

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.

Totodată, primerii cunoscuți nu permit de a depista toate tipurile ARN-ului virusului, acest fapt fiind condiționat de diversitatea mare a virusului hepatitei C. La moment sunt cunoscute 8 tipuri de virusuri VHC, fiecare din ele incluzând încă câteva subgrupuri. Astfel, dacă doi ani în urmă pentru grupul „1” VHC 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 hepatitei C permanent se mărește. Din această cauză primerii brevetati anterior nu mai pot cuprinde tot spectrul succesiunilor cunoscute ale ARN al virusului hepatitei C. Trebuie de menționat că depistarea de oricare succesiuni prin metoda PCR este posibilă când se utilizează o pereche de primeri – un primer de la succesiunea -5' (plus primerul) și altul de la succesiunea -3' (minus primerul).

Sunt cunoscuți plus primerii pentru sinteza fragmentelor de ARN al virusului hepatitei C, inclusiv și primerul brevetat de autori anterior [1].

Se cunoaște utilizarea domeniilor conservative ale ARN-ului virusului hepatitei C, așa ca domeniul 5' – netranslat sau domeniul de gena „core” [2].

Problema pe care o rezolvă invenția constă în crearea unui primer oligonucleotidic al succesiunii -3', care, în comparație cu cei cunoscuți, va fi omolog cu mai multe tipuri de ARN al virusului hepatitei C.

Problema se soluționează prin aceea că în calitate de primer oligonucleotidic (minus) pentru depistarea ARN-ului virusului hepatitei C se utilizează succesiunea oligonucleotidică din 21 nucleotide 5'-aggttaggattcgtgctcat-3'. În pereche cu minus primerul propus poate fi utilizat oricare din plus primerii.

Rezultatul invenției constă în mărirea numărului de tipuri depistate ale ARN-ului virusului hepatitei C, întrucât primerul oligonucleotidic 5'-aggttaggattcgtgctcat-3' 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 virusului hepatitei C.

Exemplu

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'-regiunea (plus primerul) și altul de la 3'-regiunea (minus primerul). Invenția dată se referă la crearea minus primerului. Pentru rezolvarea problemei s-au pus următoarele condiții:

a) temperatura de renaturare (T_m – temperature of melting) a fost limitată de la 53...57°C la condițiile standard ale reacției PCR (TrisHCl pH 8,3, KCl – 50 mM, concentrația primerilor – 250 μ M). Temperatura s-a calculat prin formula Rychlik, Spenser și Rhoads (Rychlik 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).

$$T_m = \frac{\Delta H}{(\Delta S + R \cdot \ln(c/4))} - 273,15 + 16,6 \log[K^+],$$

în care: ΔH este entalpia formării helixului,

ΔS – 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,

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%;

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.

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 minus-primerului oligonucleotidic din 21 nucleotide 5'-aggttaggattcgtgctcat-3'. Etapa următoare a constat în analiza comparativă a nivelului de omologie a primerului oligonucleotidic 5'-aggttaggattcgtgctcat-3' și primerului oligonucleotidic proxim 5'-gggtcctggaggctgcacgacctcat-3' [2] cu succesiunile nucleotidice ale ADN și ARN din baza datelor 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% (21 nucleotide) cu 1000 succesiuni din GenBank. Totodată primerul proxim are o omologie de 100% (27 nucleotide) numai cu 932 succesiuni asemănătoare. În tabel sunt prezentate unele succesiuni analizate.

Gradul de omologie a primerilor oligonucleotidici cu unele succesiuni în GenBank

Sursa succesiunilor nucleotidice în GenBank și lungimea succesiunii corespunzătoare	Succesiunile omoloage	Gradul de identitate
gi 50235321 gb AY651061.1 Genomul complet al izolatului Khaja virusului hepatitei C Lungimea = 9441	1 aggttaggattcgtgctcat 21 362 aggttaggattcgtgctcat 342	21/21
	1 gggctctggaggctgcacgacctcat 27 122 gggctctggaggctgcacgacctcat 96	27/27
gi 7650261 gb AF207772.1 AF207772 Genomul complet al tulpinii MD31 virusului hepatitei C Lungimea = 9379	1 aggttaggattcgtgctcat 21 350 aggttaggattcgtgctcat 330	21/21
	1 gggctctggaggctgcacgacctcat 27 110 gggctctggaggctgcacgacctcat 84	26/27
gi 5918928 gb AF165045.1 AF165045 Genomul complet al tulpinii MD1-1 virusului hepatitei C Lungimea = 9389	1 aggttaggattcgtgctcat 21 350 aggttaggattcgtgctcat 330	21/21
	5 cctggaggctgcacgacctcat 27 106 cctggaggctgcacgacctcat 84	22/27
gi 46392685 gb AY576554.1 Gena virusului hepatitei C pentru proteină core, izolatul pacientului 5, clona 3, parțial Lungimea = 371	1 aggttaggattcgtgctcat 21 340 aggttaggattcgtgctcat 320	21/21
	1 gggctctggaggctgcacgacctcat 27 100 gggctctggaggctgcacgacctcat 74	26/27
gi 1480856 gb U63379.1 HCU63379 Gena virusului hepatitei C pentru proteină core, parțial Lungimea = 848	1 aggttaggattcgtgctcat 21 294 aggttaggattcgtgctcat 274	21/21
	1 gggctctggaggctgcacgacctcat 27 54 gggctctggaggctgcacgacctcat 28	26/27