Способы амплификации нуклеиновых кислот для получения большего количества копий последовательности-мишени были описаны ранее. Например, Патент США. В № № 4,683,195, 4,683,202 и 4,800,159 (Mullis et al.) описана ПЦР-амплификация, в которой используется серия реакций термоциклирования денатурации и полимеризации для получения множества копий последовательности-мишени. Способы амплификации, основанные на транскрипции с использованием РНК-полимеразы, были раскрыты в Патенте США. № 5,399,491 и 5,554,516 (Kacian et al.), Патент США № 5,437,990 (Burg et al.), PCT № WO 8801302 и WO 8810315 (Gingeras et al.), Патент США. № 5 130 238 (Malek et al.); и Патент США. № 4 868 105 и 5 124 246 (Urdea et al.). Лигазная цепная реакция (LCR) использует четыре различных олигонуклеотида для амплификации мишени и ее комплементарной цепи с использованием циклов гибридизации, лигирования и денатурации (ЕР № 0 320 308). При амплификации со смещением нити (SDA) используется праймер, который содержит сайт распознавания эндонуклеазы рестрикции, которая отсекает одну нить дуплекса-мишени гемимодифицированной ДНК, за которым следуют этапы удлинения праймера и смещения нити (Патент США № 5422252 (Walker et al.)).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен олигомер нуклеиновой кислоты для амплификации нуклеотидной последовательности ВИЧ-1, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности, состоящей из идентификатора SEQ №5 до идентификатора SEQ №22 и идентификатора SEQ №33 до идентификатора SEQ №68. В одном варианте осуществления олигомер нуклеиновой кислоты имеет остов нуклеиновой кислоты, который включает одну или более 2'-О-метоксисвязей, пептидных нуклеиновокислотных связей, фосфоротиоатных связей, метилфосфонатных связей или любую комбинацию этих связей. В другом варианте осуществления олигомер представляет собой промотор-праймер, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5 - SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:33 - SEQ ID NO:45, где 5'-часть последовательности включает промоторную последовательность для РНК-полимеразы T7.

Другой вариант осуществления представляет собой смесь олигомеров нуклеиновых кислот, которая включает олигомеры для амплификации первой последовательности gag и имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:59.

Другой вариант осуществления представляет собой смесь олигомеров нуклеиновых кислот, включающую олигомеры для амплификации второй последовательности gag и имеющую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:60.

Другой вариант осуществления смеси включает олигомеры для амплификации последовательности протеазы и имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности ID № 7, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID №13, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID №37, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID №38, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID №50, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID №51, последовательности ID №19, ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID №61 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ID №62.

Одна смесь олигомеров включает олигомеры для амплификации первой последовательности обратной транскриптазы (RT) и имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO :20, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 63, идентификационный номер SEQ: 64 и идентификационный номер SEQ: 65.

Другой вариант осуществления представляет собой смесь, которая включает олигомеры для амплификации второй RT-последовательности и имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:66. Другая смесь включает олигомеры для амплификации третьей RT-последовательности и имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:67 и SEQ ID NO:68.

Другой аспект изобретения обеспечивает способ обнаружения ВИЧ-1 в биологическом образце. Способ включает этапы получения биологического образца, содержащего нуклеиновую кислоту ВИЧ-1; смешивание образца с двумя или более олигомерами для амплификации, которые специфически амплифицируют по меньшей мере одну последовательность-мишень для ВИЧ-1, содержащуюся в последовательностях gag и pol, в условиях, которые допускают амплификацию нуклеиновой кислоты, причем олигомеры для амплификации имеют последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

Идентификационный номер SEQ: 5, идентификационный номер SEQ: 11, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 33, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 35, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:46, идентификационный номер SEQ:47, идентификационный номер SEQ:17 и идентификационный номер SEQ:59 для амплификации первой последовательности gag;

Идентификационный номер SEQ: 6, идентификационный номер SEQ: 12, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 34, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 36, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:48, идентификационный номер SEQ:49, идентификационный номер SEQ:18 и идентификационный номер SEQ:60 для амплификации второй последовательности gag;

Идентификационный номер SEQ: 7, идентификационный номер SEQ: 13, идентификационный номер SEQ: 37, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 38, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 50, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:51, идентификационный номер SEQ:19, идентификационный номер SEQ:61 и идентификационный номер SEQ:62 для амплификации первой последовательности pol, которая является последовательностью протеазы;

Идентификационный номер SEQ: 8, идентификационный номер SEQ:14, идентификационный номер SEQ: 39, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 40, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 41, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 52, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:53, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:54, идентификационный номер SEQ: 20, идентификационный номер SEQ:63, идентификационный номер SEQ:64 и идентификационный номер SEQ:65 для амплификации второй последовательности pol, которая является первая последовательность обратной транскриптазы (RT);

Идентификационный номер SEQ: 9, идентификационный номер SEQ: 15, идентификационный номер SEQ: 42, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 43, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 55, идентификационный номер SEQ:56, идентификационный номер SEQ:21 и идентификационный номер SEQ:66 для амплификации третьей последовательности pol, которая является второй RT-последовательностью; и

Идентификационный номер SEQ:10, идентификационный номер SEQ:16, идентификационный номер SEQ:44, идентификационный номер SEQ: 45, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:57, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:58, идентификационный номер SEQ:22, идентификационный номер SEQ:67 и идентификационный номер SEQ:68 для амплификации четвертой последовательности pol, которая является третьей RT-последовательностью, или комбинации олигомеров, выбранных из этих групп, которая позволяет амплифицировать по меньшей мере одной последовательности gag и по меньшей мере последовательности pol; амплификация последовательности-мишени для получения продукта амплифицированной нуклеиновой кислоты; и обнаружение присутствия продукта амплифицированной нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления на стадии амплификации используется метод опосредованной транскрипцией амплификации, который проводится в существенно изотермических условиях

Идентификационный номер SEQ: 10, идентификационный номер SEQ: 16, идентификационный номер SEQ: 44, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 45, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ: 57, ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ номер SEQ:58, идентификационный номер SEQ:22, идентификационный номер SEQ:67 и идентификационный номер SEQ:68 для амплификации последовательности pol, которая является RT-последовательностью;

1. A mixture of nucleic acid oligomers for amplifying a nucleotide sequence of HIV-1 in a reverse transcriptase (RT) region, comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:67, and SEQ ID NO:68.

Additional examples of target specific amplicons for sequencing are described in U.S. patent application Ser. No. 11/104,781, titled “Methods for determining sequence variants using ultra-deep sequencing”, filed Apr. 12, 2005; PCT Patent Application Serial No. US 2008/003424, titled “System and Method for Detection of HIV Drug Resistant Variants”, filed Mar. 14, 2008; and U.S. Pat. No. 7,888,034, titled “System and Method for Detection of HIV Tropism Variants”, filed Jun. 17, 2009, each of which is hereby incorporated by reference herein in its entirety for all purposes.

Дополнительные примеры специфичных к мишени ампликонов для секвенирования описаны в патентной заявке США Сер. № 11/104,781, озаглавленной “Способы определения вариантов последовательности с использованием сверхглубокого секвенирования”, поданной 12 апреля 2005 г.; Патентной заявке PCT серийный номер US 2008/003424, озаглавленной “Система и способ выявления вариантов лекарственной устойчивости ВИЧ”, поданной 14 марта 2008 г.; и патенте США № 7888,034, озаглавленной “Система и способ выявления вариантов тропизма к ВИЧ”, поданный 17 июня 2009 г., каждый из которых настоящим включен посредством ссылки в настоящий документ полностью для всех целей.