



MD 2149 G2 2003.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2149** <sup>(13)</sup> **G2**  
(51) **Int. Cl.**<sup>7</sup>: C 12 N 15/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) <b>Nr. depozit:</b> a 2001 0385 (22) <b>Data depozit:</b> 2001.11.23	(45) <b>Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:</b> 2003.04.30, BOPI nr. 4/2003
(71) <b>Solicitant:</b> INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) <b>Inventatori:</b> MITIN Valentin, MD; TUMANOVA Lidia, MD; TARNOVSCAIA Tatiana, MD (73) <b>Titular:</b> 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: tgccgaaccg gtgagtaca.

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

Revendicări: 1

10

MD 2149 G2 2003.04.30

## MD 2149 G2 2003.04.30

### Descriere:

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

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 viral și bacterian, inclusiv a ARN-ului virusului hepatitei C.

10 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

15 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.

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.

20 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 tgcggaaccggtgagtaca. Rezultatul invenției constă în mărirea numărului de tipuri depistate ale ARN-ului virusului hepatitei C, întrucât primerul oligonucleotidic tgcggaaccggtgagtaca 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

30 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:

35 a) temperatura de renaturare ( $T_m$  – temperature of melting) a fost limitată la 53°...57°C în condițiile standard ale reacției PCR (TrisHCl pH 8,3, KCl 50 mM, concentrația primerilor 250  $\mu$ M). 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).

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

40 în care:  $\Delta H$  este entalpia formării helixului,  
 $\Delta S$  – entropia formării helixului,  
R - constanta molară a gazului (1,987 cal/grad C· mol),  
c – concentrația molară totală a oligonucleotidelor renaturate în cazul când oligonucleotidele nu sunt autocomplementare.

45  $K^+$  – concentrația potasiului în reacție;  
b) lungimea primerului: 20±2 nucleotide;  
c) numărul maxim acceptabil de repetiție al unei singure nucleotide: 4;  
d) numărul de GC-perechi de la 3' – capăt: 0;  
e) conținutul minim acceptabil de GC-perechi: 40%;  
50 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%;  
î) numărul maxim al nucleotidelor la complementație cu altele ale primerului: 3.

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

# MD 2149 G2 2003.04.30

4

Tabelul 1

Gradul de omologie al primerilor oligonucleotidice cu unele succesiuni in GenBank

5

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

**(57) Revendicare:**

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

15

**(56) Referințe bibliografice:**

1. EP 0984068 2000.03.08

**Șef Secție:**

GUȘAN Ala

**Examinator:**

BAZARENCO Tatiana

**Redactor:**

LOZOVANU Maria