



(I D) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90326 B

(51) *Classificação Internacional: (Ed. 5)*
C12Q001/68 A C12N015/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.04.20	(73) <i>Titular(es):</i> TRUSTEES OF COLUMBIA UNIV.IN CITY OF NEW YORK, TH WEST 116TH STREET BROADWAY,N.Y., NEW YORK 120027 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.04.20 US 183838	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.11.10	(72) <i>Inventor(es):</i> FRED R. KRAMER US PAUL M. LIZARDI MX
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 03/94 1994.03.17	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA OU CONCENTRAÇÃO DE UM OLIGO- OU POLINUCLEOTIDO DE INTERESSE NUMA AMOSTRA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

8.7.2090.826

4.

THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK

"PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA OU CONCENTRAÇÃO DE
UM OLIGO- OU POLINUCLEOTIDO DE INTERESSE NUMA AMOSTRA"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Ao longo do presente pedido de patente de invenção faz-se referência a diversas publicações e citações fornecidas pelas mesmas. A descrição destas publicações no seu todo, indicam-se aqui como referência neste pedido de patente, de invenção para descrever mais completamente o estado da técnica a que a presente invenção diz respeito.

É um facto actualmente estabelecido que todos os organismos vivos, incluindo os agentes infecciosos, por exemplo vírus, contêm ADN ou, algumas vezes, ARN cujas moléculas são portadoras de informação genética, sob a forma de um código de sequência nucleotídica. Embora alguns segmentos deste código sejam compartilhados por muitos organismos, existem outros segmentos que contêm sequências nucleotídicas que são únicas para um organismo particular. Diz-se que estas sequências são específicas de espécie, e proporcionam uma informação ou um sinal que pode ser utilizado para a identificação desse organismo. A técnica de hibridação dos ácidos nucleicos (1) tem um grande potencial para rápida detecção e classificação dos agentes infecciosos. No entanto, os ensaios de hibridação correntes, ainda não atingiram a sensibilidade e a rapidez

necessárias para a sua utilização prática em diagnóstico. Recentemente, pôs-se a hipótese de que a sensibilidade e a velocidade dos ensaios biológicos podiam ser melhoradas pela ligação de um ARN replicável a uma sonda de hibridação (2). Após a hibridação, poder-se-ia amplificar o ARN replicável incubando com ARN polimerase, dirigida pelo ARN, $Q\beta$ replicase (3). O grande número de cópias de ARN que se sintetizaria, serviria como uma informação de que a hibridação se tinha verificado. Na presente invenção, faz-se referência à síntese de novas sondas de hibridação de ácidos nucleicos que combinam numa molécula de ARN individual as funções duplas de sonda e de amplificador.

Uma característica que distingue a síntese do ARN pela $Q\beta$ replicase, reside no facto de um pequeno número de cordões matriz, poder iniciar a síntese de um grande número de cordões produzidos (4).

De um modo rotineiro ocorre in vitro, aumentos na ordem de um milhão de vezes da quantidade do ARN (5), como um resultado de um mecanismo de reacção auto-catalítica (6,7): os ARNs de cordão simples servem como matrizes para a síntese dos produtos do cordão simples complementares; após se ter completado o alongamento do cordão produzido, o produto e a matriz, libertam-se do complexo de replicação (8); e ambos os cordões se encontram livres para servirem como matrizes na próxima sequência de síntese. Por consequência, quanto maior fôr o excesso de replicase, assim o número de cordões de ARN aumentará exponencialmente. Após o número de cordões de ARN ter igualado o número de moléculas de replicase activas, a

síntese do ARN continua de uma forma linear. Existem numerosas vantagens na utilização da amplificação do ARN pela Q β replicase, como base de um sistema gerador de informação: a Q β replicase é altamente específica para as suas próprias matrizes de ARN (9); uma só molécula de ARN matriz pode, em princípio, iniciar replicação (10); e a quantidade de ARN sintetizado (usualmente, 200 ng em 50 μ l em 15 minutos) é tão grande que pode ser medida com o auxílio de técnicas colorimétricas simples.

Duas circunstâncias conduziram ao pedido em curso: 1) a descoberta de que segmentos de ARN heterólogos, se podiam inserir na sequência de uma matriz Q β replicase pequena, natural, ARN MDV-1 (11) sem afectar o seu poder de replicação (12); e 2) a construção de um plasmido que serve de matriz para a síntese de MDV-1 (+) ARN quando o plasmido se incuba in vitro com a ARN polimerase T7 de bacteriófago (13).

Na presente invenção, modificou-se este plasmido inserindo uma região de poliligação na sequência de CADN de MDV-1 e depois inserindo sequências de sondas de hibridação de síntese na região de poliligação. Os plasmidos resultantes serviram como matrizes para a síntese dos "ARNs recombinantes", que consistem em uma sequência de sonda embebida na sequência de ARN MDV-1 (+). As sequências de sonda que se empregaram na presente invenção e que se descreverão posteriormente nos pormenores experimentais na secção seguinte, são conhecidos por se hibridarem especificamente com o ADN repetitivo do plasmodium falciparum (14-16), um dos protozoários que causam malária. Na presente invenção demonstra-se que estas

moléculas de ARN recombinantes são bifuncionais, pelo facto de serem capazes de hibridarem especificamente, como alvos de ADN complementares e que também são capazes de servir como matrizes para a amplificação exponencial através da Q_B replicase.

No pedido de patente de invenção norte-americana Nº 4786600 de Kramer e outros, referente a 22 de Novembro de 1988, descrevem-se moléculas de ARN de cordão simples recombinante e replicáveis que compreendem uma sequência de reconhecimento, para a ligação de uma polimerase de ARN dirigida pelo ARN, uma sequência para a iniciação da síntese do cordão a ser produzido pela polimerase e uma sequência heteróloga com interesse, derivada a partir de uma molécula de ARN diferente, inserida num sítio específico, numa região interior da molécula recombinante. Kramer e outros, não explicam nem sugerem se a sequência inserida fôr uma sequência de sonda de hibridação, se as moléculas resultantes podem ser replicadas após hibridação para produzir cópias múltiplas para detecção.

No pedido de patente de invenção norte-americana Nº de Série 852692, depositado em 16 de Abril de 1986 Chu e outros, descrevem métodos para a determinação da presença de alvos, isto é, analitos, ligando um ARN replicável que serve como um grupo de referência a uma sonda, por exemplo, um oligonucleotido, um anticorpo ou lectina. Chu e outros, também descobriram que uma ARN polimerase que comanda a síntese de ARN, pode então utilizar-se, depois de ter ocorrido a hibridação, para produzir cópias múltiplas do ARN replicável para detecção. Contudo, Chu e outros não descrevem nenhum método no qual, diferentes sequências de "sondas" de ARN recombinante se possam utilizar simultaneamente no mesmo ensaio.

RESUMO DA PRESENTE INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a moléculas de sondas de ARN de cordão simples recombinante hibridáveis e replicáveis que compreendem: uma sequência de reconhecimento para a ligação de uma ARN polimerase que comanda a síntese de ARN; uma sequência necessária para a iniciação da síntese do cordão que se pretende produzir pela polimerase; e uma sequência de ARN heterólogo inserida num sítio específico na região interna da molécula recombinante e complementar para um oligo-ou polinucleotido com interesse.

A presente invenção, também proporciona um método para se determinar a presença ou concentração de um oligo-ou polinucleotido com interesse, numa amostra, compreendendo os passos: (a) constituir um complexo específico entre a molécula da sonda de ARN recombinante da reivindicação 1 e o oligo-ou polinucleotido com interesse, incubando a amostra com as moléculas de sonda de ARN recombinante, sob condições adequadas e por um período suficiente para permitir a hibridação das sequências nucleotídicas complementares; (b) remoção das moléculas sonda de ARN recombinante não hibridadas, a partir da mistura reaccional; (c) incubação da mistura reaccional com uma ARN polimerase que comanda a síntese de ARN susceptível de sintetizar cópias adicionais das moléculas sonda de ARN recombinante que se hibridaram com os oligo-ou polinucleotidos com interesse; e (d) a detecção das moléculas sonda de ARN recombinante sintetizadas no passo (c) determinando-se deste modo a presença ou concentração do oligo-ou polinucleotido com interesse.

A presente invenção proporciona ainda um método para determinar simultaneamente a presença ou concentração de diversos oligo- ou polinucleotídeos diferentes com interesse numa amostra compreendendo os passos: (a) formação de complexos específicos entre a mistura de diferentes tipos de moléculas sonda de ARN recombinante da reivindicação 1, possuindo cada um dos tipos, uma sequência diferente inserida e os oligo- ou polinucleotídeos de interesse incubando a amostra com a mistura de moléculas sonda de ARN recombinante sob condições adequadas e durante um período suficiente para permitir a hibridação das sequências nucleotídicas complementares; (b) remoção das moléculas sonda de ARN recombinante não hibridadas da mistura de reação; (c) a incubação da mistura reaccional com uma ARN polimerase que comanda o ARN capaz de sintetizar cópias adicionais de moléculas sonda de ARN recombinante que se hibridaram com os oligo- ou polinucleotídeos com interesse; (d) a separação da mistura dos ARN sintetizados, hibridando-os com polinucleotídeos dispostos ordenadamente ligados a uma membrana em cada um dos polinucleotídeos é complementar de um dos tipos de ARN sintetizado; e (e) detectando as moléculas sonda de ARN recombinante produzidas no passo (d), determinando assim a presença ou concentração de cada oligo- ou polinucleotídeo com interesse.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Estrutura do plasmídeo poli-pT7- MDV

A linha preta a cheio, representa o cADN de MDV-1. Quando se cliva este plasmídeo a endonuclease SmaI e se incuba in vitro com ARN polimerase T7, as transcrições

resultantes são ARNs replicáveis.

Figura 2. As sequências nucleotídicas de transcrições recombinantes envolvidas no interior de estruturas secundárias preconizadas por um programa de computador, são as mais estáveis (41). O ARN MDV-fal-un (+) (A) contém uma inserção de 58 nucleótidos (indicado entre setas) em vez do segmento de 3 nucleótidos, AGU, que surge no ARN de MDV-1 (+) natural (42). As estruturas secundárias preconizadas pelo programa de computador na região recombinante exterior à inserção, são idênticas às estruturas secundárias que se identificaram experimentalmente no ARN MDV-1 (36,37) o que sugere que a sequência da sonda teria pouco efeito na topologia do território MDV-1. As letras em destaque, indicam os nucleótidos complementares do ADN, do P. falciparum. As figuras 2(B) e 2(C) indicam a estrutura secundária provável das inserções presentes no ARN MDV-fal-st (+) e no ARN poli-MDV (+) (C).

Figura 3. Replicação de ARNs recombinantes. (A) A electroforese em gel de poliacrilamida indicou a mobilidade relativa de transcrições diferentes: MDV-1 (a), poli-MDV (b), MDV-fal-un (c) e MDV-fal-st (d). Os números ao lado do painel indicam a extensão de cada transcrição (em nucleotidos). (B) Iniciaram-se as reacções com Q β replicase com 200 fg de cada transcrição. A análise cinética indicou que se sintetizaram aproximadamente 100.000 cópias de cada transcrição em 20 minutos. (C) A análise electroforética do ARN presente após 45 minutos indicou que os produtos eram réplicas das transcrições. Os produtos foram provavelmente um nucleotido mais extenso do que as transcrições, uma vez que, durante a

replificação, se adiciona usualmente uma adenosina 3'-terminal (21).

Figura 4. Efeito da concentração inicial de ARN no tempo de curso da síntese de ARN recombinante. Iniciou-se uma série de reacções de 25 μ l de Q β replicase com as quantidades que se seguem de ARN MDV-fal-un: 140 pg, 1,4 pg, 14 fg, 0,14 fg e 0 fg o que corresponde a 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^3 e 0 moléculas de matriz adicionada. Retiraram-se amostras de cada reacção de 5 em 5 minutos, para se determinar a quantidade de ARN que tinha sido sintetizada. Os resultados demonstraram que o tempo gasto na fase exponencial de síntese aumentou, quando o número inicial de moléculas de matriz decresceu (5). Cada redução de 100 vezes no número de moléculas recombinantes utilizadas como matriz, resultou num atraso de 3,59 minutos para se atingir a saturação (o que indica que a população de ARN duplicou de 32,4 segundos em 32,4 segundos). A mobilidade electroforética do ARN presente em cada reacção após 25 minutos (ver ilustração interna) quando comparada com os marcadores (m), ARN recombinante (278 nucleotidos de extensão) e ARN MDV-1 (233 nucleotidos de extensão) confirmou que o produto das reacções que se iniciaram com o ARN recombinante, era ARN recombinante.

Figura 5. Hibridação de ARNs recombinantes. Hibridaram-se 28 ng de ARN poli-MDV (a), 75 ng de ARN MDV-fal-st (b), e 75 ng de ARN MDV-fal-un (c) com manchas ponteadas (34) contendo ou 0,5 μ g de ADN pPFR6 (um plasmido que contém 45 cópias da sequência alvo do P. falciparum) ou 0,5 μ g de ADN pUC13 (o plasmido vector utilizado para construir pPFR6).

O ARN recombinante, hibridou-se especificamente com os plasmídeos que contêm as sequências alvo. Quando a quantidade, quer de ARN MDV-fal-un quer de ADN, duplicou (d) verificou-se um aumento acentuado na quantidade de ARN que se ligou ao ADN alvo.

Figura 6. Relação de afinidade linear entre o logaritmo do número inicial de moléculas de ARN adicionadas, a uma reacção de $\phi\beta$ replicase e a quantidade de ARN sintetizado. Efectuou-se o diagrama da quantidade de ARN sintetizado em 25 minutos nas reacções apresentadas na figura 4, em função do logaritmo de um número de moléculas recombinantes que se adicionaram inicialmente a cada uma das reacções. Estes resultados exemplificam como devem ser interpretados os ensaios biológicos que utilizam sondas susceptíveis de serem replicadas: a quantidade de ARN produzido seria proporcional ao logaritmo do número de sondas ligadas aos alvos.

Figura 7. Auto-radiograma de reacções de hibridação indicando a quantidade de ARN presente em cada momento.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma molécula sonda de ARN de cordão simples recombinante, susceptível de se hibridar e replicar e que compreende uma sequência de reconhecimento para a ligação de uma ARN polimerase que comanda o ARN; uma sequência necessária para a iniciação da síntese do cordão pela polimerase; e uma sequência de ARN heterólogo inserida num sítio específico da região interna da molécula recombinante e complementar de um oligo- ou polinucleotido de interesse.

Num aspecto da presente invenção, a sequência de reconhecimento para a ligação de uma ARN polimerase que comanda o ARN, consiste numa região interna da molécula sonda de ARN recombinante.

Num outro aspecto da presente invenção, o local de inserção da sequência de ARN heterólogo não se encontra próximo de qualquer sequência necessária para a ligação da ARN polimerase ou para a iniciação da síntese do cordão que se pretende produzir. Ainda um outro aspecto uma tal inserção possui um efeito mínimo na capacidade de replicação da molécula. Ainda num outro aspecto da presente invenção a inserção da molécula sonda de ARN recombinante, possui um efeito mínimo sobre as estruturas secundárias e terciárias da molécula. Na prática da presente invenção, o local de inserção específico da molécula sonda de ARN recombinante situa-se num nucleotido específico. Na prática da presente invenção, a sequência heteróloga com interesse insere-se entre os nucleotidos 63 e 64.

A sequência das moléculas sonda de ARN recombinante, da presente invenção, que são necessárias para a iniciação da síntese do cordão que se pretende produzir, consiste numa sequência 3'-terminal rica em citidina.

Uma ARN polimerase que comanda o ARN útil na prática da presente invenção, é a Q β replicase.

Na presente invenção, é útil uma molécula sonda de ARN recombinante em que a molécula seja uma variante da matriz de ARN para a Q β replicase ou um seu mutante. Num outro aspecto tal matriz de ARN variante é o ARN MDV-1 ou um seu mutante. Num outro aspecto o ARN MDV-1 é o MDV-1 (+). Ainda num

outro aspecto, o ARN MDV-1 é o ARN MDV-1 (-).

São especialmente úteis na prática da presente invenção para proporcionarem moléculas sonda de ARN recombinante, as transcrições derivadas a partir de plasmídeos recombinantes, por incubação com ARN polimerase, dirigida para o ADN. Na prática da presente invenção, a molécula sonda de ARN recombinante é uma matriz variante de ARN para a Q β replicase, ou um seu mutante. Num outro aspecto preferido a matriz de ARN variante é um ARN MDV-1 ou um seu mutante. Ainda em outros aspectos o ARN MDV-1 é um ARN MDV-1 (+) ou um ARN MDV-1 (-).

Uma das características da presente invenção consiste em proporcionar uma molécula sonda de ARN recombinante em que a sequência heteróloga se encontra inserida entre os nucleotídeos 63 e 64.

Uma importante característica obtém-se através desta invenção em que a sequência heteróloga inserida da molécula sonda de ARN recombinante é complementar de uma sequência de um ácido nucleico específico dum agente infeccioso. Tal agente infeccioso pode ser um vírus, um viróide ou virussóide, um procariota, uma bactéria, um eucariota, ou um protozoário parasita, tal como os protozoários parasitas que causam a malária.

Num outro aspecto a sequência heteróloga inserida da molécula sonda de ARN recombinante, pode ser complementar de uma sequência de um gene específico ou de uma porção deste, ou de um alelo de uma sequência de um gene específico ou de uma porção deste.

A presente invenção proporciona um método para a determinação da presença ou concentração de um oligo- ou po-

linucleotido com interesse numa amostra, compreendendo os seguintes passos: (a) a formação de um complexo específico, entre as moléculas sonda de ARN recombinante, conforme anteriormente descrito, e o oligo- ou polinucleotido de interesse, incubando a amostra com a molécula sonda de ARN recombinante, sob condições adequadas e durante um período suficiente para permitir que as sequências nucleotídicas complementares se hibridem. (b) a remoção das moléculas sonda de ARN recombinante não hibridada, a partir da mistura reaccional; (c) a incubação da mistura reaccional com uma ARN polimerase, que comanda o ARN, susceptível de sintetizar cópias adicionais de moléculas sonda de ARN recombinantes que se hibridam com o oligo- ou polinucleotido com interesse; e (d) a detecção de moléculas sonda de ARN recombinante sintetizadas no passo (c), determinando, deste modo, a presença ou concentração do oligo- ou polinucleotido com interesse.

Um tal método, conforme se descreveu antes, pode ser útil para originar sinais altamente amplificados num ensaio de hibridação de ácidos nucleicos. Teoricamente, o método possui a capacidade de originar um sinal a partir de uma só molécula hibridada e, por isso, poder-se-ia utilizar num ensaio de detecção de ADN (ou de ARN) de sensibilidade elevadíssima. O método baseia-se na utilização de construções de ARN recombinante $\text{Q}\beta$ e de $\text{Q}\beta$ replicase.

Num tal método o oligo- ou polinucleotido com interesse na amostra pode ligar-se a um suporte sólido. Em tais casos, o suporte sólido pode ser uma membrana de nitrocelulose ou de nylon.

Para se levar a efeito o método da presente invenção, anteriormente descrito, e formar um complexo específico entre as moléculas sonda de ARN recombinante e o oligo- ou polinucleotido com interesse, isto é, o passo (a), o oligo- ou polinucleotido com interesse e a molécula sonda de ARN recombinante deverão encontrar-se em solução.

As moléculas de ARN recombinante não hibridadas podem separar-se das hibridadas com o oligo-ou com os polinucleotidos com interesse, empregando técnicas que são bem conhecidas na especialidade. Habitualmente, com as moléculas de ARN recombinantes, hibridadas com um oligo-ou um polinucleotido com interesse, que por sua vez se liga a um suporte sólido, esta separação consegue-se facilmente por simples lavagem o que não destrói significativamente a conexão com o suporte sólido. Para além disso, a técnica conhecida como o método de hibridação intercalada, ("sandwich") também pode ser utilizada para efectuar a separação das moléculas de ARN recombinantes e hibridadas das não hibridadas. Também podem ser utilizadas as técnicas de cromatografia e electroforéticas. Num aspecto adicional do método anteriormente descrito, removem-se as moléculas sonda de ARN recombinante não hibridadas, da mistura de reacção do passo (b), separando as moléculas sonda de ARN recombinantes hibridadas das moléculas sonda não hibridadas, através da captura do oligo-ou do polinucleotido num suporte sólido.

Para a detecção das moléculas sonda de ARN recombinante que se sintetizaram ou replicaram no passo (c) anterior, podem utilizar-se métodos bem conhecidos dos especia-

listas. Por exemplo, pode efectuar-se a detecção por absorção ultra-violeta do ARN replicado, por exemplo, pelo método de contacto de fotoimpressão (54).

Num outro aspecto, efectua-se a detecção pela incorporação de precursores ribonucleosido 5'-trifosfato, marcados radioactivamente no interior dos produtos ARN recombinante. Noutra aspecto efectua-se a detecção incorporando precursores ribonucleosidos 5'-trifosfato quimicamente modificados no interior dos produtos ARN recombinantes.

Pode incorporar-se biotina ou iminobiotina no interior do ARN replicado que pode então ser detectado por técnicas conhecidas com um aduto enzima-avidina ou enzima-estreptavidina, que se liga à biotina ligada ao ARN e catalisa a produção de um cromogénio detectável de um modo conveniente. Ver Matthews (55); Leary e outros (45). A incorporação de biotina ou de iminobiotina no interior do ARN replicado pode efectuar-se utilizando UTP que é biotinilado através de um intervalo para o carbono 5 da porção uracilo como um substrato para o replicado na reacção de replicação. Estes UTPs são compostos conhecidos. Para além disso, sabe-se que estes UTPs são substratos para a Q β replicase e que os ARNs que incluem grupos uracilo biotinilados através de grupos de espaçamento unidos ao átomo de carbono na posição 5, devido à utilização de tais UTPs na sua síntese, são matrizes para a replicação catalisada pela Q β replicase.

O ARN que resulta do processo de replicação também pode ser biotinilado utilizando acetato de fotobiotina de acordo com o procedimento de Forster e outros (56) e deste modo serem detectados por um sistema composto de cromogénio/

/aduto de avidina/enzima, tal como a síntese dos ARNs replicados com UTP biotinilado na reacção de replicação. Assim, ainda num outro aspecto, os precursores 5'-trifosfato de ribonucleosidos quimicamente modificados podem ser biotinilados ou os precursores 5'-trifosfato de ribonucleotidos quimicamente modificados podem ser fluorescentes. Obtém-se uma característica adicional deste método quando a detecção se efectua pela ligação de corantes fluorogénicos ou cromogénicos específicos do ARN com produtos de ARN recombinante. O ARN resultante do processo de replicação pode tornar-se fluorescente por meio de uma reacção catalisada pela ARN ligase T4 para anexar nucleotidos modificados para serem fluorescentes à extremidade 3' do ARN que se pretende replicar. Ver Cosstick e outros, Nucl. Acis. Res. 12, 1791-1810 (57). A fluorescência do ARN resultante pode empregar-se para se detectar o ARN por qualquer das diversas técnicas normalizadas.

Ainda entre os métodos que se podem utilizar para detectar o ARN replicado encontram-se aqueles em que uma determinada substância que se liga especificamente com um ácido nucleico se junta ao sistema no qual a replicação se efectuou ou ao meio, tal como um suporte carregado positivamente, tal como papel ECTEOLA, no qual se isolou o ARN replicado, e medindo o sinal da substância de referência. Tais substâncias incluem: corantes cromogénicos, tais como "corantes gerais" (Dahlberg e outros, (58)); azul de metileno (Dingman e Peacock, (59) , e corante de prata (Sammons e outros (32) ; Igloie, (60)); compostos fluorogénicos que se ligam ao ARN - por exemplo brometo de etidio (Sharp e outros, (61); Bailey e Davidson,

(62)); e compostos fluorogénicos que se ligam especificamente a ARNs que são matrizes para replicação através da Q β replicase - por exemplo uma ficobiliproteína (Oi e outros, (63); Stryer e outros, patente de invenção norte-americana N $^{\circ}$ 4520110) conjugados com a subunidade viral de Q β replicase.

Também se pode efectuar a detecção por métodos físicos, tais como a absorção de luz ultravioleta e a determinação da massa por pesagem.

Na incubação da mistura reaccional obtida no passo (b) utiliza-se uma ARN polimerase que comanda o ARN. Um exemplo de uma tal polimerase útil na prática da presente invenção é a Q β replicase.

A presente invenção também proporciona moléculas sonda de ARN recombinante produzidas segundo o método anteriormente descrito e em especial moléculas sonda de ARN recombinante produzidas segundo o método em que a mistura reaccional se incuba com Q β replicase para se sintetizarem as cópias adicionais das moléculas sonda de ARN recombinantes que se hibridam com os oligo- ou polinucleotidos com interesse.

Um outro aspecto do método, proporcionado pela presente invenção, obtém-se quando o tempo de incubação no passo (c) é suficientemente pequeno para que o número de cordões de ARN recombinantes produzidos não exceda o número de moléculas de polimerase, de que resulta que o número de moléculas produzidas de ARN recombinante é linearmente proporcional ao número de moléculas sonda de ARN recombinante, originalmente hibridadas.

O método aqui descrito, proporciona uma outra característica importante quando o tempo de incubação no pas-

so (c) é suficientemente longo para que o número de cordões de ARN produzidos exceda o número de moléculas de polimerase, tendo como resultado que o número de moléculas produzidas de ARN recombinante é proporcional ao logaritmo do número de moléculas sonda de ARN recombinante originalmente hibridadas.

A presente invenção também proporciona um método para determinar simultaneamente a presença ou concentração de diferentes oligo- ou polinucleotidos de interesse numa amostra, compreendendo os seguintes passos: (a) formação de complexos específicos entre uma mistura de diferentes tipos de moléculas sonda de ARN recombinante da reivindicação 1, possuindo cada um dos tipos uma sequência de inserção diferente, e os oligo- ou polinucleotidos com interesse, incubando a amostra com a mistura de moléculas sonda de ARN recombinante sob condições adequadas e durante um período suficiente para permitir que se hibridem as sequências de nucleotidos complementares; (b) remoção das moléculas sonda de ARN recombinante não hibridadas, da mistura reaccional; (c) incubação da mistura reaccional com uma ARN polimerase, dirigida para o ARN, susceptível de sintetizar cópias adicionais de moléculas sonda de ARN recombinante, que se hibridam com os oligo- ou polinucleotidos de interesse; (d) separação da mistura de ARNs recombinantes sintetizados, hibridando-os com um arranjo ordenado de polinucleotidos ligados a uma membrana em que cada um dos polinucleotidos é complementar de um tipo de ARN recombinante sintetizado; e (e) detecção de moléculas sonda de ARN recombinante, produzidas no passo (d), determinando deste modo a presença ou concentração de cada oligo- ou poli-

nucleotido de interesse.

Um bom ensaio clínico requer rapidez, especificidade e sensibilidade. Por exemplo, os ensaios usuais para a identificação de agentes patogénicos que causam meningite bacteriana aguda, carecem de rapidez e sensibilidade suficientes. Associados com a meningite encontram-se numerosos e diferentes organismos, incluindo Haemophilu influenzae, Klebsiella pneumoniae, Neisseria meningitidis, Staphylococcus aureus e Streptococcus pneumoniae. Usualmente, o paciente é uma criança. Os tratamentos eficazes necessitam da identificação do agente etiológico numa amostra de fluido cerebrospinal; e é essencial que o tratamento antibiótico seja iniciado o mais rapidamente possível. Contudo, as técnicas de laboratório correntes, necessitam de, pelo menos, 18 horas para identificar o agente. Para além disso, o volume da amostra é habitualmente de apenas 50 microlitros e muitas vezes contém menos de 50 microrganismos individuais, o que é bastante abaixo dos limites a que se podem efectuar os ensaios de detecção directa (64). Para além disso, o quadro clínico complica-se devido ao marcado aumento da abundância de bactérias que possuem genes de resistência antibiótica nos plasmidos (65,66).

Podem preparar-se séries de moléculas sonda de ARN recombinante replicáveis, sendo cada uma delas específica para um diferente organismo, que pode causar meningite. Para além disso, podem preparar-se séries de moléculas sonda de ARN recombinante, sendo cada uma delas específica para diferentes genes de resistência a antibióticos, que podem estar presentes nos agentes infecciosos.

Utilizando tais séries de moléculas sonda de ARN

recombinante, uma mistura de, por exemplo, 15 diferentes sondas de ARN recombinante replicáveis, incubam-se com ADN desnaturado obtido a partir de uma amostra de fluido espinal. Poucos tipos apenas de moléculas sondas de ARN recombinante, encontrariam alvos (por exemplo uma sonda bacteriana e três sondas de genes de resistência). Após se terem removido as moléculas sonda que não se ligaram, utiliza-se a $Q\beta$ replicase para amplificar as sondas que permaneceram. Após a amplificação, coloca-se a mistura dos ARNs produzidos em contacto com uma membrana, contendo manchas-pontos numeradas, contendo cada uma delas ADN desnaturado complementar de uma das sequências da sonda original. Deste modo, a mistura dos ARN produzidos é seleccionada para quantificação subsequente. Estes ensaios permitem o diagnóstico rápido e simultâneo dos agentes patogénicos e o seu espectro de resistência antibiótica.

De um modo semelhante, podia-se utilizar uma mistura de sondas simultaneamente para detectar o vírus da imunodeficiência humana que origina o síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) e a concentração do painel completo dos agentes oportunistas que infectam os pacientes com a imunidade suprimida.

A presente invenção encontra-se ilustrada nas secções dos Pormenores Experimentais e Discussão Experimental que se segue. Proporcionam-se estas secções para auxiliar na compreensão da presente invenção mas não devem ser interpretadas, nem devem ser construídas para limitar, de qualquer modo, a presente invenção conforme se indica nas reivindicações que a seguir se apresentam.

PORMENORES EXPERIMENTAIS

Materiais e Métodos

Enzimas

As endonucleases de restrição, ligase T4 polinucleotido quinase e ARN polimerase T7 foram adquiridos no New England Biolabs. A fosfatase alcalina do intestino da vitela, ADN ligase T4 e o fragmento Klenow de ADN polimerase I de Escherichia coli e a desoxi-ribonuclease I pancreática de bovino foram adquiridas a partir da Boehringer Mannheim. Isolou-se a Q β replicase a partir da E. coli Q13 infectada com o bacteriófago Q β de acordo com o procedimento de Eoyang e August (17), com omissão do passo de hidroxilapatite.

Oligonucleotidos

Prepararam-se os fragmentos de ADN de cordão simples, utilizando química β -cianoetil-fosforamidite (18), num sintetizador Micro-1450A (Systec). Após desbloqueamento e libertação da resina, isolaram-se os oligonucleotidos por electroforeses preparatórias em gel (19), eluíram-se a partir do gel, filtraram-se através de nitrocelulose e purificaram-se por cromatografia (20) em cartuchos SEP-PAK C18 (Waters Associates).

Plasmido para a síntese de ARN MDV-1 (+) por Transcrição

O plasmido pT7-MDV contém um promotor para a ARN polimerase T7 dirigida contra a extensão total do cADN preparado a partir do ARN MDV-1 (13). Este plasmido tem sido construído pelo facto de a transcrição a partir do promotor T7 se iniciar com o primeiro nucleotido do ARN MDV-1 (+). In-

roduziu-se um sítio de restrição SmaI na outra extremidade da sequência de cADN MDV-1, de modo a que quando este plasmídeo se lineariza por digestão com a endonuclease SmaI e se incuba depois com a ARN polimerase T7, a transcrição termine dois nucleotídeos antes da extremidade do ARN MDV-1 (+). As transcrições resultantes, que se sabe terem partido de um dinucleotídeo 3'-terminal natural, CpA-OH, servem como matrizes excelentes para a replicação exponencial pela Q β replicase. Numa outra parte, publicar-se-á uma descrição completa da construção e a utilização deste plasmídeo (13).

Plasmídeo contendo uma região de poliligação com a sequência de cADN MDV-1

Substituiu-se o fragmento PpuM I-BstE II da sequência de cADN MDV-1 no ADN pT7-MDV pelo fragmento correspondente PpuM I-BstE II de um cADN MDV-1 modificado que continha uma única sequência de reconhecimentos Xba I em lugar da sequência única de reconhecimento Hinf I no cADN MDV-1 (21). Clonou-se depois um fragmento de ADN de síntese (preparado pela complementarização de dCTAGATCTCGAGGCCTG para dCTAGCAGGCCTCGAGAT) neste sítio Xba I convertendo-o numa região de poliligação possuindo sítios de restrição únicos para Xba I, Bgl II, Xho I e Stu I. Encontra-se o diagrama deste plasmídeo que se designou por poli-pT7-MDV, na figura 1. O ARN que se sintetizou a partir deste plasmídeo, designou-se por poli-MDV. Nos ARNs recombinantes podem originar-se, por inserção de qualquer sequência de ADN heteróloga no interior de um dos sítios de restrição únicos na região de poliligação do poli-pT7-MDV, e utilizando-se depois o plasmídeo resul-

tante como uma matriz para a transcrição pela ARN polimerase T7.

Plasmidos para a síntese de sondas recombinantes por Transcrição

Construiu-se o pT7-MDV-fal-un inserindo uma sequência sonda de síntese (preparada por complementarização de dTCGAGACTAACATAGGTCTTTAACTTGACTAACA para dTCGATGTTAGTCAAGTTAA-GACCTATGTTAGTC) num sítio Xho I da sequência de poliligação no poli-pT7-MDV. Construiu-se o pT7-MDV-fal-st inserindo a sequência sonda de síntese relacionada (preparada por complementarização de dTCGAGACTAACATAGGTCTAACTTGTTAGTCA para dTCGATGACTAACAAAGTTAAGACCTATGTTAGTC) no sítio de poli-pT7-MDV. Ambas as sequências sonda eram complementares do único motivo de sequências de 21 pares de bases que se repetiam mais de mil vezes no ADN do P. falciparum (14-16). A sequência específica aqui utilizada determinou-se por sequenciação do ADN repetitivo clonado que se isolou a partir da estirpe FCR-3/ /Gambia.

Análise da sequência de nucleotídeos

Determinou-se a sequência de nucleotídeos da região recombinante de cada plasmido, de acordo com o procedimento de terminação de cadeia (22), utilizando 5'-trifosfato de 7-desaza-desoxiguanosina (Boehringer Mannheim) em substituição do 5'-trifosfato de desoxiguanosina (23) e do 5'(α -tio) trifosfato de [³⁵S]-desoxicitidina (New England Nuclear) de acordo com a referência (24). Efectuaram-se as reacções de sequenciação no ADN plasmídico total (25) utilizando um precursor de 20 nucleotídeos (Pharmacia) que era complementar da se-

quência promotora T7 (26).

Transcrição

Isolaram-se os plasmídeos a partir das bactérias segundo o método de Holmes e Quigley (27) e purificou-se por cromatografia de filtração em gel (28) numa Sephacryl S-1000 (Pharmacia). Digeriu-se então o ADN plasmídico, com Sma I ou Stu I. Efectuou-se a transcrição de acordo com uma modificação do protocolo de Axelrod e Kramer (29): incubou-se 1 µg de ADN linearizado com 80 unidades de ARN polimerase T7, durante 3 horas a 37°C em 40 µl de ATP 400 µM, [α -³²P] CTP 400 µM, GTP 400 µM, UTP 400 µM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), MgCl 12 mM, ditiotreitól 5 mM (recentemente preparado), 100 ug/ml de albumina de soro de bovino, espermidina 4 mM e 1 unidade/µl do inibidor da ribonuclease, RNasin (Promega Biotec.). Incubaram-se as transcrições marcadas com [³²-P] com 0,1 µg/µl de de-soxi-ribonuclease I isenta de ribonuclease (30), para destruir a matriz de ADN e depois purificou-se por extracção com fenol/clorofórmio/álcool isoamilico, seguida de precipitação com etanol. Determinou-se a concentração de cada ARN a partir da sua radioactividade específica. Determinou-se a dimensão e a homogeneidade do ARN por electroforese através de placas de gel de poliacrilamida a 6% na presença de ureia 7 M (31). Visualizaram-se as bandas de ARN por coloração com prata (32).

Replicação

Incubaram-se cerca de $1,4 \times 10^{-18}$ g e $1,4 \times 10^{-10}$ g de transcritos (dependendo da reacção) com $2,4 \times 10^{-6}$ g de Q β replicase a 37°C em 25 µl de ATP 400 µM,

[α -³²P] CTP 400 μ M, GTP 400 μ M, UTP 400 μ M, MgCl₂ 14 mM e Tris-HCl 90 mM (pH 7,5). Efectuaram-se amostras de cada reacção de 5 em 5 minutos. Determinou-se a quantidade de ARN de cada amostra de 2 μ l, ligando o [³²P] ARN a discos de celulose DE81 (Whatman), conforme descrito por Maxwell e seus colaboradores (33) e medindo a radioactividade em cada disco com um contador de cintilações. Determinou-se a dimensão e a homogeneidade do ARN em amostras seleccionadas por electroforese em gel de poliacrilamida. Detectaram-se as bandas de [³²P] ARN por autorradiografia.

Hibridação

Utilizaram-se como alvos dois plasmidos diferentes. O primeiro, pPFR6, construiu-se por inserção de um fragmento de ADN contendo 45 cópias dispostas de um modo encadeado da sequência repetitiva de 21 pares de base do ADN do P. falciparum (estirpe FCR-3/Gambia) no interior do sítio BamHI do ADN de pUC13 (Boehringer Mannheim). Quinze das 45 sequências repetidas eram idênticas à sequência inserida nas sondas de ARN recombinante. As outras sequências repetidas, continham micro-heterogeneidades. O segundo plasmido pUC13, serviu como controlo negativo para a hibridação das sondas de ARN recombinante. Linearizou-se cada plasmido por digestão com BamH I, desnaturou-se por incubação em NaOH 0,4 N durante 60 segundos, a 42°C, e ligaram-se aliquotas de 0,5 μ g ou de 1,0 μ g a uma membrana de nitrocelulose BA83 (Schleicher e Schuell) de acordo com o procedimento de manchas ponteadas de Kafatos e seus colaboradores (34). Cortou-se a membrana em secções, contendo cada uma delas um par duplo de manchas

4.

ponteadas de pFR6 e pUC13. Hibridou-se previamente cada secção de membrana, durante 3 horas a 37°C em 5X SSPE [5X SSPE é NaCl 900 mM, fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4), e EDTA 5 mM], 2 mg/ml de dodecil-sulfato de sódio, 500 µg/ml de heparina (Sigma) e formamida a 20%. Depois incubou-se cada secção de membrana durante 4 horas a 25°C com cerca de 23 ng ou 150 ng de [³²P] ARN que se pretende ensaiar e 10 µg de veículo tARN E. coli não marcado (Boehringer Mannheim) dissolvido em 2 ml de tampão de pré-hibridação. Ensaíram-se os seguintes ARNs: poli-MDV, MDV-fal-un, MDV-fal-st e versões truncadas de cada um deles (transcritas a partir dos plasmidos clivados no sítio Stu I). Após hibridação, lavaram-se três vezes as membranas (15 minutos/lavagem) a 25°C com uma solução contendo 4X SSPE, 2 mg/ml de dodecil-sulfato de sódio e 400 µg/ml de heparina, seguida por duas lavagens de 10 minutos a 25°C em 1X SSPE e uma lavagem de 12 minutos a 37°C em 1X SSPE. Detectou-se o ARN hibridado por autorradiografia.

Replicação dos ARNs recombinantes após hibridação

Para se estudar a replicabilidade do ARN ligado, eluiu-se o ARN MDV-fal-un hibridado com manchas ponteadas, efectuando a fervura em 200 µl de água durante 60 segundos. Analisou-se a integridade do ARN eluido, em electroforese de gel de poliacrilamida. Determinou-se a replicabilidade do ARN eluido, iniciando uma reacção de Qβ replicase, com 0,1 µl de eluente. Seguiu-se esta reacção de modo cinético e determinou-se a identidade do ARN produzido por electroforese em gel de poliacrilamida. Para além disso, adicionaram-se directamente, manchas ponteadas hibridadas individual-

mente a reacções de Q β replicase, para se verificar se o ARN ligado podia servir como uma matriz. Estas reacções continham 100 μ g/ml de albumina de soro de bovino para excluir a possibilidade de que a Q β replicase se pudesse ligar à membrana de nitrocelulose.

Preparação de Reacções de Hibridação

Prepararam-se oito diferentes reacções de hibridação de 70 μ l contendo o seguinte número de moléculas de uma transcrição da região múltipla de HIV-1: $2,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^7$, $2,5 \times 10^6$, $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^3$, $2,5 \times 10^2$ e 0. Adicionou-se a cada uma das oito reacções 5×10^8 moléculas de um ARN recombinante (indicado na figura 2A) contendo uma sequência sonda que é complementar para uma secção conservada da região pol do mARN HIV-1 e hibridou-se com as moléculas alvo na presença de tiocinato de guanidina 2,5 M. Isolaram-se os híbridos sonda-alvo através de três ciclos de captura reversível de alvo em gotas magnéticas, conforme descrito na página 36 da proposta. Libertaram-se então as sondas de ARN recombinante a partir dos híbridos que se isolaram por incubação em 50 μ l de um tampão isento de sal a 37°C. Utilizaram-se 40 μ l de cada uma destas oito soluções para se iniciarem oito reacções de amplificação de 120 μ l de Q β replicase correspondentes. Estas reacções incubaram-se em paralelo. Retiraram-se amostras de 5 μ l de cada uma das oito reacções, em intervalos de 2 minutos, entre 6 e 28 minutos. A concentração de magnésio nestas reacções (7 mM) foi metade da habitualmente utilizada, devido ao facto de se ter recentemente descoberto que a baixas concentrações de magnésio a

proporção de replicação do ARN MDV-1 de contaminação era suprimida em comparação com a proporção de replicação do ARN recombinante. Analisou-se uma porção de ARN contido em cada uma das 96 amostras, por electroforese em gel de acrilamida e verificou-se que continha apenas a ARN recombinante, o que confirmou a utilidade de se utilizar uma concentração baixa de magnésio. Finalmente, uma porção de ARN contida em cada uma das 96 amostras, (correspondente a uma alíquota de 1 μ l de reacção de amplificação) precipitou-se em ácido fosfórico a 3,5% e ligou-se a uma membrana de nylon no formato de mancha pontuada numa posição 96.

Resultados Experimentais

Configuração das sondas replicáveis

Um dos objectivos da presente invenção, consistia em construir um ARN que servisse como uma sonda específica para o ADN do P. falciparum e como uma matriz para a amplificação exponencial pela $Q\beta$ replicase. Escolheu-se o ARN MDV-1 como a molécula parente, devido ao facto de os ARNs MDV-1 modificados poderem sintetizar-se por transcrição a partir de plasmidos recombinantes (13). O ARN MDV-1 contém muitas estruturas secundárias estáveis (35-37), e estas estruturas secundárias são necessárias para a replicação (38-40). O sítio escolhido para a inserção de sequências sonda no interior do ARN MDV-1 encontrava-se localizado no exterior da molécula (12), em que era menos provável que a inserção perturbasse a estrutura e, desse modo, interferisse provavelmente menos, com a replicação. Na selecção da sequência da sonda ter-se-á de ter em conta dois conceitos principais: 1) a se-

quência inserida tem que assumir uma conformação de cordão simples para se hibridar com as suas sequências alvo; 2) a sequência inserida tem de formar estruturas secundárias porque, caso contrário, o produto e matriz podem formar um complexo duplo letal durante a replicação (40). Devido ao facto destas duas preocupações imporem restrições contraditórias na configuração da sequência inserida, prepararam-se ARNs recombinantes contendo cada um deles uma sequência de sonda diferentes. O primeiro recombinante, o ARN MDV-fal-un, possuía provavelmente uma região sonda não estruturada, de acordo com uma análise computadorizada da sua sequência (41). O segundo recombinante, o ARN MDV-fal-st, diferia do ARN MDV-fal-un numa região de 5 nucleotidos. Como consequência formaria provavelmente, uma estrutura secundária mais estável na região que continha a sonda. A figura 2 representa a sequência nucleotídica e a estrutura secundária provável do ARN MDV-fal-un, ARN MDV-fal-st e ARN poli-MDV.

Replicação dos ARNs Recombinantes

Prepararam-se 4 ARNs diferentes através da transcrição in vitro: MDV-1, poli-MDV, MDV-fal-un e MDV-fal-st. A análise electroforética destas transcrições, conforme se ilustra na figura 3 (A), demonstrou que os recombinantes que continham sequências sonda podiam distinguir-se facilmente a partir das outras transcrições pela sua mobilidade relativa. Isolaram-se depois as transcrições a partir da mistura reaccional e utilizaram-se como matrizes para a síntese de ARN adicional através de Q β replicase. A análise cinética da quantidade de ARN sintetizado nas reacções de Q β replicase,

conforme se indica na figura 3 (B), demonstraram que quer os ARNs recombinantes estruturados quer os não estruturados eram excelentes matrizes para a replicação exponencial. Para além disso, conforme se indica na Figura 3 (C), a análise electroforética do ARN sintetizado em cada reacção de Q β replicase indicou que os produtos eram réplicas homogéneas das transcrições originais.

Para se comparar a proporção de replicação do ARN recombinante com a proporção de replicação do ARN MDV-1, iniciaram-se reacções de Q β replicase com misturas de ARN MDV-fal-st (+) e ARN MDV-1 (+). Incubaram-se as reacções durante 20 minutos, permitindo a síntese de, aproximadamente, dez milhões de cópias de cada ARN. Analisaram-se os ARNs produzidos pelas reacções, por electroforese em gel de poliacrilamida. Indicam-se no Quadro 1 os resultados, que indicam que, apesar do ARN recombinante ser 55 nucleotidos mais extenso do que o ARN MDV-1 a partir do qual é derivado, este se encontra amplificado essencialmente na mesma proporção pela Q β replicase.

4.

QUADRO 1. Replicação de Misturas de ARN MDV-1 e de ARN Recombinante

ARN INICIAL (fg)		ARN PRODUZIDO (ng)	
MDV-1	MDV-fal-st	MDV-1	MDV-fal-st
1	1	42	54
10	1	115	13
1	10	17	149

Amplificação Exponencial após Diluições em Série

Devido à sensibilidade dos ensaios biológicos que empregam sondas replicáveis, depender de quantas moléculas recombinantes podem servir como matrizes para a síntese de uma quantidade facilmente detectável de ARN produzido, iniciou-se uma série de reacções de $Q\beta$ replicase, com quantidades decrescentes de ARN MDV-fal-un. Os resultados desta série de reacções indicam-se na Figura 4 e demonstram que uma reacção iniciada com cerca de 1000 moléculas de ARN recombinante (0,14 fg), produziu 129 nanogramas de ARN recombinante, após 30 minutos de síntese, o que corresponde a uma amplificação de um bilião de vezes. Obtiveram-se resultados cinéticos virtualmente idênticos numa série de reacções paralelas iniciadas com ARN MDV-fal-st, o que indica que a falta rela-

tiva de uma estrutura secundária na região da sonda do ARN MDV-fal-un não tem o efeito discernível na replicação.

A análise electroforética demonstrou que o produto da reacção para a qual não se tinha adicionado matriz exógena, era o ARN MDV-1. Esta análise encontra-se ilustrada na Figura 4. Isto era esperado, devido ao método que se havia utilizado para isolar a Q β replicase (17) não eliminar todas as moléculas de ARN MDV-1 contaminantes (5). Com base no tempo desta reacção para se atingir a saturação (quando o número de moléculas de ARN iguala o número de moléculas de replicase activas) calculou-se que apenas 40 moléculas de ARN MDV-1 se encontravam inicialmente presentes. Estes factos foram confirmados pelos seguintes resultados: quando se iniciava a reacção com 100 moléculas de ARN MDV-fal-un, o produto, após 25 minutos, continha 30% de ARN MDV-1; e quando a reacção se iniciava apenas com 10 moléculas de ARN MDV-fal-un continha a maioria do ARN MDV-1. Uma vez que se havia utilizado Q β replicase isenta de todos os ARNs de contaminação (43), esperar-se-ia que apenas o ARN recombinante tivesse sido sintetizado.

Hibridação de ARNs recombinantes

Cada um dos ARNs recombinantes demonstrou ligar-se especificamente a plasmidos desnaturados contendo uma quantidade conhecida de sequências alvo P. falciparum (Figura 5). Nenhum ARN recombinante se ligou a plasmidos de controlo que careciam de sequências de P. falciparum. Para além disso, o ARN poli-MDV, que não contém uma sequência sonda, não se ligou a qualquer plasmido. Tomados em conjunto, estes resultados demonstram que os ARNs recombinantes se ligam es-

4.

pecificamente aos seus alvos e que, sob as condições de hibridação que se empregaram, a presença da estrutura na região de sonda tem um efeito mínimo na hibridação.

Numa outra experiência, prepararam-se versões truncadas de cada uma das sondas recombinantes por transcrição a partir dos plasmidos que se haviam linearizado por digestão com *Stu I*, em vez de *Sma I*. Estas transcrições tinham uma extensão de 111 nucleotidos e continham 63 nucleotidos a partir da extremidade 5' do ARN MDV-1 (+) e 48 nucleotidos a partir da região de inserção, incluindo a sequência total da sonda. Nas condições de hibridação que se empregaram, não se puderam observar quaisquer diferenças entre a hibridação dos ARNs truncados e a hibridação dos ARNs de extensão total. Este resultado demonstra que a topologia de restrição do território de MDV-1 (44) que rodeia a região de sonda na molécula de extensão total, tem um pequeno efeito na capacidade da sonda para se hibridar com o seu alvo.

Replicação de ARNs Recombinantes após Hibridação

Efectuaram-se experiências adicionais para determinar se os ARNs recombinantes hibridados mantinham a sua capacidade para servir como matrizes para a Q β replicase, após todas as manipulações que ocorrem durante a hibridação dos filtros. Eluiu-se o ARN MDV-fal-un que se tinha hibridado com plasmidos, contendo sequências de *P. falciparum*, a partir de manchas ponteadas, de acordo com um passo de aquecimento breve. A análise electroforética demonstrou que se tinham libertado moléculas recombinantes intactas. Ensaiou-se então uma porção de ARN eluído, para se observar se esta poderia

servir com uma matriz para a Q β replicase. Uma amplificação de dez milhões de vezes ocorreu em 20 minutos. A análise electroforética do produto desta reacção, demonstrou que se tratava de ARN MDV-fal-un puro. A partir dos resultados destas experiências, estimou-se que, pelo menos 10% do ARN eluído, mantinha a sua actividade biológica.

Realizou-se uma outra experiência para verificar se as sondas recombinantes podiam servir como templates para a Q β replicase enquanto ainda ligada às manchas ponteadas.

Incubaram-se directamente fragmentos de membranas contendo ARN MDV-fal-un hibridado com Q β replicase. As reacções que continham membranas com ARN hibridado com sequências alvo sintetizaram mais ARN recombinante do que as reacções contendo membranas que careciam de sequências alvo. Estes resultados preliminares, sugerem que pode não ser necessário um passo especial de libertação para se iniciar a replicação dos ARNs recombinantes hibridados.

Resultados das Reacções de Hibridação

Os resultados apresentam-se na Figura 7.

Discussão Experimental

Na maioria dos ensaios biológicos que utilizam sondas moleculares, a quantidade de sonda ligada é proporcional ao número de alvos. Os esquemas de amplificação tais como os que empregam grupos enzimáticos (45) ou reacções em cadeia de polimerase (46-48) possibilitam a detecção de um pequeno número de alvos. Contudo, a relação de afinidade entre a di-

mensão do sinal amplificado e o número de alvos continua a ser linear. As características únicas cinéticas das reacções de $Q\beta$ replicase permitirão a configuração dos ensaios biológicos, nos quais a dimensão do sinal amplificado é linearmente proporcional ao logaritmo do número de alvos. A Figura 6 representa dados a partir da experiência indicada na Figura 4, para ilustrar esta relação de afinidade: efectuou-se o diagrama do logaritmo do número de moléculas de ARN recombinante, inicialmente presentes em cada reacção, em função da quantidade de ARN sintetizado em 25 minutos (tempo durante o qual cada reacção completou a fase exponencial de síntese). Pode considerar-se a quantidade de ARN recombinantes inicialmente adicionado a estas reacções como representado a quantidade de sonda que se teria ligado aos alvos no ensaio actual e a quantidade de ARN amplificado durante um estímulo de 25 minutos cujo sinal se teria detectado. Os resultados indicam que a dimensão do sinal amplificado, estaria na ordem dos cem nanogramas, se o número de alvos fosse tão pequeno quanto cem ou tão grande quanto um bilião. Assim, os ensaios biológicos que empregam a amplificação pela $Q\beta$ replicase seriam capazes de detectar alvos num intervalo de, pelo menos, seis ordens de grandeza.

Teoricamente, os ensaios que utilizam $Q\beta$ replicase seriam extremamente sensíveis devido ao facto de estas reacções poderem iniciar com apenas uma molécula de ARN matriz (10). Na prática, a sensibilidade dos ensaios limitar-se-á ao nível de persistência de sondas não especificamente ligadas. Nas experiências anteriormente descritas, verificou-

-se que seiscentas mil moléculas de ARN MDV-fal-un se haviam ligado não especificamente a manchas ponteadas de nitrocelulose que continham 1,5 µg de ADN pUC13. Parece que será necessária uma técnica de hibridação diferente para verificar os limites de sensibilidade dos ensaios que empregam sondas replicáveis. Existem vários métodos promissores que poderiam resultar num nível marcadamente reduzido, incluindo aqueles em que a hibridação ocorre em solução (49-51) e aqueles que empregam técnicas de hibridação "intercaladas" ("sandwich") (52,53). Combinando uma técnica de redução efectiva de fundo com a enorme amplificação inerente à utilização de sondas replicáveis será possível desenvolver ensaios que possam detectar algumas centenas de moléculas alvo. Isto permitiria a detecção de moléculas de ADN ou ARN relativamente raras numa amostra de investigação e a detecção de, pelo menos, um agente infeccioso simples numa amostra clínica.

Construíram-se recentemente ARNs recombinantes replicáveis contendo uma diversidade de sequências inseridas. Isto leva-nos a crer que, pela escolha adequada das inserções, podem preparar-se sondas de ARN recombinante capazes de detectar o ácido nucleico de qualquer vírus, bactéria ou parasita eucariótico.

Os ARNs recombinantes amplificados contêm uma sequência (a sonda) que identifica qual foi o alvo detectado. Contudo, será possível conceber ensaios de diagnóstico que utilizam uma mistura de ARN recombinantes, contendo cada um deles uma sequência sonda específica para o genoma de um agente infeccioso diferente. Após a amplificação com $\phi\beta$ replicase,

a população de ARN conteria réplicas apenas daquelas sondas que se tinham ligado aos seus alvos. A hibridação subsequente destes ARNs amplificados com uma membrana, contendo manchas ponteadas de ADN dispostas ordenadamente, complementares de cada uma das sondas permitiria a identificação simultânea de diversos organismos diferentes na mesma amostra.

A densidade de cada ponto da Figura 7 indica a quantidade de ARN que se encontra em cada momento. Embora não se tenha observado ARN durante os momentos iniciais de cada reacção, este é o período no qual a população de ARN aumenta exponencialmente. O ARN torna-se visível aproximadamente ao mesmo tempo que o número de moléculas de ARN iguala o número de moléculas de replicase activa ("ponto de saturação").

Por consequência, a quantidade de ARN nos pontos de tempos visíveis, aumenta linearmente. Os resultados indicam que o momento, no qual o ponto de saturação ocorre em cada reacção de amplificação, é uma função do número de moléculas alvo que se encontrava originalmente presentes na reacção de hibridação correspondente. Quanto menos moléculas alvo se encontravam presentes, menor era o número de sondas que se ligaram aos alvos e, assim, menor foi o número de sondas que se encontravam disponíveis para iniciarem a reacção de amplificação. Este resultado demonstra que se poderia desenvolver um ensaio automatizado, no qual o dispositivo de detecção (baseado talvez na fluorescência de um ligante ARN, tal como o brometo de etídio) se poderia utilizar para determinar o tempo de saturação. O número de sondas originalmente presentes na reacção de amplificação (o qual seria proporcional ao número de alvos na amostra) podia então calcular-se a partir

do tempo que esta levasse a atingir a saturação. Os resultados indicam também uma via alternativa para determinar o número de alvos presentes na amostra. A quantidade de ARN presente num momento particular de tempo, após todas as reacções de saturação terem sido atingidas (por exemplo, aos 24 minutos), é linearmente proporcional ao logaritmo do número de sondas originalmente presente em cada reacção de amplificação (ver também figura 6).

Finalmente, os resultados deste ensaio aperfeiçoado indicam que o limite corrente de sensibilidade se encontra entre 2500 e 25000 moléculas de alvo. As reacções iniciadas com sondas libertadas a partir de reacções de hibridação que continham um pequeno número de alvos proporcionaram resultados virtualmente indistinguíveis. Uma vez que o ARN que se obteve a partir destas reacções era ARN recombinante, o ARN libertado deve consistir na sua maior parte, de sondas não especificamente hibridadas que não foram removidas durante o procedimento de isolamento de híbridos.



Referências

1. Gillespie, D. e Spiegelman, S. J. Mol. Biol. 12, 1965, 829 - 842.
2. Chu, B.C.F., Kramer, F.R. e Orgel, L.E. Nucleic Acids Res. 14, 1986, 5591 - 5603.
3. Haruna, I. e Spiegelman, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1965, 579 - 587.
4. Haruna, I. e Spiegelman, S. Science 150, 1965, 884 - 886.
5. Kramer, F.R., Mills, D.R., Cole, P.E., Nishihara, T. e Spiegelman S. J. Mol. Biol. 89, 1974, 719 - 736.
6. Weissmann, C., Felix, G. e Slor, H. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 1968, 83 - 100.
7. Spiegelman, S., Pace, N.F., Mills, D.R., Levisohn, R., Eikhom, T.S., Taylor, M.M., Peterson, R.L. e Bishop, D.H.L. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 1968, 101 - 124.
8. Dobkin, C., Mills, D.R., Kramer, F.R. e Spiegelman, S. Biochemistry 18, 1979, 2038 - 2044.
9. Haruna, I. e Spiegelman, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1965, 1189 - 1193.
10. Levisohn, R. e Spiegelman, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1969, 866 - 872.

11. Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R. e Spiegelman, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1972, 3038 - 3042.
12. Miele, E.A., Mills, D.R. e Kramer, F.R. J. Mol. Biol. 171, 1983, 281 - 295.
13. Mills, D.R., Axelrod, V.D., Tussie-Luna, I., Lizardi, P.M. e Kramer, F.R. manuscrito em preparação, 1988.
14. Franzen, L., Westin, G., Shabo, R., Aslund, L., Perlmann, H., Persson, T., Wigzell, H. e Pettersson, U. Lancet 1, 1984, 525 - 528.
15. Aslund, L., Franzen, L., Westin, G., Persson, T., Wigzell, H. e Pettersson, U. J. Mol. Biol. 185, 1985, 509 - 516.
16. Zolig, J.W., Andrade, L.E. e Scott, E.D. Mol. Biochem. Parasitol. 22, 1987, 145 - 151.
17. Eoyang, L. e August, J.T. in Cantoni, G.L. e Davis, D.R. (eds) Procedures in Nucleic Acid Research, Harper e Row, New York, 1971, Vol.2, pp. 829 - 839.
18. Gait, M.J. Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984.
19. Matthes, H.W.D., Zenke, W.M. Grundstrom, T., Staub, A., Wintzerith, M. e Chambon, P. EMBO J. 3, 1984, 801 - 805.

20. Lo, K-M., Jones, S.S., Hackett, N.R. e Khorana, H.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, 2285 - 2289.
21. Bausch, J.N. Kramer, F.R., Miele, E. A., Dobkin, C. e Mills, D.R. J. Biol. Chem. 258, 1983, 1978 - 1984.
22. Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1977, 5463 - 5467.
23. Mizusawa, S., Nishimura, S. e Seela, F. Nucleic Acids Res. 14, 1986, 1319 - 1324.
24. Biggin, M.D., Gibson, T.J. e Hong, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1983, 3963 - 3965.
25. Wallace, R.B., Johnson, M.J. Suggs, S.V., Miyoshi, K., Bhatt, R, e Itakura, K. Gene 16, 1981, 21 - 26.
26. Osterman, H.L. e Coleman, J.E. Biochemistry 20, 1981, 4885 - 4892.
27. Holmes, D.S. e Quigley, M. Anal Biochem. 114, 1981, 193 - 197.
28. Bywater, M., Bywater, R. e Hellman, L. Anal. Biochem 132, 1983, 219 - 224.
29. Axelrod, V.D. e Kramer, F.R. Biochemistry 24, 1985, 5716 - 5723.
30. Tullis, R.H. e Rubin, H. Anal. Biochem. 107, 1980, 260 - 264.

31. Maniatis, T., Jeffrey, A. e van deSande, H.
Biochemistry 14, 1975, 3787 - 3794.
32. Sammons, D.W., Adams, L.D. e Nishizawa, E.E.
Electrophoresis 2, 1981, 135 - 141.
33. Maxwell, I.H., Van Ness, J. e Hahn, W.E. Nucleic
Acids Res. 5, 1978, 2003 - 2038.
34. Kafatos, F.C. Jones, C.W. e Efstratiadis, A.,
Nucleic Acids Res. 7, 1979, 1541 - 1552.
35. Klotz, G., Kramer, F.R., e Kleinschmidt, A.K.
Electron Microscopy 2, 1980, 530 - 531.
36. Mills, D.R., Kramer, F.R., Dobkin, C., Nishihara,
T. e Cole, P.E. Biochemistry 19, 1980, 228 - 236.
37. Kramer, F.R. e Mills, D.R. Nucleic Acids Res. 19,
1981, 5109 - 5124.
38. Mills, D.R., Dobkin, C. e Kramer, F.R. Cell 15,
1978, 541 - 550.
39. Nishihara, T., Mills, D.R. e Kramer, F.R. J. Bio-
chem. 93, 1983, 669 - 674.
40. Priano, C., Kramer, F.R. e Mills, D.R. Cold. Spring
Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 1987, 321 - 330.
41. Zuker, M. e Stiegler, P. Nucleic Acids Res. 9,
1981, 133 - 148.

42. Mills, D.R., Kramer, F.R. e Spiegelman, S. Science 180, 1973, 916 - 927.
43. Hill, D. e Blumenthal, T. Nature 301, 1983, 350 - 352.
44. Biebricher, C.K., Diekmann, S. e Luce, R. J. Mol. Biol. 154, 1982, 629 - 648.
45. Leary, J.J., Brigati, D.J. e Ward, D.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1983, 4045 - 4049.
46. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. e Arnheim, N. Science 230, 1985, 1350 - 1354.
47. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. e Erlich, H.A. Science 239, 1988, 487 - 491.
48. Erlich, H.A., Gelfand, D.H. e Saiki, R.K. Nature 331, 1988, 461 - 462.
49. Kohne, D.E., Levison, S.A. e Byers, M.J. Biochemistry 16, 1977, 5329 - 5341.
50. Pellegrino, M.G., Lewin, M., Meyer, III, W.A., Lanciotti, R.S., Bhaduri-Hauck, L., Volsky, D.J., Sakai, K., Folks, T.M. e Gillespie, D., BioTechniques 5, 1987, 452 - 459.
51. Urdea, M.S., Running, J.A. Horn, T., Clyne, J., Ku, L. e Warner, B. D. Gene 61, 1987, 253 - 264.

52. Palva, A. e Ranki, M. Clin. Lab. Med. 5, 1985, 475 - 490.
53. Syvanen, A.-C., Laaksonen, M. e Soderlund, H. Nucleic Acids Res. 14, 1986, 5037 - 5048.
54. Kutateladze, T.V., Axelrod, V.D. Gorbulve, V.G., Belzhelarskaya, S.N. e Vartikyan, R.M. Anal. Biochem. 100, 1979, 129 - 135.
55. Matthews, J.A., Batki, A., Hynds, C. e Kricka, L.J. Anal. Biochem. 151, 1985, 205 - 209.
56. Forster, A.C., Melnnes, J.L. Skingle, D.C. Symons, R.H., Nucleic Acids Res. 13(3), 1985, 745 - 761.
57. Cosstick, R., McLaughlin, L.W. e Eckstein, F. Nucleic Acids Res. 12, 1984, 1791 - 1810.
58. Dahlberg, A.E., Dingman, C.W. e Peacock, A.C., J. Mol. Biol. 41, 1969, 139 - 147.
59. Dingman, C.W. e Peacock, A.C., Biochemistry, 7, 1968, 2038 - 2044.
60. Igloi, G.L. Anal. Biochem. 134, 1983, 184 - 188.
61. Sharop, P.A., Sugden, B. e Sambrook, J. Biochemistry 12, 1973, 3055 - 3063.
62. Bailey, J.M. e Davidson, N. Anal. Biochem. 70, 1976, 75 - 85.
63. Oi, V.T., Glazer, A.N. e Stryer, L. J. Cell. Biol. 93, 1982, 981 - 986.



REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para a determinação da presença ou concentração de um oligo- ou polinucleotido de interesse numa amostra, caracterizado pelo facto:

a) de se formar um complexo específico entre a molécula sonda de RNA recombinante constituída por:

i) uma sequência de identificação para a ligação de um RNA/RNA polimerase dirigida;

ii) uma sequência necessária para a iniciação da síntese do cordão pela polimerase; e

iii) uma sequência de RNA heteróloga inserida num sítio específico na região interna da molécula recombinante e complementar a um oligo- ou polinucleotido de interesse, e o oligo- ou polinucleotido de interesse, incubando a amostra

com as moléculas sonda de RNA recombinante sob condições adequadas e durante um intervalo de tempo suficiente para permitir hibridar sequências de nucleotídeos complementares;

b) de se remover moléculas sonda de RNA recombinante não hibridadas da mistura reaccional;

c) de se incubar a mistura reaccional com uma RNA/RNA polimerase dirigida susceptível de sintetizar cópias adicionais das moléculas sonda de RNA recombinante que são hibridadas nos oligo- ou polinucleotídeos de interesse; e

d) de se detectar as moléculas sonda de RNA recombinante sintetizadas no passo c), determinando, assim, a presença ou concentração do oligo- ou polinucleotídeo de interesse.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o oligo- ou polinucleotídeo na amostra estar ligado a um suporte sólido.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o suporte sólido ser uma nitrocelulose ou membrana de "nylon".

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de no passo a) o oligo- ou polinucleotídeo de interesse e a molécula sonda de RNA recombinante estarem em solução.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado

pelo facto de no passo b) se separar as moléculas sonda de RNA recombinante hibridadas das moléculas sonda não hibridadas pela retenção do oligo- ou polinucleotido num suporte sólido.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se efectuar a detecção por incorporação de precursores de ribonucleosido 5'-trifosfato marcados radioactivamente nos produtos de RNA recombinante.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se efectuar a detecção por incorporação de precursores de ribonucleosido 5'-trifosfato quimicamente modificado nos produtos de RNA recombinante.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de os precursores de ribonucleosido 5'-trifosfato quimicamente modificado serem biotinilados.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de os precursores de ribonucleosido 5'-trifosfato quimicamente modificado serem fluorescentes.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de se efectuar a detecção pela ligação de corantes fluorogénicos ou cromogénicos específicos de RNA aos produtos de



RNA recombinante.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se efectuar a detecção por métodos físicos.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de no passo c) a RNA/RNA polimerase dirigida ser $C\beta$ replicase.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o tempo de incubação no passo c) ser suficientemente curto para que o número de cordões de RNA recombinante não exceda o número de moléculas de polimerase, pelo que o número de moléculas de RNA recombinante é linearmente proporcional ao número de moléculas sonda de RNA recombinante originalmente hibridadas.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o tempo de incubação no passo c) ser suficientemente longo para que o número de cordões de RNA recombinante exceda o número de moléculas de polimerase, do que resulta o número de moléculas de RNA recombinante ser proporcional ao logaritmo do número de moléculas sonda de RNA recombinante originalmente hibridadas.

15.- Processo para a determinação simultânea da presença ou concentração de vários oligo- ou polinucleotidos diferentes de

interesse numa amostra, caracterizado pelo facto:

a) de se formar complexos específicos entre uma mistura de tipos diferentes de moléculas sonda de RNA recombinante, tal como definidas na reivindicação 1, possuindo cada tipo uma sequência inserida diferente, e os oligo- ou polinucleotidos de interesse, por incubação da amostra com a mistura de moléculas sonda de RNA recombinante sob condições adequadas e durante um intervalo de tempo suficiente para permitir hibridar sequências de nucleotidos complementares;

b) de se remover moléculas sonda de RNA recombinante não hibridadas da mistura reaccional;

c) de se incubar a mistura reaccional com uma RNA/RNA polimerase dirigida susceptível de sintetizar cópias adicionais das moléculas sonda de RNA recombinante que são hibridadas nos oligo- ou polinucleotidos de interesse;

d) de se separar a mistura de RNAs recombinantes sintetizados hibridando-os numa sequência ordenada de polinucleotidos ligados a uma membrana, onde cada polinucleotido é complementar de um tipo de RNA recombinado sintetizado; e

e) de se detectar as moléculas sonda de RNA recombinante produzidas no passo d), determinando, assim a presença ou concentração de cada oligo- ou polinucleotido de interesse.

16.- Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante

4

a sequência de identificação para a ligação de uma RNA/RNA polimerase dirigida estar numa região interna da molécula.

17.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante o sítio de inserção não estar perto de qualquer sequência necessária para a ligação da RNA polimerase ou para a iniciação da síntese dos cordões.

18.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante a inserção ter um efeito mínimo na replicabilidade da molécula.

19.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de, na molécula sonda de RNA recombinante a inserção ter um efeito mínimo sobre a estrutura secundária e terciária da molécula.

20.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante a sequência necessária para a iniciação da síntese de cordões ser uma sequência 3'-terminal rica em citidina.

21.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante

4.

a RNA/RNA polimerase dirigida ser $\Omega\beta$ replicase.

22.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante o sítio de inserção específico ser num nucleotido específico.

23.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de a molécula sonda de RNA recombinante ser um suporte de RNA variante para $\Omega\beta$ replicase ou um seu mutante.

24.- Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de o suporte de RNA variante ser MDV-1 RNA ou um seu mutante.

25.- Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de o MDV-1 RNA ser MDV-1 (+) RNA.

26.- Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de o MDV-1 RNA ser MDV-1 (-) RNA.

27.- Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo facto de na molécula sonda se RNA recombinante a sequência heteróloga de interesse estar inserida entre os nucleotidos 63 e 64.

28.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de a molécula sonda de RNA recombinante ser um transcrito derivado de um plasmídeo recombinante por incubação com um RNA/RNA polimerase dirigido.

29.- Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo facto de a molécula sonda de RNA recombinante ser um suporte de RNA variante para Q β replicase ou um seu mutante.

30.- Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de a molécula sonda de RNA recombinante ser MDV-1 RNA ou um seu mutante.

31.- Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de o MDV-1 RNA ser MDV-1(+) RNA.

32.- Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de o MDV-1 RNA ser MDV-1(-) RNA.

33.- Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante a sequência heteróloga ser inserida entre os nucleotídeos 63 e 64.

34.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante

4.

a sequência heteróloga inserida ser complementar de uma sequência de ácido nucleico específico de um agente infeccioso.

35.- Processo de acordo com as reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante a sequência heteróloga inserida ser complementar de uma sequência de genes específicos ou a uma sua porção.

36.- Processo de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo facto de na molécula sonda de RNA recombinante a sequência de genes específicos ser um alelo ou uma sua porção,



RESUMO

"PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA
OU CONCENTRAÇÃO DE UM OLIGO- OU POLINU-
CLEOTIDO DE INTERESSE NUMA AMOSTRA"

A presente invenção refere-se a métodos para determinar a presença ou concentração de um oligo- ou polinucleotido de interesse numa amostra

- a) formando-se um complexo específico entre a molécula sonda de RNA recombinante,
- b) removendo-se moléculas sonda de RNA recombinante não hibridadas da mistura reaccional;
- c) incubando-se a mistura reaccional com uma RNA/RNA polimerase dirigida susceptível de sintetizar cópias adicionais das moléculas sonda de RNA recombinante que são hibridadas nos oligo- ou polinucleotidos de interesse; e
- d) detectando-se as moléculas sonda de RNA recombinante sintetizadas no passo c).

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

Lisboa, 20 de Abril de 1989

4.

1/11

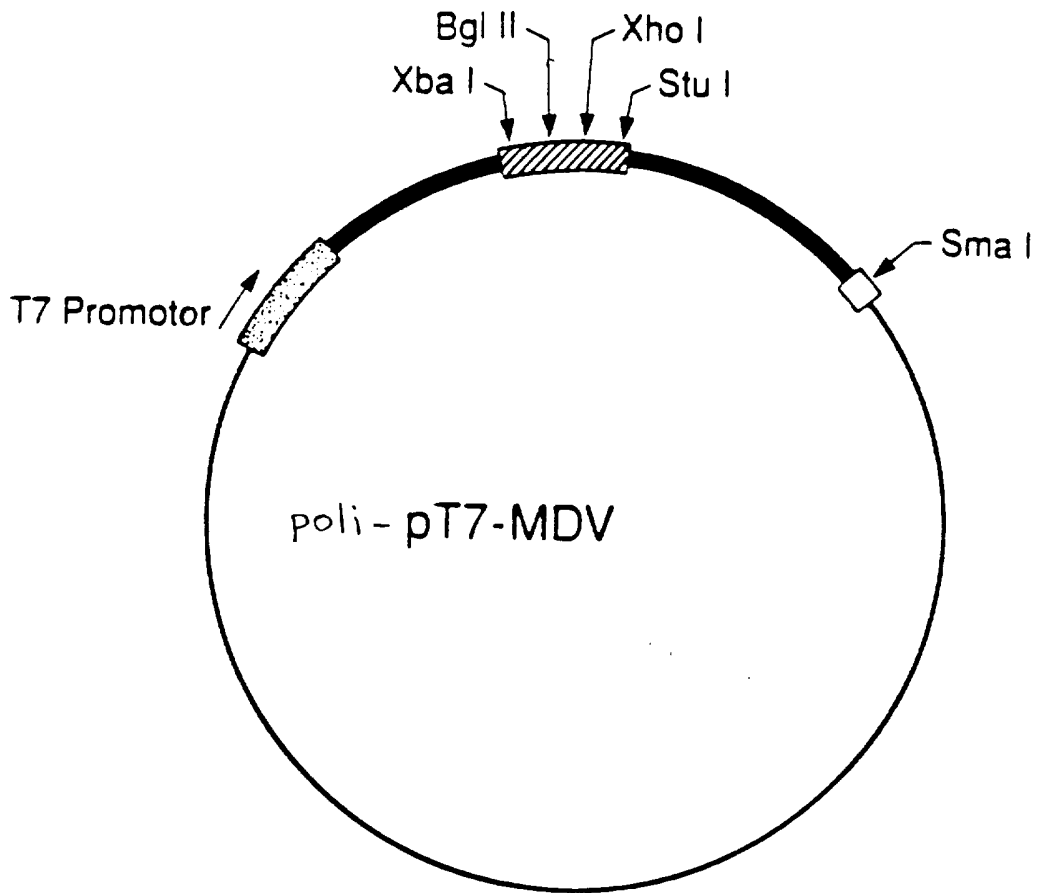


FIGURA 1

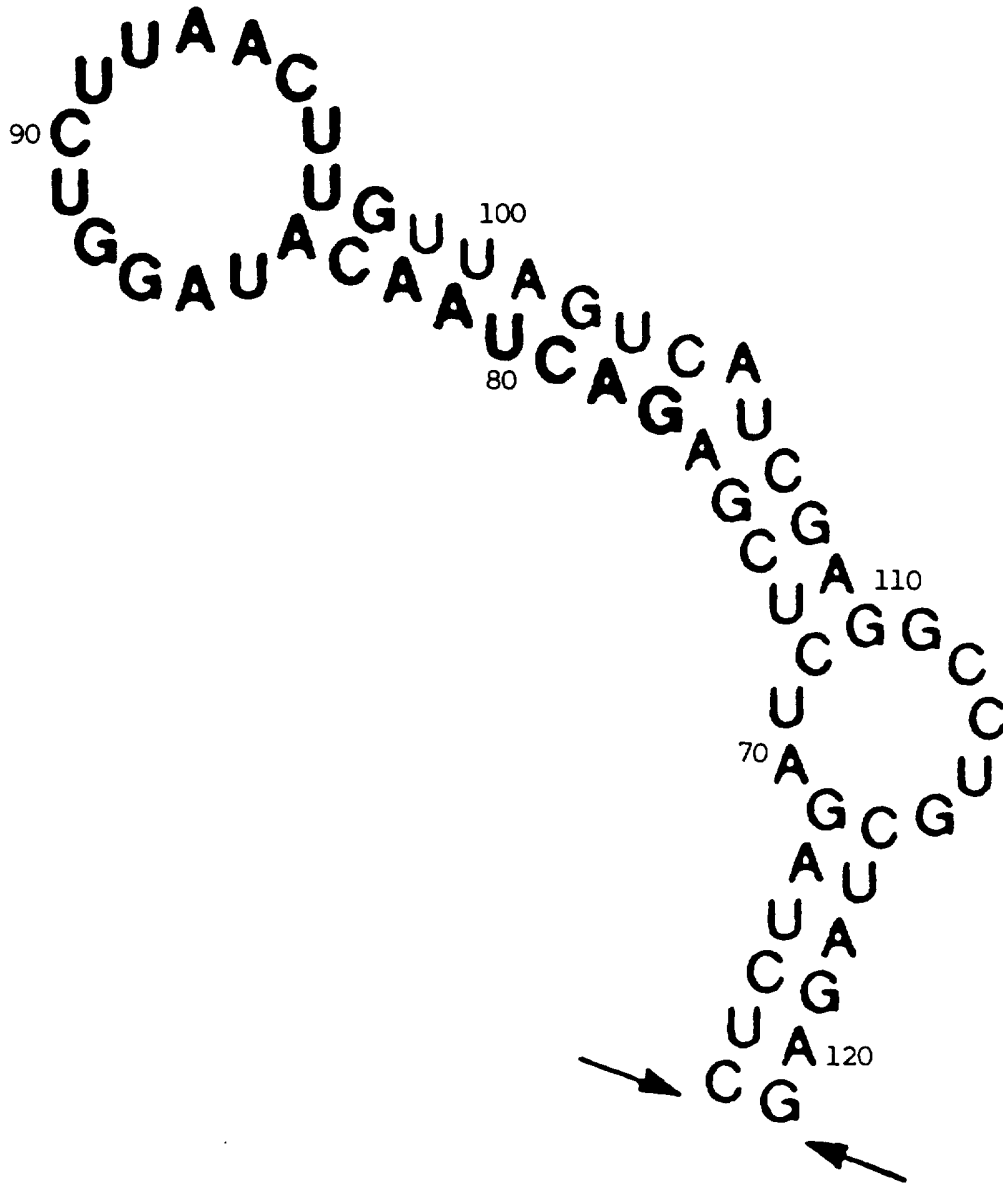


FIGURA 2(B)

4.

4/11

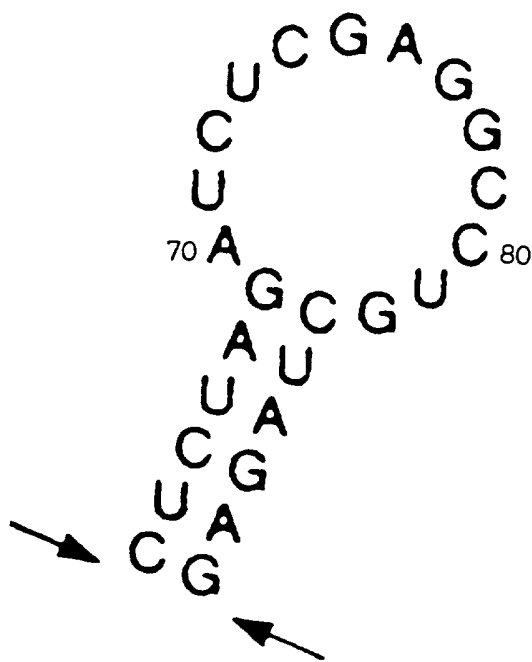


FIGURA 2(C)

4.

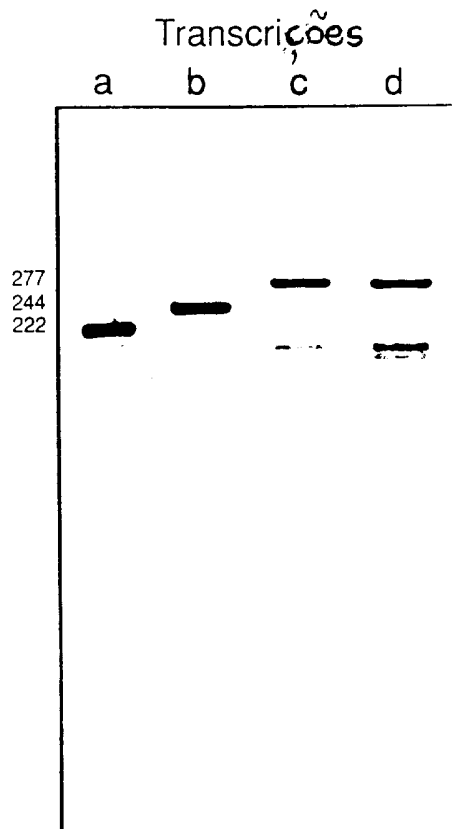


FIGURA 3(A)

978306

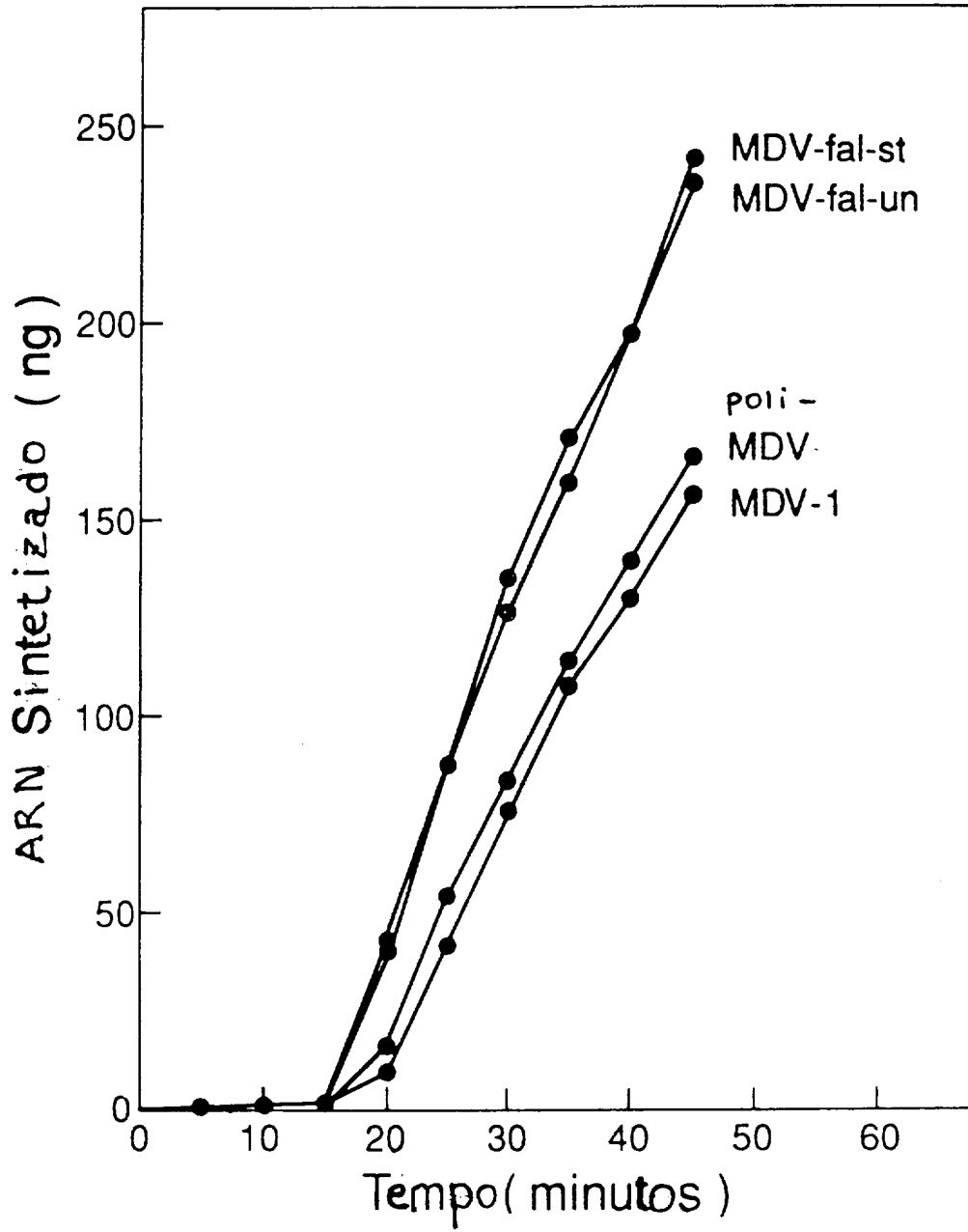


FIGURA 3(B)

90520

4.

7/11

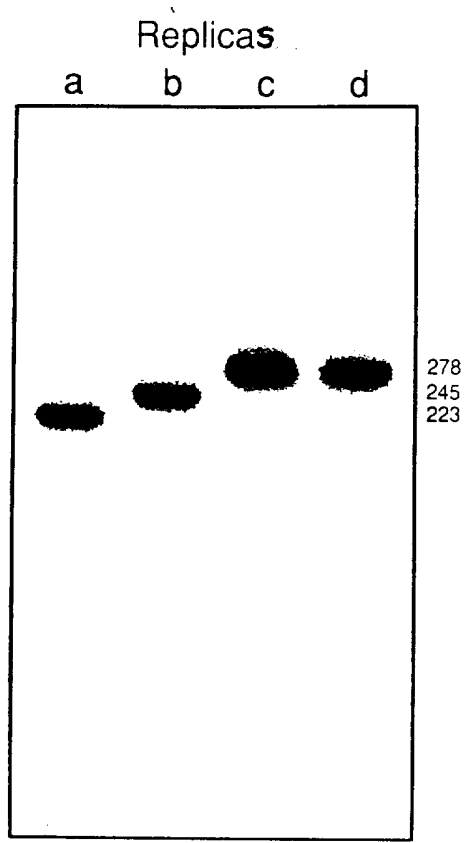


FIGURA 3(C)

4.

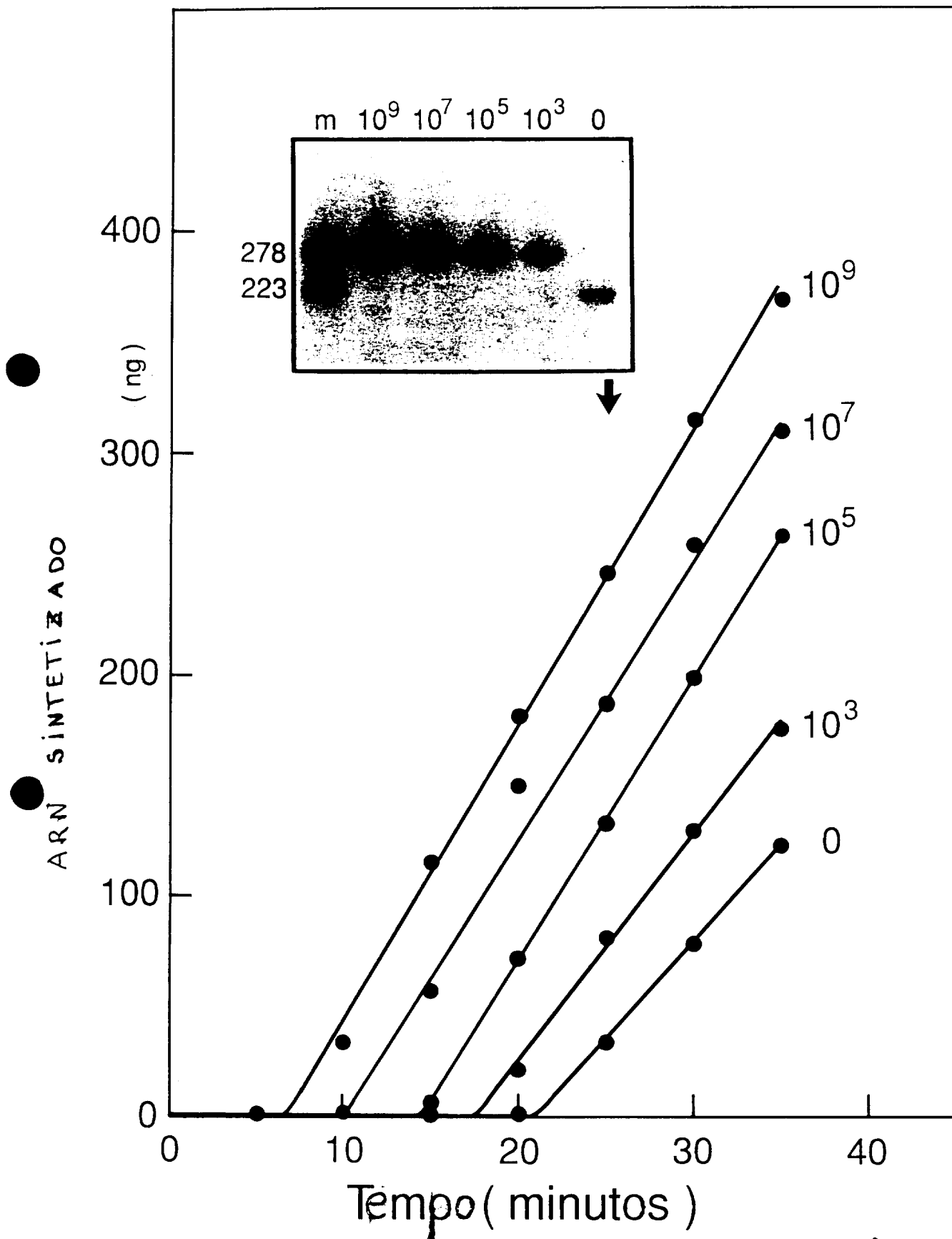


FIGURA 4

BAD ORIGINAL



90306

9/11

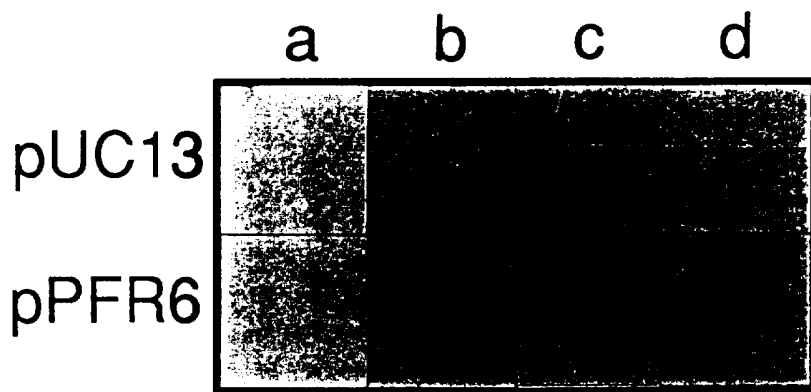


FIGURA 5

4.

10/11

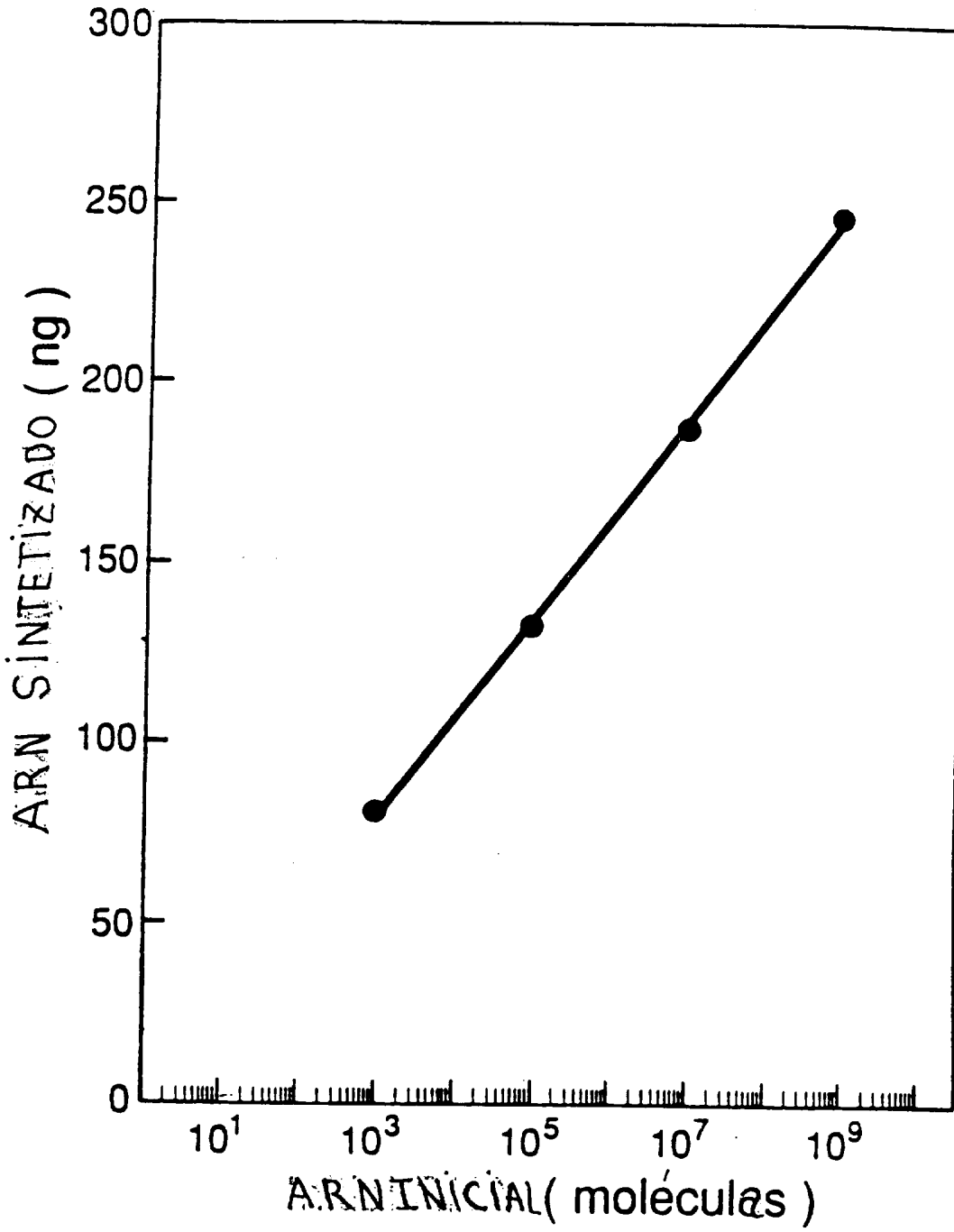


FIGURA 6

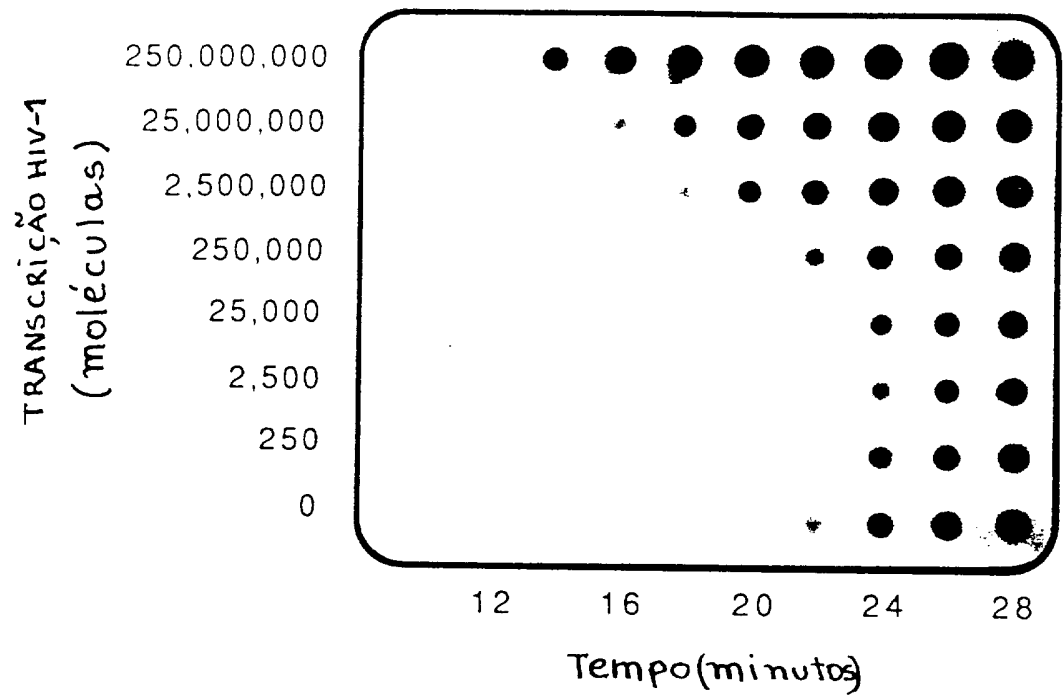


FIGURA 7