



MD 2149 F1 2003.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2149** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) **Int. Cl.**⁷: C 12 N 15/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2001 0385 (22) Data depozit: 2001.11.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.04.30, BOPI nr. 4/2003
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: MITIN Valentin, MD; TUMANOVA Lidia, MD; TARNOVSCAIA Tatiana, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Primer oligonucleotidic pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la biotehnologie, în particular la genetică și poate fi utilizată pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C.

Primerul oligonucleotidic conține 19 nucleotide în următoarea succesiune: tgcggaaccg gtgagtaca.

5
2
Rezultatul invenției constă în mărirea numărului de tipuri depistate ale ARN-ului virusului hepatitei C.

Revendicări: 1

10

MD 2149 F1 2003.04.30

MD 2149 F1 2003.04.30

3

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, în particular la genetică și poate fi utilizată pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C.

5 Primerii se utilizează în reacțiile PCR și RT-PCR (reacția polimerazei în lanț și transcripția reversă – reacția polimerazei în lanț) pentru determinarea succesiunilor nucleotidice specifice și pentru depistarea ADN/ARN virale și bacteriene, inclusiv a ARN-ului virusului hepatitei C.

Se cunoaște utilizarea domeniilor conservative ale ARN-ului virusului C, așa ca domeniul 5' – netranslat sau domeniul de gena "core" [1]. Însă primerii cunoscuți nu permit a depista toate tipurile ARN-ului virusului, aceasta fiind condiționat de diversitatea mare a virusului hepatitei C. La moment sunt cunoscute 8 tipuri de virusuri HCV, fiecare din ele incluzând încă câteva subgrupuri. Astfel, dacă doi ani în urmă pentru grupul „1” HCV erau cunoscute 3 subgrupuri – 1a, 1b, 1c, în prezent numărul lor s-a mărit până la 1f. În afară de aceasta, numărul succesiunilor clonate și secvențiate ale ARN-ului virusului C permanent se mărește. Din această cauză primerii brevetați anterior nu mai pot cuprinde tot spectrul succesiunilor cunoscute ale ARN-ului virusului hepatitei C.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în crearea unui primer oligonucleotidic (succesiune oligonucleotidică specifică) care va fi omolog pentru multe tipuri de ARN al virusului hepatitei C în comparație cu cei cunoscuți.

Problema dată poate fi rezolvată dacă în calitate de primer oligonucleotidic pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C se va utiliza succesiunea oligonucleotidică din 19 nucleotide tgcggaaccg gtgagtaca.

20 Rezultatul invenției constă în mărirea numărului de tipuri depistate ale ARN-ului virusului hepatitei C, întrucât primerul oligonucleotidic tgcggaaccg gtgagtaca permite a depista mai multe tipuri de ARN al virusului hepatitei C, prezentând omologie de 100% cu 1000 de succesiuni nucleotidice diferite ale ARN-ului hepatitei C.

Exemplu

25 Crearea primerului oligonucleotidic (succesiune oligonucleotidică specifică) pentru depistarea sigură a virusului hepatitei C prin intermediul metodei RT-PCR s-a efectuat cu ajutorul softului PCGene. Trebuie de menționat că depistarea oricărei succesiuni prin metoda RT-PCR este posibilă când se utilizează o pereche de primeri – un primer de la 5' – regiune (plus–primerul) și altul de la 3' – regiune (minus–primerul). Invenția dată se referă la crearea plus–primerului. Pentru rezolvarea problemei în evidență s-au pus următoarele condiții:

30 a) temperatura de renaturare (T_m – temperature of melting) a fost limitată la $53^\circ \dots 57^\circ\text{C}$ în condițiile standard ale reacției PCR (TrisHCl pH 8,3, KCl 50 mM, concentrația primerilor 250 μM). Temperatura s-a calculat prin formula Rychlik, Spenser și Rhoads (Ruchlik W., Spenser W.J., Rhoads R.E., Nucleic Acids Res., 1990, 18: 6409-6412; Rychlik W., Rhoads R.E., Nucleic Acids Res., 1989, 17: 8543-8551).

35
$$T_m = \frac{d\text{e}1\text{H}}{(\text{d}e\text{S} + R * \ln(c/4))} - 273,15 + 16,61 \log[\text{K}^+]$$

în care: de1H este entalpia formării helixului,

deS – entropia formării helixului,

R - constanta molară a gazului (1,987 cal/grad C· mol),

40 c – concentrația molară totală a oligonucleotidelor renaturate în cazul când oligonucleotidele nu sunt autocomplementare.

K^+ – concentrația potasiului în reacție;

b) lungimea primerului: 20 ± 2 nucleotide;

c) numărul maxim acceptabil de repetiție al unei singure nucleotide: 4;

45 d) numărul de GC-perechi de la 3' – capăt: 0;

e) conținutul minim acceptabil de GC-perechi: 40%;

f) conținutul maxim acceptabil de GC-perechi: 60%;

g) numărul maxim al nucleotidelor la autocomplementația primerului: 4;

h) întinderea helixului dublu în interiorul primerului cel mult 4 nucleotide;

i) procentajul maxim de complementație cu alte regiuni ale ARN-ului: 70%;

50 j) numărul maxim al nucleotidelor la complementație cu altele ale primerului: 3.

Pe baza condițiilor fixate s-au examinat succesiuni nucleotidice ale ADN și ARN din Banca mondială de nucleotide (GenBank, softul BLAST: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Rezultatele obținute au permis construirea plus-primerului oligonucleotidic din 19 nucleotide 5'-tgcggaaccggtgagtaca-3'. Etapa următoare a constat în analiza comparativă a nivelului de omologie a primerului oligonucleotidic 5'-tgcggaaccggtgagtaca-3' și primerului oligonucleotidic proxim 5'-cccgggaggctctcgtagaccgtgca-3' cu succesiunile nucleotidice ale ADN și ARN din baza de date GenBank. Prin intermediul softului BLAST s-au analizat 1000 de succesiuni nucleotidice ale diferitelor tipuri de virus al hepatitei C. Conform analizei s-a constatat că primerul creat are o omologie de 100% (19 nucleotide) cu 1000 (probabil și mai multe) succesiuni din GenBank. Totodată

MD 2149 F1 2003.04.30

4

primerul proxim are o omologie de 100% (25 nucleotide) numai cu 389 succesiuni asemănătoare. În tabelul 1 sunt prezentate unele succesiuni analizate.

Tabelul 1

Gradul de omologie al primerilor oligonucleotidici cu unele succesiuni în GenBank

5

Sursa succesiunilor nucleotidice în GenBank și lungimea succesiunii corespunzătoare	Succesiunile omoloage	Gradul de identitate
<u>gi 5441837 emb AJ242653.1 SSE242653</u> Repliconul I389/NS2-3' UTR al virusului hepatitei C Lungimea =8649	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 149 tgcggaaccggtgagtaca 167	19/19
	1 cccgggaggctcctagaccgtgca 25 315 cccgggaggctcctagaccgtgca 339	25/25
<u>gi 7650251 gb AF207767.1 AF 207767</u> Genomul complet al tulpinii MD26 virusului hepatitei C Lungimea=9379	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 137 tgcggaaccggtgagtaca 155	19/19
	1 cccgggaggctcctagaccgtgca 25 303 cccgggaggctcctagaccgtgca 327	24/25
<u>gi 13122269 dbj AB047643.1 AB047643</u> Gena virusului hepatitei C pentru poliproteină, clona: JCH-4 Lungimea=9641	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 148 tgcggaaccggtgagtaca 166	19/19
	1 cccgggaggctcctagaccgtgca 25 314 cccgggaggctcctagaccgtgca 338	24/25
<u>gi 9757541 dbj AB030907.1 AB030907</u> Gena de tipul 2b a virusului hepatitei C pentru poliproteină, izolatul: JPUT971017 Lungimea=9654	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 149 tgcggaaccggtgagtaca 167	19/19
	1 cccgggaggctcctagaccgtgca 25 315 cccgggaggctcctagaccgtgca 339	24/25
<u>gi 3152974 emb AJ006317.1 HCV6317</u> Tipul 3a 5' UTR al virusului hepatitei C, izolatul tx 33.6, parțial Lungimea=230	1 tgcggaaccggtgagtaca 19 45 tgcggaaccggtgagtaca 63	19/19
	1 cccgggaggctcctagaccgtgca 16 213 cccgggaggctcctagaccgtgca 228	16/25

10

MD 2149 F1 2003.04.30

5

(57) Revendicare:

Primer oligonucleotidic pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C, care conține 19 nucleotide în următoarea succesiune: tgcggaaccg gtagtaca.

5

(56) Referințe bibliografice:

1. EP 0984068 2000.03.08

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

LOZOVANU Maria