



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2010116772/10, 29.09.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.09.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
28.09.2007 GB 0719034.1

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2011 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 27.08.2013 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2007050465 A2, 03.05.2007. WO 03025175 A2, 27.03.2003. SAMUELS Y. ET AL. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, v.304, №5670, 23.04.2004, p.554, таблицы S2 и S3. THELWELL N ET AL. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 28.04.2010

(86) Заявка РСТ:  
GB 2008/003306 (29.09.2008)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2009/040557 (02.04.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е. Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

**БОРД Рут (GB),  
ФЕРГЮСОН Дженнифер (GB),  
РАВЕТТО Пол Фрэнсис (GB),  
ТЕЛУЭЛЛ Никола Джо (GB),  
УИТКОМБ Дэвид (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

**КВИАДЖЕН МАНЧЕСТЕР  
ЛИМИТЕД (GB)**

**(54) ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫЕ ПРАЙМЕРЫ**

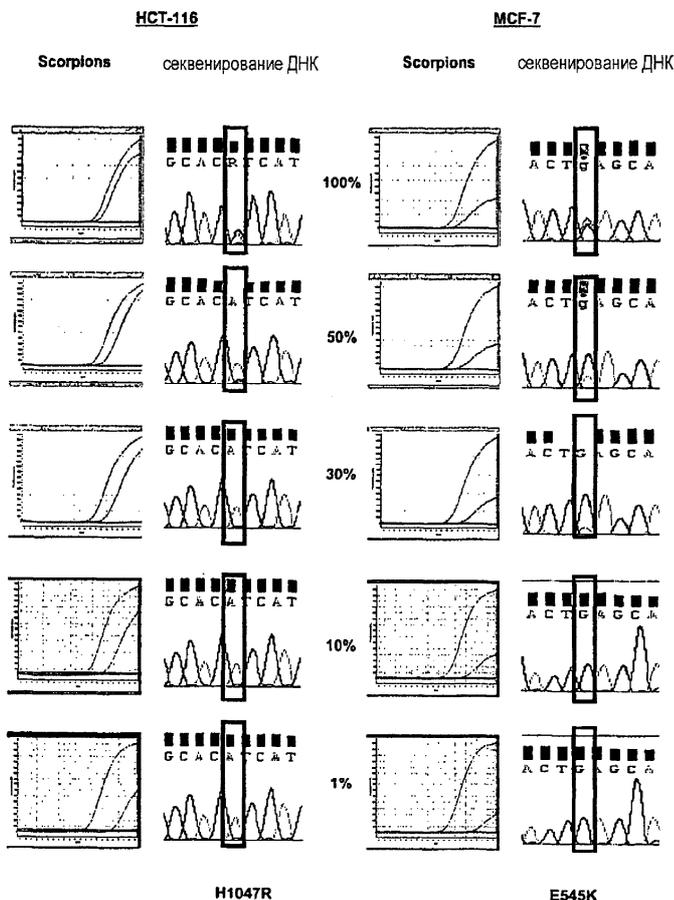
(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к способу и набору для определения наличия или отсутствия мутации в гене PIK3CA. Способ включает смешивание образца нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере фрагмент гена PIK3CA, содержащий по меньшей мере

одну мутацию, выбранную из E542K, E545K, H1047R и H1047L, с полинуклеотидным праймером, состоящим из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:28, где смесь также содержит второй праймер, и второй праймер соответствует области фрагмента последовательности PIK3CA, расположенного ниже области, которая

комплементарна полинуклеотиду, и проведение ПЦР смеси. Детектируют гибридизацию полинуклеотида с образцом нуклеиновой кислоты, где гибридизация указывает на присутствие мутации. Набор включает по меньшей мере два праймера, где первый праймер состоит из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:28, а второй праймер соответствует области

фрагмента последовательности Р1К3СА, расположенного ниже области, которая комплементарна первому полинуклеотиду. Предложенное изобретение позволяет эффективно детектировать мутации в фрагментах гена Р1К3СА, содержащих по меньшей мере одну мутацию, выбранную из E542K, E545K, H1047R и H1047L. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 1 ил., 4 табл., 4 пр.



ФИГ.1

(56) (продолжение):

NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, v.28, №19, 01.10.2000, p.3752-3761, реферат. HORIIKE A. ET AL. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small cell lung cancer. CHEST JUN 2007, v.131, №6, 2007, p.1628-1634. WO 2007106407 A2, 20.09.2007. RU 2240350 C1, 20.11.2004.

RU 2491289 C2

RU 2491289 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07H 21/00* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010116772/10, 29.09.2008**

(24) Effective date for property rights:  
**29.09.2008**

Priority:

(30) Convention priority:  
**28.09.2007 GB 0719034.1**

(43) Application published: **10.11.2011 Bull. 31**

(45) Date of publication: **27.08.2013 Bull. 24**

(85) Commencement of national phase: **28.04.2010**

(86) PCT application:  
**GB 2008/003306 (29.09.2008)**

(87) PCT publication:  
**WO 2009/040557 (02.04.2009)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E. Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**BORD Rut (GB),  
FERGJuSON Dzhennifer (GB),  
RAVETTO Pol Frehnsis (GB),  
TELUEhLL Nikola Dzho (GB),  
UITKOMB Dehvid (GB)**

(73) Proprietor(s):

**KVIADZhEN MANChESTER LIMITED (GB)**

**(54) POLYNUCLEOTIDE PRIMERS**

(57) Abstract:

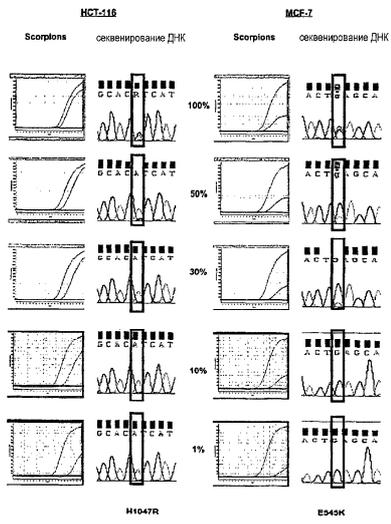
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to field of biotechnology, namely to method and set for determining presence or absence of mutation in gene PIK3CA. Method includes mixing sample of nucleic acid, which contains at least fragment of gene PIK3CA, containing at least one mutation, selected from E542K, E545K, H1047R and H1047L, with polynucleotide primer, which consists of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:21 or SEQ ID NO:28, where mixture also contains second primer, and second primer corresponds to area of fragment of sequence PIK3CA, located lower than area, which is complementary to polynucleotide, and carrying out

PCR of the mixture. Hybridisation of polynucleotide with sample of nucleic acid is detected, where hybridisation indicates presence of mutation. Set includes at least two primers, where first primer consists of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:21 or SEQ ID NO:28, and second primer corresponds to area of fragment of sequence PIK3CA, located lower than area, which is complementary to polynucleotide.

EFFECT: claimed invention makes it possible to efficiently detect mutations in fragments of gene PIK3CA, which includes at least one mutation, selected from E542K, E545K, H1047R and H1047L.

4 cl, 1 dwg, 4 tbl, 4 ex



ФИГ.1

RU 2491289 C2

RU 2491289 C2

Область техники

Настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, набору, содержащему полинуклеотид, и способу определения наличия или отсутствия мутаций в гене.

Предшествующий уровень техники

5 Фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) входят в состав большого семейства киназ липидов, вовлеченных в систему клеточных сигналов. Метаболический путь PI3K-АКТ активируется при нескольких типах опухолей, приводя к нарушению роста клеток, пролиферации и уменьшению выживаемости (добавьте ссылку 1 недавнего обзора). Не  
10 так давно определили мутации в каталитической субъединице PI3K класса 1A (PIK3CA) при злокачественных опухолях человека<sup>[1]</sup>. Точную роль таких мутаций при канцерогенезе все еще следует однозначно определить, но с продолжающейся разработкой большого количества предназначенных для PI3K ингибиторов, обнаружение мутаций станет все в большей степени важным для выявления больных.  
15 Технические проблемы для обнаружения таких мутаций являются результатом ограничений при биопсиях опухоли, которые могут содержать только небольшое количество последовательностей с мутациями. Кроме того, ДНК, выделенная из погруженной в парафин ткани, часто деградирована и плохого качества.  
20 Минимальный уровень мутантной ДНК, необходимой для определения при секвенировании составляет 15-25% и, следовательно, существует острая потребность в разработке чувствительных анализов, способных определять небольшое количество мутированных аллелей в гетерогенном образце, и в продуктах, необходимых для проведения анализов.

25 Настоящее изобретение направлено на разрешение вопросов, связанных с данной потребностью.

Описание изобретения

30 Настоящее изобретение относится к чувствительным и устойчивым анализам мутаций PIK3CA, связанных с опухолями.

По одному из аспектов настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере шесть концевых нуклеотидов одной из следующих ниже последовательностей праймеров или последовательности, ей комплементарной:  
35 SEQ ID NO:3-16, 18, 20-33, 35 или 37-39. То есть, полинуклеотид содержит по меньшей мере шесть нуклеотидов с 3'-конца одной из следующих ниже последовательностей праймеров или последовательности, ей комплементарной: SEQ ID NO:3-16, 18, 20-33, 35 или 37-39.

40 Предпочтительно, полинуклеотид содержит по меньшей мере 75% от 8, 10, 12, 14, 16, 17, 18 или 20 нуклеотидов с 3'-конца, или целиком одну из следующих ниже последовательностей праймеров, последовательности, ей комплементарной, или последовательности, обладающей идентичностью к ней 80%, 90%, 95% или 99%: SEQ ID NO:3-16, 18, 20-33, 35 или 37-39.

45 В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере 75% от десяти нуклеотидов с 3'-конца одной из следующих ниже последовательностей праймеров или последовательности, ей комплементарной: SEQ ID NO:3-16, 18, 20-33, 35 или 37-39.

50 Таким образом, полинуклеотид составляет менее чем 100 нуклеотидов в длину, предпочтительно, менее чем 80 нуклеотидов в длину, более предпочтительно, менее чем 60 нуклеотидов в длину, более предпочтительно, менее чем 40 нуклеотидов, более предпочтительно, менее чем 30 нуклеотидов в длину.

Предпочтительно, полинуклеотид дополнительно содержит группу гасителя и

группу флуорофора.

Таким образом, группа гасителя и группа флуорофора разделены концевой последовательностью нуклеотидов, содержащей первый и второй участки, причем нуклеотиды первого участка комплементарны, но в обратном порядке, нуклеотидам  
5 второго участка, так что гибридизация первого участка со вторым приводит к достаточно близкому расположению группы гасителя к группе флуорофора для того, чтобы погасить группу флуорофора.

Предпочтительно, концевая последовательность дополнительно содержит третий  
10 участок, содержащий последовательность, комплементарную участку гена PIK3CA.

Предпочтительно, полинуклеотид содержит по меньшей мере шесть нуклеотидов с 3'-конца SEQ ID NO:18, и концевая последовательность содержит SEQ ID NO:17.

Альтернативно, полинуклеотид содержит по меньшей мере концевые нуклеотиды с 3'-конца SEQ ID NO:35, и концевая последовательность содержит SEQ ID NO:34.  
15

Альтернативно, полинуклеотид содержит по меньшей мере концевые нуклеотиды с 3'-конца SEQ ID NO:39, и концевая последовательность содержит SEQ ID NO:38.

Таким образом, группа гасителя включает Dabcyl.

Предпочтительно, флуорофор включает Hex, Fam или Rox.

По другому аспекту настоящее изобретение относится к набору, содержащему по  
20 меньшей мере два из полинуклеотидов по изобретению.

Предпочтительно, набор содержит полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO:18, и полинуклеотид, содержащий любую из SEQ ID NO:3-16; или полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO:35, и полинуклеотид, содержащий любую из SEQ ID NO:20-33;  
25 или полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO:39, и полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO:37.

Таким образом, набор дополнительно содержит нуклеотидтрифосфаты, фермент полимеризации и/или буферный раствор.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к  
30 применению полинуклеотида или набора по изобретению; или полинуклеотида, содержащего четыре или пять из шести нуклеотидов с 3'-конца SEQ ID NO:3-16, 18, 20-33 или 35, или последовательности ей комплементарной для определения мутации в образце нуклеиновой кислоты, содержащем по меньшей мере фрагмент гена PIK3CA.  
35

Предпочтительно, фрагмент гена PIK3CA в образце нуклеиновой кислоты представляет собой фрагмент длиной по меньшей мере 10 нуклеотидов, предпочтительно, длиной 20 нуклеотидов, более предпочтительно, длиной 30 нуклеотидов и, более предпочтительно, длиной 40 нуклеотидов.

По другому аспекту настоящего изобретения предлагается способ определения  
40 наличия или отсутствия мутации в гене PIK3CA, включающий в себя стадии:

а) смешивания образца нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере фрагмент гена PIK3CA, с полинуклеотидом, содержащим по меньшей мере шесть нуклеотидов с 3'-конца одной из следующих ниже последовательностей праймера, или  
45 комплементарную ей последовательность: SEQ ID NO:3-16 или 20-33; и

б) детекции гибридизации полинуклеотида с образцом нуклеиновой кислоты, где гибридизация указывает на наличие мутации.

Таким образом, полинуклеотид содержит одну из следующих ниже последовательностей праймера: SEQ ID NO:3-16 или 20-33.  
50

Предпочтительно, способ дополнительно включает перед стадией а) стадию амплификации количества копий фрагмента гена PIK3CA, применяя амплификацию нуклеиновой кислоты с циклическим изменением температур, предпочтительно, ПЦР.

Предпочтительно, стадия b) включает проведение полимеризации ДНК, используя полинуклеотид в качестве первого праймера, и определение продукта удлинения при полимеризации.

Таким образом, стадия b) включает стадию смешивания образца нуклеиновой кислоты и полинуклеотида со вторым праймером, который соответствует участку фрагмента последовательности РІКЗСА по ходу транскрипции участка, к которому комплементарен полинуклеотид, и проведение ПЦР для смеси.

Предпочтительно, второй праймер содержит: SEQ ID NO:18, и полинуклеотид содержит по меньшей мере четыре или пять из шести нуклеотидов с 3'-конца SEQ ID NO:3-16; или второй праймер содержит SEQ ID NO:35 и полинуклеотид содержит по меньшей мере четыре или пять из шести нуклеотидов с 3'-конца SEQ ID NO:20-33.

Альтернативно, способ дополнительно включает стадию проведения ПЦР образца, используя контрольные праймеры, и сравнение амплификации гена РІКЗСА с амплификацией с использованием полинуклеотида и второго праймера.

Предпочтительно, контрольные праймеры содержат SEQ ID NO:37 и 39.

Таким образом, полинуклеотид содержит группу гасителя и группу флуорофора, и где стадия b) включает воздействие на смесь светом с длиной волны, на которую флуорофор реагирует при отсутствии группы гасителя, и детекцию света при длине волны, испускаемой группой флуорофора при отсутствии группы гасителя.

Предпочтительно, ген РІКЗСА представляет собой последовательность, доступную по инвентарному номеру в GenBank NM\_006218, номер версии NM\_006218.2 GI: 54792081, включенный в настоящий документ в качестве ссылки.

В тех случаях, когда в описании изобретения указано «по меньшей мере четыре или пять из шести нуклеотидов с 3'-конца» исходной последовательности, это означает, что из шести нуклеотидов в исходной последовательности либо один, либо два нуклеотида могут отсутствовать или могут быть замещены другим нуклеотидом. Разумеется, в некоторых вариантах осуществления последовательность содержит все шесть нуклеотидов исходной последовательности.

В данном описании изобретения «ARMS» представляет собой амплификационную систему для идентификации мутаций, описанную, например, в EP-A-0332435.

В тех случаях, когда в описании изобретения указана процентная доля для полинуклеотида, сравниваемого с исходным полинуклеотидом, это можно определить при помощи алгоритмов, известных в данной области.

Например, процент идентичности между двумя последовательностями можно определить, используя алгоритм BLASTP, версию 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402), используя параметры по умолчанию.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 показаны результаты проведения детекции при помощи праймеров Scorpion и секвенирования образцов, содержащих мутантный ген РІКЗСА.

Подробное описание

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотидным праймерам, которые можно использовать в анализах для определения мутаций гена РІКЗСА в образце, содержащем нуклеиновые кислоты.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотидные праймеры представляют собой прямой и обратный праймеры, которые гибридизуются с геном РІКЗСА, чтобы способствовать прохождению реакции амплификации при ПЦР.

Таким образом, прямой праймер гибридизуется против хода транскрипции и в противоположном направлении цепи от обратного праймера, и прямой и обратный праймеры вместе определяют последовательность ампликона, которая амплифицируется во время ПЦР. Последовательность прямого праймера выбирают таким образом, чтобы он не был комплементарен последовательности дикого типа, но обладал способностью гибридизоваться с мутантной последовательностью РІКЗСА.

Для того чтобы определить наличие мутантного гена РІКЗСА в образце, праймеры смешивают с образцом. Затем к образцу добавляют необходимые для ПЦР компоненты (соответствующие нуклеотидтрифосфаты, фермент ДНК-полимеразу и буферный раствор) и проводят ПЦР. Если образец содержит мутантную последовательность, к которой может гибридизоваться прямой праймер, то ампликон амплифицируется во время ПЦР и, таким образом, выявляют наличие мутантной последовательности в образце. Если образец не содержит мутантной последовательности, то прямой праймер связывается с последовательностью РІКЗСА с низкой эффективностью и, таким образом, имеет место слабая амплификация или амплификации последовательности ампликона отсутствует.

Для того чтобы определить мутацию E542K, последовательность прямого праймера может представлять собой одну из SEQ ID NO:3-9, предпочтительно SEQ ID NO:5. Для того чтобы определить мутацию E545K, последовательность прямого праймера может представлять собой одну из SEQ ID NO:10-16, предпочтительно SEQ ID NO:14. Для того чтобы определить мутацию H1047R, последовательность прямого праймера может представлять собой одну из SEQ ID NO:20-26, предпочтительно 21. Для того чтобы определить мутацию H1047L, последовательность прямого праймера может представлять собой одну из SEQ ID NO:27-33, предпочтительно 28. Тем не менее, следует понимать, что точная последовательность прямого праймера не должна быть идентичной данным последовательностям, при условии, что прямой праймер гибридизуется с мутантной последовательностью лучше, чем с последовательностью дикого типа. В последовательностях, указанных выше, это шесть концевых нуклеотидов (то есть нуклеотиды с 3'-конца) праймеров, которые обеспечивают специфичность связывания, следовательно, эти нуклеотиды должны быть идентичны данной последовательности.

Для того чтобы определить наличие ампликона, полученного в образце, обратный праймер в вариантах осуществления настоящего изобретения представляет собой так называемый праймер «Scorpions». Подробное описание праймеров Scorpions предлагается в заявке WO-A-99/066071, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. Праймер Scorpions содержит последовательность праймера, комплементарную первой целевой последовательности гена (в данном изобретении РІКЗСА), и концевая последовательность содержит последовательность зонда, ограниченного двумя взаимно комплементарными последовательностями. Участок, блокирующий ДНК-полимеразу (такой как мономер гексаэтиленгликоль (HEG)) расположен между последовательностью праймера и концевой последовательностью. Группа флуорофора расположена на одном крае концевой последовательности, и группа гасителя расположена на другом крае концевой последовательности. При использовании последовательность праймера в праймере Scorpions во время ПЦР действует обычным способом в качестве обратного праймера, и, таким образом, целый праймер Scorpions, включающий в себя концевую последовательность, вводится в состав ампликона. Участок, блокирующий ДНК-полимеразу предотвращает дубликацию концевой последовательности. Таким

образом, взаимно комплементарные последовательности в концевой последовательности склонны гибридизоваться друг с другом, приближая группу флуорофора к группе гасителя и предотвращая эмиссию от группы флуорофора. Однако если ампликон содержит вторую целевую последовательность, комплементарную последовательности зонда, то последовательность зонда предпочтительно связывается со второй целевой последовательностью, разделяя взаимно комплементарные последовательности. Это приводит к тому, что группа флуорофора и группа гасителя пространственно располагаются на определенном расстоянии, так что группа флуорофора испускает свет одной длины волны в ответ на падающий свет другой длины волны. Таким образом, праймер Scorpions позволяет с легкостью обнаруживать ампликоны и, кроме того, избегать появления ложно положительных результатов (вызванных димерами праймеров, например), потому что сигнал получают только тогда, когда ампликон содержит вторую целевую последовательность.

Группа флуорофора может представлять собой Hex (4,7,2',4',5',7'-гексахлор-(3',6'-дипивалоилфлуоресцеин)-6-карбоксамидогексил]-1-О-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит), Fam ((3',6'-дипивалоилфлуоресцеин)-6-карбоксамидогексил]-1-О-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит) или Rox (5,6,-карбокси-X-родамин). Группа гасителя может представлять собой Dabcyl (5'-диметокситритилокси-5-[N-4'-карбокси-4-(диметиламино)-азобензол]-аминогексил-3-акрилимид]-2'-дезоксиуридин-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит).

В вариантах осуществления настоящего изобретения праймер Scorpions предлагается для обнаружения мутаций E542K и E545K, где последовательность праймера представляет собой SEQ ID NO:18 и последовательность зонда представляет собой SEQ ID NO:17. Праймер Scorpions предлагается для обнаружения мутаций H1047R и H1047L, где последовательность праймера представляет собой SEQ ID NO:35 и последовательность зонда представляет собой SEQ ID NO:34.

Тем не менее, следует принять во внимание, что применение праймеров Scorpions не является обязательным для изобретения и можно применять другие способы обнаружения синтеза ампликонов, такие как обнаружение продуктов с TaqMan™, как описано в патентах №№ US-A-5487972 и US-A-5210015.

В некоторых вариантах осуществления также проводят контрольный анализ для того, чтобы определить общую концентрацию гена PIK3CA в образце. Это достигается при проведении отдельной реакции ПЦР с контрольными прямым и обратным праймерами, которые определяют ампликон в другом участке гена PIK3CA. Предпочтительно, чтобы прямой праймер представлял собой SEQ ID NO:37 и обратный праймер представлял собой праймер Scorpions, в котором последовательность праймера представляет собой SEQ ID NO:39 и последовательность зонда представляет собой SEQ ID NO:38. Количество циклов ПЦР, необходимых для получения порогового количества контрольных ампликонов, затем сравнивают с количеством циклов ПЦР, необходимых для получения порогового количества ампликонов, содержащих мутантную последовательность для того, чтобы оценить относительную долю мутантных копий гена PIK3CA в образце. Такие контрольные анализы, как правило, проводят отдельно от тестовых анализов.

Анализ ПЦР предпочтительно проводят в виде анализов мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

Образец нуклеиновой кислоты для анализа обычно представляет собой образец крови, кала, мокроты, смыва из толстой кишки, смыв из бронхов или другой жидкости

организма или ткани, полученной от индивидуума. Индивидуум обычно представляет собой человека, предпочтительно, Homo sapiens. Следует понимать, что образец для анализа может в равной степени представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую последовательности в образце для анализа. Это означает, что все или часть областей в нуклеиновой кислоте образца можно сначала амплифицировать, применяя любую подходящую технику, такую как амплификация нуклеиновой кислоты с циклическим изменением температур, в частности ПЦР, или амплификация целого генома (WGA) до использования в способе по изобретению.

Можно использовать любой подходящий фермент для полимеризации при условии, что он не влияет на способность ДНК-полимеразы в существенной степени различать нормальную и мутантную матрицу последовательности. Примеры подходящих ферментов включают в себя термостабильные ферменты, которые обладают незначительной 3'-5'-эксонуклеазной активностью, например, Taq ДНК-полимераза, особенно ДНК-полимераза «Ampli Taq Gold»™ (PE Applied Biosystems), фрагмент Штоффеля или другие соответствующим образом укороченные с N-конца модификации Taq или Tth (Thermus thermophilus) ДНК-полимеразы.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются наборы, содержащие один или несколько полинуклеотидов по изобретению и нуклеотидтрифосфаты, фермент ДНК-полимеразу и буферный раствор, необходимые для проведения реакции ПЦР. Предпочтительные наборы содержат прямые и обратные праймеры для обнаружения определенной мутации и прямые и обратные контрольные праймеры.

## ПРИМЕРЫ

### Материалы и способы

Праймеры конструировали для 4 наиболее распространенных мутаций в гене RIK3CA (номер доступа: NM\_006218). Праймеры ARMS конструировали для определения 2 мутаций в экзоне 20: H1047R и H1047L; и 2 мутаций в экзоне 9: E452K и E454K. Контрольный праймер конструировали для положения 2450 кДНК в гене RIK3CA.

Также конструировали Scorpions. Для того чтобы обеспечить возможность объединения множества анализов, в каждой реакции три праймера scorpion метили при помощи различных флуорофоров.

### Конструирование праймеров

Ряд праймеров для ARMS конструировали специфичными для каждого целевого участка. Целевой участок для мутаций E542K и E545K показан ниже в виде SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно (мутантное основание показано в скобках с нормальным вариантом на первом месте). Прямые праймеры для мутаций также показаны ниже (SEQ ID NO:3-16). Для увеличения специфичности данных реакций использовали дополнительные несовпадающие основания в праймерах ближе к 3'-концу (показаны подчеркиванием в последовательностях праймеров). Оптимальные праймеры (E542K-2 и E545K-4) использовали для описываемых экспериментов. Праймер Scorpions, пригодный для применения с последовательностями праймеров, показан в виде SEQ ID NO:17 и 18. Участки соответствия между праймером Scorpions и целевыми участками показаны одинаковым выделением или подчеркиванием.

Участок экзона 9

AACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCTCAGTG

5 ATTT (C/T) AGAGAGAGGATCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCTGTTCTTTGTCATTTTCCCTT

AATTCATTGTCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATAAAATAATATCTTATATA (SEQ ID NO:1)

10 AACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCT (C/T)

AGTGATTTTCAGAGAGAGGATCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCTGTTCTTTGTCATTTTCCCTT

15 AATTCATTGTCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATAAAATAATATCTTATATA (SEQ ID

NO:2)

Мутация	Последовательность праймера	SEQ ID NO:
20 E542K-0	5' -CTTTCTCCTGCTCAGTGATTTT-3'	3
E542K-1	5' -CTTTCTCCTGCTCAGTGATTAT-3'	4
25 E542K-2	5' -CTTTCTCCTGCTCAGTGATTCT-3'	5
E542K-3	5' -CTTTCTCCTGCTCAGTGATTGT-3'	6
E542K-4	5' -CTTTCTCCTGCTCAGTGATATT-3'	7
30 E542K-5	5' -CTTTCTCCTGCTCAGTGATCTT-3'	8
E542K-6	5' -CTTTCTCCTGCTCAGTGATGTT-3'	9
35 E545K-0	5' -ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCTT-3'	10
E545K-1	5' -ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCAT-3'	11

40 E545K-2	5' -ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCCT-3'	12
E545K-3	5' -ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCGT-3'	13
E545K-4	5' -ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATT-3'	14
45 E545K-5	5' -ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGGTT-3'	15
E545K-6	5' -ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGTTT-3'	16
50 Праймер scorpion для экзона 9	Hex-CGCGCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCGCG- que-heg-CAATGAATTAAGGGAAAATGACA	17 и 18

Участок экзона 20

Целевой участок для мутаций H1047R и H1047L показан ниже в виде последовательности SEQ ID NO:19 (мутантное основание показано в скобках с нормальным вариантом на первом месте). Прямые праймеры для мутаций также показаны ниже (SEQ ID NO:20-33). Для увеличения специфичности данных реакций

5 использовали дополнительные несовпадающие основания в праймерах ближе к 3'-концу (показаны подчеркиванием в последовательностях праймеров). Оптимальные праймеры (H1047R-1 и H1047L-1) использовали для описываемых экспериментов. Праймер Scorpions, пригодный для применения с последовательностями праймеров,

10 показан в виде SEQ ID NO:34 и 35. Участки соответствия между праймером Scorpions и целевыми участками показаны одинаковым выделением или подчеркиванием.

AGTGCAGTGTGGAATCCAGAGTGAGCTTTCATTTTCTCAGTTATCTTTTCAGTTCAATGCATGC

TGTTTAATTGTGTGGAAGATCCAATCCATTTTTGTTGTCCAGCCACCATGA (T/C/A) GTGCAT

15 CATTCATTTGTTTCATGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTCAGTTTTATCTAAGGCTAGGGTCTT

TCGAATGTATGCAATGTCATCAAAAGATTGTAGTTCTGGCATTCCAGAGCCAAGCATCATTGAG

20 AAAAGATTTATGAAGAGATTGGCATGCTGTCTGAATAGCTAGATAAGCCTT (SEQ ID

25

30

35

40

45

50

NO:19)

Мутация	Последовательность праймера	SEQ ID NO:
5 H1047R-0	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>AC</u> -3'	20
H1047R-1	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>CC</u> -3'	21
H1047R-2	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>GC</u> -3'	22
10 H1047R-3	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>TC</u> -3'	23
H1047R-4	5' -TGTTGTCCAGCCACCAT <u>AA</u> C-3'	24
15 H1047R-5	5' -TGTTGTCCAGCCACCAT <u>CA</u> C-3'	25
H1047R-6	5' -TGTTGTCCAGCCACCAT <u>TA</u> C-3'	26
H1047L-0	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>AA</u> -3'	27
20 H1047L-1	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>CA</u> -3'	28
H1047L-2	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>GA</u> -3'	29
25 H1047L-3	5' -TGTTGTCCAGCCACCATG <u>TA</u> -3'	30
H1047L-4	5' -TGTTGTCCAGCCACCAT <u>AA</u> A-3'	31
H1047L-5	5' -TGTTGTCCAGCCACCAT <u>CA</u> A-3'	32
30 H1047L-6	5' -TGTTGTCCAGCCACCAT <u>TA</u> A-3'	33
35 праймер scorpion для экзона 20	Fam-CGCGGCATGAAATACTCCAAAGCCGCG- que-heg-CCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAA	34 и 35

Контрольные праймеры

40 Контрольные праймеры показаны ниже. Участки соответствия между праймером Scorpions и целевыми участками показаны одинаковым выделением или подчеркиванием.

45 AGGCTTGAAGAGTGTCGAATTATGTCCTCTGCAAAAAGGCCACTGTGGTTGAATTGGGAGAACC  
CAGACATCATGTCAGAGTTACTGTTTCAGAACAATGAGATCATCTTTAAAAATGGGGATGG

(SEQ ID NO: 36)

50

мутация	последовательность праймера	SEQ ID NO:
контрольный праймер	5' -AGATGATCTCATTTGTTCTGAAACAG-3'	37
праймер scorpion для контроля	Rox-CCGGCCAATTCAACCACAGTGGCCGG- que-heg-GGCTTGAAGAGTGTTCGAATTA	38 и 39

Все праймеры синтезировались и предоставлялись Invitrogen. Буфер для ПЦР, Taq и магний предоставлялись Eurogentec и dNTPS приобретали в Abgene Ltd. Scorpions синтезировались и предоставлялись ATDBio.

Анализы объединяли в 2 реакциях, состоящих из контрольного анализа и 2 анализов ARMS (1 × экзон 9 и 1 × экзон 20). Анализы проводили в 25 мкл объема реакционной смеси, содержащей 1× буфер ПЦР, 4,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ смеси dNTP, 0,25 мкМ каждого праймера (контрольного праймера и 2 праймеров ARMS) и 0,25 мкМ каждого scorpion (scorpion для контроля (SEQ ID NO:38 и 39), scorpion для экзона 20 (SEQ ID NO:34 и 35) и scorpion для экзона 9 (SEQ ID NO:17 и 18)). 2,5 мкл матрицы ДНК добавляли к каждой реакции. Праймеры для H1047R и E542K объединяли с 2,5 единиц Taq полимеразы на реакцию. Праймеры для H1047L и E545K объединяли с 3,0 единиц Taq полимеразы на реакцию. Используемый праймер для E542K представлял собой E542K-2 (SEQ ID NO:5). Используемый праймер для E545K представлял собой E545K-4 (SEQ ID NO:14). Используемый праймер для H1047R представлял собой H1047R-1 (SEQ ID NO:21). Используемый праймер для H1047L представлял собой H1047L-1 (SEQ ID NO:28).

Во всех случаях реакции амплифицировали на Stratagene Mx3000P при следующих ниже условиях: 95°C в течение 10 минут, после чего следовали 45 циклов при 90°C в течение 30 секунд и при 60°C в течение 1 минуты.

Кассеты ДНК, содержащие точечные мутации, для использования в качестве положительных контролей конструировали на основе способа, описанного Higuchi et al.<sup>[2]</sup> Вкратце, соответствующие внешний праймер и праймер-мутант применяли для получения полукассет с комплементарными концами, причем каждая из полукассет содержала мутантное основание. Данные продукты ПЦР смешивали и амплифицировали с внутренними вложенными праймерами. Самоамплификация комплементарных полукассет и последующая амплификация приводила к получению готового продукта с мутантным основанием. Продукты секвенировали, чтобы убедиться, что получена правильная последовательность. Данный процесс повторяли для каждой исследуемой мутации. Кассеты ДНК смешивали с равным количеством геномной ДНК для получения 100% положительного контроля.

#### Пример 1

Для того чтобы определить специфичность реакций и праймеров, каждый анализ проводили с использованием 5-50 нг геномной ДНК на реакцию, чтобы вычислить сигнал разрыва, вызванного удлинением праймера с несовпадающими основаниями. Для каждой реакции определяли величину ΔCt (контрольный Ct - мутантный Ct) (Ct = пороговый цикл). Реакции проводили шесть раз для каждой концентрации ДНК и повторяли трижды в отдельных экспериментах, чтобы определить отсечение по величине ΔCt, ниже которого любое увеличение, как можно считать, происходит вследствие присутствия мутантной последовательности и не вследствие сигнала

разрыва. Отсечение по величине  $\Delta C_t$ , как определили, составляла 1  $C_t$  ниже наиболее низкого значения  $\Delta C_t$ , наблюдаемого во всех реакциях для каждого анализа. При анализах H1047R и H1047L отсечение по  $\Delta C_t$  определили как 12, при анализе E542K отсечение по  $\Delta C_t$  составляло 9 и при анализе E545K отсечение по  $\Delta C_t$  составляло 8.

#### Пример 2

Для того чтобы оценить чувствительность анализа, 5 копий мутантной ДНК разбавляли в различных концентрациях геномной ДНК, чтобы получить в результате конечные концентрации 5, 2, 1, 0,5 и 0,1% мутантной ДНК по отношению к дикому типу. В таблице 1 проиллюстрирована чувствительность 4 анализов ARMS. В таблице показаны величины  $\Delta C_t$  для уменьшающихся концентраций мутантной ДНК с фоновым значением для ДНК дикого типа. Предпочтительные отсечения по  $\Delta C_t$  показаны в последней колонке. В анализах экзона 20 смогли определить 5 копий мутантной ДНК, когда он содержал только 0,1% от общей ДНК (с предварительно определенным отсечением по  $\Delta C_t$ ). В анализах экзона 9 смогли определить 5 копий мутантной ДНК при концентрации 1% с предварительно определенными величинами отсечения по  $\Delta C_t$  (таблица 1).

ДНК дикого типа /реакция (копии)	мутантная ДНК /реакция (копии)	относительный % мутантных аллелей	$\Delta C_t$				отсечение по $\Delta C_t$	
			H1047L	H1047R	E542K	E545K		
100	5	5%	5,9	4,3	5,1	5,8		
250	5	2%	7,2	6,7	7,2	6,4	H1047L	12
500	5	1%	8,3	7,6	8,4	7,0	H1047R	12
1000	5	0,5%	9,3	9,0	10,2	8,1	E542K	9
5000	5	0,1%	11,5	10,5	12,1	10,1	E545K	8

#### Пример 3

Смешивание с клеточными линиями, содержащими мутацию H1047R (HCT-116) и E545K (MCF-7), использовали для сравнения относительной чувствительности анализов ARMS по сравнению с секвенированием. Обе клеточные линии были гетерозиготны по мутации. Секвенирование проводили, используя праймеры и условия проведения циклов ПЦР, как описано Samuels et al<sup>[1]</sup>. Анализы ARMS и секвенирование проводили при концентрациях мутантного гена 100%, 50%, 30%, 10% и 1% от общей смеси. Результаты показаны на фигуре 1, на которой результаты под заголовком «Scorpions» показывают увеличение количества копий ампликона после последовательных циклов ПЦР (результаты при использовании контрольных праймеров и мутантных праймеров показаны в виде отдельных линий). Под заголовком «Секвенирование ДНК» показаны результаты секвенирования обратной цепи гена в смеси. При секвенировании не смогли определить наличие мутантов H1047R, при количестве менее чем 50% от общей смеси и не смогли определить наличие мутантов E545K в количестве менее чем 30% от общей смеси. В анализах с использованием праймеров по изобретению, в отличие от этого, были способны определить наличие мутантов при концентрации 1%.

#### Пример 4

Данный анализ применяли в отношении ДНК, выделенной из свежзамороженной ткани различных типов опухолей, которые оценивали в отношении наличия мутаций PIK3CA, применяя анализ ARMS/Scorpion. Всего была доступна ДНК из 279 образцов опухоли. При анализе выявили мутации в 5 из 49 (10,2%) образцов

колоректального рака, в 19 из 49 (38,7%) образцов рака молочной железы, в 1 из 51 (1,9%) образца рака легких и в 1 из 34 (2,9%) образцов меланомы. Никаких мутаций не определили в 50 образцах рака простаты или 46 образцах рака яичников. Из колоректальных образцов, положительных в отношении мутаций PIK3CA, 3 представляли собой H1047R, 1 представлял собой H1047L и 1 представлял собой E542K; из образцов рака молочной железы, положительных в отношении PIK3CA, 15 представляли собой H1047R, 1 представлял собой H1047L и 3 представляли собой E545K; обе мутации в образцах рака легких и образце меланомы, положительном в отношении мутаций PIK3CA представляли собой H1047R. При секвенировании идентифицировали только 14 от общего количества 26 (53%) определенных мутаций. При секвенировании обнаружили мутацию в одном образце рака молочной железы, для определения которой не был разработан анализ ARMS (с.1634 A>G; p E545G). Она не являлась новой мутацией и была ранее описана при раке молочной железы и колоректальном раке<sup>[3-5]</sup>.

Частота мутаций PIK3CA в анализируемых образцах согласовывалась с предыдущими исследованиями за исключением рака яичников<sup>[1, 3-9]</sup>. Мутации PIK3CA ранее были описаны при раке яичников, но предполагали, что они могли быть ассоциированы с эндометриоидными и светлоклеточными раками<sup>[8, 10]</sup>. Все тестируемые в данном исследовании раки яичников представляли собой серозную аденокарциному, что может объяснить отсутствие какой-либо мутации PIK3CA.

При анализе ARMS идентифицировали значительно больше мутаций в клинических образцах, чем обнаружили посредством прямого секвенирования. Смешивание с клеточной линией подтверждает, что данный анализ более чувствителен, чем секвенирование, при определении исследуемых мутаций PIK3CA. Вероятно, гетерогенность клинических образцов, которые будут содержать и опухолевую и нормальную ткань, будет означать, что в некоторых случаях частота мутаций будет ниже, чем пригодная для определения способами секвенирования, и в силу этого анализ ARMS больше подходит для клинического применения. Недостаток заключается в том, что будут определяться только определенные специфичные мутации ARMS. Тем не менее, в данной серии из 279 образцов была определена только одна мутация в экзоне 9 или 20 гена PIK3CA, для определения которой не был разработан анализ ARMS.

В заключение, в примерах показано, что настоящее изобретение относится к чувствительному высокопроизводительному анализу для определения 4 наиболее распространенных мутаций в гене PIK3CA. Данный анализ можно применять для небольшого количества ДНК и можно определять низкие уровни мутантного PIK3CA в образце.

Список последовательностей в нестандартном формате

<210> 1  
 <223> E542K целевой участок  
 <210> 2  
 <223> E545K целевой участок  
 <210> 3  
 <223> E542K-0 прямой праймер  
 <210> 4  
 <223> E542K-1 прямой праймер  
 <210> 5  
 <223> E542K-2 прямой праймер

- <210> 6  
<223> E542K-3 прямой праймер  
<210> 7  
<223> E542K-4 прямой праймер  
5 <210> 8  
<223> E542K-5 прямой праймер  
<210> 9  
<223> E542K-6 прямой праймер  
10 <210> 10  
<223> E545K-0 прямой праймер  
<210> 11  
<223> E545K-1 прямой праймер  
<210> 12  
15 <223> E545K-2 прямой праймер  
<210> 13  
<223> E545K-3 прямой праймер  
<210> 14  
20 <223> E454K-4 прямой праймер  
<210> 15  
<223> E545K-5 прямой праймер  
<210> 16  
<223> E545K-6 прямой праймер  
25 <210> 17  
<223> праймер Scorpion для экзона 9  
<210> 18  
<213> праймер Scorpion 2 для экзона 9  
30 <210> 19  
<223> H1047R и H1047L целевые участки  
<210> 20  
<223> H1047R-0 прямой праймер  
<210> 21  
35 <223> H1047R-1 прямой праймер  
<210> 22  
<223> H1047R-2 прямой праймер  
<210> 23  
40 <223> H1047R-3 прямой праймер  
<210> 24  
<223> H1047R-4 прямой праймер  
<210> 25  
<223> H1047R-5 прямой праймер  
45 <210> 26  
<223> H1047R-6 прямой праймер  
<210> 27  
<223> H1047L-0 прямой праймер  
50 <210> 28  
<223> H1047L-1 прямой праймер  
<210> 29  
<223> H1047L-3 прямой праймер

<210> 30

<223> H1047-3 прямой праймер

<210> 31

<223> H1047L-4 прямой праймер

<210> 32

<223> H1047L-5 прямой праймер

<210> 33

<223> H1047L-6 прямой праймер

<210> 34

<223> праймер Scorpion для экзона 20

<210> 35

<223> праймер Scorpion 2 для экзона 20

<210> 36

<223> контрольный целевой участок

<210> 37

<223> контрольный праймер

<210> 38

<223> контрольный праймер Scorpion

<210> 39

<223> контрольный праймер Scorpion 2

Список литературы:

1. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304(5670):554.

2. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(15):7351-67.

3. Wu G, Xing M, Mambo E, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7(5):R609-16.

4. Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2875-8.

5. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(11):1649-54.

6. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2005;24(8):1477-80.

7. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004;3(8):772-5.

8. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004;64(21):7678-81.

9. Omholt K, Krockel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2006;16(2):197-200.

10. Wang Y, Helland A, Holm R, Kristensen GB, Borresen-Dale AL. PIK3CA mutations in advanced ovarian carcinomas. *Hum Mutat* 2005;25(3):322.

#### Формула изобретения

1. Способ определения наличия или отсутствия мутации в гене PIK3CA, включающий в себя стадии:

а) смешивания образца нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере фрагмент гена PIK3CA, содержащий по меньшей мере одну мутацию, выбранную

из E542K, E545K, H1047R и H1047L, с полинуклеотидным праймером, состоящим из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:28, где смесь также содержит второй праймер, и второй праймер соответствует области фрагмента последовательности PIK3CA, расположенного ниже области, которая комплементарна полинуклеотиду, и проведение ПЦР смеси; и

б) детекции гибридизации полинуклеотида с образцом нуклеиновой кислоты, где гибридизация указывает на присутствие мутации.

2. Способ по п.1, где второй праймер является праймером Scorpion.

3. Способ по п.1 или 2, где второй праймер содержит группу гасителя и группу флуорофора, и где стадия б) включает воздействие на смесь светом с длиной волны, на которую флуорофор реагирует при отсутствии группы гасителя, и детекцию света при длине волны, испускаемой группой флуорофора при отсутствии группы гасителя.

4. Набор для детекции мутаций в фрагментах гена PIK3CA, содержащих по меньшей мере одну мутацию, выбранную из E542K, E545K, H1047R и H1047L, включающий по меньшей мере два праймера, где первый праймер состоит из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:28, а второй праймер соответствует области фрагмента последовательности PIK3CA, расположенного ниже области, которая комплементарна первому полинуклеотиду.

25

30

35

40

45

50

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> DxS Limited

<120> ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫЕ ПРАЙМЕРЫ

<130> MWPP102416

<150> GB0719034.1

<151> 2007-09-28

<160> 39

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 180

<212> ДНК

<213> Искусственный

<220>

<223> целевой участок E542K

<400> 1

aacagagaat ctccatttta gcacttacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgctc 60

agtgatttya gagagaggat ctcgtgtaga aattgctttg agctgttctt tgtcattttc 120

ccttaattca ttgtctctag ctagtctggt actctgtaaa ataaaataat atcttatata 180

<210> 2

<211> 180

<212> ДНК

<213> Искусственный

<220>

<223> целевой участок E545K

<400> 2

aacagagaat ctccatttta gcacttacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgcty 60

agtgatttca gagagaggat ctcgtgtaga aattgctttg agctgttctt tgtcattttc 120

ccttaattca ttgtctctag ctagtctggt actctgtaaa ataaaataat atcttatata 180

<210> 3

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственный

<220>

<223> прямой праймер E542K-0

<400> 3

ctttctcctg ctcaagtatt tt 22

<210> 4  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E542K-1  
  
 <400> 4  
 ctttctcctg ctcaagtgatt at 22

<210> 5  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E542K-2  
  
 <400> 5  
 ctttctcctg ctcaagtgatt ct 22

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E542K-3  
  
 <400> 6  
 ctttctcctg ctcaagtgatt gt 22

<210> 7  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E542K-4  
  
 <400> 7  
 ctttctcctg ctcaagtgata tt 22

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E542K-5  
  
 <400> 8  
 ctttctcctg ctcaagtgatc tt 22

<210> 9

<211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E542K-6  
  
 <400> 9  
 ctttctcctg ctcagtgatg tt 22

<210> 10  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E545K-0  
  
 <400> 10  
 actccataga aaatctttct cctgcctt 27

<210> 11  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E545K-1  
  
 <400> 11  
 actccataga aaatctttct cctgcat 27

<210> 12  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E545K-2  
  
 <400> 12  
 actccataga aaatctttct cctgcct 27

<210> 13  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E545K-3  
  
 <400> 13  
 actccataga aaatctttct cctgcgt 27

<210> 14  
 <211> 27

<212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E454K-4  
  
 <400> 14  
 actccataga aaatctttct cctgatt 27  
  
 <210> 15  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E545K-5  
  
 <400> 15  
 actccataga aaatctttct cctgggt 27  
  
 <210> 16  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> прямой праймер E545K-6  
  
 <400> 16  
 actccataga aaatctttct cctgttt 27  
  
 <210> 17  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> праймер Scorpion для экзона 9  
  
 <400> 17  
 cgcgctcgtg tagaaattgc tttagcscgc 30  
  
 <210> 18  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> праймер Scorpion 2 для экзона 9  
  
 <400> 18  
 caatgaatta agggaaaatg aca 23  
  
 <210> 19  
 <211> 300  
 <212> ДНК

<213> Искусственный

<220>

<223> целевые участки H1047R и H1047L

<400> 19  
 agtgcagtgt ggaatccaga gtgagctttc atttttctcag ttatcttttc agttcaatgc 60  
 atgctgttta attgtgtgga agatccaatc catttttggt gtccagccac catgahgtgc 120  
 atcattcatt tgtttcatga aatactccaa agcctcttgc tcagttttat ctaaggctag 180  
 ggtctttoga atgtatgcaa tgtcatcaaa agattgtagt tctggcattc cagagccaag 240  
 catcattgag aaaagattta tgaagagatt ggcattgctgt cgaatagcta gataagcctt 300

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>

<223> прямой праймер H1047R-0

<400> 20  
 tgttgtccag ccaccatgac 20

<210> 21  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>

<223> прямой праймер H1047R-1

<400> 21  
 tgttgtccag ccaccatgcc 20

<210> 22  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>

<223> прямой праймер H1047R-2

<400> 22  
 tgttgtccag ccaccatggc 20

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>

<223> прямой праймер H1047R-3

<400> 23  
 tgttgtccag ccaccatgtc 20

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> прямой праймер H1047R-4

<400> 24  
 tgttgtccag ccaccataac 20

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> прямой праймер H1047R-5

<400> 25  
 tgttgtccag ccaccatcac 20

<210> 26  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> прямой праймер H1047R-6

<400> 26  
 tgttgtccag ccaccattac 20

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> прямой праймер H1047L-0

<400> 27  
 tgttgtccag ccaccatgaa 20

<210> 28  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный

<220>  
 <223> прямой праймер H1047L-1

<400> 28

tgttgtccag ccaccatgca	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> прямой праймер H1047L-3	
<400> 29	
tgttgtccag ccaccatgga	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> прямой праймер H1047-3	
<400> 30	
tgttgtccag ccaccatgta	20
<210> 31	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> прямой праймер H1047L-4	
<400> 31	
tgttgtccag ccaccataaa	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> прямой праймер H1047L-5	
<400> 32	
tgttgtccag ccaccatcaa	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> Искусственный	
<220>	
<223> прямой праймер H1047L-6	
<400> 33	
tgttgtccag ccaccattaa	20

<210> 34  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> праймер Scorpion для экзона 20  
  
 <400> 34  
 cgcggcatga aatactcсаа агссгсг 27  
  
 <210> 35  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> праймер Scorpion 2 для экзона 20  
  
 <400> 35  
 ccctagcctt agataаааст гaгсаа 26  
  
 <210> 36  
 <211> 125  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> контрольный целевой участок  
  
 <400> 36  
 aggcttgaag agtgtcgaat tatgtcctct gcaaaaaggc cactgtgggtt gaattgggag 60  
 аасссагаса tcatgtcaga gttactgttt сагаасаатг агатсатстт тааааатггг 120  
 gatgg 125  
  
 <210> 37  
 <211> 25  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> контрольный праймер  
  
 <400> 37  
 агатгатсстс аттгттсгга аасаг 25  
  
 <210> 38  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственный  
  
 <220>  
 <223> контрольный праймер Scorpion

<400> 38  
ccggccaatt caaccacagt ggccgg 26

<210> 39  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Искусственный

<220>  
<223> контрольный праймер Scorpion 2

<400> 39  
ggcttgaaga gtgtcgaatt a 21