плавления по меньшей мере одного детекторного зонда может быть по меньшей мере на 12°C ниже, предпочтительно по меньшей мере на 14°C ниже, еще более предпочтительно по меньшей мере на 16°C ниже, но более предпочтительно на 18°C ниже, например по меньшей мере на 20°C ниже, например, в диапазоне от 15 до 25°C, например, в диапазоне от 30 до 40°C или даже до 45°C ниже температуры плавления праймера-Н. Например, температура плавления всех детекторных зондов может быть по меньшей мере на 12°C ниже, предпочтительно по меньшей мере на 14°C ниже, еще более предпочтительно по меньшей мере на 16°C ниже, но более предпочтительно на 18°C ниже, например, по меньшей мере на 20°C ниже, например, в диапазоне от 15 до 45°C ниже, чем температура плавления праймера-Н. Однако также можно применять зонды с более высокой температурой плавления.

Температура плавления детекторного(ых) зонда(ов) предпочтительно является достаточно высокой для обеспечения специфического отжига детекторных зондов, но при этом значительно ниже температуры плавления праймера-Н. Часто температура плавления детекторных зондов может быть сходна с температурой плавления праймера-Л. Например, температура плавления по меньшей мере одного детекторного зонда может быть такой же, как температура плавления праймера-Л  $\pm 10^\circ\text{C}$ , такой же, как температура плавления праймера-Л  $\pm 5^\circ\text{C}$ , например, приблизительно такой же, как температура плавления праймера-Л. В других вариантах реализации изобретения температура плавления зонда может быть выше,

чем температура плавления праймера-L, например, на 15-20°C выше, чем температура плавления праймера-L. Таким образом, температура плавления детекторного зонда может, например, находиться в диапазоне от 35 до 60°C, например, в диапазоне от 35 до 55°C, предпочтительно в диапазоне от 40 до 50°C.

Часто будет предпочтительным, чтобы детекторный зонд обеспечивал другой обнаружимый сигнал в зависимости от наличия последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Это может быть достигнуто несколькими различными способами.

В одном варианте реализации изобретения детекторный зонд связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем, способным гасить сигнал флуорофора, если указанный детекторный зонд не связан со своей мишенью. Соответственно, флуоресценция указанного флуорофора не будет обнаруживаться. Однако, если детекторный зонд связывается с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты/последовательностью, комплементарной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, то это приводит к достаточной степени удаления гасителя из флуорофора, чтобы устранить гашение, что позволяет обнаружить флуоресценцию флуорофора. Удаление гасителя из флуорофора может выполняться различными способами. Например, в ПЦР может применяться полимеразы нуклеиновой кислоты, обладающая 5'-3'-экзонуклеазной активностью. При элонгации любой связанный зонд будет деградировать под влиянием указанной 5'-3'-экзонуклеазной активности, с отделением тем самым флуорофора от гасителя. Кроме того, трехмерная конформация детекторного зонда может меняться при связывании, что приводит к удалению гасителя из флуорофора.

В одном варианте реализации изобретения разделенные реакционные смеси ПЦР содержат детекторный реагент, который является детекторным зондом варианта. Детекторный зонд варианта представляет собой детекторный зонд, как описано выше, который способен гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, содержащей вариант последовательности, со значительно более высокой аффинностью, чем с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, не содержащей варианта последовательности.

В одном варианте реализации изобретения разделенные реакционные смеси ПЦР содержат детекторный реагент, который является детекторным зондом дикого типа.

Детекторный зонд дикого типа представляет собой детекторный зонд, как описано выше, который способен гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, не содержащей варианта последовательности. Может быть предпочтительным, чтобы детекторный зонд дикого типа мог гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, не содержащей варианта последовательности, со значительно более высокой аффинностью, чем с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, содержащей вариант последовательности. В вариантах реализации изобретения, относящихся к обнаружению присутствия последовательности целевой нуклеиновой кислоты, разделенные реакционные смеси ПЦР могут содержать детекторный реагент, который является детекторным зондом дикого типа. В таком варианте реализации изобретения может быть достаточным содержания в разделенных реакционных смесях ПЦР детекторного зонда только одного типа. Например, реакционные смеси ПЦР могут содержать детекторный зонд дикого типа в качестве единственного детекторного зонда, или реакционные смеси ПЦР могут содержать детекторный зонд варианта в качестве единственного детекторного зонда.

В одном варианте реализации изобретения каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР содержит как детекторный зонд варианта, так и детекторный зонд дикого типа. Это может, в частности, иметь место в вариантах реализации изобретения, относящихся к обнаружению варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

Детекторный зонд варианта может быть связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем, причем гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора. Предпочтительно, гаситель и флуорофор соединены с детекторным зондом варианта таким образом, что гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора, когда зонд находится в свободном состоянии. Таким образом, флуорофор и гаситель часто расположены достаточно близко друг к другу, таким образом, что гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора. В детекторном зонде варианта флуорофор и гаситель часто связаны с разными нуклеотидами.

Детекторный зонд дикого типа может быть связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем, причем гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора. Предпочтительно, гаситель и флуорофор соединены с зондом обнаружения дикого типа таким образом, что гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора, когда зонд находится в свободном состоянии. Таким образом, флуорофор и гаситель часто расположены достаточно близко друг к другу, таким образом, что гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора. В детекторном зонде дикого типа флуорофор и гаситель часто связаны с разными нуклеотидами.

В вариантах реализации изобретения с применением как детекторного зонда варианта, так и детекторного зонда дикого типа, детекторный зонд варианта может быть связан с другим флуорофором, чем детекторный зонд дикого типа. В частности, детекторный зонд варианта может быть связан по меньшей мере с одним флуорофором, флуоресценцию которого можно отличить от флуоресценции всех флуорофоров, связанных с детекторным зондом дикого типа. Аналогичным образом, детекторный зонд дикого

типа варианта может быть связан по меньшей мере одним с флуорофором, флуоресценцию которого можно отличить от флуоресценции всех флуорофоров, связанных с детекторным зондом варианта.

Стадия g) способов по изобретению может включать обнаружение флуоресценции детекторного зонда варианта. Таким образом, стадия g) может включать обнаружение флуоресценции флуорофора, связанного с детекторным зондом варианта. Это может иметь место, например, в вариантах реализации изобретения, в которых:

зонд варианта связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем, способным гасить флуоресценцию флуорофора;

полимераза нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК-полимеразу, обладающую 5'-3'-экзонуклеазной активностью; и/или

способ представляет собой способ обнаружения присутствия варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

Аналогично, стадия g) способов по изобретению может включать обнаружение флуоресценции детекторного зонда дикого типа. Таким образом, стадия g) может включать обнаружение флуоресценции флуорофора, связанного с детекторным зондом дикого типа. Это может иметь место, например, в вариантах реализации изобретения, в которых:

детекторный зонд дикого типа связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем, способным гасить флуоресценцию флуорофора;

полимераза нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК-полимеразу, обладающую 5'-3'-экзонуклеазной активностью; и/или

способ представляет собой способ обнаружения присутствия последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

В вариантах реализации изобретения, в которых ПЦР разделена на реакционные смеси ПЦР, содержащиеся в каплях, указанную флуоресценцию можно обнаружить, например, с применением детектора, дающего возможность обработки образцов в форме капель, причем обнаружение проводится для отдельных капель, поступающих в детектор, которые впоследствии покидают детектор. Например, устройство для проточной цитометрии может быть адаптировано для применения с целью обнаружения флуоресценции образцов в форме капель. В некоторых случаях для обнаружения флуоресценции капель в едином файле применяется микрожидкостное устройство, оснащенное насосами для управления движением капель. В некоторых случаях капли размещены на двумерной поверхности, а детектор перемещается относительно поверхности, обнаруживая флуоресценцию в каждом из положений, содержащем одну каплю.

После получения данных обнаружения флуоресценции для хранения и обработки данных можно использовать компьютер. Вычислительную логику компьютера можно использовать для выполнения таких функций, как вычитание фоновой флуоресценции, отнесение мишени и/или референтных последовательностей и количественный анализ данных. Компьютер может быть полезен для отображения, хранения, извлечения или вычисления результатов диагностики молекулярного профиля; отображения, хранения, извлечения или вычисления исходных данных анализа геномной экспрессии или экспрессии нуклеиновой кислоты; или отображения, хранения, извлечения или вычисления любой информации об образце или пациенте, полезной для описанных в данном документе способов.

Обнаружимый(е) сигнал(ы) может быть сгенерирован на основе обнаружимого света, испускаемого детекторным зондом дикого типа, и, необязательно, детекторным зондом варианта в частях. Детекторные зонды варианта могут сообщать, произошла ли по меньшей мере одна из двух или более конкретных реакций амплификации, представленных сигналом, в части, и, таким образом, присутствует ли по меньшей мере одна копия варианта последовательности в части. Уровень или амплитуда сигнала, соответствующего зондам, могут быть проанализированы для определения того, произошла ли по крайней мере одна из конкретных реакций и присутствует ли по крайней мере одна копия одной из конкретных мишеней. Уровень или амплитуда сигнала может варьировать в зависимости от наличия последовательности целевой нуклеиновой кислоты, присутствующей или отсутствующей в каждой части. Например, часть, положительная для конкретной мишени, может давать уровень или амплитуду сигнала, которая выше заданного порога и/или находится в заданном диапазоне. Части могут быть проанализированы и сигналы сгенерированы в любой(ых) подходящей(их) временной точке. Примеры временных точек включают окончание анализа (анализ конечной точки), когда реакции заканчиваются, и данные больше не меняются, или какой-либо более ранний период времени, когда данных уже достаточно и они позволяют надежно провести разделение. В общем, может быть предпочтительным, чтобы обнаружение выполнялось после выполнения количества циклов экспоненциальных ПЦР, необходимого для того, чтобы истинно положительные сигналы достигли достаточно высокой амплитуды.

В одном аспекте, представленном в данном документе, предлагается способ обнаружения присутствия целевой последовательности с применением одного детекторного зонда.

В некоторых случаях АИПР и экспоненциальная ПЦР проводятся в режиме цПЦР, такой как цкПЦР. Обнаружение и подсчет могут быть проведены для двух различных популяций капель с целью определения концентрации последовательности целевой нуклеиновой кислоты, содержащей вариант по-

следовательности (см. обзор на фиг. 1 А), по сравнению с не содержащей указанного варианта последовательности (см. фиг. 1В).

В данном документе флуорофор может означать соединение с флуоресцентной эмиссией, например, с максимумом флуоресцентной эмиссии в диапазоне от около 350 до около 900 нм. Можно применять широкий спектр флуорофоров, включая, но не ограничиваясь этим: 5-FAM (также называемый 5-карбоксихлорофлуоресцеином; также называемый спиро(изобензофуран-1(3Н), 9'-(9Н)ксантен)-5-карбоновой кислотой, 3',6'-дигидрокси-3-оксо-6-карбоксихлорофлуоресцеином); 5-гексахлорофлуоресцеин; ([4,7,2',4',5',7'-гексахлор (3',6'-дипивалоилфлуоресцеинил)-6-карбоновая кислота]); 6-гексахлорофлуоресцеин; ([4,7,2',4',5',7'-гексахлор-(3',6'-дипивалоилфлуоресцеинил)-5-карбоновая кислота]); 5-тетрахлорофлуоресцеин; ([4,7,2',7'-тетрахлор-(3',6'-дипивалоилфлуоресцеинил)-5-карбоновая кислота]); 6-тетрахлорофлуоресцеин; ([4,7,2',7'-тетрахлор-(3',6'-дипивалоилфлуоресцеинил)-6-карбоновая кислота]); 5-TAMRA (5-карбокситетраметилпродамин); Xanthylum, 9-(2,4-дикарбоксихлорид)-3,6-бис(диметиламино); 6-TAMRA (6-карбокситетраметилпродамин); 9-(2,5-дикарбоксихлорид)-3,6-бис(диметиламино); EDANS (5-((2-аминоэтил)амино)нафталин-1-сульфоная кислота); Cy5 (индодикарбоцианин-5); Cy3 (индодикарбоцианин-3); и BODIPY FL (2,6-дибром-4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-8-индацен-3-пропионая кислота); краситель Quasar™-670 (Biosearch Technologies); оранжевый краситель Cal Fluor™ (Biosearch Technologies); красители Rox; красители Max (Integrated DNA Technologies), а также их подходящие производные.

Гаситель в данном документе может означать молекулу или часть соединения, которая способна уменьшать флуоресценцию флуорофора при присоединении к детекторному зонду или находясь вблизи него. Гашение может происходить по любому из нескольких механизмов, включая резонансный перенос энергии флуоресценции, фотоиндуцированный перенос электронов, парамагнитное усиление интеркомбинационной конверсии, обменное взаимодействие Декстера и экситонное взаимодействие, такое как образование темных комплексов. Выбор гасителя может зависеть от применяемого флуорофора. Ряд коммерчески доступных гасителей известен из уровня техники и включает, но не ограничиваясь этим, DABCYL, гасители Black Hole™ (BHQ-1, BHQ-2 и BHQ-3), Iowa Black™ FQ и Iowa Black™ RQ. Это так называемые темные гасители. Им не присуща естественная флуоресценция, что позволяет устранить фон, наблюдаемый в случае других гасителей, таких как TAMRA, которые по своей природе являются флуоресцентными.

В литературе имеется большое количество практических руководств для выбора подходящих пар репортера-гасителя для конкретных зондов, примеры которых дают следующие ссылки: Clegg, Meth. Enzymol., 211: 353-388 (1992); Wo et al., Anal. Biochem., 218: 1-13 (1994); Pesce et al., editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); и т.п. Кроме того, в литературе приводятся ссылки, содержащие исчерпывающие списки флуоресцентных и хромогенных молекул и их соответствующие оптические свойства для выбора пар репортера-гасителя, например, Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); и т.п. Кроме того, в литературе имеется обширное руководство по дериватизации молекул репортера и гасителя для ковалентного присоединения с помощью широко применяемых реакционноспособных групп, которые могут быть добавлены к олигонуклеотиду, как проиллюстрировано в следующих ссылках: Haugland (цитируется выше); Ullman et al., патент США № 3996345; Khanna et al., патент США № 4351760.

Как обнаружимую метку (например, флуорофор), так и гаситель можно присоединить к зонду с применением способов, известных из уровня техники. В некоторых случаях одного из пары репортера/гасителя присоединяют к 5'-части зонда в направлении 5' относительно целевого локуса, если последовательность зонда является комплементарной целевому локусу, а другого из пары репортера/гасителя присоединяют к 3'-части зонда.

Обнаружимые метки и гасители могут быть введены при синтезе олигонуклеотида посредством стандартной фосфорамидитной химии. Кроме того, они могут быть введены после синтеза путем введения линкера с соответствующей функциональной группой в ходе синтеза олиго. После синтеза обнаружимый элемент (например, флуорофор) можно связать с функциональной группой олигонуклеотида. В случае более длинных последовательностей, чтобы обеспечить эффективное гашение, последовательности, расположенные непосредственно в направлении 3' относительно флуорофора и 5' относительно гасителя, могут быть сделаны комплементарными друг другу, чтобы позволить образование стебля шпильки (например, молекулярного маяка). Таким образом, во время фазы отжига АИПР и/или экспоненциальной ПЦР такой зонд будет гибридизоваться с амплифицированной целевой последовательностью, тем самым физически удаляя обнаружимую метку (например, флуорофор) от гасителя, что позволяет обнаруживать более интенсивную флуоресценцию. Однако в отсутствие амплифицированной целевой последовательности зонд образует шпильку, что ведет к сближению обнаружимого элемента (например, флуо-

рофора) и гасителя с ограничением флуоресценции в реакции. В таких реакциях для расщепления зонда не требуется полимеразы с 5'-3'-экзонуклеазной активностью. Надлежащее место присоединения сигнального репортера (например, флуорофора) и гасителя и расстояние между сигнальным репортером (например, флуорофором) и гасителем известно из уровня техники.

В некоторых случаях детекторный зонд является зондом TaqMan®.

В случае зонда TaqMan® (Heid et al., 1996) может применяться флуорогенная 5'-экзонуклеазная активность Taq-полимеразы для измерения количества целевых последовательностей в образцах кДНК. Зонды TaqMan® могут содержать флуорофор, обычно при 5'-основании или вблизи него, и гаситель может находиться при 3'-основании или вблизи него. Гаситель может быть красителем, таким как TAMRA, или может быть нефлуоресцентной молекулой, такой как 4-(4-диметиламинофенилазо)бензойная кислота (DABCYL). См. Tyagi et al., *Nature Biotechnology* 16:49-53 (1998). При облучении возбужденный флуоресцентный краситель скорее переносит энергию в соседнюю молекулу гасителя, чем флуоресцирует (это называется РПЭФ = Форстеровский или резонансный перенос энергии флуоресценции). Таким образом, непосредственная близость флуорофора и гасителя может предотвращать эмиссию флуоресценции, пока зонд остается интактным. Зонды TaqMan® могут быть сконструированы для отжига к внутреннему участку продукта ПЦР. Когда полимеразы реплицирует матрицу, с которой связан зонд TaqMan®, ее 5'-экзонуклеазная активность может расщеплять зонд. Такое расщепление может прекратить действие гасителя (без РПЭФ), и репортерный краситель начинает излучать флуоресценцию, которая может усиливаться в каждом цикле пропорционально скорости расщепления зонда. Накопление продуктов ПЦР может быть обнаружено путем мониторинга усиления флуоресценции флуорофора. Поскольку расщепление может происходить в случае, когда детекторный зонд гибридизуется с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, обнаруженная флуоресценция может быть результатом специфической амплификации. В некоторых случаях процесс гибридизации и расщепления не мешает экспоненциальной ПЦР. В некоторых случаях флуорогенный зонд не содержит G на 5'-конце. A и G, смежные с репортерным красителем, могут гасить репортерную флуоресценцию даже после расщепления.

В некоторых случаях детекторный зонд является молекулярным маяком. Молекулярные маяки (ММ) могут представлять собой олигонуклеотиды, предназначенные для обнаружения и количественного определения целевых нуклеиновых кислот (например, целевых ДНК). 5' и 3' концы ММ могут в совокупности содержать пару фрагментов, способных наделять ММ обнаружимыми свойствами. Один из концов может быть присоединен к флуорофору, а другой может быть присоединен к молекуле гасителя, способной гасить флуоресцентное излучение флуорофора. Например, в паре флуорофора/гасителя можно использовать флуорофор, такой как EDANS или флуоресцеин, например, на 5'-конце, и гаситель, такой как Dabcyl, например, на 3'-конце.

Если ММ присутствует в растворе в свободной форме, т.е., не гибридизован со второй нуклеиновой кислотой, то стебель ММ может быть стабилизирован путем комплементарного спаривания оснований. Такое самокомплементарное спаривание может приводить к образованию структуры "шпильчатой петли" для ММ, в которой фрагменты флуорофора и гасителя проксимальны друг относительно друга. При такой конфигурации флуоресцентный фрагмент можно гасить флуорофором.

Петля молекулярного маяка может быть комплементарной или идентичной части последовательности целевой нуклеиновой кислоты, таким образом, что гибридизация петли с ее комплементарной последовательностью в целевых локусах вынуждает диссоциацию стебля, тем самым удаляя флуорофор и гаситель друг от друга. Такое удаление может приводить к устранению флуорофора, что приводит к усилению флуоресценции ММ.

Более подробная информация о стандартных способах получения и применения ММ хорошо известна в литературе, например, в Leone et al. (1995) "Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA." *Nucleic Acids Res.* 26:2150-2155; Tyagi and Kramer (1996) "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization" *Nature Biotechnology* 14:303-308; Blok и Kramer (1997), патент США № 6548254.

Детекторный зонд может быть также зондом Scorpions™. Зонд Scorpions™ может обеспечить механизм обнаружения стебля-петли на основе РПЭФ аналогично Молекулярному Маяку, за исключением того, что зонд дополнительно содержит присоединенный сегмент, который служит амплификационным праймером (см., например, Whitcombe et al. *Nat. Biotechnol.* 1999, August 17(8): 804-7; патент США № 6326145). В некоторых случаях зонд может быть зондом Sunrise™. Зонд Sunrise™ может содержать праймер, присоединенный к шпильке зонда, который удлиняется в ходе амплификации. Такое расположение может отделять метку внутреннего гасителя от 5'-концевого флуорофора (Nazarenko et al., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25: 2516-2521).

3'-концевой нуклеотид олигонуклеотидного зонда можно блокировать или сделать неспособным к амплификации с помощью полимеразы нуклеиновой кислоты. Такую блокировку удобно осуществлять путем присоединения молекулы репортера или гасителя к концевому 3'-углероду олигонуклеотидного зонда с помощью линкерного фрагмента.

В некоторых случаях референтный зонд может быть введен в разделенные реакционные смеси

ПЦР. Референтный зонд может быть неспецифическим референтным зондом или специфическим референтным зондом. Референтный зонд может гибридизоваться с референтным локусом.

В одном варианте реализации изобретения способы по изобретению включают применение одной пары праймеров, состоящей из праймера-N и праймера-L, в сочетании с одним детекторным зондом, таким как детекторный зонд варианта или детекторный зонд дикого типа. В других вариантах реализации изобретения способы включают применение одной пары праймеров, состоящей из праймера-N и праймера-L, в сочетании с двумя детекторными зондами, которые представляют собой детекторный зонд варианта и детекторный зонд дикого типа.

В одном варианте реализации изобретения обнаружение осуществляют с помощью детекторного реагента, который является красителем. Краситель может быть, среди прочего, например, агентом связывания с большой бороздкой, агентом связывания с малой бороздкой, интеркалятором или внешним связующим агентом. Типичные красители, которые могут быть подходящими, включают люминесцентные цианины, фенантридины, акридины, индолы, имидазолы и т.п., такие как ДАФИ, краситель Hoechst® 33258, акридиновый оранжевый и т.д. Типичные интеркалирующие красители, которые могут быть подходящими, среди прочего, включают этидия бромид, пропидия йодид, Краситель EvaGreen®, зеленый краситель SYBR®, золотистый краситель SYBR® и 7-аминоактиномицин D (7-AAD).

В данном документе термин "зонд, способный обнаруживать специфическую мутацию", как правило, представляет собой зонд, содержащий непрерывную последовательность целевой последовательности, содержащей указанную мутацию, или комплементарную ей последовательность.

### **Способ прогнозирования наличия клинического состояния**

Способы по изобретению могут применяться во множестве различных областей. Фактически, способы подходят для любой области применения, в которой желательно обнаруживать присутствие последовательности целевой нуклеиновой кислоты и/или различать последовательности целевой нуклеиновой кислоты, содержащие или не содержащие варианта последовательности.

Например, способы могут быть пригодны для судебного применения, где часто проводится анализ нуклеиновых кислот на очень ограниченном количестве материала. Данные способы могут, например, применяться при подготовке фингерпринтов генетического материала для определения наличия конкретных полиморфизмов.

Одной из очень полезных областей применения способов по изобретению является прогнозирование наличия клинического состояния у индивидуума.

Многие клинические состояния связаны с наличием конкретных последовательностей целевой нуклеиновой кислоты. Некоторые клинические состояния характеризуются наличием варианта последовательности в целевой нуклеиновой кислоте. Другие клинические состояния связаны с маркерами, например, наличие варианта последовательности может быть показателем клинических состояний.

Таким образом, в одном варианте реализации изобретение относится к способам прогнозирования наличия клинического состояния у индивидуума, причем указанное клиническое состояние связано с наличием варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и, при этом, указанный способ включает стадии:

- а) обеспечение образца из организма указанного индивидуума, который содержит матричные нуклеиновые кислоты,
- б) применение описанных в данном документе способов обнаружения варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты, притом, что присутствие указанного варианта последовательности в указанной целевой нуклеиновой кислоте указывает на наличие указанного клинического состояния.

Многие клинические состояния связаны с наличием одного или более вариантов последовательности(ей). Таким образом, клиническое состояние может быть любым клиническим состоянием, связанным с наличием варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

Вариант последовательности может представлять собой биомаркер, который коррелирует, например, с наличием клинического состояния, с риском прогрессирования клинического состояния, с восприимчивостью клинического состояния к конкретному лечению или с риском смерти. Таким образом, вариант последовательности может быть соотнесен с прогнозированием относительно клинического состояния.

В одном варианте реализации изобретения клиническое состояние представляет собой рак. Указанный рак может быть любым видом рака, например, видом рака, выбранным из группы, состоящей из карциномы молочной железы, колоректального отдела, поджелудочной железы, желудка, стромальными опухолями ЖДТ, гепатоцеллюлярной, легкого, мелкоклеточной легкого, яичника, матки, шейки матки, мочевого пузыря, почек, предстательной железы, яичка, карциномой щитовидной железы, злокачественной меланомой, остеосаркомой, хондросаркомой, миосаркомой, глиобластомой или другими видами опухолей головного мозга, другими желудочно-кишечными и зародышевыми опухолями головы и шеи и злокачественными опухолями кроветворной системы.

Вариант последовательности может быть связан с указанным видом рака. Например, наличие вари-

анта последовательности может указывать на присутствие указанного вида рака. Однако часто требуется дополнительное исследование, чтобы определить, страдает ли указанный индивидуум указанным видом рака.

В приведенной ниже таблице представлены неограничивающие примеры мутаций, связанных с раком, присутствие которых может быть обнаружено с применением способов по изобретению. Однако квалифицированному специалисту будут известны многочисленные другие мутации, связанные с раком, которые могут быть обнаружены с применением способов по изобретению.

| Клиническое состояние | Белок  | Учетный номер UniProt | RefSeq ID | CCDS ID                  | Мутация(и)             |
|-----------------------|--------|-----------------------|-----------|--------------------------|------------------------|
| Рак молочной железы   | PIK3CA | P42336                | NM_006218 | CCDS43171 (SEQ ID NO:69) | H1047R, E542K, E545K   |
| Меланома              | BRAF   | P15056                | NM_004333 | CCDS5863 (SEQ ID NO:70)  | V600E                  |
| Рак легкого           | EGFR   | P00533                | NM_005228 | CCDS5514 (SEQ ID NO:71)  | L858R, T790M           |
| Колоректальный рак    | KRAS   | P01116                | NM_004985 | CCDS8702 (SEQ ID NO:72)  | G12D, G12V, G12C, G13D |

Перечисленные выше мутации указаны на уровне белка. Первая буква обозначает аминокислоту дикого типа, число - положение аминокислоты, а последняя буква -замену аминокислоты, обнаруженную у мутанта. Таким образом, в качестве примера H1047R указывает на то, что гистидин с номером аминокислоты 1047 был заменен аргинином. В данном документе для аминокислот используются однобуквенные коды ИЮПАК или трехбуквенные коды.

Таким образом, изобретение может относиться к способам и наборам компонентов, включающим (применение) пару праймеров, причем

праймер-Н содержит непрерывную последовательность в диапазоне от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 69, 70, 71 или 72, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность в диапазоне от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 69, 70, 71 или 72; или

праймер-Н содержит непрерывную последовательность в диапазоне от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 69, 70, 71 или 72, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность в диапазоне от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 69, 70, 71 или 72;

и при этом праймер-Н и праймер-Л вместе способны к амплификации целевой последовательности, содержащей по меньшей мере один из нуклеотидов, кодирующих любую из упомянутых в данном документе мутаций.

В одном варианте реализации изобретения предлагаются способы прогнозирования наличия клинического состояния у индивидуума, причем указанное клиническое состояние связано с наличием последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и при этом указанный способ включает стадии:

а) обеспечение образца из организма указанного индивидуума, который содержит матричные нуклеиновые кислоты,

б) применение описанных в данном документе способов обнаружения варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты,

причем, что присутствие указанной целевой нуклеиновой кислоты указывает на наличие указанного клинического состояния.

Клиническим состоянием является инфекция инфекционным возбудителем, и в этом случае целевая нуклеиновая кислота, например, может быть последовательностью нуклеиновой кислоты из генома указанного патогена.

Образец может быть любым образцом из организма указанного индивидуума. В частности, образец должен представлять собой образец, содержащий матричные нуклеиновые кислоты. В вариантах реализации изобретения, в которых клиническое состояние является раком, образец предпочтительно содержит ДНК из раковых клеток. Таким образом, образец может содержать раковые клетки, содержащие ДНК, и/или образец может содержать свободную ДНК, полученную из раковых клеток.

Образец может быть выбран, например, из группы, состоящей из образцов крови, биопсии, образцов фекалий, образцов слюны, образцов мочи, образцов вагинальной жидкости, образцов асцитной жидкости, образцов спинномозговой жидкости и образца тканевого экссудата. Кроме того, образец может быть частью любого из вышеперечисленного. Например, образец может быть образцом крови или его фракцией, такой как образец плазмы или образец сыворотки.

Матричные нуклеиновые кислоты могут быть любыми нуклеиновыми кислотами, содержащимися в образце, например, геномная ДНК или РНК. Кроме того, матричные нуклеиновые кислоты могут пред-

ставлять собой кДНК, полученную на основе РНК, присутствующей в образце.

В одном варианте реализации изобретения матричные нуклеиновые кислоты выбраны из группы, состоящей из внеклеточной ДНК, нуклеосомной ДНК и циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК), которая может быть обнаружена в циркулирующей крови и других жидкостях организма.

Образец в соответствии с настоящим изобретением может быть извлечен из организма индивидуума и использован в способах по изобретению.

Индивидуум может быть любым животным, таким как млекопитающее, включая человека. В предпочтительном варианте реализации изобретения индивидуум является человеком.

### Примеры

Ниже изобретение проиллюстрировано следующими примерами, которые, однако, не должны истолковываться как ограничивающие изобретение.

Объекты.

Изобретение может быть дополнительно определено следующими объектами.

1. Способ обнаружения присутствия варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты в образце, включающий стадии:

- a) обеспечение образца, содержащего матричные нуклеиновые кислоты;
- b) обеспечение набора праймеров, содержащего, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-L, притом, что температура плавления праймера-Н, по меньшей мере, на 10°C выше температуры плавления праймера-L, и, при этом, праймер-L содержит последовательность, комплементарную фрагменту продукта элонгации праймера-Н,
- c) обеспечение полимеразы нуклеиновой кислоты, обладающей полимеразной активностью при температуре элонгации,
- d) получение разделенных реакционных смесей ПЦР, каждая из которых содержит часть образца, набор праймеров, полимеразу нуклеиновой кислоты, реагенты для ПЦР и необязательно детекторные реагенты
- e) проведение асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР), включающий стадии:
  - i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы;
  - ii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, позволяющей отжигать праймер-Н, но не праймер-L;
  - iii) необязательная инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре элонгации;
  - iv) необязательное повторение стадий с i по ш;
- f) проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающей стадии:
  - i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы;
  - ii) инкубация ПЦР при низкой температуре отжига, позволяющей отжигать как праймер-Н, так и праймер-L;
  - iii) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию всех отоженных праймеров;
  - iv) необязательное повторение стадий II-IV, с получением таким образом продукта ПЦР;
- g) обнаружение присутствия в продукте ПЦР варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия e) приводит к амплификации только одной нити последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадия f) приводит к амплификации обеих нитей последовательности целевой нуклеиновой кислоты с получением продукта ПЦР.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что вариант последовательности представляет собой однонуклеотидную мутацию.

5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что вариант последовательности представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (ОНП).

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что продукт ПЦР может содержать как последовательность целевой нуклеиновой кислоты, содержащую вариант последовательности, так и последовательность целевой нуклеиновой кислоты, не содержащую варианта последовательности.

7. Способ обнаружения присутствия последовательности целевой нуклеиновой кислоты в образце, включающий стадии:

- a) обеспечение образца, содержащего матричные нуклеиновые кислоты;
- b) обеспечение набора праймеров, содержащего, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-L, притом, что температура плавления

праймера-Н, по меньшей мере, на 10°C выше температуры плавления праймера-Л и, при этом, праймер-Л содержит последовательность, комплементарную продукту элонгации праймера-Н,

с) обеспечение полимеразы нуклеиновой кислоты, обладающей полимеразной активностью при температуре элонгации, которая выше, чем температура плавления праймера Н,

д) получение разделенных реакционных смесей ПЦР, каждая из которых содержит часть образца, набор праймеров, полимеразу нуклеиновой кислоты, реагенты для ПЦР и необязательно детекторные реагенты,

е) проведение асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР), включающей стадии:

i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы;

ii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, позволяющей отжигать праймер-Н, но не праймер-Л;

iii) необязательная инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре элонгации;

iv) необязательное повторение стадий i-iii;

f) проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающей стадии:

i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы;

ii) инкубация ПЦР при низкой температуре отжига, позволяющей отжигать как праймер-Н, так и праймер-Л;

iii) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию всех отоженных праймеров;

iv) необязательное повторение стадий ii-iv с получением продукта ПЦР;

g) обнаружение того, содержит ли продукт ПЦР последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что АИПР на стадии е) включает стадии:

i. инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы;

ii. инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, позволяющей отжигать праймер-Н, но не праймер-Л, причем высокая температура отжига одновременно является температурой элонгации, что позволяет элонгацию отоженного праймера-Н;

iii. повторение стадий i-ii;

9. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что АИПР на стадии е) включает стадии:

i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации с денатурацией ДНК на однонитевые молекулы;

ii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, позволяющей отжигать праймер-Н, но не праймер-Л,

iii) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию отоженного праймера-Н;

iv) повторение стадий i-iii.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-Н в наборе праймеров является единственным праймером с температурой плавления, по меньшей мере, на 10°C выше, чем температура плавления праймера-Л.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что набор праймеров состоит из праймера-Н и праймера-Л, и, при этом, праймер-Н и праймер-Л способны специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-Н идентичен последовательности на 5'-конце последовательности целевой нуклеиновой кислоты, а праймер-Л идентичен комплементарной последовательности на 3'-конце последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадия е) приводит к элонгации праймера-Н при отсутствии обнаружимого элонгации праймера-Л.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадия е) приводит к элонгации праймера-Н без обнаружимого элонгации какого-либо другого праймера.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 15°C выше, чем температура плавления праймера-Л.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 16°C выше, предпочтительно по меньшей мере на 18°C выше, например, по меньшей мере на 20°C выше, например, в диапазоне от 15 до 50°C, например, в диапазоне от 15 до 25°C выше, чем температура плавления праймера-Л.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что температура плавления праймера-Н находится в диапазоне от 60 до 90°C, например, в диапазоне от 60 до 80°C, предпочтительно в диапазоне 70 до 85°C, например, в диапазоне от 70 до 80°C.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что температура плавления праймера-L находится в диапазоне от 30 до 55°C, например, в диапазоне от 35 до 55°C, предпочтительно в диапазоне от 40 до 50°C.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что температура плавления праймера-H по меньшей мере на 15°C выше температуры плавления любого другого праймера из набора праймеров, который вместе с праймером-H способен амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты

20. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что набор праймеров не содержит праймеров:

а) с температурой плавления, которая находится в диапазоне  $\pm 15^\circ\text{C}$ , предпочтительно в диапазоне  $\pm 20^\circ\text{C}$ , например, в диапазоне  $\pm 25^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-H; и

б) которые вместе с праймером-H могут образовывать пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что набор праймеров содержит более одного праймера-H, причем температура плавления любого праймера, который вместе с любым из праймеров-H образует пару праймеров по меньшей мере на 15°C ниже температуры плавления праймера-H из этой пары праймеров.

22. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-H содержит один или более нуклеотидных аналогов, например одну или более запертых нуклеиновых кислот (ЗНК).

23. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что каждая из разделенных реакционных смесей ПНР содержит в среднем не более 10, например, не более 5 матричных нуклеиновых кислот, содержащих последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

24. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что каждая из разделенных реакционных смесей ПНР содержится в каплях, полученных с применением генератора капель.

25. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что каждая из разделенных реакционных смесей ПНР содержится в капле объемом в диапазоне от 1 до 10000 пл, например, около 1000 пл.

26. Способ по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что разделенные реакционные смеси ПНР держатся на планшетах для микротитрования.

27. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадия е) включает повторяющиеся стадии i-iii в диапазоне от 8 до 256 повторений, предпочтительно в диапазоне от 16 до 128 повторений, например, в диапазоне от 32 до 128 повторений, например, около 64 повторений, например, 64 повторения.

28. Способ по любому из пп.9 и 10-27, отличающийся тем, что стадия е) содержит повторяющиеся стадии i-iii в диапазоне от 8 до 256 повторений, предпочтительно в диапазоне от 16 до 128 повторений, например, в диапазоне от 32 до 128 повторений, например, около 64 повторений, например, 64 повторения.

29. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что высокая температура отжига на стадии е), по меньшей мере, на 10°C выше, предпочтительно, по меньшей мере, на 15°C выше, например, по меньшей мере, на 20°C выше, чем температура плавления праймера-L.

30. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадия f) содержит повторяющиеся стадии i-iii в диапазоне от 15 до 60 повторений, предпочтительно в диапазоне от 20 до 40 повторений, например, в диапазоне от 20 до 30 повторений, например, в диапазоне от 25 до 30 повторений.

31. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-L представляет собой модифицированный праймер-L с рассогласованием, причем способ включает стадию низкотемпературной ПЦР между стадиями е) и f), и, при этом, низкотемпературная ПЦР включает стадии:

i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы;

ii) инкубация ПЦР при очень низкой температуре отжига, что позволяет отжигать как праймер-H, так и часть праймера-L без рассогласования;

iii) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгировать все отожденные праймеры;

iv) необязательное повторение стадий i-iii с получением таким образом продукта ПЦР.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что очень низкая температура отжига, по меньшей мере, на 5°C ниже, чем низкая температура отжига.

33. Способ по любому из пп.31-32, отличающийся тем, что очень низкая температура отжига, по меньшей мере, на 20°C ниже, чем низкая температура отжига.

34. Способ по любому из пп.31-33, отличающийся тем, что праймер-L представляет собой олигонуклеотид, состоящий из 5'-последовательности размером от 1 до 10 нуклеотидов; и непрерывной последовательности размером от 7 до 15 нуклеотидов, которая идентична или комплементарна фрагменту по-

следовательности целевой нуклеиновой кислоты.

35. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР содержит детекторный реагент, который является детекторным зондом варианта, причем указанный детекторный зонд варианта способен гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, содержащей вариант последовательности, со значительно более высокой аффинностью, чем с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, не содержащей варианта последовательности.

36. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР содержит детекторный реагент, который является детекторным зондом дикого типа, причем указанный детекторный зонд дикого типа способен гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, не содержащей варианта последовательности.

37. Способ по любому из пп.35 и 36, отличающийся тем, что каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР содержит детекторный зонд варианта и детекторный зонд дикого типа.

38. Способ по любому из пп.35-37, отличающийся тем, что детекторный зонд варианта связан с флуорофором и гасителем, причем гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора и, при этом, флуорофор и гаситель связаны с разными нуклеотидами зонда.

39. Способ по любому из пп.36-38, отличающийся тем, что детекторный зонд дикого типа связан с флуорофором и гасителем, причем гаситель способен гасить флуоресценцию флуорофора и, при этом, флуорофор и гаситель связаны с разными нуклеотидами зонда.

40. Способ по любому из пп.37-39, отличающийся тем, что детекторный зонд варианта связан с другим флуорофором, чем детекторный зонд дикого типа.

41. Способ по любому из пп.35-40, отличающийся тем, что стадия г) включает обнаружение флуоресценции флуорофора, связанного с детекторным зондом варианта.

42. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-Н выбран из группы, состоящей из праймеров-Н, приведенных в табл. 3.

43. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-Л выбран из группы, состоящей из праймеров-Л, приведенных в табл. 3.

44. Способ по любому из пп.35-43, отличающийся тем, что детекторный зонд варианта выбран из группы, состоящей из Зондов-МУТ, приведенных в табл. 3.

45. Способ по любому из пп.36-44, отличающийся тем, что детекторный зонд дикого типа выбран из группы, состоящей из Зондов-ДТ, приведенных в табл. 3.

46. Способ прогнозирования наличия клинического состояния у индивидуума, причем указанное клиническое состояние связано с наличием варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и, при этом, указанный способ включает стадии:

обеспечение образца из организма указанного индивидуума, который содержит матричные нуклеиновые кислоты;

применение способа по любому из пп.1-45;

притом, что наличие указанного варианта последовательности в указанной целевой нуклеиновой кислоте указывает на присутствие указанного клинического состояния.

47. Способ по п.46, отличающийся тем, что клиническое состояние представляет собой рак.

48. Способ по п.46, отличающийся тем, что мутация представляет собой мутацию, связанную с раком.

49. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что образец представляет собой образец крови или ее фракцию, а матричные нуклеиновые кислоты выбраны из группы, состоящей из внеклеточной ДНК, нуклеосомной ДНК и циркулирующей опухолевой ДНК.

50. Способ по любому из пп.45-49, отличающийся тем, что образец выбран из группы, состоящей из образцов слюны, образцов мочи, образцов вагинальной жидкости, образца асцитной жидкости, образцов спинномозговой жидкости и образцов тканевого экссудата.

51. Способ по любому из пп.45-50, отличающийся тем, что мутация выбрана из группы, состоящей из:

А) мутации в РРС3СА, такой как любая из мутаций Н1047R или Е542К или Е542К;

В) мутации в BRAF, такой как V600E;

С) мутации в KRAS, такой как любая из мутаций G12D, G12V, G12C или G13D; и

Д) мутации в EGFR, такой как любая из мутаций L858R или T790M.

52. Способ по любому из пп.45-50, отличающийся тем, что мутация выбрана из группы, состоящей из мутаций, приведенных в табл. 3.

53. Способ прогнозирования наличия клинического состояния у индивидуума, причем указанное клиническое состояние связано с наличием последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и, при этом, указанный способ включает следующие стадии:

обеспечение образца из организма указанного индивидуума, который содержит матричные нуклеиновые кислоты;

применение способа по любому из пп.7-45;

притом, что наличие указанной целевой нуклеиновой кислоты указывает на присутствие указанного клинического состояния.

54. Способ по п.53, отличающийся тем, что клиническое состояние представляет собой инфекцию инфекционным патогеном.

55. Способ по п.54, отличающийся тем, что целевая нуклеиновая кислота представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты из генома указанного патогена.

56. Набор компонентов, содержащий

набор праймеров, содержащий, по меньшей мере, пару праймеров, способных к специфической амплификации последовательности целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-L, и при этом температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 10°C выше температуры плавления праймера-L, притом, что праймер-L содержит последовательность, комплементарную продукту элонгации праймера-Н;

детекторный зонд, способный гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, причем указанный зонд связан, по меньшей мере, с одним флуорофором и, по меньшей мере, с одним гасителем;

полимеразу нуклеиновой кислоты;

реагенты для ПНР;

реагенты для приготовления капель, содержащих разделенные реакционные смеси ПНР.

57. Набор компонентов по п.56, отличающийся тем, что набор праймеров является таким, как определено в любом из пп.10-22.

58. Набор компонентов по любому из пп.56-57, отличающийся тем, что праймер-Н является таким, как определено в любом из пп.10-22.

59. Набор компонентов по любому из пп.56-58, отличающийся тем, что праймер-L является таким, как определено в любом из пп.10-22.

60. Набор компонентов по любому из пп.56-59, отличающийся тем, что детекторный зонд является таким, как определено в любом из пп.35-45.

61. Набор компонентов по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что праймер-Н выбран из группы, состоящей из праймеров-Н, приведенных в табл. 3.

62. Набор компонентов по любому из пп.56-61, отличающийся тем, что праймер-L выбран из группы, состоящей из праймеров-L, приведенных в табл. 3.

63. Набор компонентов по любому из пп.56-62, отличающийся тем, что детекторный зонд варианта выбран из группы, состоящей из Зондов-МУТ, приведенных в табл. 3.

64. Набор компонентов по любому из пп.56-63, отличающийся тем, что детекторный зонд дикого типа выбран из группы, состоящей из Зондов-ДТ, приведенных в табл. 3.

65. Набор компонентов по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 69, а праймер-L содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 69; или

праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 69, а праймер-L содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 69; и

при этом праймер-Н и праймер-L вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую, по меньшей мере, один из нуклеотидов 3140, 1624 или 1633 SEQ ID NO: 69.

66. Набор компонентов по п.65, отличающийся тем, что набор компонентов содержит зонд, способный обнаруживать мутацию A-G нуклеотида 3140 SEQ ID NO: 69; мутацию G-A нуклеотида 1624 SEQ ID NO: 69 и/или мутацию G-A нуклеотида 1633 SEQ ID NO: 69.

67. Набор компонентов по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 70, а праймер-L содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 70; или

праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 70, а праймер-L содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 70; и

при этом праймер-Н и праймер-L вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую нуклеотид 1799 SEQ ID NO: 70.

68. Набор компонентов по п.67, отличающийся тем, что набор компонентов содержит зонд, способный обнаруживать мутацию T-A нуклеотида 1799 SEQ ID NO: 70.

69. Набор компонентов по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 71, а праймер-L содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 71; или праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 71, а праймер-L содержит непре-

рывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 71;

и, при этом, праймер-Н и праймер-Л вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую, по меньшей мере, один из нуклеотидов 2573 или 2369 SEQ ID NO: 71.

70. Набор компонентов по п.69, отличающийся тем, что набор компонентов содержит зонд, способный обнаруживать:

мутацию Т-Г нуклеотида 2573 SEQ ID NO: 71; и/или мутацию С-Т нуклеотида 2369 SEQ ID NO: 71.

71. Набор компонентов по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что

праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 72, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 72; или

праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 72, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 72; и

при этом праймер-Н и праймер-Л вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую, по меньшей мере, нуклеотид 34, 35 или 38 SEQ ID NO: 72.

72. Набор компонентов по п.71, отличающийся тем, что набор компонентов содержит зонд, способный обнаруживать мутацию G-A нуклеотида 38 SEQ ID NO: 72; мутацию G-T нуклеотида 34 SEQ ID NO: 72; мутацию G-C нуклеотида 34 SEQ ID NO: 72; мутацию G-A нуклеотида 34 SEQ ID NO: 72; мутацию G-T нуклеотида 35 SEQ ID NO: 72; мутацию G-C нуклеотида 35 SEQ ID NO: 72 и/или мутацию G-A нуклеотида 35 SEQ ID NO: 72.

73. Набор компонентов по любому из пп.65-73, отличающийся тем, что праймер-Н состоит из указанной непрерывной последовательности в диапазоне от 50 до 100 нуклеотидов, причем до 20, например, до 15, например, до 10 нуклеотидов могут, быть заменены нуклеотидным аналогом, например, запертой нуклеиновой кислотой (ЗНК).

74. Набор компонентов по любому из пп.65-73, отличающийся тем, что праймер-Н состоит из непрерывной последовательности в диапазоне от 50 до 100 нуклеотидов, например, в диапазоне от 50 до 75 нуклеотидов указанной SEQ ID NO.

75. Набор компонентов по любому из пп.65-74, отличающийся тем, что праймер-Л состоит из указанной непрерывной последовательности в диапазоне от 10 до 20 нуклеотидов и до 10 дополнительных нуклеотидов.

76. Способ по любому из пп.1-55, отличающийся тем, что способ осуществляют с применением набора компонентов по любому из пп.55-75.

### Примеры

Ниже изобретение проиллюстрировано следующими примерами, которые, однако, не должны истолковываться как ограничивающие изобретение.

Пример 1. Способы ИДСПУК (Инкрементные До, Симметричные После, Улучшенное Качество).

Способ ИДСПУК представляет собой инновационный способ, позволяющий достоверно уменьшить последствия любых потенциальных ошибок ДНК-полимеразы, чтобы дать истинным положительным реакциям преимущество согласованного сигнала перед ложноположительными реакциями.

В данном примере описывается способ ИДСПУК в цифровой установке для капельной ПНР с применением специфических целевых пар праймеров и флуоресцентных зондов, которые различают вариант (например, мутант) и последовательности дикого типа (аллели). Однако принципы способа могут применяться ко многим различным системам на основе полимеразы.

В примере описаны способы обнаружения однонуклеотидной мутации в образце, который может содержать как дикий тип, так и мутантную ДНК.

Для пилотных анализов были сконструированы праймеры с высокой  $T_{пл}$  (праймер-Н) длиной ~ 60 п.о. и протестированы для подтверждения относительно эффективного действия при температурах отжига ~ 72°C или выше. Зонды были спроектированы таким образом, чтобы перекрывать вариантное основание с длиной ~ 13-16 п.о., с балансом между централизованным расположением варианта основания и попыткой максимизировать  $T_{пл}$ . Праймеры с низкой  $T_{пл}$  (праймер-Л) сконструированы как можно более короткими, с минимально возможной  $T_{пл}$  (обычно < 48°C), но при этом сохраняют надлежащую специфичность последовательности и, следовательно, достаточно качественный флуоресцентный сигнал независимо от флуорофора. Для зондов с флуоресцентной меткой и гасителем, как правило, применяли FAM для мутантного аллеля и HEX для дикого типа; но можно применять любые флуорофоры. Длина и  $T_{пл}$  зондов могут быть сходными с параметрами праймера-Л или на несколько градусов выше. Количество применяемых циклов АИПР может варьировать, но обычно может быть равно 64, и количество циклов симметричной ПЦР может варьировать, но обычно может быть равно 27. Поскольку применяется много термических циклов, и полимеразы теряет активность в зависимости от общего времени при высоких температурах, в данном примере выбрана длительность каждого шага денатурации 10 с (типичную программу термической циклизации см. в табл. 1).

Пример подходящей схемы анализа проиллюстрирован на фиг. 2. На фиг. 2 представлены праймер-Н и праймер-Л, а также Детекторный зонд мутанта (Зонд МУТ) и детекторный зонд дикого типа (Зонд

ДТ) для обнаружения двух мутаций в онкогене РПС3СА, а именно Н1047R и Е542К.

Типичные результаты для ИДСПУК по сравнению с анализом из уровня техники представлены на фиг. 3. Более конкретно, на фиг. 3 проиллюстрирован результат анализа ИДСПУК, выполненного в виде цифровой капельной ПЦР, с применением условий термической циклизации, приведенных в табл. 1, и праймеров и зондов, представленных на фиг. 2, по сравнению с коммерческими анализами производства Bio-Rad Laboratories (Анализ мутации РПС3СА р.Н1047R PrimePCR™, человек, номер по каталогу 100-31246, и Анализ мутации РПС3СА ДТ для р.Н1047R PrimePCR™, человек, номер по каталогу 100-31249), проведенными в соответствии со стандартным протоколом производителя (далее носит название "Коммерческий анализ").

Для осуществления коммерческих и ИДСПУК анализов проводили цифровую капельную ПЦР с применением приборов Bio-Rad Laboratories, включая генератор капель QX100 (номер по каталогу 186-3002) и устройство для считывания капель QX100 (номер по каталогу 186-3001), и программного обеспечения QuantaSoft (номер по каталогу 186-3003). В коммерческих анализах производства Bio-Rad Laboratories соблюдали протокол производителя. Анализы ИДСПУК проводили в соответствии с нашими способами по изобретению.

На фиг. 6 представлена частота мутантных аллелей по данным измерения в сравнении с ожидаемой частотой мутантных аллелей. Эксперименты проводили, по существу, как описано в данном документе выше со ссылкой на фиг. 3, за исключением того, что способы выполняли с применением матрицы, содержащей смесь дикого типа и мутантной ДНК в разных соотношениях, как проиллюстрировано на фигуре. В то время как в отрицательном контроле с применением способа ИДСПУК не обнаружено ложноположительных мутантных последовательностей, отрицательный контроль в коммерческом анализе показал такое же количество мутантов (ложноположительных), как и в образце с ожидаемой частотой мутантных аллелей 0,01%. Таким образом, при применении способа ИДСПУК ожидаемую частоту мутантных аллелей получают при полной тестируемой концентрации мутантной матрицы, тогда как коммерческий анализ дает такую же частоту мутантных аллелей по результатам измерения для образцов, не содержащих мутантной ДНК, 0,001% и 0,01% мутантной ДНК. Таким образом, способ ИДСПУК обнаруживает ожидаемый % мутантных аллелей даже в образце, содержащем всего 0,001% мутантной ДНК (см. фиг. 6, нижняя панель).

Таблица 1. Типичные условия термической циклизации ИДСПУК

| Стадия               | Циклы | Температура  | Время          |
|----------------------|-------|--------------|----------------|
| Активация фермента   | 1     | 95 °С        | 10 мин         |
| Денатурация          | 64    | 94 °С        | 10 с           |
| Отжиг/элонгация      |       | высок. темп. | 45 с           |
| Денатурация          | 27    | 94 °С        | 10 с           |
| Отжиг                |       | низк. темп.  | 30 с           |
| Элонгация            |       | 72 °С        | 30 с           |
| Деактивация фермента | 1     | 98 °С        | 10 мин         |
| Задержка             | 1     | 4 °С         | неопределенное |

На фиг. 4 представлены два разных праймера-Н, праймер-Л, а также Детекторный зонд мутанта (Зонд МУТ) и детекторный зонд дикого типа (Зонд ДТ) для обнаружения мутации в онкогене РПС3СА, а именно Н1047R.

Результат применения праймеров и зондов, представленных на фиг. 4, в разных реакционных способах проиллюстрирован на фиг. 5. Более конкретно, в разделенных реакционных смесях, содержащих бета 1 или бета 2 праймер-Н вместе с праймером-Л и специфическим для мутации и специфическим для дикого типа зондами, как представлено на фиг. 4, реакцию проводили с применением матричной ДНК с положительной мутацией (не показано, все анализы обнаруживали мутацию) и матрицы дикого типа, без АИПР (А), с АИПР при более низкой (67°С) температуре (В) и с АИПР при более высокой (74°) температуре (С). Значительное уменьшение количества ложноположительных сигналов достигнуто в С.

Цифровую капельную ПЦР и ИДСПУК проводили, как описано в данном документе выше, с применением условий циклизации термоциклизацией, приведенных на фиг. 5.

Аналогичные реакции ИДСПУК проводили с применением ряда различных праймеров. На фиг. 5D проиллюстрирован специфический для мутанта сигнал и отсутствие ложноположительных сигналов в анализе для обнаружения мутации РПС3СА Е542К. Применяли следующие праймеры и зонды:

| Ген    | Мутация АА | Мутация КП | Вид       | Последовательность (от 5' к 3')                                     |
|--------|------------|------------|-----------|---|
| РПС3СА | Е542К      | с.1624G>A  | Праймер-Н | T+AA+TA+AA+GA+AAAAGAAA+CAG<br>AGAA+TC+TC+CATTTAGCACTTACC<br>TGTGAC* |
| РПС3СА | Е542К      | с.1624G>A  | Праймер-Л | ATTCTACACGAGATC   |
| РПС3СА | Е542К      | с.1624G>A  | Зонд-ДТ   | CTCTCTGAAATCACTGAG  |
| РПС3СА | Е542К      | с.1624G>A  | Зонд-МУТ  | CTCTCTAAAATCACTGAG  |

\* Основания ЗНК обозначены символом "+" перед нуклеотидом.

На фиг. 5E проиллюстрирован специфический для мутанта сигнал и отсутствие ложноположительных сигналов в анализе для обнаружения мутации R133CA E542K. Применяли следующие праймеры и зонды:

| Ген    | Мутация AA | Мутация КП | Вид       | Последовательность (от 5' к 3')                              |
|--------|------------|------------|-----------|--|
| R133CA | E545K      | c.1633G>A  | Праймер-Н | T+AA+TA+AA+GA+AAAAGAAA+CAGAGAA+TC+TC+CATTTTAGCACTTACCTGTGAC* |
| R133CA | E545K      | c.1633G>A  | Праймер-L | ATTCTACACGAGATC  |
| R133CA | E545K      | c.1633G>A  | Зонд-ДТ   | TCACTGAGCAGGAG   |
| R133CA | E545K      | c.1633G>A  | Зонд-МУТ  | TCACTAAGCAGGAG   |

\* Основания ЗНК обозначены символом "+" перед нуклеотидом.

Праймер-Н, применяемый на фиг. 5D и 5E, содержал несколько оснований ЗНК, что приводило к высокой температуре плавления, обеспечивая значительную разницу  $T_{пл}$  между праймером-Н и праймером-L, так что стадия АИПР была чисто асимметричным (в одном направлении) копированием однонитевой матрицы. Как можно увидеть, ложноположительных результатов не обнаружено.

На фиг. 5F проиллюстрирован специфический для мутанта сигнал и отсутствие ложноположительных сигналов в анализе для обнаружения мутации NRAS Q61R. Применялись следующие праймеры и зонды:

| Ген  | Мутация AA | Мутация КП | Вид       | Последовательность (от 5' к 3')                             |
|------|------------|------------|-----------|---|
| NRAS | Q61R       | c.182A>G   | Праймер-Н | CCAGGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTATAGATGGTGAAACCTGTTGTGGACATACTGG |
| NRAS | Q61R       | c.182A>G   | Праймер-L | GATTTGGTCTCTCATG  |
| NRAS | Q61R       | c.182A>G   | Зонд-ДТ   | CTTCTGTCCAGCTG  |
| NRAS | Q61R       | c.182A>G   | Зонд-МУТ  | CTTCTCGTCCAGCTG   |

Теоретические расчеты, предполагающие 100% эффективность для количества копий мутантных аллелей на цикл ИДСПУК АИПР и симметричной ПЦР по сравнению со стандартной ПЦР, приведены в табл. 2. Как можно увидеть, в типичной точке обнаружения сигнала с применением способа ИДСПУК после 27 цикла, наилучший сценарий введения ложноположительного варианта в цикле 1 приводит к генерации ложных нуклеиновых кислот в количестве около 2 % по сравнению с истинно положительной реакцией. И наоборот, в анализе со стандартной ПЦР ложноположительные нуклеиновые кислоты могут присутствовать в количестве около 25 % от общего количества истинно положительных результатов по существу в любом цикле (обычно обнаружение проводится с 40 циклами), что способствует возникновению значительного ложноположительного сигнала.

Таблица 2. Теоретические расчеты для копий мутантных аллелей

| РАЗДЕЛЕННЫЕ РЕАКЦИОННЫЕ СМЕСИ    | ЦИКЛ | ВСЕГО КОПИЙ МУТ (ИЗ 1 ДИПЛОИДНОГО МУТАНТА) | ВСЕГО КОПИЙ МУТ (ИЗ 1-ГО ЦИКЛА ДТ → МУТ ОШИБКА ПОЛИМЕРАЗЫ) | ВСЕГО КОПИЙ МУТ (ИЗ 1 ДИПЛОИДНОГО МУТАНТА) | ВСЕГО КОПИЙ МУТ (ИЗ 1-ГО ЦИКЛА ДТ → МУТ ОШИБКА ПОЛИМЕРАЗЫ) |
|----------------------------------|------|--|--|--|--|
|                                  |      | АИПР / СИММЕТРИЧНАЯ ПЦР                    | АИПР / СИММЕТРИЧНАЯ ПЦР                                    | СТАНДАРТНАЯ ПЦР                            | СТАНДАРТНАЯ ПЦР  |
| НАЧАЛЬНОЕ КОЛ-ВО МУТАНТНЫХ КОПИЙ | 0    | 2  | —  | 2  | —  |
|                                  | 1    | 3  | 1 (ОШИБКА ПОЛИМЕРАЗЫ)                                      | н/о  | н/о  |

## 038921

|                                    |    |                   |                   |                   |                        |
|------------------------------------|----|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
|                                    | 2  | 4                 | 1                 | н/о               | н/о                    |
|                                    | 6  | 8                 | 1                 | н/о               | н/о                    |
| СТАДИЯ АИПР                        | 14 | 16                | 1                 | н/о               | н/о                    |
|                                    | 30 | 32                | 1                 | н/о               | н/о                    |
|                                    | 62 | 64                | 1                 | н/о               | н/о                    |
|                                    | 64 | 66                | 1                 | н/о               | н/о                    |
|                                    | 1  | 132               | 2                 | 4                 | 1 (ОШИБКА ПОЛИМЕРАЗ Ы) |
|                                    | 2  | 264               | 4                 | 8                 | 2                      |
|                                    | 3  | 528               | 8                 | 16                | 4                      |
|                                    | 4  | 1056              | 16                | 32                | 8                      |
|                                    | 5  | 2112              | 32                | 64                | 16                     |
|                                    | 6  | 4224              | 64                | 128               | 32                     |
|                                    | 7  | 8448              | 128               | 256               | 64                     |
|                                    | 8  | 16896             | 256               | 512               | 128                    |
|                                    | 9  | 33792             | 512               | 1024              | 256                    |
|                                    | 10 | 67584             | 1024              | 2048              | 512                    |
|                                    | 11 | 135168            | 2048              | 4096              | 1024                   |
| СИММЕТРИЧ НАЯ ПЦР                  | 12 | 270336            | 4096              | 8192              | 2048                   |
| ИЛИ                                | 13 | 540672            | 8192              | 16384             | 4096                   |
| СТАНДАРТНА Я ПЦР                   | 14 | 1081344           | 16384             | 32768             | 8192                   |
|                                    | 15 | 2162688           | 32768             | 65536             | 16364                  |
|                                    | 16 | 4325376           | 65536             | 131072            | 32768                  |
|                                    | 17 | 8650752           | 131072            | 262144            | 65536                  |
|                                    | 18 | 17301504          | 262144            | 524288            | 131072                 |
|                                    | 19 | 34603008          | 524288            | 1048576           | 262144                 |
|                                    | 20 | 69206016          | 1048576           | 2097152           | 524288                 |
|                                    | 21 | 138412032         | 2097152           | 4194304           | 1048576                |
|                                    | 22 | 276824064         | 4194304           | 8388608           | 2097152                |
|                                    | 23 | 553648128         | 8388608           | 16777216          | 4194304                |
|                                    | 24 | 1107296256        | 16777216          | 33554432          | 8388608                |
|                                    | 25 | 2214592512        | 33554432          | 67108864          | 16777216               |
|                                    | 26 | 4429185024        | 67108864          | 134217728         | 33554432               |
| ТИПИЧНАЯ ТОЧКА ОБНАРУЖЕНИЯ СИГНАЛА | 27 | <b>8856370048</b> | 134217728         | 268435456         | 67108864               |
|                                    | 28 | 17716740096       | 268435456         | 536870912         | 134217728              |
|                                    | 29 | 35433480192       | 536870912         | 1073741824        | 268435456              |
|                                    | 30 | 70866960384       | 1073741824        | 2147483648        | 536870912              |
|                                    | 31 | 141733920768      | 2147483648        | 4294967296        | 1073741824             |
|                                    | 32 | 283467841536      | 4294967296        | <b>8589934592</b> | 2147483648             |
|                                    | 33 | 566935683072      | <b>8589934592</b> | 17179869184       | 4294967296             |
|                                    | 34 | 1133871366144     | 17179869184       | 34359738368       | <b>8589934592</b>      |
|                                    | 35 | 2267742732288     | 34359738368       | 68719476736       | 17179869184            |
|                                    | 36 | 4535485464576     | 68719476736       | 137438953472      | 34359738368            |
|                                    | 37 | 9070970929152     | 137438953472      | 274877906944      | 68719476736            |
|                                    | 38 | 18141941858304    | 274877906944      | 549755813888      | 137438953472           |
|                                    | 39 | 36283883716608    | 549755813888      | 1099511627776     | 274877906944           |
|                                    | 40 | 72567767433216    | 1099511627776     | 2199023255552     | 549755813888           |

Специалист в данной области техники сможет сконструировать подходящие праймеры и детекторные зонды других мутаций в соответствии с описанным в данном документе способом ИДСПУК. В табл. 3 приведены неограничивающие примеры подходящих праймеров-Н, праймеров-L и детекторных зондов

ряда различных мутаций.

Каждая из мутаций, описанных в табл. 3, может быть обнаружена посредством выполнения ИД-СПУК, как описано в данном документе, причем реакционная смесь ИДСПУК содержит праймер-Н, праймер-Л Зонд-ДТ и Зонд-МУТ, указанные для конкретной мутации в табл. 3. Способ ИДСПУК может быть выполнен по существу так, как описано в данном примере, например, с применением условий термической циклизации, приведенных в табл. 1. Высокая и низкая температура отжига может быть установлена в соответствии с  $T_{пл}$ , указанной в табл. 3.

Таблица 3

| Ген        | Мутация AA | Мутация КП    | Вид       | Направление | Тпл (°C) | Длина (п.о.) | Последовательность (от 5' к 3')  |
|------------|------------|---------------|-----------|-------------|----------|--------------|--|
| PIK3C<br>A | H1047R     | c.3140A><br>G | Праймер-Н | П           | 82       | 60           | AAGACCCTAGCCTTAGA<br>TAAACTGAGCAAGAG<br>GCTTTGGAGTATTTTCAT<br>GAAACAAATG   |
| PIK3C<br>A | H1047R     | c.3140A><br>G | Праймер-Л | О           | 51,4     | 16           | CATTTTTGTTGTCCAG   |
| PIK3C<br>A | H1047R     | c.3140A><br>G | Зонд-ДТ   | О           | 54       | 14           | CCACCATGATGTGC   |
| PIK3C<br>A | H1047R     | c.3140A><br>G | Зонд-МУТ  | О           | 57,7     | 14           | CCACCATGACGTGC   |
| PIK3C<br>A | E542K      | c.1624G><br>A | Праймер-Н | О           | 78,7     | 60           | CTGTAATAAAGAAAAA<br>GAAACAGAGAATCTCC<br>ATTTTAGCACTTACCTG<br>TGACTCCATAG   |
| PIK3C<br>A | E542K      | c.1624G><br>A | Праймер-Л | П           | 31,8     | 12           | CTACACGAGATC   |
| PIK3C<br>A | E542K      | c.1624G><br>A | Зонд-ДТ   | П           | 46,9     | 16           | CTCTGAAATCACTGAG   |
| PIK3C<br>A | E542K      | c.1624G><br>A | Зонд-МУТ  | П           | 43,9     | 16           | TCTCTAAAATCACTGA   |
| PIK3C<br>A | E545K      | c.1633G><br>A | Праймер-Н | О           | 78,7     | 60           | CTGTAATAAAGAAAAA<br>GAAACAGAGAATCTCC<br>ATTTTAGCACTTACCTG<br>TGACTCCATAG   |
| PIK3C<br>A | E545K      | c.1633G><br>A | Праймер-Л | П           | 31,8     | 12           | CTACACGAGATC   |
| PIK3C<br>A | E545K      | c.1633G><br>A | Зонд-ДТ   | П           | 49,2     | 14           | TCACTGAGCAGGAG   |
| PIK3C<br>A | E545K      | c.1633G><br>A | Зонд-МУТ  | П           | 44,9     | 14           | TCACTAAGCAGGAG   |
| BRAF       | V600E      | c.1799T><br>A | Праймер-Н | О           | 89,6     | 60           | TCTTACCATCCACAAAA<br>TGGATCCAGACAACCTGT<br>TCAAACCTGATGGGACCC<br>ACTCCATCG |
| BRAF       | V600E      | c.1799T><br>A | Праймер-Л | П           | 45,6     | 15           | GATTTTGGTCTAGCT  |
| BRAF       | V600E      | c.1799T><br>A | Зонд-ДТ   | П           | 44,2     | 14           | ACAGTGAAATCTCG   |
| BRAF       | V600E      | c.1799T><br>A | Зонд-МУТ  | П           | 43,3     | 14           | ACAGAGAAATCTCG   |
| EGFR       | L858R      | c.2573T><br>G | Праймер-Н | О           | 89,5     | 60           | AAGCCACCTCCTTACTT<br>TGCCTCCTTCTGCATGG<br>TATTCTTTCTTCCGCA<br>CCCAGCAG     |

|      |       |           |           |   |      |    |  |
|------|-------|-----------|-----------|---|------|----|--|
| EGFR | L858R | c.2573T>G | Праймер-L | П | 42   | 14 | TGTCAAGATCACAG   |
| EGFR | L858R | c.2573T>G | Зонд-ДТ   | П | 60,7 | 13 | TTTTGGGCTGGCG  |
| EGFR | L858R | c.2573T>G | Зонд-МУТ  | П | 60,4 | 12 | TTTTGGGCGGGC   |
| EGFR | T790M | c.2369C>T | Праймер-Н | О | 93   | 60 | TGGGAGCCAATATTGTC<br>TTTGTGTTCCCGGACAT<br>AGTCCAGGAGGCAGCC<br>GAAGGGCATG |
| EGFR | T790M | c.2369C>T | Праймер-L | П | 43,5 | 10 | ACCGTGCAGC   |
| EGFR | T790M | c.2369C>T | Зонд-ДТ   | П | 51,2 | 13 | TCATCACGCAGCT  |
| EGFR | T790M | c.2369C>T | Зонд-МУТ  | П | 47   | 13 | TCATCATGCAGCT  |
| KRAS | G13D  | c.38G>A   | Праймер-Н | О | 84,4 | 60 | ATTGTTGGATCATATTC<br>GTCCACAAAATGATTCT<br>GAATTAGCTGTATCGTC<br>AAGGCACTC |
| KRAS | G13D  | c.38G>A   | Праймер-L | П | 37,9 | 13 | CTTGTGGTAGTTG  |
| KRAS | G13D  | c.38G>A   | Зонд-ДТ   | П | 53,4 | 13 | CTGGTGGCGTAGG  |
| KRAS | G13D  | c.38G>A   | Зонд-МУТ  | П | 45,6 | 13 | CTGGTGACGTAGG  |
| KRAS | G12C  | c.34G>T   | Праймер-Н | О | 84,4 | 60 | ATTGTTGGATCATATTC<br>GTCCACAAAATGATTCT<br>GAATTAGCTGTATCGTC<br>AAGGCACTC |
| KRAS | G12C  | c.34G>T   | Праймер-L | П | 37,9 | 13 | CTTGTGGTAGTTG  |
| KRAS | G12C  | c.34G>T   | Зонд-МУТ  | П | 50,3 | 13 | AGCTTGTGGCGTA  |
| KRAS | G12C  | c.34G>T   | Зонд-ДТ   | П | 53,6 | 13 | AGCTGGTGGCGTA  |
| KRAS | G12R  | c.34G>C   | Праймер-Н | О | 84,4 | 60 | ATTGTTGGATCATATTC<br>GTCCACAAAATGATTCT<br>GAATTAGCTGTATCGTC<br>AAGGCACTC |
| KRAS | G12R  | c.34G>C   | Праймер-L | П | 37,9 | 13 | CTTGTGGTAGTTG  |
| KRAS | G12R  | c.34G>C   | Зонд-МУТ  | П | 53,8 | 13 | AGCTCGTGGCGTA  |
| KRAS | G12R  | c.34G>C   | Зонд-ДТ   | П | 53,6 | 13 | AGCTGGTGGCGTA  |
| KRAS | G12S  | c.34G>A   | Праймер-Н | О | 84,4 | 60 | ATTGTTGGATCATATTC<br>GTCCACAAAATGATTCT<br>GAATTAGCTGTATCGTC<br>AAGGCACTC |
| KRAS | G12S  | c.34G>A   | Праймер-L | П | 37,9 | 13 | CTTGTGGTAGTTG  |
| KRAS | G12S  | c.34G>A   | Зонд-МУТ  | П | 45,7 | 13 | AGCTAGTGGCGTA  |
| KRAS | G12S  | c.34G>A   | Зонд-ДТ   | П | 53,6 | 13 | AGCTGGTGGCGTA  |
| KRAS | G12V  | c.35G>T   | Праймер-Н | О | 84,4 | 60 | ATTGTTGGATCATATTC<br>GTCCACAAAATGATTCT<br>GAATTAGCTGTATCGTC<br>AAGGCACTC |
| KRAS | G12V  | c.35G>T   | Праймер-L | П | 37,9 | 13 | CTTGTGGTAGTTG  |
| KRAS | G12V  | c.35G>T   | Зонд-МУТ  | П | 50,3 | 13 | AGCTGTTGGCGTA  |
| KRAS | G12V  | c.35G>T   | Зонд-ДТ   | П | 53,6 | 13 | AGCTGGTGGCGTA  |
| KRAS | G12A  | c.35G>C   | Праймер-Н | О | 84,4 | 60 | ATTGTTGGATCATATTC<br>GTCCACAAAATGATTCT<br>GAATTAGCTGTATCGTC<br>AAGGCACTC |
| KRAS | G12A  | c.35G>C   | Праймер-L | П | 37,9 | 13 | CTTGTGGTAGTTG  |
| KRAS | G12A  | c.35G>C   | Зонд-МУТ  | П | 54,1 | 13 | AGCTGCTGGCGTA  |
| KRAS | G12A  | c.35G>C   | Зонд-ДТ   | П | 53,6 | 13 | AGCTGGTGGCGTA  |
| KRAS | G12D  | c.35G>A   | Праймер-Н | О | 84,4 | 60 | ATTGTTGGATCATATTC<br>GTCCACAAAATGATTCT<br>GAATTAGCTGTATCGTC<br>AAGGCACTC |
| KRAS | G12D  | c.35G>A   | Праймер-L | П | 37,9 | 13 | CTTGTGGTAGTTG  |
| KRAS | G12D  | c.35G>A   | Зонд-МУТ  | П | 50,1 | 13 | AGCTGATGGCGTA  |
| KRAS | G12D  | c.35G>A   | Зонд-ДТ   | П | 53,6 | 13 | AGCTGGTGGCGTA  |

## Пример 2.

Методы ИДСПУК выполняли, по существу, как описано в примере 1, за исключением того, что применяли дополнительную стадию низкотемпературной ПЦР. В данном примере способа ИДСПУК для Праймера-L используется рассогласованная последовательность. Это приводит к дополнительному разрыву в разнице эффективной температуры плавления между Праймером-Н и Праймером-L на стадии АИПР.

Дизайн анализа, применяемый в данном примере, проиллюстрирован на фиг. 7А и включает праймер-Н, детекторный зонд дикого типа (зонд ДТ) и детекторный зонд варианта (зонд МУТ). Кроме того, анализ включает применение Праймера-L, содержащего 4 рассогласованных нуклеотида. Способ, применяемый в данном примере, включает стадию АИПР, стадию ПЦР с низкой температурой, а затем экспоненциальную ПЦР. Точная программа амплификатора представлена на фиг. 7В.

Настоящий пример представляет собой анализ ИДСПУК для мутации KRAS G13D. Рассогласованная последовательность длиной 4 основания введена на 5'-конце Праймера-L, а последовательность праймера, комплементарная мишени, является короткой. Поэтому температура плавления Праймера-L очень низкая, и отжиг при высокой температуре отжига на стадии АИПР (в данном примере 73°C) не будет происходить. На симметричной стадии применяемая температура отжига очень низкая (в данном примере 30°C). После нескольких циклов (в данном примере 5 циклов) последовательность, комплементарную полноразмерному Праймеру-L, вводят в синтезированный продукт, и симметричная ПЦР может быть продолжена при более высокой температуре отжига (в данном примере 53°C), причем теперь полноразмерный Праймер-L является идеально подходящим.

Результат представлен на фиг. 7В и демонстрирует специфический для мутанта сигнал и отсутствие ложноположительных результатов.

## Перечень последовательностей

```

<110> Saga Diagnostics AB
<120> Обнаружение целевой нуклеиновой кислоты и вариантов
<130> P3800PC00
<160> 72
<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1
<211> 60
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер-Н

<400> 1
aagaccctag ccttagataa aactgagcaa gaggctttgg agtatttcat gaaacaaatg
60

<210> 2
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер-L

<400> 2
catttttgtt gtccag
16

<210> 3
<211> 14
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Зонд ДТ

<400> 3
ccaccatgat gtgc
14

<210> 4
<211> 14
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Зонд-МУТ

<400> 4

```

ссaccatgac gtgc

14

<210> 5

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер-Н

<400> 5

ctgtaataaa gaaaaаааа саgаgааtct ссatttttagc acttacctgt gactccatag

60

<210> 6

<211> 12

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер-L

<400> 6

сtасасgаgа tс

12

<210> 7

<211> 16

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Зонд-ДТ

<400> 7

ctctgaaatc actgag

16

<210> 8

<211> 16

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Зонд-МУТ

<400> 8

tctctaaaat сactga

16

<210> 9

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер-Н

&lt;400&gt; 9

ctgtaataaa gaaaaааааа сагагаатсt ссатттtagc acttacctgt gactccatag  
60

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер-L

&lt;400&gt; 10

сacacacaga tc  
12

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Зонд-ДТ

&lt;400&gt; 11

tcactgagca ggaг  
14

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность Зонд-МУТ

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Зонд-МУТ

&lt;400&gt; 12

tcactaagca ggaг  
14

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер-Н

&lt;400&gt; 13

tcttaccatc cacaaaaatgg atccagacaa ctgttcaaac tgatgggacc cactccatcg  
60

<210> 14  
 <211> 15  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер-L

<400> 14  
 gattttggtc tagct  
 15

<210> 15  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Зонд-ДТ

<400> 15  
 асаgtgaaat ctcg  
 14

<210> 16  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность Зонд-МУТ

<220>  
 <223> Зонд-МУТ

<400> 16  
 асаgаgaaat ctcg  
 14

<210> 17  
 <211> 60  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер-Н

<400> 17  
 aagccacctc cttaactttgc ctcttctgc atggattct ttctcttccg caccagcag  
 60

<210> 18  
 <211> 14  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер-L

<400> 18  
tgtcaagatc асаg  
14

<210> 19  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-ДТ

<400> 19  
ttttgggctg гсg  
13

<210> 20  
<211> 12  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 20  
ttttggggcgg гс  
12

<210> 21  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 21  
tgggagccaa tattgtcttt gtgttcccgg acatagtcca ggaggcagcc gaagggcatg  
60

<210> 22  
<211> 10  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Л

<400> 22  
accgtgcagc  
10

<210> 23  
<211> 13

<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-ДТ

<400> 23  
tcatcacgca gct  
13

<210> 24  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 24  
tcatcatgca gct  
13

<210> 25  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 25  
attgttgat catattcgtc cacaaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc  
60

<210> 26  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 26  
cttgtggtag ttg  
13

<210> 27  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-ДТ

<400> 27

ctggtggcgt agg  
13

<210> 28  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 28  
ctggtgacgt agg  
13

<210> 29  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 29  
attgttgat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggactc  
60

<210> 30  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 30  
cttgtggtag ttg  
13

<210> 31  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 31  
agcttgtggc gta  
13

<210> 32  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Зонд-ДТ

<400> 32  
 agctggtggc gta  
 13

<210> 33  
 <211> 60  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер-Н

<400> 33  
 attggtggat catattcgtc cacaaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc  
 60

<210> 34  
 <211> 13  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Праймер-Л

<400> 34  
 cttgtggtag ttg  
 13

<210> 35  
 <211> 13  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Зонд-МУТ

<400> 35  
 agctcgtggc gta  
 13

<210> 36  
 <211> 13  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Зонд-ДТ

<400> 36  
 agctggtggc gta  
 13

<210> 37  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 37  
attgttggat catattcgtc cacaaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc  
60

<210> 38  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 38  
cttgtggtag ttg  
13

<210> 39  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 39  
agctagtggc gta  
13

<210> 40  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-ДТ

<400> 40  
agctgggtggc gta  
13

<210> 41  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 41  
attgttgat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc  
60

<210> 42  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Г.

<400> 42  
cttgtggtag ttg  
13

<210> 43  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 43  
agctgttggc gta  
13

<210> 44  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-ДТ

<400> 44  
agctgttggc gta  
13

<210> 45  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 45  
attgttgat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggcactc  
60

<210> 46  
<211> 13

<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 46  
cttgtggtag ttg  
13

<210> 47  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 47  
agctgctggc gta  
13

<210> 48  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-ДТ

<400> 48  
agctggtggc gta  
13

<210> 49  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 49  
attgttgat catattcgtc cacaaaatga ttctgaatta gctgtatcgt caaggactc  
60

<210> 50  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 50

cttgtggtag ttg  
13

<210> 51  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-МУТ

<400> 51  
agctgatggc gta  
13

<210> 52  
<211> 13  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Зонд-ДТ

<400> 52  
agctggtggc gta  
13

<210> 53  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н

<400> 53  
aagaccctag ccttagataa aactgagca gaggctttgg agtatttcat gaaacaatg  
60

<210> 54  
<211> 100  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Фрагмент последовательности РИЗСА

<400> 54  
gaaagaccct agccttagat aaaactgagc aagaggcttt ggagtatttc atgaaacaaa  
60

tgaatgatgc acatcatggt ggctggacaa caaaaatgga  
100

<210> 55

<211> 14  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> МУТ-зонд

<400> 55  
ссaccatgac gtgc  
14

<210> 56  
<211> 16  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 56  
catttttggt gtccag  
16

<210> 57  
<211> 14  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> ДТ-зонд

<400> 57  
ссaccatgat gtgc  
14

<210> 58  
<211> 16  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> ДТ-зонд

<400> 58  
ctctgaaatc actgag  
16

<210> 59  
<211> 12  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 59

ctacacgaga tc  
12

<210> 60  
<211> 16  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> МУТ-зонд

<400> 60  
tctctaaaat cactga  
16

<210> 61  
<211> 111  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Фрагмент РНК3СА

<400> 61  
ttctacacga gatcctctct ctgaaatcac tgagcaggag aaagattttc tatggagtca  
60

caggtaagtg ctaaaatgga gattctctgt ttctttttct ttattacaga a  
111

<210> 62  
<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 62  
ctgtaataaa gaaaaаааа сагагаатсt ccatttttagc acttacctgt gactccatag  
60

<210> 63  
<211> 38  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность Праймер-Н

<220>  
<223> Праймер-Н (бета-1)

<400> 63  
ctgagcaaga ggctttggag tatttcatga aacaaatg  
38

<210> 64

038921

<211> 60  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-Н (бета-2)

<400> 64  
tagccttaga taaaactgag caagaggctt tggagtattt catgaaaca atgaatgatg  
60

<210> 65  
<211> 100  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Фрагмент РИК3СА

<400> 65  
cctagcctta gataaaaactg agcaagaggc tttggagtat ttcataaaca aatgaatga  
60

tgcacatcat ggtggctgga caacaataat ggattggatc  
100

<210> 66  
<211> 15  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> МУТ-зонд

<400> 66  
ccaccatgac gtgca  
15

<210> 67  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер-L

<400> 67  
tccaatccat ttttggtg  
18

<210> 68  
<211> 15  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ДТ-зонд

<400> 68  
ccaccatgat gtgca  
15

<210> 69  
<211> 3207  
<212> ДНК  
<213> Homo Sapiens

<400> 69  
atgcctccac gaccatcatc aggtgaactg tggggcatcc acttgatgcc cccaagaatc  
60

ctagtagaat gtttactacc aatggaatg atagtgactt tagaatgcct ccgtgaggct  
120

acattaataa ccataaagca tgaactatth aaagaagcaa gaaaatacc cctccatcaa  
180

cttcttcaag atgaatcttc ttacatthtc gtaagtgtta ctcaagaagc agaaagggaa  
240

gaatthtttg atgaaacaag acgactthtg gaccttcggc thtttcaacc cthtttaaaa  
300

gtaattgaac cagtaggcaa ccgtgaagaa aagatcctca atcgagaaat tggthttgct  
360

atcggcacgc cagtgtgtga atthgatatg gthaaagatc cagaagtaca ggacttccga  
420

agaaatattc tgaacgthtg taaagaagct gtggatctta gggacctcaa thcacctcat  
480

agtagagcaa tgtatgtcta tcctccaaat gtagaatctt caccagaatt gccaaagcac  
540

atatataata aattagataa agggcaaata atagtggatg tctgggtaat agthttctcca  
600

aataatgaca agcagaagta tactctgaaa atcaacctg actgtgtacc agaacaagta  
660

attgctgaag caatcaggaa aaaaactcga agtatgttgc tctctctga acaactaaaa  
720

ctctgtgtht tagaatatca gggcaagat atthtaaaag tgtgtggatg tgatgaatac  
780

thcttagaaa aatatcctct gagtcagat aagtatataa gaagctgtat aatgcttggg  
840

aggatgcca atthgatgtt gatggctaaa gaaagcctth atthctcaact gccaatggac  
900

tgthttacaa tgccatctta thccagacgc atthccacag ctacaccata tatgaatgga  
960

## 038921

gaaacatcta caaaatccct ttgggttata aatagtgcac tcagaataaa aattctttgt  
1020

gcaacctacg tgaatgtaaa tattcgagac attgataaga tctatgttcg aacaggtatc  
1080

taccatggag gagaaccctt atgtgacaat gtgaacactc aaagagtacc ttgttccaat  
1140

cccaggtgga atgaatggct gaattatgat atatacattc ctgatcttcc tcgtgctgct  
1200

cgactttgcc tttccatttg ctctgttaaa ggccgaaagg gtgctaaaga ggaacactgt  
1260

ccattggcat ggggaaatat aaacttgttt gattacacag aactctagt atctggaaaa  
1320

atggctttga atctttggcc agtacctcat ggattagaag atttgcgtaa ccctattggc  
1380

gttactggat caaatccaaa taaagaaact ccatgcttag agttggagtt tgactggttc  
1440

agcagtgtgg taaagttccc agatatgtca gtgattgaag agcatgcaa ttggctctga  
1500

tcccgagaag caggatttag ctattcccac gcaggactga gtaacagact agctagagac  
1560

aatgaattaa gggaaaatga caaagaacag ctcaaagcaa tttctacacg agatcctctc  
1620

tctgaaatca ctgagcagga gaaagathtt ctatggagtc acagacacta ttgtgtaact  
1680

atccccgaaa ttctacccaa attgcttctg tctgttaaatt ggaattctag agatgaagta  
1740

gccagatgt attgcttggc aaaagattgg cctccaatca aacctgaaca ggctatggaa  
1800

cttctggact gtaattacc cagatcctatg gttcgagggt ttgctgttcg gtgcttggaa  
1860

aaatatttaa cagatgacaa actttctcag tatttaattc agctagtaca ggtcctaaaa  
1920

tatgaacaat atttggataa cttgcttctg agatctttac tgaagaaagc attgactaat  
1980

caaaggattg ggcacttttt cttttggcat ttaaaatctg agatgcacaa taaaacagtt  
2040

agccagaggt ttggcctgct tttggagtcc tattgtcgtg catgtgggat gtatttgaag  
2100

cacctgaata ggcaagtcca ggcaatggaa aagctcatta acttaactga cattctcaaa  
2160

038921

caggagaaga aggatgaaac acaaaaggta cagatgaagt ttttagttga gcaaatgagg  
2220

cgaccagatt tcatggatgc tctacagggc tttctgtctc ctctaaacc tgctcatcaa  
2280

ctaggaaacc tcaggcttga agagtgtcga attatgtcct ctgcaaaaag gccactgtgg  
2340

ttgaattggg agaaccaga catcatgtca gagttactgt ttcagaacaa tgagatcatc  
2400

tttaaaaatg gggatgattt acggcaagat atgctaacac ttcaaattat tcgtattatg  
2460

gaaaatatct ggcaaaatca aggtcttgat cttogaatgt taccttatgg ttgtctgtca  
2520

atcggtgact gtgtgggact tattgaggtg gtgcgaaatt ctcacactat tatgcaaatt  
2580

cagtgcaaag gcggttgaa aggtgcactg cagttcaaca gccacacact acatcagtgg  
2640

ctcaaagaca agaacaaagg agaaatatat gatgcagcca ttgacctggt tacacgttca  
2700

tgtgctggat actgtgtagc taccttcatt ttgggaattg gagatcgtca caatagtaac  
2760

atcatggtga aagacgatgg acaactgttt catatagatt ttggacactt tttggatcac  
2820

aagaagaaaa aatttggta taaacgagaa cgtgtgccat ttgttttgac acaggatttc  
2880

ttaatagtga ttagtaaagg agcccaagaa tgcacaaaga caagagaatt tgagaggttt  
2940

caggagatgt gttacaaggc ttatctagct attcgacagc atgccaatct cttcataaat  
3000

cttttctcaa tgatgcttgg ctctggaatg ccagaactac aatcttttga tgacattgca  
3060

tacattcgaa agaccctagc cttagataaa actgagcaag aggctttgga gtatttcatg  
3120

aaacaaatga atgatgcaca tcatggtggc tggacaacaa aaatggattg gatcttccac  
3180

acaattaaac agcatgcatt gaactga  
3207

- <210> 70
- <211> 2301
- <212> ДНК
- <213> Homo Sapiens

## 038921

<400> 70  
 atggcggcgc tgagcggcggc cggcggcggc ggcgcggcgc cgggccaggc tctgttcaac  
 60  
 ggggacatgg agcccgaggc cggcggcggc gccggcggc cggcctcttc ggctgcggac  
 120  
 cctgccattc cggaggaggt gtggaatc aaacaaatga ttaagttgac acaggaacat  
 180  
 atagaggccc tattggacaa atttggcggc gagcataatc caccatcaat atatctggag  
 240  
 gcctatgaag aatacaccag caagctagat gcactccaac aaagagaaca acagttattg  
 300  
 gaatctctgg ggaacggaac tgatttttct gtttctagct ctgcatcaat ggataccggt  
 360  
 acatcttctt cctcttctag cctttcagtg ctacctcat ctctttcagt tttcaaaat  
 420  
 cccacagatg tggcacggag caacccaag tcaccacaaa aacctatcgt tagagtcttc  
 480  
 ctgcccaaca aacagaggac agtggtagct gcaagggtg gagttacagt ccgagacagt  
 540  
 ctaaagaaag cactgatgat gagaggtcta atcccagagt gctgtgctgt ttacagaatt  
 600  
 caggatggag agaagaaacc aattggttgg gacactgata ttcctggct tactggagaa  
 660  
 gaattgcatg tggaagtgtt ggagaatgtt ccaacttaca cacacaactt tgtacgaaaa  
 720  
 acgtttttca ccttagcatt ttgtgacttt tgtcgaaagc tgcttttcca gggtttccgc  
 780  
 tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cgttgtagta cagaagttcc actgatgtgt  
 840  
 gttaattatg accaacttga tttgctgttt gtctccaagt tctttgaaca ccaccaata  
 900  
 ccacaggaag aggcgtcctt agcagagact gccctaacat ctggatcacc cccttccgca  
 960  
 cccgcctcgg actctattgg gccccaaatt ctcaccagtc cgtctccttc aaaatccatt  
 1020  
 ccaattccac agcccttccg accagcagat gaagatcacc gaaatcaatt tgggcaacga  
 1080  
 gaccgatcct catcagctcc caatgtgcat ataaacacaa tagaacctgt caatattgat  
 1140

## 038921

gacttgatta gagaccaagg atttcgtggt gatggaggat caaccacagg tttgtctgct  
1200

acccccctg cctcattacc tggctcacta actaacgtga aagcettaca gaaatctcca  
1260

ggacctcagc gagaaaggaa gtcactttca tcctcagaag acaggaatcg aatgaaaaca  
1320

cttggtagac gggactcgag tgatgattgg gagattcctg atgggcagat tacagtggga  
1380

caaagaattg gatctggatc atttggaaaca gtctacaagg gaaagtggca tggatgatgtg  
1440

gcagtgaaaa tgttgaatgt gacagcacct acacctcagc agttacaagc cttcaaaaat  
1500

gaagtaggag tactcaggaa aacacgacat gtgaatatcc tactcttcat gggctattcc  
1560

acaagccac aactggctat tgttaccag tgggtgtgagg gctccagctt gtatcacat  
1620

ctccatatca ttgagaccaa atttgagatg atcaaactta tagatattgc acgacagact  
1680

gcacagggca tggattactt acacgccaag tcaatcatcc acagagacct caagagtaat  
1740

aatatatttc ttcatagaaga cctcacagta aaaatagggtg attttggctct agctacagtg  
1800

aatctcgat ggagtgggtc ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg  
1860

gcaccagaag tcatacagaat gcaagataaa aatccataca gctttcagtc agatgtatat  
1920

gcatttggaa ttgttctgta tgaattgatg actggacagt taccttattc aaacatcaac  
1980

aacagggacc agataatattt tatgggtggga cgaggatacc tgtctccaga tctcagtaag  
2040

gtacggagta actgtccaaa agccatgaag agattaatgg cagagtgctt caaaaagaaa  
2100

agagatgaga gaccactctt tccccaaatt ctgcctctta ttgagctgct ggcccgtca  
2160

ttgccaaaaa ttcaccgcag tgcatcagaa ccctccttga atcgggctgg tttccaaaca  
2220

gaggatttta gtctatatgc ttgtgcttct ccaaaaacac ccatccaggc agggggatat  
2280

ggtgcgtttc ctgtccactg a  
2301

## 038921

<210> 71  
<211> 3633  
<212> ДНК  
<213> Homo Sapiens

<400> 71  
atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctccctggcg tgctggctgc gctctgcccg  
60  
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagt ttgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag  
120  
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgagggtg  
180  
gtccttggga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag  
240  
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgcctca acacagtgga gcaattcct  
300  
ttgaaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca  
360  
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccat gagaaattta  
420  
caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggtc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag  
480  
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgc gatggacttc  
540  
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg  
600  
ggatgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgcca gcagtgtcc  
660  
gggcgctgcc gtggcaagtc ccccagtgc tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc  
720  
acaggcccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaatt tccgagacga agccacgtgc  
780  
aaggacacct gccccact catgctctac aaccaccaca cgtaccagat ggatgtgaac  
840  
cccaggggca aatacagctt tgggtccacc tgcgtgaaga agtgcctccg taattatgtg  
900  
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tggggggccg acagctatga gatggaggaa  
960  
gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata  
1020  
ggatattggtg aatttaaaga ctactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa  
1080

038921

aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc  
1140

ttcacacata ctctctctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa  
1200

atcacagggc ttttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt  
1260

gagaacctag aatcatacgc cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgagtc  
1320

gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat  
1380

gtgataatth caggaaaaca aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg  
1440

tttgggacct ccggtcagaa aacccaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag  
1500

gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc  
1560

agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgcaac  
1620

cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca  
1680

gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc  
1740

cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg  
1800

ggagaaaaca acaccctggc ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc  
1860

catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggctctg aaggctgtcc aacgaatggg  
1920

cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtggggggccc tcctcttget gctgggtggtg  
1980

gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgagg  
2040

aggctgctgc aggagagggg gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac  
2100

caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc  
2160

ggtgcgttcg gcacgggtgta taagggactc tggatoccag aagggtgagaa agttaaatt  
2220

cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaaca ggaatcctc  
2280

## 038921

gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgct gctgggcatc  
2340

tgcctcacct ccaccgtgca gctcatcacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac  
2400

tatgtccggg aacacaaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag  
2460

atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttgg tgcaccgca cctggcagcc  
2520

aggaacgtac tggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagatthttg gctggccaaa  
2580

ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg  
2640

atggcattgg aatcaattht acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac  
2700

ggggtgactg thtgggagtt gatgacctth ggatccaagc catatgacgg aatccttgcc  
2760

agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc  
2820

atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgccccaaag  
2880

ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccagag acccccagcg ctaccttgtc  
2940

atccaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc  
3000

ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag  
3060

cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtgca  
3120

accagcaaca attccaccgt ggcttgcatg gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccac  
3180

aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgctt gactgaggac  
3240

agcatagacg acaccttct cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tccccaaagg  
3300

cccgtggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaaccc cggcccagc  
3360

agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaacccca gtatctcaac  
3420

actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa  
3480

ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa  
3540

gccaaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc  
3600

gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga  
3633

<210> 72  
<211> 567  
<212> ДНК  
<213> Homo Sapiens

<400> 72  
atgactgaat ataaacttgt ggtagttgga gctgggtggcg taggcaagag tgccttgacg  
60

atacagctaa ttcagaatca ttttgtggac gaatatgatc caacaataga ggattcctac  
120

aggaagcaag tagtaattga tggagaaacc tgtctcttgg atattctcga cacagcaggt  
180

caagaggagt acagtgcaat gagggaccag tacatgagga ctggggaggg ctttctttgt  
240

gtatttgcca taaataatac taaatcattt gaagatattc accattatag agaacaaatt  
300

aaaagagtta aggactctga agatgtacct atggtcctag taggaaataa atgtgatttg  
360

ccttctagaa cagtagacac aaaacaggct caggacttag caagaagtta tggaaattcct  
420

tttattgaaa catcagcaaa gacaagacag ggtggtgatg atgccttcta tacattagtt  
480

cgagaaattc gaaaacataa agaaaagatg agcaaagatg gtaaaaagaa gaaaaagaag  
540

tcaaagacaa agtgtgtaat tatgtaa  
567

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения последовательности целевой нуклеиновой кислоты или обнаружения ее варианта последовательности в образце, включающий стадии:

- a) предоставление образца, содержащего матрицы нуклеиновых кислот;
- b) предоставление набора праймеров, содержащего, по меньшей мере, пару праймеров, способных к специфической амплификации последовательности целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-Л, и при этом температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 16°C, чем температура плавления праймера-Л, притом, что праймер-Л содержит последовательность, комплементарную фрагменту продукта элонгации праймера-Н;
- c) обеспечение полимеразы нуклеиновой кислоты, обладающей полимеразной активностью при температуре элонгации;
- d) получение разделенных реакционных смесей ПЦР, каждая из которых содержит часть образца, набор праймеров, полимеразу нуклеиновой кислоты, реагенты для ПЦР;
- e) проведение асимметричной инкрементной полимеразной реакции (АИПР), включающей стадии:
  - i) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одностранные молекулы;
  - ii) отжиг праймера-Н, но не праймера-Л, к одностранным молекулам с последующей элонгацией праймера-Н;
  - iii) с амплификацией таким образом только одной нити последовательности целевой нуклеиновой кислоты;
- f) проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающей стадии:

1) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы;

2) инкубация ПЦР при низкой температуре отжига, позволяющей отжигать как праймер-Н, так и праймер-Л;

3) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгацию всех отоженных праймеров;

4) с амплификацией таким образом обеих нитей последовательности целевой нуклеиновой кислоты и получением продукта ПЦР;

г) обнаружение присутствия в продукте ПЦР последовательности целевой нуклеиновой кислоты или варианта последовательности в последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия ii стадии е) включает инкубацию разделенных реакционных смесей ПЦР при высокой температуре отжига, что позволяет отжигать праймер-Н, но не праймер-Л;

последующую инкубацию разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре элонгации, где высокая температура отжига и температура элонгации отличаются.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия ii стадии е) включает инкубацию разделенных реакционных смесей ПЦР при единой температуре, которая позволяет отжиг праймера-Н, но не праймера-Л, и элонгацию отоженного праймера-Н, где праймер-Н имеет высокую температуру отжига, которая является такой же, как и температура элонгации.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что стадия е) дополнительно включает повторение стадий i-ii, необязательно от 8 до 256 раз.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что разделенные реакционные смеси ПЦР со стадии d) дополнительно содержат детекторные реагенты.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что стадия f) дополнительно включает повторение стадий 1-3.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 20°C выше, чем температура плавления праймера-Л.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что вариант последовательности представляет собой однонуклеотидную мутацию.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-Н в наборе праймеров является единственным праймером с температурой плавления по меньшей мере на 15°C выше, чем температура плавления праймера-Л.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что набор праймеров содержит более одной пары праймеров, способных амплифицировать различные последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 15°C выше температуры плавления любого другого праймера в наборе праймеров, который вместе с праймером-Н способен амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что набор праймеров не содержит праймеров

а) с температурой плавления, которая находится в диапазоне  $\pm 15^\circ\text{C}$ , предпочтительно в диапазоне  $\pm 20^\circ\text{C}$ , например, в диапазоне  $\pm 25^\circ\text{C}$  от температуры плавления праймера-Н; и

б) которые вместе с праймером-Н могут образовывать пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что высокая температура отжига на стадии е) по меньшей мере на 10°C, предпочтительно по меньшей мере на 15°C, например, по меньшей мере на 20°C выше температуры плавления праймера-Л.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что стадия е) приводит к элонгации праймера-Н при отсутствии обнаружимой элонгации любого другого праймера.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что праймер-Л представляет собой модифицированный праймер-Л с рассогласованием, причем способ включает стадию низкотемпературной ПЦР между стадиями е) и f), при этом низкотемпературная ПЦР включает следующие стадии:

1) инкубация разделенных реакционных смесей ПЦР при температуре денатурации, с денатурацией ДНК на одонитевые молекулы;

2) инкубация ПЦР при очень низкой температуре отжига, что позволяет отжигать как праймер-Н, так и часть праймера-Л без рассогласования;

3) инкубация ПЦР при температуре элонгации, что позволяет элонгировать все отоженные праймеры;

4) необязательное повторение стадий с 1) по 3) с получением таким образом продукта ПЦР.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что очень низкая температура отжига по меньшей мере на 5°C ниже низкой температуры отжига.

17. Способ по любому из пп.15-16, отличающийся тем, что праймер-L представляет собой олигонуклеотид, состоящий из

а) 5'-последовательности размером от 1 до 10 нуклеотидов; и

б) непрерывной последовательности размером от 7 до 15 нуклеотидов, которая идентична или комплементарна фрагменту последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР содержит детекторный реагент, который является детекторным зондом варианта, причем указанный детекторный зонд варианта способен гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, содержащей вариант последовательности, со значительно более высокой аффинностью, чем с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, не содержащей варианта последовательности, и/или каждая из разделенных реакционных смесей ПЦР содержит детекторный реагент, который является детекторным зондом дикого типа, причем указанный детекторный зонд дикого типа способен гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, не содержащей варианта последовательности.

19. Способ обнаружения наличия рака у индивидуума, причем указанный рак связан с наличием мутации, связанной с раком, в последовательности целевой нуклеиновой кислоты, включающий стадии:

а) обеспечение образца из организма указанного индивидуума, который содержит матричные нуклеиновые кислоты;

б) применение способа по любому из пп.1-18;

причем, что наличие указанной мутации, связанной с раком, в указанной целевой нуклеиновой кислоте указывает на наличие указанного рака.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что мутация, связанная с раком, выбрана из группы, состоящей из

A) мутации в PIK3CA, такой как любая из мутаций H1047R или E542K или E542K;

B) мутации в BRAF, такой как V600E;

C) мутации в KRAS, такой как любая из мутаций G12D, G12V, G12C или G13D; и

D) мутации в EGFR, такой как любая из мутаций L858R или T790M.

21. Способ обнаружения наличия инфекции инфекционным патогеном у индивидуума, причем указанная инфекция связана с наличием последовательности целевой нуклеиновой кислоты, включающий следующие стадии:

а) обеспечение образца из организма указанного индивидуума, который содержит матричные нуклеиновые кислоты;

б) применение способа по любому из пп.1-18;

причем, что указанная целевая нуклеиновая кислота является последовательностью нуклеиновой кислоты из генома указанного патогена, и где наличие указанной целевой нуклеиновой кислоты указывает на наличие указанной инфекции.

22. Набор для использования в способе обнаружения последовательности целевой нуклеиновой кислоты, содержащий:

i) набор праймеров, содержащий, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-L, и при этом температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 16°C выше температуры плавления праймера-L, причем праймер-L содержит последовательность, комплементарную продукту элонгации праймера-Н;

ii) детекторный зонд, способный гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, причем указанный зонд связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем;

iii) полимеразу нуклеиновой кислоты;

iv) реагенты для ПЦР; и

v) реагенты для приготовления капель, содержащих разделенные реакционные смеси ПЦР, и где

а) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 69, а праймер-L содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 69; или

б) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 69, а праймер-L содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 69; и

при этом праймер-Н и праймер-L вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую по меньшей мере один из нуклеотидов 3140, 1624 или 1633 SEQ ID NO: 69.

23. Набор для использования в способе обнаружения последовательности целевой нуклеиновой кислоты, содержащий:

i) набор праймеров, содержащий, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически ам-

плифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-Л, и при этом температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 16°C выше температуры плавления праймера-Л, притом, что праймер-Л содержит последовательность, комплементарную продукту элонгации праймера-Н;

ii) детекторный зонд, способный гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, причем указанный зонд связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем;

iii) полимеразу нуклеиновой кислоты;

iv) реагенты для ПЦР; и

v) реагенты для приготовления капель, содержащих разделенные реакционные смеси ПЦР, и где

а) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 70, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 70; или

б) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 70, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 70; и

при этом, праймер-Н и праймер-Л вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую нуклеотид 1799 SEQ ID NO: 70.

24. Набор для использования в способе обнаружения последовательности целевой нуклеиновой кислоты, содержащий:

i) набор праймеров, содержащий, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-Л, и при этом температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 16°C выше температуры плавления праймера-Л, притом, что праймер-Л содержит последовательность, комплементарную продукту элонгации праймера-Н;

ii) детекторный зонд, способный гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, причем указанный зонд связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем;

iii) полимеразу нуклеиновой кислоты;

iv) реагенты для ПЦР; и

v) реагенты для приготовления капель, содержащих разделенные реакционные смеси ПЦР, и где

а) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 71, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 71; или

б) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 71, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 71; и

при этом праймер-Н и праймер-Л вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую, по меньшей мере, один из нуклеотидов 2573 или 2369 SEQ ID NO: 71.

25. Набор для использования в способе обнаружения последовательности целевой нуклеиновой кислоты, содержащий:

i) набор праймеров, содержащий, по меньшей мере, пару праймеров, способных специфически амплифицировать последовательность целевой нуклеиновой кислоты, причем набор праймеров содержит, по меньшей мере, праймер-Н и праймер-Л, и при этом температура плавления праймера-Н по меньшей мере на 16°C выше температуры плавления праймера-Л, притом, что праймер-Л содержит последовательность, комплементарную продукту элонгации праймера-Н;

ii) детекторный зонд, способный гибридизоваться с последовательностью целевой нуклеиновой кислоты, причем указанный зонд связан по меньшей мере с одним флуорофором и по меньшей мере с одним гасителем;

iii) полимеразу нуклеиновой кислоты;

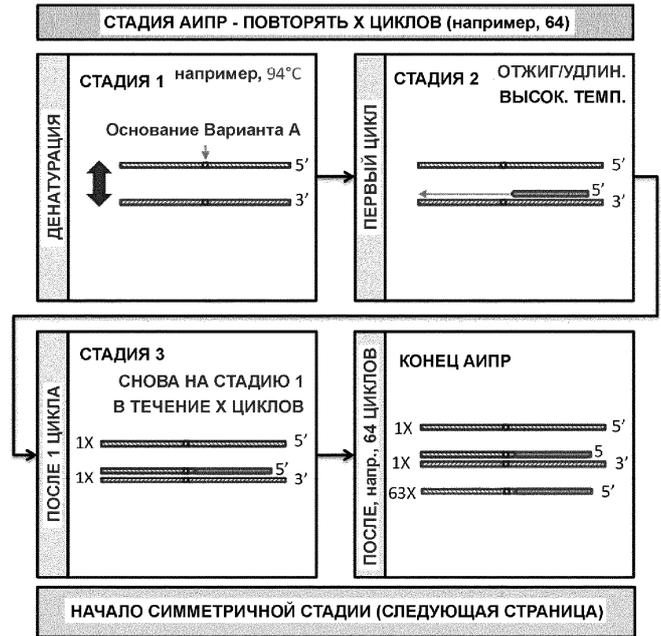
iv) реагенты для ПЦР; и

v) реагенты для приготовления капель, содержащих разделенные реакционные смеси ПЦР, и где

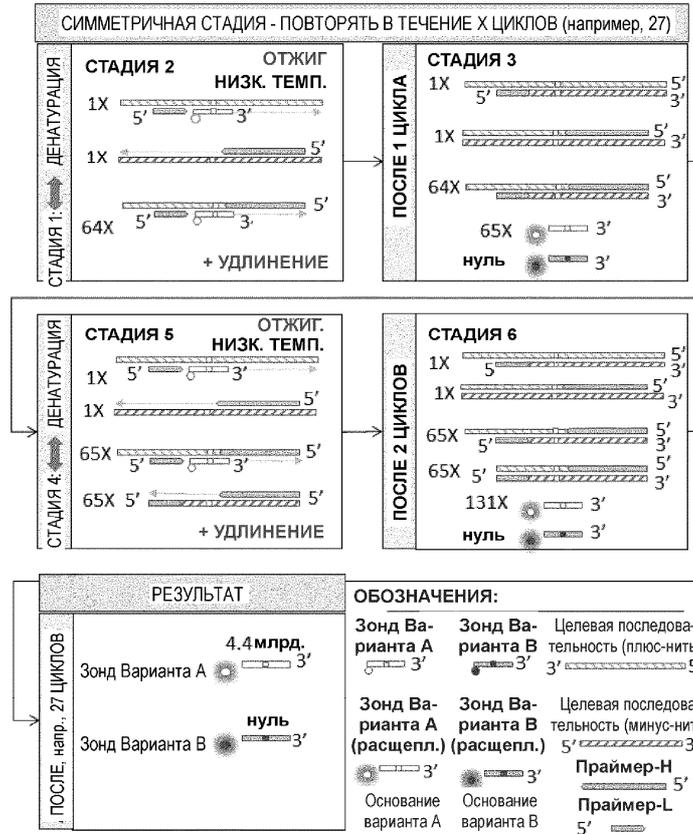
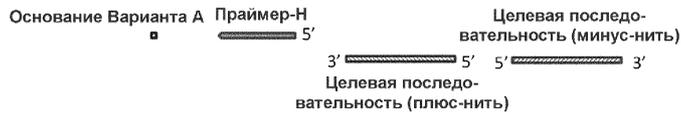
а) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов SEQ ID NO: 72, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 72; или

б) праймер-Н содержит непрерывную последовательность размером от 50 до 100 нуклеотидов последовательности, комплементарной SEQ ID NO: 72, а праймер-Л содержит непрерывную последовательность размером от 10 до 20 нуклеотидов SEQ ID NO: 72; и

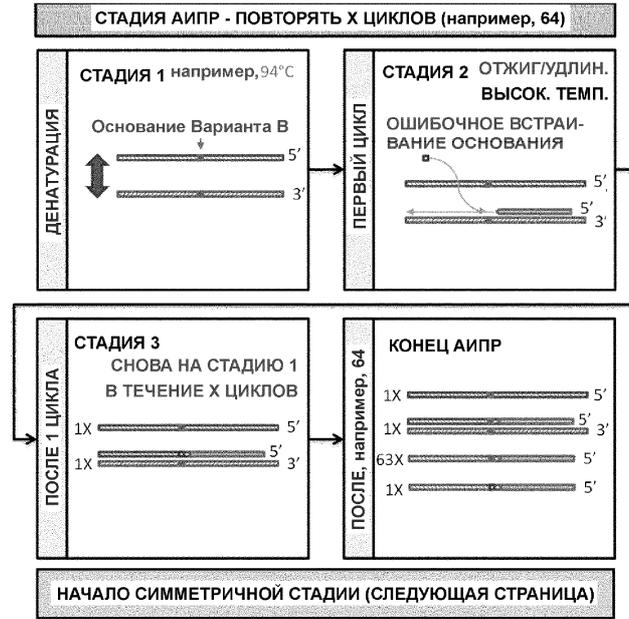
при этом праймер-Н и праймер-Л вместе способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую, по меньшей мере, нуклеотид 34, 35 или 38 SEQ ID NO: 72.



**ОБОЗНАЧЕНИЯ:**



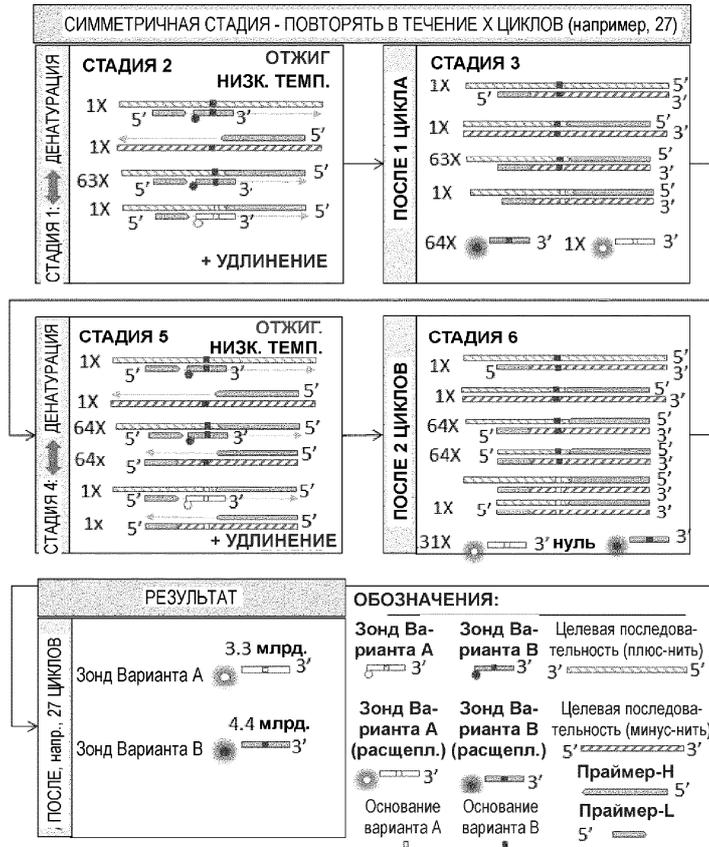
Фиг. 1А



**ОБОЗНАЧЕНИЯ:**

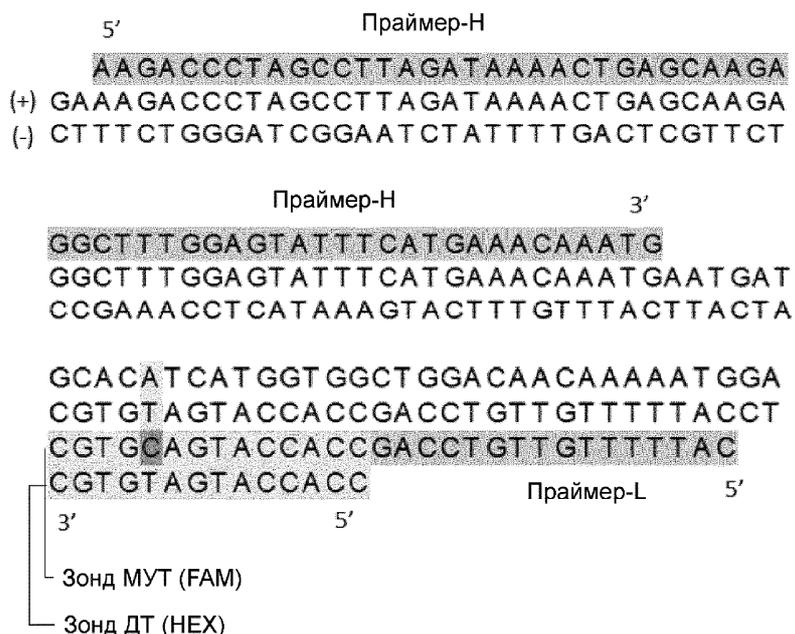
Оснoвание Варианта А      Праймер-Н      Целевая последовательность (плюс-нить)

Оснoвание Варианта В      Целевая последовательность (минус-нить)

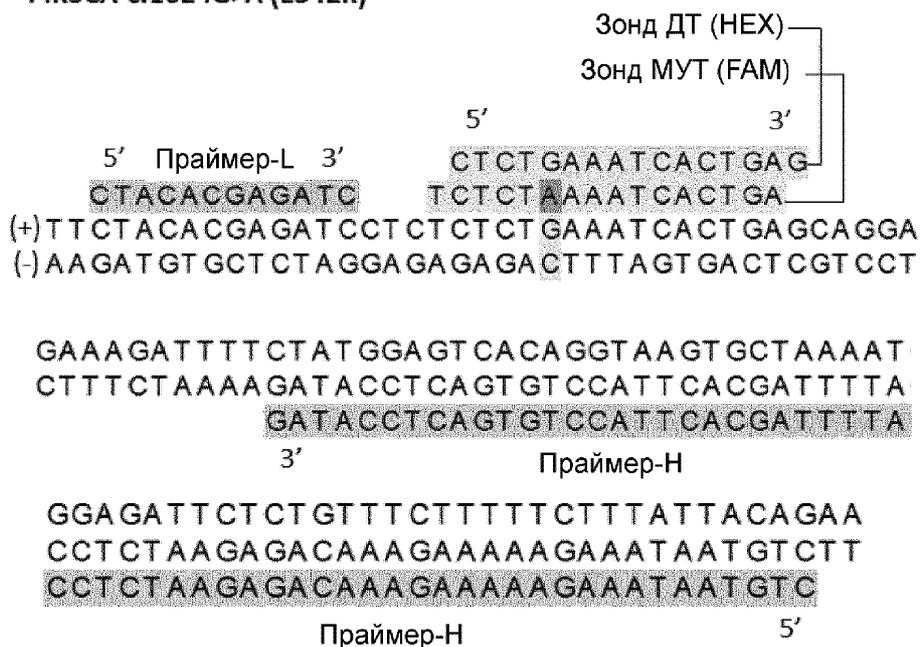


Фиг. 1В

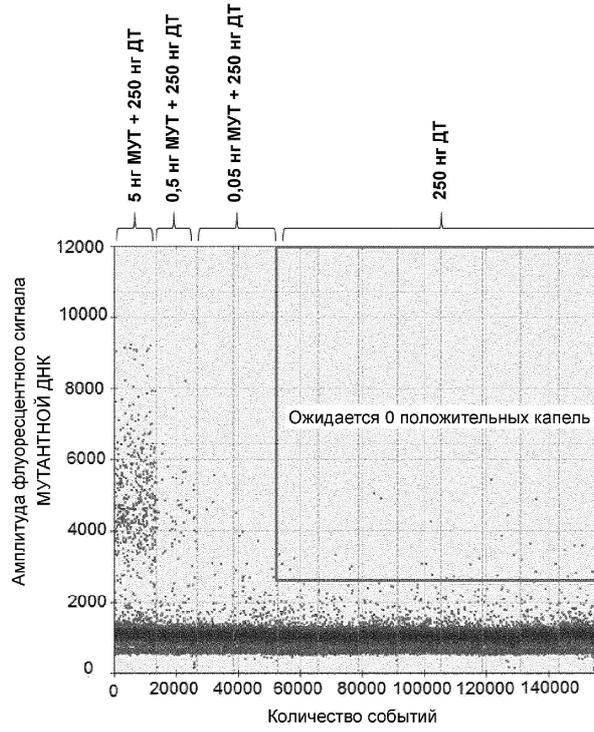
## PIK3CA с.3140A&gt;G (H1047R)



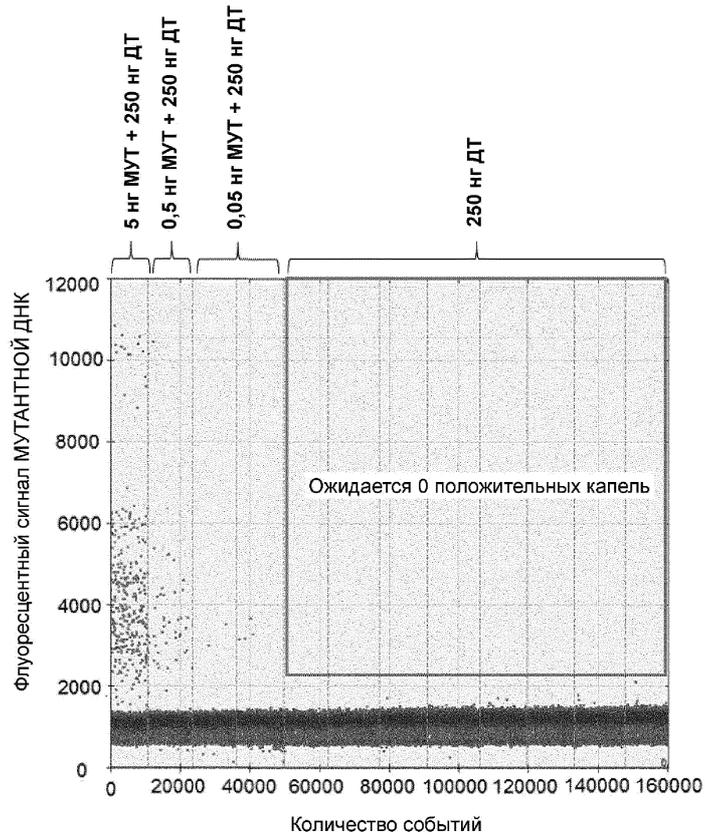
## PIK3CA с.1624G&gt;A (E542K)



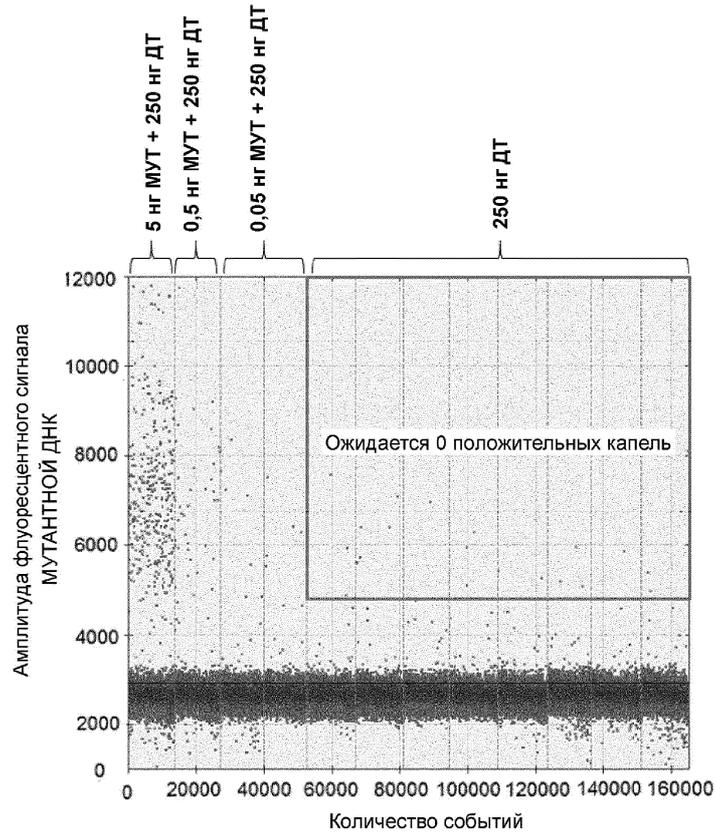
Фиг. 2



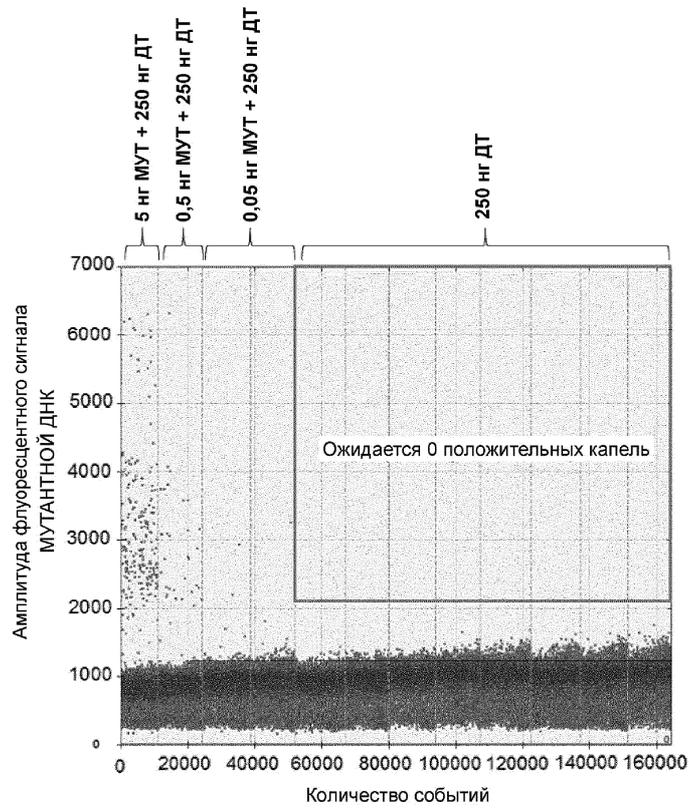
Фиг. 3А



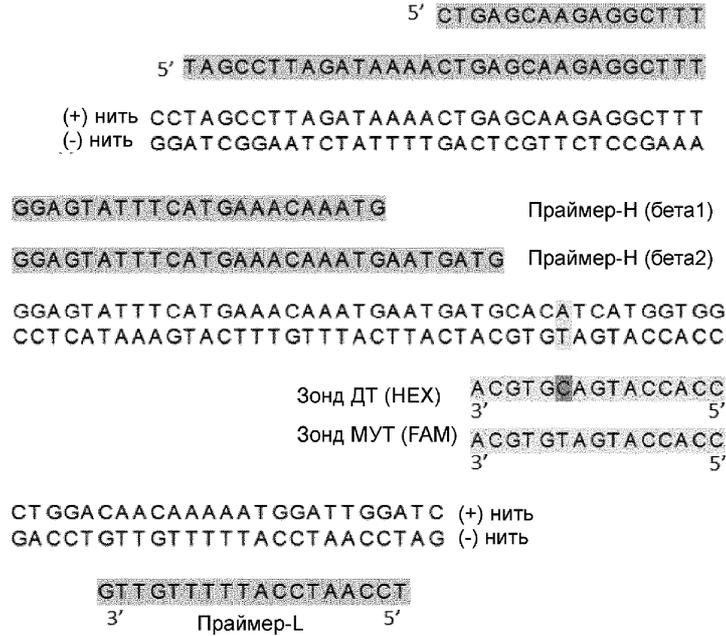
Фиг. 3В



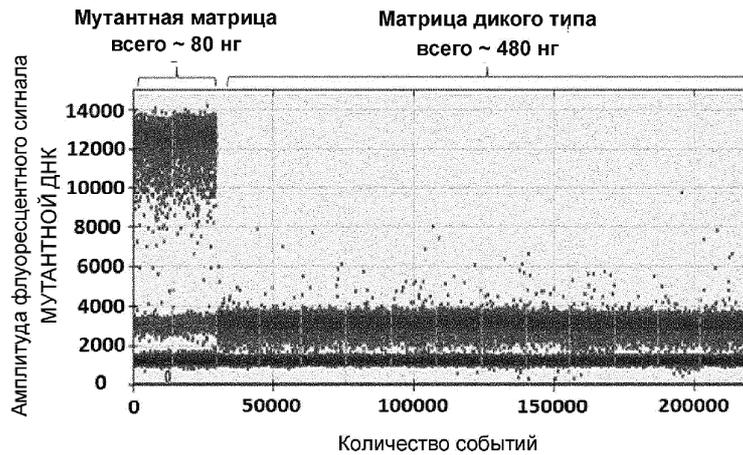
Фиг. 3С



Фиг. 3D



Фиг. 4



**ПРОГРАММА АМПЛИФИКАТОРА:**

95° C – 10 мин

БЕЗ АИПР:

Повторение 35 циклов:

94° C – 10 с

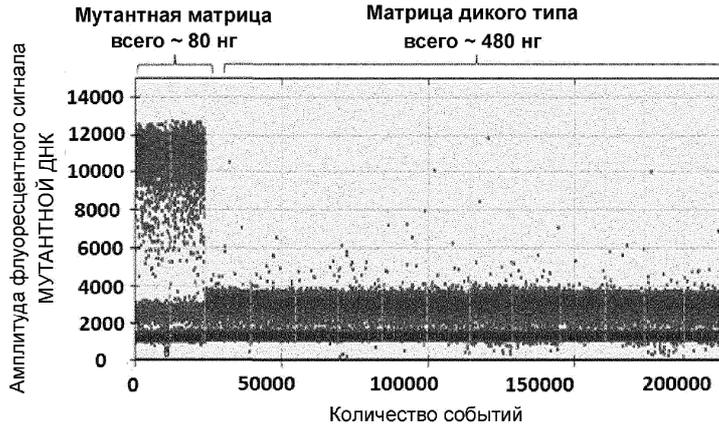
52° C – 30 с

72° C – 30 с

98° C – 10 мин

СИММЕТРИЧНАЯ  
 ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ  
 ПЦР

Фиг. 5А



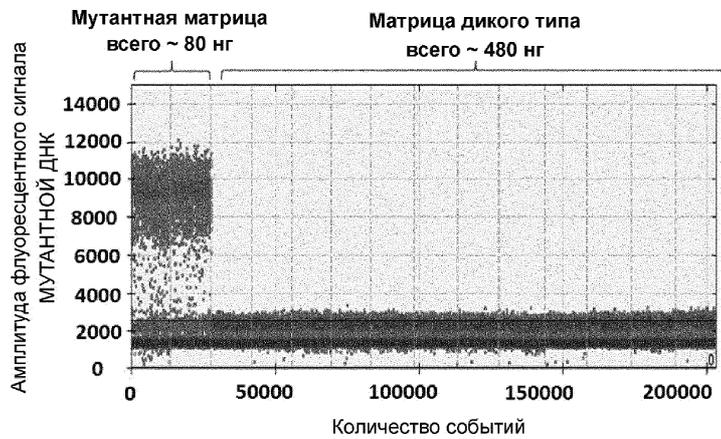
**ПРОГРАММА АМПЛИФИКАТОРА:**

95° С – 10 мин

Повторение 64 цикла: } АИПР  
 94° С – 10 с  
 67° С – 45 с

Повторение 25 циклов: } СИММЕТРИЧНАЯ  
 94° С – 10 с } ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ  
 52° С – 30 с } ПЦР  
 72° С – 30 с  
 98° С – 10 мин

Фиг. 5В



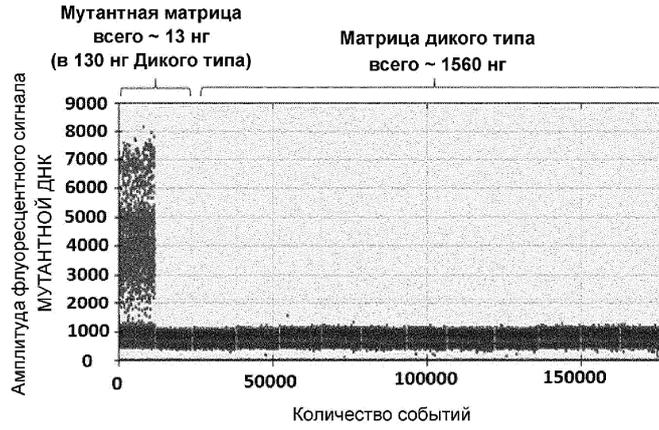
**ПРОГРАММА АМПЛИФИКАТОРА:**

95° С – 10 мин

Повторение 64 цикла: } АИПР  
 94° С – 10 с  
 74° С – 45 с

Повторение 25 циклов: } СИММЕТРИЧНАЯ  
 94° С – 10 с } ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ  
 52° С – 30 с } ПЦР  
 72° С – 30 с  
 98° С – 10 мин

Фиг. 5С



**ПРОГРАММА АМПЛИФИКАТОРА:**

95°C – 10 мин

Повторение 64 цикла:

- 94°C – 10 с
- 75° С – 45 с

Повторение 27 циклов:

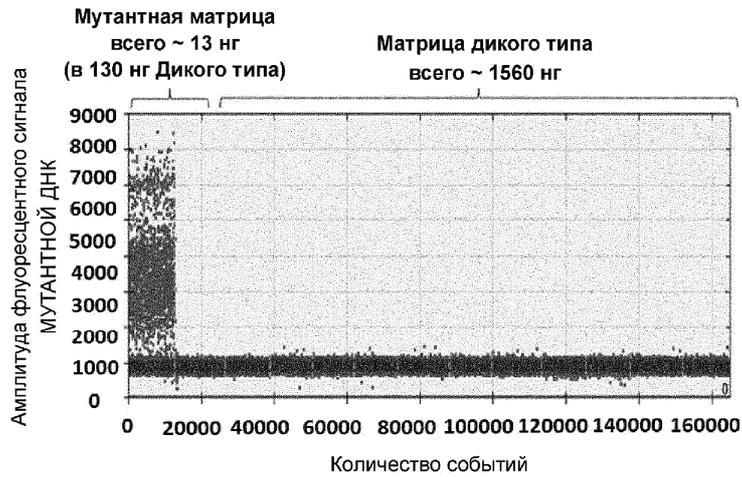
- 94°C – 10 с
- 48° С – 30 с
- 72°C – 30 с

98°C – 10 мин

АИПР

СИММЕТРИЧНАЯ  
ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ  
ПЦР

Фиг. 5D



**ПРОГРАММА АМПЛИФИКАТОРА:**

95°C – 10 мин

Повторение 64 цикла:

- 94°C – 10 с
- 75°C – 45 с

Повторение 27 циклов:

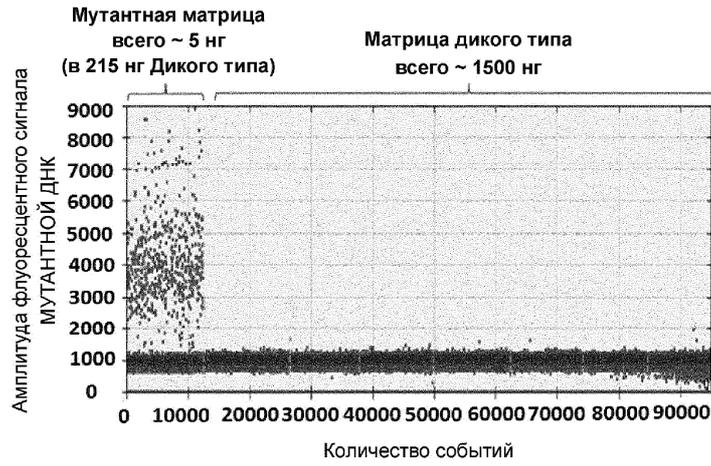
- 94°C – 10 с
- 46°C – 30 с
- 72°C – 30 с

98°C – 10 мин

АИПР

СИММЕТРИЧНАЯ  
ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ  
ПЦР

Фиг. 5E



**ПРОГРАММА АМПЛИФИКАТОРА:**

95°C – 10 мин

Повторение 64 цикла:

- 94°C – 10 с
- 73°C – 45 с

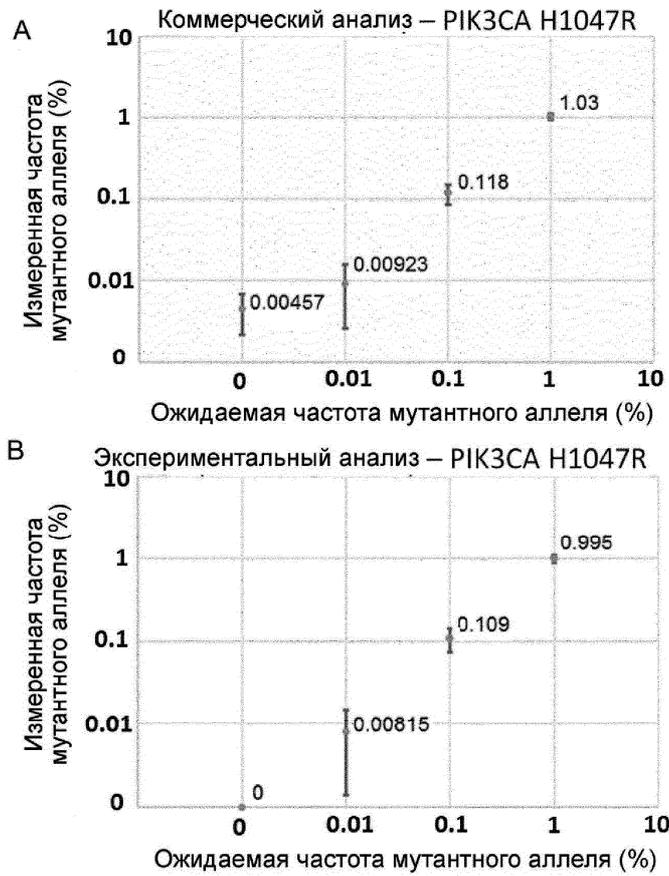
Повторение 27 циклов:

- 94°C – 10 с
- 48°C – 30 с
- 72°C – 30 с
- 98°C – 10 мин

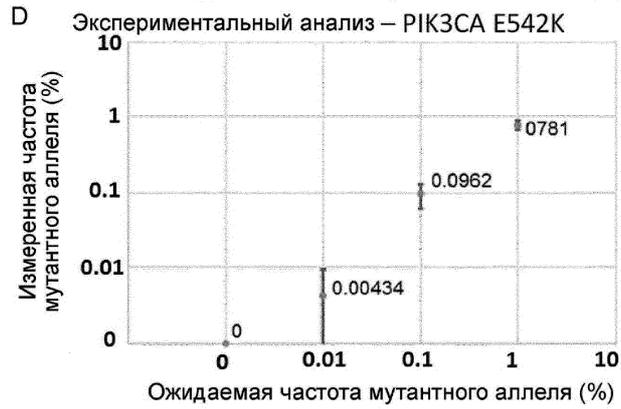
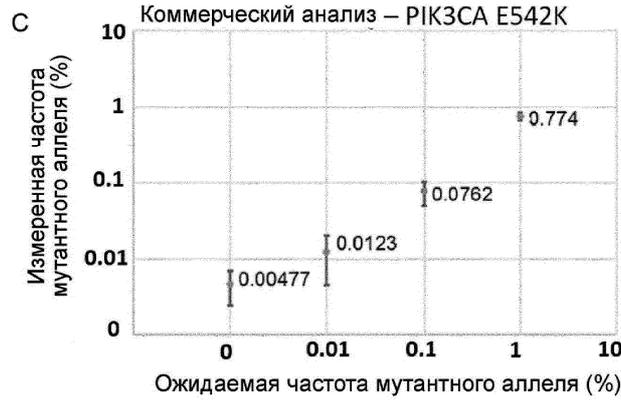
АИПР

СИММЕТРИЧНАЯ  
ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ  
ПЦР

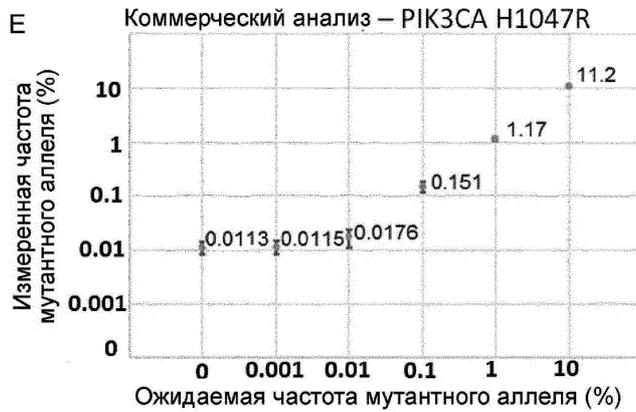
Фиг. 5F



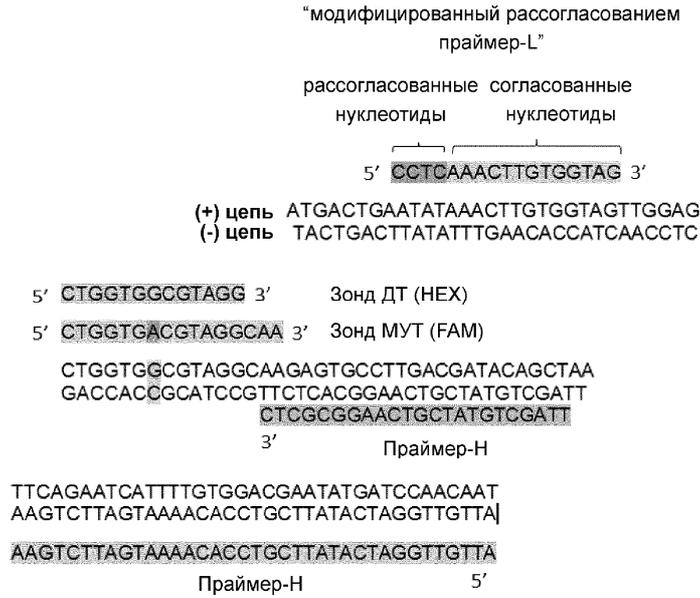
Фиг. 6А-В



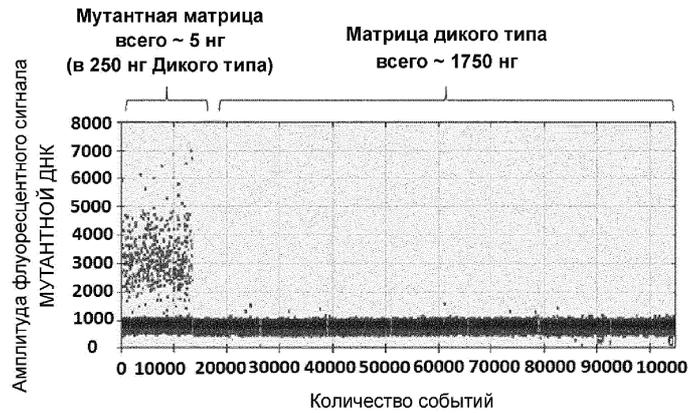
Фиг. 6C-D



Фиг. 6E-F



Фиг. 7А



## ПРОГРАММА АМПЛИФИКАТОРА:

95°C – 10 мин

Повторение 64 цикла:

94°C – 10 с } АИПР  
73°C – 45 с }

Повторение 5 циклов:

94°C – 10 с } НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ  
30°C – 30 с } ПЦР  
72°C – 30 с }

Повторение 22 цикла:

94°C – 10 с } СИММЕТРИЧНАЯ  
53°C – 30 с } ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ  
72°C – 30 с } ПЦР  
98°C – 10 мин

Фиг. 7В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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