



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0616466-8 A2**

(22) Data de Depósito: 06/10/2006
(43) Data da Publicação: 21/06/2011
(RPI 2111)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68 2006.01
C12N 9/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO DE ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), MÉTODOS PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO, UM ALVO, UMA VARIANTE DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM ÁCIDO NUCLEÍCO METILADO E PARA DETECTAR PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO USANDO UMA CASCATA DE AMPLIAÇÃO, MÉTODOS PARA FABRICAR UMA PLURALIDADE DE ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), E USO DE PELO MENOS UM OLIGONUCLEOTÍDEO**

(30) Prioridade Unionista: 07/10/2005 US 60/724,567,
13/10/2005 US 60/726,291

(73) Titular(es): JOHNSON & JOHNSON RESEARCH PTY
LIMITED

(72) Inventor(es): ALISON VELYIAN TODD, DONALD JOHN
BIRKETT, ELISA MOKANY, TRAM BICH DOAN

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT AU2006001473 de 06/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/041774 de 19/04/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), MÉTODOS PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO, UM ALVO, UMA VARIANTE DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM ÁCIDO NUCLEÍCO METILADO E PARA DETECTAR PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO USANDO UMA CASCATA DE AMPLIAÇÃO, MÉTODOS PARA FABRICAR UMA PLURALIDADE DE ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), E USO DE PELO MENOS UM OLIGONUCLEOTÍDEO. A presente invenção refere-se a Enzimas de Ácido Nucleico Multicomponentes (MNAzimas) e métodos para seu uso. AS MNAzimas compreendem dois ou mais componentes oligonucleotídeos que se autocombinam na presença de uma ou mais moléculas facilitadoras de combinação de MNAzimas, para formar uma estrutura cataliticamente ativa. São fornecidos também métodos para usar MNAzimas na detecção, identificação e/ou quantificação de um ou mais alvos. Os métodos podem ser praticados em ensaios baseados em solução ou em ensaios nos quais um ou mais componentes da reação estão afixados a uma estrutura de suporte. Os métodos permitem multiplexar a detecção de MNAzimas para detectar múltiplos alvos em uma única reação. São fornecidos também kits para fabricar as composições, e para praticar os métodos aqui fornecidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÃO DE ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), MÉTODOS PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO, UM ALVO, UMA VARIANTE DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM ÁCIDO NUCLEÍCO METILADO E PARA DETECTAR PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO USANDO UMA CASCATA DE AMPLIAÇÃO, MÉTODOS PARA FABRICAR UMA PLURALIDADE DE ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), E USO DE PELO MENOS UM OLIGONUCLEOTÍDEO"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADA

Este pedido de patente reivindica o benefício dos pedidos de patente provisórios nos 60/726.291, depositado em 13 de outubro de 2005, e 60/724.567, depositado em 7 de outubro de 2005, respectivamente, que são aqui incorporados como referência em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a ácidos nucleicos multicomponentes catalíticos e métodos para seu uso. Mais particularmente, a invenção refere-se a composições que compreendem enzimas de ácidos nucleicos multicomponentes autocombinativos, métodos para fabricar tais composições, e métodos para usar tais composições, incluindo para detectar, identificar e/ou quantificar alvos tais como facilitadores de combinação e outras entidades para detectar uma modificação catalítica de substratos pelas ditas enzimas de ácidos nucleicos multicomponentes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Várias publicações, que podem incluir patentes, pedidos de patente publicados, artigos técnicos e artigos científicos, são citados neste relatório descritivo inteiro entre parênteses, e as citações completas de cada um deles podem ser encontradas no final deste relatório descritivo. Cada uma dessas publicações citadas é aqui incorporada como referência em sua totalidade.

As moléculas de ácidos nucleicos podem adotar configurações estruturais secundárias que podem conferir atividade enzimática ou catalítica. A tecnologia de evolução in vitro facilitou a descoberta e o desenvolvi-

mento desses ácidos nucleicos catalíticos, freqüentemente referidos como "DNAzimas" ou "ribozimas", que são capazes de catalisar uma ampla série de reações, incluindo a clivagem de ácidos nucleicos (Carmi *et al.*, 1996; Raillard e Joyce, 1996; Breaker, 1997; Santoro e Joyce, 1998), ligação de
 5 ácidos nucleicos (Cuenoud e Szostak, 1995), metalação da porfirina (Li e Sen, 1996), e a formação de ligações carbono-carbono (Tarasow *et al.*, 1997), ligações éster (Illangasekare *et al.*, 1995) ou ligações amida (Lohse e Szostak, 1996).

Particularmente, foram identificadas DNAzimas e ribozimas que
 10 clivam especificamente seqüências de ácidos nucleicos distintas depois da hibridização por intermédio do pareamento de bases de Watson Crick. As DNAzimas são capazes de clivar moléculas de RNA (Breaker e Joyce, 1994; Santoro e Joyce, 1997) ou DNA (Carmi *et al.*, 1996). As moléculas de RNA catalíticas (ribozimas) também são capazes de clivar seqüências de RNA
 15 (Haseloff e Gerlach, 1988) e DNA (Raillard e Joyce, 1996). A taxa de clivagem catalítica da maioria das enzimas de ácidos nucleicos é dependente da presença e da concentração de ions de metais bivalentes tais como Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , e Pb^{2+} (Santoro e Joyce, 1998; Brown *et al.*, 2003).

20 Os ácidos nucleicos catalíticos, tais como a ribozima Hammerhead e as DNAzimas 10:23 e 8:17, têm múltiplos domínios. Eles têm um domínio catalítico conservado (núcleo catalítico) flanqueado por dois domínios de ligação do substrato, não-conservados ("braços hibridizantes"), que são regiões de seqüência que se ligam especificamente ao substrato. Hase-
 25 loff e Gerlach prepararam por engenharia genética a ribozima Hammerhead, que foi assim denominada devido à estrutura *em* forma de alça ("stern-loop") que traz os dois domínios conservados juntos, que formam o núcleo catalítico (Haseloff e Gerlach, 1988). As DNAzimas "10:23" e "8:17" são capazes de clivar substratos de ácidos nucleicos em ligações fosfodiéster específicas
 30 do RNA (Santoro e Joyce, 1997). A DNAzima 10:23 tem um domínio catalítico de 15 desoxinucleotídeos, flanqueado por dois braços de reconhecimento de substrato. A DNAzima 8:17 tem um domínio catalítico de 14 desoxinucle-

otídeos, que também é flanqueado por dois braços de reconhecimento de substrato.

Um ácido nucléico catalítico pode clivar um substrato de ácido nucléico com uma seqüência-alvo que atende aos requisitos mínimos. A seqüência do substrato deve ser substancialmente complementar aos braços hibridizantes do ácido nucléico catalítico, e o substrato deve conter uma seqüência específica no sítio de clivagem. Os requisitos específicos da seqüência no sítio de clivagem incluem, por exemplo, uma seqüência de ribonucleotídeo purina:pirimidina para clivagem pela DNAzima 10:23 DNAzima (Santoro e Joyce, 1997), e a seqüência uridina:X para as ribozimas Hammerhead (Perriman *et al.*, 1992), onde X pode ser A, C, ou U, mas não G.

Os ácidos nucléicos catalíticos demonstraram tolerar apenas certas modificações na área que forma o núcleo catalítico (Perreault *et al.*, 1990; Perreault *et al.*, 1991; Zaborowska *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2004; Silverman, 2004)). Os exemplos de seqüências responsáveis pela atividade catalítica de DNAzimas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Seqüências Exemplificativas para Algumas DNAzimas Ativas e seus Substratos

Tipo de DNAzima	Seqüência da DNAzima	Seqüência do Substrato
8:17	(N) _x TNNNAGCNNNWCGK(N) _x	(N') _x (rN) _x G (N') _x
10:23	(N) _x GGMTMGHNDNNNMGD(N) _x	(N') _x rR rY (N') _x
N = A, C, T, G ou qualquer análogo; N' = qualquer nucleotídeo complementar a N; (N) _x or (N') _x = qualquer número de nucleotídeos; W = A ou T; K = A, G ou AA; rN = qualquer base de ribonucleotídeo; (rN) _x = qualquer número de ribonucleotídeos; rR = A ou G; rY = C ou U; M = A ou C; H = A, C ou T; D = G, A ou T		

A substituição de certos ribonucleotídeos por certos desoxirribonucleotídeos em ribozimas conhecidas foi tentada sob certas condições (McCall *et al.*, 1992). As ribozimas que foram convertidas inteiramente em DNA não têm atividade em virtude das diferenças de conformação de RNA e

DNA (Perreault *et al.*, 1990). Estes estudos demonstram que as enzimas de RNA não podem ser modificadas para dar enzimas de DNA funcionais meramente substituindo ribonucleotídeos por desoxirribonucleotídeos.

Foram realizados alguns estudos que tentaram desenvolver certas ribozimas homodiméricas e heterodiméricas para aplicações terapêuticas (Kuwabara *et al.*, 1999; Kuwabara *et al.*, 2000; Oshima *et al.*, 2003). Nesses estudos, o núcleo catalítico da ribozima compreendia unicamente ribonucleotídeos. Além disso, a capacidade para as DNAzimas funcionarem em formatos diméricos ou mutiméricos não foi considerada, nem foi fornecida qualquer informação sobre como extrapolar de uma ribozima dimérica para uma DNAzima dimérica em termos de uma estrutura possível de uma DNAzima dimérica e a atividade resultante.

Os ácidos nucleicos catalíticos foram usados em combinação com protocolos de ampliação *in vitro* como um meio para gerar um sinal detectável, permitindo assim o monitoramento em tempo real de seqüências-alvo de ácidos nucleicos ampliadas (Todd *et al.*, 2000) (US 6,140,055; US 6,201,113; WO 99/45146; PCT/IB99/00848; WO 99/50452). Zymogene detection (US 6,140,055; US 6,201,113; WO 99/45146; PCT/IB99/00848; WO 99/50452), também conhecido com detecção de DzyNA (Todd *et al.*, 2000), resulta em alvo concomitante e ampliação do sinal. Isto ocorre porque as DNAzimas ou ribozimas catalíticas co-ampliam junto com seqüências-alvo para produzir amplicons que funcionam como enzimas verdadeiras capazes de rotatividade múltipla. Assim sendo, cada amplicon de ácido nucleico catalítico cliva múltiplos substratos repórteres. As DNAzimas e ribozimas são introduzidas nos amplicons usando iniciadores com rotuladores de 5' que são inativos, seqüências *anti-sentido* de ácidos nucleicos catalíticos. Quando estas seqüências são copiadas durante a ampliação *in vitro*, as seqüências *sense* cataliticamente ativas são co-ampliadas junto com a seqüência-alvo. A abordagem zimogênio/DzyNA é muito flexível pois a ampliação catalítica do sinal pode estar ligada a métodos de ampliação-alvo, incluindo PCR (reação de polimerase em cadeia), ampliação por deslocamento de filamento ("SDA"), ou ampliação *rotação circular* ("RCA"-Rolling circle), produzindo

amplicons de DNAzimas; e ampliação baseada em seqüências de ácidos nucleicos ("NASBA"), replicação de seqüências auto-sustentada ("3SR"), ou ampliação mediada por transcrição ("TMA"), produzindo amplicons de ribozimas. Além disso, como inúmeras moléculas de ácidos nucleicos catalíticos com uma ampla faixa de atividades catalíticas foram descobertas ou surgiram, a abordagem de zimogênio pode usar um substratorepórter diferente de um ácido nucleico, onde a leitura do ensaio é dependente de uma modificação química diferente de clivagem de um substrato de ácido nucleico. A abordagem zimogênio/DzyNA (Todd et al., 2000) ou NASBA/ribozima (WO 00/58505) pode ser considerada sensível e útil, mas há o potencial de interferência devido à ampliação de seqüências iniciadoras.

NASBA foi usada para produzir amplicons de RNA que contêm o ácido nucleico-alvo e uma seção do núcleo catalítico da ribozima Hammerhead (GAArA), introduzida como seqüência *anti-sentido* anexada com rotulador a um iniciador e depois copiada (WO 00/58505). A seqüência adicional necessária para a atividade catalítica (CUGANrGrA) foi introduzida como seqüência *sense* sequence em uma segunda molécula, que foi rotulada com um fluoróforo e *quencher*, e que também serviu como substratorepórter. Certas bases de ribonucleotídeos (rN acima) devem permanecer como ribonucleotídeos, senão a atividade catalítica da ribozima é perdida. Duas moléculas que consistiam inteiramente em DNA foram consideradas incapazes de formar enzimas heterodiméricas cataliticamente ativas (WO 00/58505).

Os ácidos nucleicos catalíticos foram usados também para a detecção de polimorfismos de nucleotídeos individuais ("SNPs"). O requisito estrito para pareamento de bases de Watson Crick entre os braços de ligação de ácidos nucleicos catalíticos e o substrato permitiu o desenvolvimento de métodos que permitem a discriminação de seqüências curtas intimamente relacionadas. As DNAzimas e ribozimas demonstraram discriminar entre duas seqüências que diferem em tão pouco quanto uma única base (Cairns et al., 2000) (WO 99/50452).

As DNAzimas têm propriedades que proporcionam vantagens sobre as ribozimas para certas aplicações *in vitro*. O DNA é inerentemente

mais estável do que o RNA, e assim sendo, é mais robusto com prazo de validade mais longo. O DNA pode ser estocado por longos períodos à temperatura ambiente, seja em solução ou em uma forma liofilizada. As DNAzimas também são preferíveis sobre a maioria de enzimas protéicas em certas aplicações porque, por exemplo, elas não são desnaturadas irreversivelmente por exposição a altas temperaturas durante a ampliação.

Assim sendo, existe uma necessidade presentemente nessas técnicas de obter métodos simples, rápidos, e econômicos para detectar, identificar e quantificar seqüências de ácidos nucleicos e outras entidades, que, de preferência, fornecem ácidos nucleicos catalíticos baseados em DNAzimas e/ou ribozimes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, fornece-se uma composição que compreende pelo menos dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de um facilitador de combinação de MNAzima, para formar uma enzima de ácido nucleico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima), onde cada um dos ditos pelo menos primeiro e dito segundo componentes oligonucleotídeos compreendem uma parte ramificada de substrato, uma parte de núcleo catalítico, e uma parte ramificada de sensor; onde depois da autocombinação, a parte ramificada de sensor dos ditos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos atuam como braços sensores da MNAzima, a parte do braço substrato dos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos atuam como braços substratos da MNAzima, e a parte nuclear catalítica dos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos atuam como um núcleo catalítico de MNAzima; e onde os braços sensores da MNAzima interagem com o dito facilitador de combinação de MNAzima de modo a manter o primeiro e o segundo componentes oligonucleotídeos em proximidade para associação das suas respectivas partes nucleares catalíticas, para formar o núcleo catalítico da MNAzima, sendo o dito núcleo catalítico capaz de modificar pelo menos um subs-

trato, e onde as ditas ramificações de substrato da dita MNazima engatam em um substrato, de tal modo que o dito núcleo catalítico da dita MNazima possa modificar o dito substrato.

- Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, 5 facilitador de combinação ou substrato pode compreender DNA ou um seu análogo.

O facilitador de combinação pode ser um alvo a ser identificado, detectado ou quantificado. O alvo pode compreender um ácido nucléico. O ácido nucléico pode ser selecionado no grupo que compreende DNA, DNA 10 metilado, DNA alquilado, RNA, RNA metilado, microRNA, siRNA, shRNA, tRNA, mRNA, snoRNA, stRNA, smRNA, pré- e primicroRNA, outros RNAs não-codificadores, RNA ribossômico, derivados deles, amplicons, ou qualquer combinação deles. O RNA ribossômico pode ser RNA ribossômico 16S.

- A fonte do ácido nucléico pode ser selecionada no grupo que 15 compreende uma fonte sintética, mamífera, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, *Archaea*, ou qualquer combinação delas.

O ácido nucléico pode ser ampliado. A ampliação pode compreender uma ou mais entre PCR (reação de polimerase em cadeia), ampliação por deslocamento de filamento ("SDA"), ampliação isotérmica mediada por 20 alça (LAMP), ampliação *rotação circular* ("RCA"), ampliação mediada por transcrição (TMA), replicação de seqüências auto-sustentada ("3SR"), ou ampliação baseada em seqüências de ácidos nucléicos (NASBA), ou reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR).

- A composição pode compreender ainda pelo menos um terceiro 25 componente oligonucleotídeo que atua para estabilizar pelo menos um entre as ditas partes de braços de substrato ou partes ramificada de sensor.

Pelo menos um entre o dito facilitador de combinação, os ditos componentes oligonucleotídeos ou substrato, ou uma combinação deles, pode compreender mais do que uma molécula.

- 30 As partes do núcleo catalítico do primeiro componente oligonucleotídeo podem ser selecionadas no grupo que compreende SEQ ID Nos: 149 – 153, 155 – 157, 159 e 161, e as partes do núcleo catalítico do segun-

do componente catalítico podem ser selecionadas no grupo que compreende SEQ ID Nos: 166 – 170 e 172.

A composição pode compreender ainda pelo menos um inibidor da dita autocombinação da dita MNAzima.

5 Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos ou facilitador de combinação ou substrato ou uma combinação deles pode compreender ainda pelo menos um aptâmero ou parte dele. O aptâmero ou parte dele pode compreender pelo menos um ácido nucléico, peptídeo, polipeptídeo ou proteína ou um seu derivado ou combinação.

10 A composição pode compreender ainda pelo menos um inibidor da dita autocombinação da dita MNAzima.

Pelo menos um entre o dito primeiro ou o dito segundo componentes oligonucleotídeos ou o dito facilitador de combinação ou o dito substrato pode compreender ainda pelo menos uma parte de uma seqüência autocomplementar capaz de formar uma estrutura de grampo. A estrutura de grampo pode inibir a autocombinação da dita MNAzime. A inibição da autocombinação pode ser removida após o contato de um aptâmero com um alvo. O aptâmero ou parte dele pode se ligar a um alvo selecionado no grupo que compreende ácidos nucléicos, proteínas, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles.

15 A estrutura de grampo pode inibir a autocombinação da dita MNAzime. A inibição da autocombinação pode ser removida após o contato de um aptâmero com um alvo. O aptâmero ou parte dele pode se ligar a um alvo selecionado no grupo que compreende ácidos nucléicos, proteínas, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles.

20 O substrato pode compreender um ácido nucléico ou uma proteína.

25 O ácido nucléico pode compreender pelo menos um entre um ácido nucléico rotulado, RNA, DNA, análogo de ácido nucléico, ácido nucléico peptídico, ácido nucléico bloqueado, quimera peptídeo-ácido nucléico, ou qualquer combinação deles. A proteína pode compreender pelo menos um entre um anticorpo, polipeptídeo, glicoproteína, lipoproteína, ou qualquer combinação deles. O substrato pode compreender ainda pelo menos uma nanopartícula ou micropartícula ou uma combinação delas. O substrato pode ser afixado a um suporte insolúvel ou estar livre em solução. O substrato pode compreen-

30

der uma parte detectável e uma parte *quencher*, onde depois da modificação do dito substrato pela dita MNazima, um efeito detectável proporcionado pela dita parte detectável é aumentado ou diminuído.

Os braços do substrato podem engatar no dito substrato através de
5 pareamento de bases complementares.

A modificação do dito substrato pela dita MNazima pode proporcionar um efeito detectável. A modificação do dito substrato pode ser selecionada no grupo que compreende clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-carbono, ligações éster ou ligações amida, ou
10 qualquer combinação delas. O efeito detectável pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência, ressonância de plasmônios superficiais, espectroscopia de massas, RMN, ressonância *spin* de elétrons, espectroscopia de polarização da fluorescência, dicroísmo circular, imunoensaio, cromatografia, radiometria, fotometria, cintilografia, métodos eletrônicos, UV, espec-
15 troscopia em luz visível ou no infravermelho, métodos enzimáticos, ou qualquer combinação deles. O efeito detectável pode ser medido, onde a magnitude da dita medição é indicativa da quantidade de um alvo.

Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, o dito facilitador de combinação ou o dito substrato pode ser selecionado no grupo
20 que compreende DNA, RNA, análogos de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras peptídeos-ácidos nucleicos, ou uma combinação deles. O facilitador de combinação e o dito substrato podem compreender ácidos nucleicos que são completamente ou parcialmente complementares a pelo menos uma parte dos ditos primeiro ou se-
25 gundo componentes oligonucleotídeos. Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, o dito facilitador de combinação ou o dito substrato pode compreender pelo menos uma substituição ou adição de nucleotídeo selecionada no grupo que compreende 4-acetilcitidina, 5-(carbóxi-hidróxi-metil)-uridina, 2'-O-metil-guanosina, inosina, N6-isopentenil-
30 adenosina, 1-metil-adenosina, 1-metil-pseudouridina, 1-metil-guanosina, 1-metil-inosina, 2,2-dimetil-guanosina, 2-metil-adenosina, 2-metil-guanosina, 3-metil-citidina, 5-metil-citidina, N6-metil-adenosina, 7-metil-guanosina, 5-metil-

amino-metil-uridina, 5-metóxi-amino-metil-2-tiouridina, beta-D-manosil-metil-uridina, 5-metóxi-carbonil-metil-uridina, 5-metóxi-uridina, 2-metil-tio-N6-isopentenil-adenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metil-tiopurin-6-il)-carbamoil)-treonina, N-((9-beta-ribofuranosil-purin-6-il)-N-metil-carbamoil)-treonina, uridino-5-oxoacetato de metila, ácido uridino-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metil-uridina, N-((9-beta-ribofuranosil-purin-6-il)-carbamoil)-treonina, 2'-O-metil-5-metil-uridina, 2'-O-metil-uridina, wybutosina, 3-(3-amino-carbóxi-propil)-uridina, beta-D-arabinosil-uridina, beta-D-arabinosil-timidina.

A composição pode compreender ainda pelo menos um terceiro componente oligonucleotídeo e um quarto componente oligonucleotídeo que se autocombinam na presença de pelo menos um facilitador de combinação adicional, para formar pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, onde cada um dos ditos pelo menos terceiro e quarto componentes oligonucleotídeos compreendem uma parte de braços de substrato, uma parte de núcleo catalítico e uma parte ramificada de sensor; onde depois da autocombinação de pelo menos um terceiro componente oligonucleotídeo e um quarto componente oligonucleotídeo, a parte do braço sensor dos ditos pelo menos terceiro e o dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos formam os braços sensores da dita pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, a parte dos ditos braços de substrato do dito pelo menos terceiro e do dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos formam os braços de substrato da dita pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, e a parte dos braços do núcleo catalítico do dito pelo menos terceiro e do dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos formam um núcleo catalítico da dita pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional; e onde os braços sensores da dita pelo menos um MNAzima adicional interagem com o dito pelo menos um facilitador de combinação adicional de modo a manter os dito pelo menos terceiro e o dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos próximos um do outro para associação de duas

partes do núcleo catalítico, para formar o núcleo catalítico da dita pelo menos MNAzima adicional, sendo o dito núcleo catalítico capaz de atuar sobre pelo menos um substrato adicional, e onde os braços do substrato da dita pelo menos uma MNAzima adicional engatam em pelo menos um substrato adicional, de tal modo que o núcleo catalítico da dita pelo menos uma MNAzima adicional atue sobre o dito pelo menos um substrato adicional.

Os substratos adicionais podem ser iguais, diferentes ou uma combinação deles.

De acordo com um segundo aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de pelo menos um facilitador de combinação, compreendendo

(a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de um facilitador de combinação, para formar pelo menos uma enzima de ácido nucleico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

(b) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma mostra que putativamente contém o facilitador de combinação sob condições que permitem:

(1) a autocombinação da dita pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa, e

(2) a atividade catalítica da dita MNAzima; e

(c) determinar a presença da atividade da atividade catalítica da dita pelo menos uma MNAzima, onde a presença da atividade catalítica é indicativa da presença do dito pelo menos um facilitador de combinação.

Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos ou facilitador de combinação pode compreender DNA ou um seu análogo.

O facilitador de combinação pode ser um alvo a ser identificado, detectado ou quantificado. O alvo pode compreender um ácido nucléico. O ácido nucléico pode ser selecionado no grupo que compreende DNA, DNA metilado, DNA alquilado, RNA, RNA metilado, microRNA, siRNA, shRNA, mRNA, tRNA, snoRNA, stRNA, smRNA, pré- e primicroRNA, outros RNAs

não-codificadores, RNA ribossômico, derivados deles, amplicons deles, ou qualquer combinação deles. O RNA ribossômico pode ser RNA ribossômico 16S.

5 A fonte do ácido nucléico pode ser selecionada no grupo que compreende uma fonte sintética, mamífera, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, *Archaea*, ou qualquer combinação delas.

O método pode compreender ainda uma etapa de ampliar o facilitador de combinação. A etapa de ampliação pode compreender uma ou mais entre: reação de polimerase em cadeia (PCR), ampliação por deslocamento de filamento ("SDA"), ampliação isotérmica mediada por alça (LAMP), ampliação *rotação circular* ("RCA"), ampliação mediada por transcrição (TMA), replicação de seqüências auto-sustentada ("3SR"), ou ampliação baseada em seqüências de ácidos nucléicos (NASBA), ou reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR).

15 Pelo menos um entre o dito facilitador de combinação, os ditos componentes oligonucleotídeos ou substrato, ou uma combinação deles, pode compreender mais do que uma molécula.

O método pode compreender ainda a determinação da presença da dita atividade catalítica durante ou depois da dita ampliação.

20 A autocombinação da MNAzima pode requerer o contato do facilitador de combinação com um ou ambos entre os ditos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos.

O método pode compreender ainda pelo menos um terceiro componente oligonucleotídeo que fica em contato com pelo menos uma parte de qualquer um dos dois ou ambos entre o primeiro e o segundo componentes oligonucleotídeos, para autocombinar a MNAzima. O terceiro componente oligonucleotídeo pode compreender mais do que uma molécula.

De acordo com um terceiro aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de pelo menos um facilitador de combinação, compreendendo

30 (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo

componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de pelo menos um primeiro facilitador de combinação, para formar pelo menos uma primeira enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

- (b) disponibilizar pelo menos um primeiro substrato, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita primeira MNAzima, onde a dita modificação do dito substrato pela dita MNAzima proporciona um efeito detectável;

- (c) colocar os ditos dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém o dito pelo menos primeiro facilitador de combinação sob condições que permitem:
 - (1) a autocombinação da dita pelo menos primeira MNAzima, e
 - (2) a atividade catalítica da dita pelo menos primeira MNAzima; e
 (d) detectar o dito efeito detectável.

- Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos ou facilitador de combinação pode compreender DNA ou um seu análogo.

- O facilitador de combinação pode ser um alvo a ser identificado, detectado ou quantificado. O alvo pode compreender um ácido nucléico. O ácido nucléico pode ser selecionado no grupo que compreende DNA, DNA metilado, DNA alquilado, RNA, RNA metilado, microRNA, siRNA, shRNA, tRNA, mRNA, snoRNA, stRNA, smRNA, pré- e primicroRNA, outros RNAs não-codificadores, RNA ribossômico, derivados deles, amplicons deles, ou qualquer combinação deles. O RNA ribossômico pode ser RNA ribossômico 16S.

- A fonte do ácido nucléico pode ser selecionada no grupo que compreende uma fonte sintética, mamífera, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, *Archaea*, ou qualquer combinação delas.

- O método pode compreender ainda uma etapa de ampliar o ácido nucléico. A etapa de ampliação pode compreender uma ou mais entre: reação de polimerase em cadeia (PCR), ampliação por deslocamento de filamento ("SDA"), ampliação isotérmica mediada por alça (LAMP), ampliação *rotação circular* ("RCA"), ampliação mediada por transcrição (TMA), replicação de seqüências auto-sustentada ("3SR"), ou ampliação baseada em

seqüências de ácidos nucleicos (NASBA), ou reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR).

Pelo menos um entre o dito facilitador de combinação, os ditos componentes oligonucleotídeos ou substrato, ou uma combinação deles,
5 pode compreender mais do que uma molécula.

O método pode compreender ainda detectar o dito efeito detectável durante ou depois da ampliação. O efeito detectável pode ser indicativo da presença do dito facilitador de combinação. O efeito detectável pode ser medido quantitativamente ou qualitativamente.

10 Cada um dos substrato pode ser um ácido nucleico ou uma proteína. O ácido nucleico pode compreender pelo menos um entre um ácido nucleico rotulado, RNA, DNA, análogo de ácido nucleico, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado, quimera peptídeo-ácido nucleico, ou qualquer combinação deles. A proteína pode compreender pelo menos um entre
15 um anticorpo, polipeptídeo, glicoproteína, lipoproteína, ou qualquer combinação deles. O substrato pode compreender ainda pelo menos uma nanopartícula ou micropartícula ou uma combinação delas. O substrato pode ser afixado a um suporte insolúvel ou estar livre em solução.

O substrato pode compreender um ácido nucleico e os braços
20 do dito substrato podem engatar no dito substrato através de pareamento de bases complementares.

O substrato pode compreender uma parte detectável e uma parte *quencher*, onde depois da modificação do substrato pela MNazima, um efeito detectável proporcionado pela parte detectável é aumentado ou diminuído. O efeito detectável pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência, ressonância de plasmônios superficiais, espectroscopia de massas, RMN, ressonância *spin* de elétrons, espectroscopia de polarização da fluorescência, dicroísmo circular, imunoensaio, cromatografia, radiometria, fotometria, cintilografia, métodos eletrônicos, UV, espectroscopia em luz visível
25 ou no infravermelho, métodos enzimáticos, ou qualquer combinação deles.

O método pode compreender ainda a ampliação do efeito detectável pelo uso de uma cascata de ampliação de efeitos detectáveis. A casca-

ta de ampliação de efeitos detectáveis pode compreender uma ou mais entre uma cascata de ribozima/ligase, uma cascata circular de enzimas de ácidos nucleicos, uma cascata de enzimas protéicas, ou uma ou mais enzimas afixadas a um suporte, ou qualquer combinação delas.

- 5 A modificação do dito substrato pode ser selecionada no grupo que compreende clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-carbono, ligações éster ou ligações amida.

- 10 O método pode compreender ainda disponibilizar pelo menos um terceiro e quarto componentes oligonucleotídeos, sendo os ditos pelo menos terceiro e o pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos capazes de se autocombinarem na presença de pelo menos um facilitador de combinação adicional, para formar pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, e onde pelo menos um substrato adicional está presente na amostra, sendo o dito substrato adicional capaz de ser modificado pela
- 15 MNAzima adicional, onde a dita modificação proporciona o dito efeito detectável adicional.

O pelo menos um efeito detectável adicional pode ser detectável independentemente.

- 20 Pelo menos um entre cada substrato adicional pode ser afixado a um suporte insolúvel, de tal modo que apenas uma entre uma parte detectável e uma parte *quencher* do substrato adicional permaneça afixada ao suporte quando o dito substrato adicional é modificado pela dita MNAzima adicional.

- 25 Um substrato adicional pode ser afixado a pelo menos um suporte insolúvel, de tal modo que um efeito detectável seja produzido quando este substrato é modificado por sua respectiva MNAzima.

De acordo com um quarto aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de pelo menos um alvo, compreendendo

- 30 (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e pelo menos um segundo componente oligonucleotídeo são capazes de se autocombina-

rem na presença do dito alvo, para formar uma enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima); e onde pelo menos um entre o dito primeiro e o dito segundo componentes oligonucleotídeos compreende pelo menos uma parte de aptâmero;

- 5 (b) colocar os ditos componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém o dito pelo menos um alvo, sob condições que permitem:

- (1) ligar o dito alvo às ditas partes de aptâmero, e
(2) a atividade catalítica da MNAzima; e

- 10 (c) determinar a presença da atividade catalítica da MNAzima, onde a presença da atividade catalítica é indicativa da presença do dito alvo.

Pelo menos um dos ditos componentes oligonucleotídeos pode ser afixado a um suporte sólido.

- 15 Pelo menos um dos ditos componentes oligonucleotídeos pode compreender DNA ou um seu análogo.

O alvo pode ser identificado, detectado ou quantificado.

- O método pode compreender ainda disponibilizar pelo menos um terceiro e um quarto componentes oligonucleotídeos, sendo que pelo menos o terceiro e pelo menos o quarto componentes oligonucleotídeos são
20 capazes de se autocombinarem na presença de pelo menos um alvo adicional, para formar pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, e onde pelo menos um entre o dito terceiro ou quarto componentes oligonucleotídeos compreende pelo menos uma parte de aptâmero adicional que se liga ao dito pelo menos um alvo adicional.

- 25 De acordo com um quinto aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de pelo menos um alvo, compreendendo

- (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo
30 componente oligonucleotídeo são capazes de se autocombinarem na presença de pelo menos um facilitador de combinação e do dito pelo menos um alvo, para formar pelo menos uma enzima de ácido nucléico multicomponen-

te cataliticamente ativa (MNAzima); e onde pelo menos um entre o dito primeiro ou segundo componentes oligonucleotídeos ou o dito pelo menos um facilitador de combinação compreende ainda pelo menos um aptâmero ou parte dele, e onde o dito alvo é capaz de se ligar ao dito pelo menos um aptâmero ou parte dele;

(b) disponibilizar pelo menos um inibidor da dita autocombinação da dita MNAzima;

(c) colocar os ditos componentes oligonucleotídeos, o facilitador de combinação, e o dito inibidor em contato com uma amostra que putativamente contém o dito pelo menos um alvo, sob condições que permitem:

(1) ligar o dito alvo ao dito pelo menos um aptâmero ou parte dele, e

(2) a atividade catalítica da dita pelo menos uma MNAzima; e

(3) a remoção da dita inibição da dita autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa; e

(d) determinar a presença da atividade catalítica da dita MNAzima, onde a presença da dita atividade catalítica é indicativa da presença do dito alvo.

O pelo menos um alvo pode ser selecionado no grupo que compreende proteínas, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons, ácidos nucleicos ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles.

Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, facilitador de combinação ou inibidor pode estar afixado a um suporte insolúvel.

Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, facilitador de combinação, aptâmero ou parte de aptâmero pode compreender ainda o dito inibidor.

Pelo menos um entre o dito primeiro ou o dito segundo componentes oligonucleotídeos ou facilitador de combinação pode compreender

ainda uma parte de uma sequência autocomplementar capaz de formar um estrutura de grampo. A estrutura de grampo pode inibir a autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa.

5 O aptâmero ou parte dele pode compreender pelo menos um ácido nucléico, peptídeo, polipeptídeo ou proteína ou um derivado ou combinação deles.

A inibição da autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa pode ser removida depois do contato do dito aptâmero ou parte do aptâmero com o alvo.

10 O inibidor pode ser capaz de se ligar a pelo menos um no grupo que compreende o dito aptâmero ou parte dele.

O inibidor pode ser selecionado no grupo que compreende RNA, DNA, análogos de ácidos nucléicos, ácidos nucléicos peptídicos, ácidos nucléicos bloqueados, quimeras peptídeos-ácidos nucléicos, ou uma combinação deles.

15 O método pode compreender ainda disponibilizar um substrato que pode ser modificado pela dita MNAzima para proporcionar um efeito desejável. A modificação pode ser selecionada no grupo que compreende clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-carbono, ligações éster ou ligações amida. O substrato pode não ser modificado pelos ditos primeiro ou segundo componentes oligonucleotídeos individualmente ou por ambos dos ditos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos na ausência do dito facilitador de combinação e o dito alvo.

25 O substrato pode compreender um ácido nucléico ou uma proteína. O ácido nucléico compreende pelo menos um entre ácido nucléico rotulado, RNA, DNA, análogo de ácido nucléico, ácido nucléico peptídico, ácido nucléico bloqueado, quimera peptídeo-ácido nucléico, ou qualquer combinação deles. A proteína pode compreender pelo menos um entre um anticorpo, polipeptídeo, glicoproteína, lipoproteína, ou qualquer combinação deles.

30 O substrato pode compreender ainda pelo menos uma nanopartícula ou micropartícula ou uma combinação delas.

A detecção do efeito detectável pode ser indicativa da dita ativi-

dade catalítica da dita MNAzima cataliticamente ativa, e onde a dita atividade catalítica é indicativa do dito alvo. O efeito detectável pode ser medido quantitativamente ou qualitativamente. O efeito detectável pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência, ressonância de plasmônios superficiais, espectroscopia de massas, RMN, ressonância *spin* de elétrons, espectroscopia de polarização da fluorescência, dicroísmo circular, imunoensaio, cromatografia, radiometria, fotometria, cintilografia, métodos eletrônicos, espectroscopia em UV, luz visível ou no infravermelho, métodos enzimáticos, ou qualquer combinação deles.

10 O substrato pode compreender uma parte detectável e uma parte *quencher*, onde depois da modificação do dito substrato pela dita MNAzima, um efeito detectável proporcionado pela dita parte detectável é aumentado ou diminuído.

De acordo com um sexto aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de pelo menos um alvo, compreendendo

(a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo são capazes de se autocombinarem na presença de pelo menos um facilitador de combinação e do dito pelo menos um primeiro alvo, para formar pelo menos uma primeira enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

(b) disponibilizar pelo menos um primeiro substrato, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita primeira MNAzima, onde a dita modificação do dito substrato pela dita MNAzima proporciona um efeito detectável;

(c) onde pelo menos um entre o dito primeiro ou o dito segundo componentes oligonucleotídeos ou o dito pelo menos primeiro facilitador de combinação ou o dito pelo menos primeiro substrato compreende ainda um aptâmero e onde o ditto alvo é capaz de se ligar a pelo menos uma parte do ditto aptâmero, produzindo pelo menos um primeiro inibidor que é capaz de inibir a dita autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa na au-

sência do dito alvo;

(d) colocar os ditos componentes oligonucleotídeos, o dito facilitador de combinação, o dito substrato, e o dito inibidor em contato com uma amostra que putativamente contém o dito alvo, sob condições que permitem:

- 5 (1) a ligação do dito alvo ao dito aptâmero, e
- (2) a remoção da dita inibição da dita autocombinação da dita MNazima cataliticamente ativa,
- (3) a atividade catalítica da MNazima; e
- (e) determinar a presença do dito efeito detectável, detectando desta
- 10 forma a presença do dito alvo.

Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos ou facilitador de combinação pode compreender DNA ou um análogo dele.

O aptâmero ou parte dele pode ser ligar a um alvo selecionado no grupo que compreende ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lipí-

15 deos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles.

Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos ou facilitador de combinação, substrato, ou inibidor pode ser afixado a um

20 suporte insolúvel.

Pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, facilitador de combinação, aptâmero ou parte dele pode compreender ainda o dito inibidor.

O aptâmero ou parte dele pode compreender pelo menos um

25 entre um ácido nucleico, peptídeo, polipeptídeo, ou proteína, ou um derivado ou combinação deles.

Pelo menos um entre o dito primeiro ou o dito segundo componentes oligonucleotídeos, facilitador de combinação ou substrato pode compreender ainda uma parte de uma seqüência autocomplementar capaz de

30 formar uma estrutura de grampo. A estrutura de grampo pode inibir a autocombinação da dita MNazima cataliticamente ativa. A inibição da autocom-

binação da dita MNAzima cataliticamente ativa pode ser removida depois do contato do dito aptâmero ou parte do aptâmero com o alvo.

O inibidor pode ser capaz de se ligar a pelo menos um no grupo que compreende o dito aptâmero ou parte dele. O inibidor pode ser selecionado no grupo que compreende RNA, DNA, análogos de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras peptídeos-ácidos nucleicos, ou uma combinação deles.

O substrato pode compreender um ácido nucleico ou uma proteína. O ácido nucleico pode compreender pelo menos um entre um ácido nucleico rotulado, RNA, DNA, análogo de ácido nucleico, ácido nucleico peptídico, ácido nucleico bloqueado, quimera peptídeo-ácido nucleico, ou qualquer combinação deles. A proteína pode compreender pelo menos um entre um anticorpo, polipeptídeo, glicoproteína, lipoproteína, ou qualquer combinação deles.

O substrato pode compreender ainda pelo menos uma nanopartícula ou micropartícula ou uma combinação delas.

A detecção do dito efeito detectável pode detectar a presença do dito alvo. O efeito detectável pode ser medido quantitativamente ou qualitativamente. O efeito detectável pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência, ressonância de plasmônios superficiais, espectroscopia de massas, RMN, ressonância *spin* de elétrons, espectroscopia de polarização da fluorescência, dicroísmo circular, imunoensaio, cromatografia, radiometria, fotometria, cintilografia, métodos eletrônicos, espectroscopia em UV, luz visível ou no infravermelho, métodos enzimáticos, ou qualquer combinação deles.

O substrato pode compreender uma parte detectável e uma parte *quencher*, onde depois da modificação do dito substrato pela dita MNAzima, um efeito detectável proporcionado pela dita parte detectável é aumentado ou diminuído. A modificação do dito substrato pode ser selecionada no grupo que compreende clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-carbono, ligações éster ou ligações amida.

O método pode compreender ainda disponibilizar pelo menos

um terceiro e quarto componentes oligonucleotídeos, sendo os ditos pelo menos terceiro e o pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos capazes de se autocombinarem na presença de pelo menos um facilitador de combinação adicional e pelo menos um alvo adicional, para formar pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional; e

5 onde pelo menos um substrato adicional está presente na amostra, sendo o dito substrato adicional capaz de ser modificado pela MNAzima adicional, onde a dita modificação proporciona o dito efeito detectável adicional; e

onde pelo menos um entre os ditos terceiro ou quarto componentes oligonucleotídeos ou o dito facilitador de combinação adicional ou o dito substrato

10 adicional compreende ainda pelo menos um aptâmero adicional que se liga ao dito pelo menos um alvo adicional;

onde pelo menos uma molécula inibidora adicional entra em contato com uma parte do dito aptâmero adicional, inibindo desta forma a dita autocombi-

15 nação da dita MNAzima cataliticamente ativa adicional na ausência do dito alvo adicional; e

onde o dito pelo menos um facilitador de combinação entra em contato com pelo menos uma parte dos ditos componentes oligonucleotídeos adicionais.

O pelo menos um efeito detectável adicional pode ser detectável

20 independentemente.

Cada dos substratos adicionais podem ser iguais, diferentes ou uma combinação deles.

Pelo menos um de cada substrato adicional pode ser afixado a um suporte insolúvel, de tal modo que apenas uma entre uma parte detectá-

25 vel e uma parte *quencher* do substrato adicional permaneça afixada ao suporte quando o dito suporte é modificado pela dita MNAzima adicional.

De acordo com um sétimo aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de pelo menos uma sequência de ácidos nucleicos, compreendendo

30 (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de uma varian-

te de seqüência de um ácido nucléico, para formar uma enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

(b) disponibilizar pelo menos um substrato, sendo o dito substrato capaz de ser modificado pela dita primeira MNAzima, onde a dita modificação do dito substrato pela dita MNAzima proporciona um efeito detectável;

(c) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém a dita variante de seqüência, sob condições que permitem:

- (1) a autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa, e
- (2) a atividade catalítica da dita MNAzima; e
- (d) determinar a presença do dito efeito detectável, detectando desta forma a presença da dita pelo menos uma variante de seqüência.

A variante de seqüência pode ser selecionada no grupo que compreende polimorfismos de nucleotídeos singulares, múltiplos polimorfismos de nucleotídeos, inserções, deleções, duplicações, translocações, variantes de seqüências com deslocamento de estrutura, variantes de seqüências sem sentido, ou qualquer combinações deles. A variante de seqüência pode estar presente em DNA ou RNA.

Qualquer um dos dois ou ambos entre os dito primeiro e o dito segundo componentes oligonucleotídeos podem compreender mais do que uma molécula.

A amostra que contém a dita variante de seqüência pode ser selecionada no grupo que compreende DNA metilado ou não-metilado modificado com bissulfito, RNA metilado ou não-metilado modificado com bissulfito, pelo menos um amplicon do DNA metilado ou não-metilado modificado com bissulfito, pelo menos um amplicon do RNA metilado ou não-metilado modificado com bissulfito, ou uma combinação deles.

A autocombinação da enzima de ácido nucléico multicomponente pode requerer o contato de pelo uma parte de qualquer um dos dois ou ambos entre o primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos com o ácido nucléico que compreende a dita variante de seqüência.

O método pode compreender ainda uma etapa de ampliar o áci-

do nucléico que contém a dita variante de seqüência. A etapa de ampliar pode compreender uma ou mais entre: reação de polimerase em cadeia (PCR), ampliação por deslocamento de filamento (SDA), ampliação isotérmica mediada por alça (LAMP), ampliação *rotação circular* (RCA), ampliação mediada por transcrição (TMA), replicação de seqüências auto-sustentada (3SR), ampliação baseada em seqüências de ácidos nucléicos (NASBA), ou reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR). O método pode compreender ainda a determinação da presença da dita variante de seqüência de ácidos nucléicos durante ou depois da dita ampliação.

10 O efeito detectável pode ser detectado por espectroscopia de fluorescência, ressonância de plasmônios superficiais, espectroscopia de massas, RMN, ressonância *spin* de elétrons, espectroscopia de polarização da fluorescência, dicroísmo circular, imunoensaio, cromatografia, radiometria, fotometria, cintilografia, métodos eletrônicos, espectroscopia em UV, luz
15 visível ou no infravermelho, métodos enzimáticos, ou qualquer combinação deles.

O substrato pode compreender uma parte detectável e uma parte *quencher*, onde depois da modificação do dito substrato pela dita MNAzima, um efeito detectável é proporcionado pela dita parte detectável é aumentado ou diminuído.

20 O substrato pode ser afixado a um suporte insolúvel ou ficar livre em solução.

A modificação pode ser selecionada no grupo que compreende clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-carbono, ligações éster ou ligações amida.

25 O método pode compreender ainda

(a) disponibilizar pelo menos um terceiro componente oligonucleotídeo e pelo menos um quarto componente oligonucleotídeo que se autocombinam na presença de pelo menos uma variante de seqüência de ácidos nucléicos adicional, para formar pelo menos uma enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima) adicional;

(b) colocar os ditos pelo menos terceiro e pelo menos quarto

componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém pelo menos uma variante de sequência de ácidos nucleicos adicional, na presença de pelo menos um substrato adicional capaz de ser modificado pela dita pelo menos uma MNAzima adicional, onde a dita modificação do dito pelo menos um substrato adicional proporciona pelo menos um efeito detectável adicional, sob condições que permitem:

(1) a autocombinação da pelo menos uma MNAzima, e

(2) a atividade catalítica da pelo menos uma MNAzima; e

(c) detectar o dito pelo menos um efeito detectável adicional, detectando desta forma a presença da dita pelo menos uma variante de sequência adicional.

O pelo menos um efeito detectável adicional pode ser detectável independentemente.

Os substratos adicionais podem ser iguais, diferentes ou uma combinação deles.

O método compreende ainda disponibilizar um suporte insolúvel que tem o dito substrato afixado a ele.

Pelo menos um entre cada substrato adicional pode ser afixado a um suporte insolúvel, de tal modo que apenas uma entre uma parte detectável e uma parte *quencher* do substrato adicional permaneça afixada ao suporte quando o dito substrato adicional é modificado pela dita MNAzima adicional.

De acordo com um oitavo aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de uma variante de sequência de um ácido nucleico, compreendendo

(a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos que compreendem pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo capazes de se autocombinarem na presença de um ácido nucleico, para formar pelo menos uma primeira enzima de ácido nucleico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

(b) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém o ácido nucleico, na

presença de pelo menos um primeiro substrato modificável pela dita pelo menos primeira MNAzima, onde o substrato compreende uma parte detectável capaz de proporcionar pelo menos um primeiro efeito detectável após a modificação do substrato pela dita pelo menos primeira MNAzima, sob condições que permitem:

- (1) a autocombinação da MNAzima, e
- (2) a atividade catalítica da MNAzima; e

(c) onde a ausência da atividade catalítica é indicativa da presença de uma variante de seqüência no dito ácido nucléico.

10 De acordo com um nono aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar a presença de pelo menos um ácido nucléico metilado, compreendendo

(a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de um ácido nucléico metilado, para formar pelo menos uma enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

(b) disponibilizar pelo menos um primeiro substrato, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita primeira MNAzima, onde a dita modificação do dito substrato pela dita MNAzima proporciona um efeito detectável;

(c) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém a o ácido nucléico metilado, sob condições que permitem:

- (1) a autocombinação da MNAzima, cataliticamente ativa e
- (2) a atividade catalítica da MNAzima; e

(d) detectar a presença do dito pelo menos um efeito detectável, detectando desta forma a presença do dito pelo menos um ácido nucléico metilado.

30 As condições podem compreender ainda uma temperatura que facilita a hibridização da dita MNAzima com o dito ácido nucléico metilado, mas não com o ácido nucléico não-metilado.

O método pode compreender ainda ampliar o efeito detectável pelo uso de uma cascata de ampliação de efeitos detectáveis. A cascata de ampliação de efeitos detectáveis pode compreender uma ou mais entre um cascata de ribozima/ligase, uma cascata circular de enzimas de ácido nu-
 5 cléicos, uma cascata de enzimas protéicas, ou uma ou mais enzimas afixa-
 das a um suporte, ou qualquer combinação delas.

A fonte do ácido nucléico metilado pode ser selecionada no gru-
 po que compreende uma fonte sintética, mamífera, humana, animal, vegetal,
 fúngica, bacteriana, *Archaea*, ou qualquer combinação delas.

10 O ácido nucléico metilado pode ser selecionado no grupo que
 compreende RNA metilado ou DNA metilado.

A autocombinação da enzima de ácido nucléico multicomponente
 pode requerer o contato do ácido nucléico metilado com um ou ambos entre
 os ditos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos.

15 O método pode compreender ainda disponibilizar um suporte
 insolúvel que tem pelo menos um entre o dito substrato ou os ditos primeiro
 ou segundo componentes oligonucleotídeos, ou uma combinação deles afixado a ele.

A detecção do dito efeito detectável pode ser detectada por es-
 20 pectroscopia de fluorescência, ressonância de plasmônios superficiais, es-
 pectroscopia de massas, RMN, ressonância *spin* de elétrons, espectroscopia
 de polarização da fluorescência, dicroísmo circular, imunoensaio, cromato-
 grafia, radiometria, fotometria, cintilografia, métodos eletrônicos, espectros-
 copia em UV, luz visível ou no infravermelho, métodos enzimáticos, ou qual-
 25 quer combinação deles.

O substrato pode compreender uma parte detectável e uma par-
 te *quencher*, onde depois da modificação do dito substrato pela dita MNAzi-
 ma, um efeito detectável é proporcionado pela dita parte detectável é au-
 mentado ou diminuído.

30 A modificação pode ser selecionada no grupo que compreende
 clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-
 carbono, ligações éster ou ligações amida.

O método pode compreender ainda disponibilizar pelo menos um terceiro e quarto componentes oligonucleotídeos, sendo os ditos pelo menos terceiro e o pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos capazes de se autocombinarem na presença de pelo menos um ácido nucléico metilado adicional, para formar pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, e

onde pelo menos um substrato adicional está presente na amostra, sendo o dito substrato adicional capaz de ser modificado pela dita MNAzima adicional, onde a dita modificação proporciona o dito efeito detectável adicional.

O pelo menos um efeito detectável adicional pode ser detectável independentemente.

Cada um dos substratos adicionais podem ser iguais, diferentes ou uma combinação deles.

Pelo menos um entre o dito substrato adicional pode ser afixado a um suporte insolúvel, de tal modo que apenas uma entre uma parte detectável e uma parte *quencher* do substrato adicional permaneça afixada ao suporte quando o dito substrato adicional é modificado pela dita MNAzima adicional.

De acordo com um décimo aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar pelo menos um facilitador de combinação, usando uma cascata de ampliação, compreendendo

(a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos que compreendem pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo que se autocombinarem na presença de um primeiro facilitador de combinação, para formar pelo menos uma primeira enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

(b) disponibilizar um suporte insolúvel que tem pelo menos um primeiro substrato afixado a ele, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita MNAzima, onde o dito primeiro substrato compreende pelo menos uma terceira molécula que compreende pelo menos uma primeira enzima cataliticamente ativa que é liberada depois da modificação do dito

primeiro substrato pela dita primeira MNAzima;

- (c) colocar os ditos dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém o dito facilitador de combinação, na presença do dito suporte insolúvel que tem o dito primeiro substrato afixado a ele, sob condições que permitem:

- (1) a autocombinação da MNAzima, e
(2) a atividade catalítica da MNAzima; e

- (d) disponibilizar um suporte insolúvel que tem pelo menos um segundo substrato afixado a ele, sendo o dito segundo substrato clivável pela dita primeira enzima cataliticamente ativa, onde o dito segundo substrato compreende pelo menos uma quarta molécula que compreende pelo menos uma porção detectável que é liberado depois da modificação do dito segundo substrato pela dita primeira MNAzima;

- (e) onde a dita primeira enzima cataliticamente ativa modifica uma pluralidade de ditos segundo substratos, liberando desta forma uma pluralidade de porções detectáveis,

- (f) onde as ditas porções detectáveis são detectáveis depois da modificação do dito segundo substrato pela dita primeira enzima cataliticamente ativa; e

- (g) onde a detecção das ditas porções detectáveis é indicativa da presença do dito facilitador de combinação.

- As porções detectáveis podem compreender ainda uma segunda enzima cataliticamente ativa adicional capaz de modificar o dito primeiro substrato, liberando desta forma a enzima cataliticamente ativa adicional. Pelo menos entre uma das ditas primeira ou segunda enzima cataliticamente ativa pode ser selecionada no grupo que compreende MNAzimas, DNAzimas, ribozimas, enzimas hidrolíticas, endonucleases de restrição, exonucleases, proteases, proteinases, hidrolases, liticases, peptidases, dipeptidases, esterases, caspases, catepsinas, dessulfidrases, amidases, glicosidases.

- O facilitador de combinação pode compreender um alvo a ser identificado, detectado ou quantificado. O alvo pode ser selecionado no grupo que compreende ácidos nucléicos, proteínas, glicoproteínas, lipídeos,

lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles.

5 O ácido nucléico pode ser selecionado no grupo que compreende DNA, DNA metilado, DNA alquilado, RNA, RNA metilado, microRNA, siRNA, shRNA, tRNA, mRNA, snoRNA, stRNA, smRNA, pré- e primicroRNA, outros RNAs não-codificadores, RNA ribossômico, derivados deles, amplicons deles, ou qualquer combinação deles. De acordo com um décimo primeiro aspecto da presente invenção, fornece-se um método para detectar um alvo usando uma cascata de ampliação sinais mediada pela MNAzima, compreendendo

15 (a) disponibilizar primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo que se autocombinam na presença do dito alvo, para formar uma primeira enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima);

20 (b) disponibilizar um suporte insolúvel que tem um primeiro substrato e um segundo substratos afixados a ele, sendo que os ditos primeiro e segundo substratos são capazes de serem modificados pela dita primeira MNAzima, onde os ditos primeiro e segundo substratos compreendem pelo menos um terceiro e um quarto componentes oligonucleotídeos, respectivamente, capazes de formar uma segunda MNAzima cataliticamente ativa, onde os ditos terceiro e quarto componentes oligonucleotídeos são liberados depois da modificação do ditos primeiro e segundo substratos pela dita primeira MNAzima; e

25 (c) Proporcionar um dito suporte insolúvel que tem um terceiro e um quarto substratos afixados a ele, sendo que os ditos terceiro e quarto substratos são capazes de serem modificados pela dita segunda MNAzima, onde os ditos terceiro e quarto substratos compreendem pelo menos um quinto e um sexto componente oligonucleotídeo respectivamente, capazes de formar uma técnica MNAzima cataliticamente ativa, onde os ditos quinto e sexto componentes oligonucleotídeos são liberados depois da modificação

dos ditos terceiro e quarto substratos pela dita segunda MNAzima, e;

(d) disponibilizar um facilitador de combinação capaz de facilitar a combinação da dita segunda e da dita terceira MNAzima, e

(e) disponibilizar um quinto substrato que é capaz de ser modificado pela dita segunda MNAzima para proporcionar um efeito detectável;

(f) colocar os ditos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que putativamente contém o dito alvo, na presença do dito facilitador de combinação, e na presença do dito suporte insolúvel que tem os ditos primeiro, segundo, terceiro e quarto substratos afixados a ele, sob condições que permitem:

(1) a autocombinação da dita primeira, segunda e terceira MNAzimas, e

(2) a atividade catalítica das ditas primeira, segunda e terceira MNAzimas; e

(g) onde a dita terceira MNAzima modifica os ditos primeiro e segundo substratos, para desta forma produzir ainda a dita segunda MNAzima, onde a dita segunda MNAzima modifica ainda pelo menos um entre os ditos terceiro, quarto e quinto substratos, para desta forma produzir a dita terceira MNAzima, para desta forma proporcionar ainda o dito efeito detectável, e

(h) onde a detecção do dito efeito detectável é indicativa da presença do dito alvo.

O alvo pode ser identificado, detectado ou quantificado. O alvo pode ser selecionado no grupo que compreende ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles. O ácido nucleico pode ser selecionado no grupo que compreende DNA, DNA metilado, DNA alquilado, RNA, RNA metilado, microRNA, siRNA, shRNA, tRNA, mRNA, snoRNA, stRNA, smRNA, pré- e primicroRNA, outros RNAs não-codificadores, RNA ribossômico, derivados deles, amplicons, ou qualquer combinação deles.

O quinto substrato pode ser igual ou diferente a qualquer um dos

ditos primeiro, segundo, terceiro ou quarto substratos.

Cada um dos ditos primeiro, segundo, terceiro ou quarto substratos pode estar presente no mesmo suporte sólido ou em suportes sólidos diferentes, ou qualquer combinação deles.

- 5 A modificação de pelo menos um entre os ditos primeiro, segundo, terceiro ou quarto substratos pode proporcionar ainda um efeito detectável.

De acordo com um décimo segundo aspecto da presente invenção, fornece-se um método para produzir uma pluralidade de de enzimas de
10 ácidos nucleicos multicomponentes (MNAzimas) que reconhecem pelo menos um facilitador de combinação e modificam um substrato, sendo que o método compreende:

- (a) disponibilizar uma pluralidade de facilitadores de combinação a serem identificados, detectados ou quantificados,
 - 15 (b) desenhar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, onde pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de um facilitador de combinação, para formar uma enzima de ácido nucleico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima), onde cada um entre o pelo menos primeiro e segundo
20 componentes oligonucleotídeos compreendem uma parte ramificada de substrato, uma parte de núcleo catalítico, e uma parte ramificada de sensor, onde depois da autocombinação, a parte do braço sensor do primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos formam braços sensores da MNAzima, a parte ramificada de substrato do primeiro e segundo componentes
25 oligonucleotídeos formam os braços de substrato da MNAzima, e a parte do núcleo catalítico do primeiro e segundo componentes oligonucleotídeo formam um núcleo catalítico da MNAzima;
- e onde os braços sensores da MNAzima interagem com um facilitador de combinação de modo a manter o primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos próximos para associação das suas respectivas partes de núcleo
30 catalítico, para formar o núcleo catalítico da MNAzima, sendo o dito núcleo catalítico capaz de atuar sobre pelo menos um substrato, e onde os braços

de substrato da MNAzima engatam um substrato de tal modo que o núcleo catalítico da MNAzima possa modificar o dito substrato;

- (c) alterar os ditos dois ou mais componentes oligonucleotídeos, de tal modo que a parte ramificada de substrato e a parte do núcleo catalítico do primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos sejam constantes, e a parte ramificada de sensor de pelo menos um entre o primeiro e o segundo componentes oligonucleotídeos seja adaptada para reconhecer outro entre uma pluralidade de facilitadores de combinação, e
- (d) repetir a etapa de alterar para cada um da pluralidade de facilitadores de combinação.

De acordo com um décimo terceiro aspecto da presente invenção, fornece-se um *kit* para detectar a presença de uma pluralidade de alvos, compreendendo uma pluralidade de componentes oligonucleotídeos desenhados para combinar uma pluralidade de MNAzimas, cada uma correspondente a pelo menos um entre uma pluralidade de alvos, e pelo menos um substrato.

De acordo com um décimo quarto aspecto da presente invenção, fornece-se um *kit* para combinar uma pluralidade de MNAzimas, compreendendo uma pluralidade de facilitações de combinação, uma pluralidade de componentes desenhados para combinar uma pluralidade de MNAzimas, cada uma correspondendo a cada da pluralidade de facilitadores de combinação, e pelo menos um substrato.

De acordo com um décimo quinto aspecto da presente invenção, fornece-se um *kit* para detectar um alvo, compreendendo uma pluralidade de componentes oligonucleotídeos desenhados para combinar uma MNAzima correspondente ao alvo, e um substrato.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Uma modalidade preferida da presente invenção será agora descrita apenas a título exemplificativo, fazendo referência aos desenhos anexos, onde:

A Figura 1 é um desenho de uma MNAzima ilustrada em uma representação de de um desenho exemplificativo de uma MNAzima, onde as

partes ramificada de substrato (A) de *partizimas* A e B se ligam a um substrato repórter, ao qual está afixado um rotulador fluorescente (à esquerda) e um *quencher* (à direita). As partes do núcleo catalítico (C) ficam localizadas entre as partes ramificada de substrato (A) e as partes ramificada de sensor (B). Depois da ligação das partes ramificada de sensor (B) a um Alvo, o substrato repórter é clivado no Sítio de Clivagem da MNAzima, aumentando desta forma a fluorescência.

A Figura 2 indica as estratégias para a detecção de alvos mediada pela MNAzima, e ilustra um fluxograma que indica as aplicações exemplificativas de métodos para a detecção de alvos, usando MNAzimas. As MNAzimas podem ser usadas para (1) detecção direta; (2) detectar amplicons gerados, por exemplo, por PCR, SDA, LAMP, RCA, TMA, 3SR ou NASBA durante ou após a ampliação; e (3) iniciar uma cascata de ampliação de sinais.

A Figura 3 ilustra o método para detecção de alvos, usando uma MNAzima e substratos genéricos ancorados, indicando uma representação de MNAzimas exemplificativas e um método para a detecção de alvos usando MNAzimas que clivam substratos amarrados a um suporte. Nesta modalidade, a MNAzima se forma apenas na presença de um facilitador de combinação (alvo). Quando a MNAzima cliva o substrato amarrado entre um fluoróforo e um *quencher*, um sinal é gerado. Como ilustrado neste caso, depois da clivagem entre o fluoróforo F e o *quencher* Q, há um aumento resultante na fluorescência. Geralmente, o método pode ser desenhado de tal modo que o fluoróforo F ou o *quencher* Q possa ficar afixado ao suporte depois de ocorrer a clivagem. Quadro (i): O suporte ilustrado tem apenas um substrato amarrado a ele. Quadro (ii): Pode haver múltiplos substratos amarrados em diferentes posições. Cada substrato pode ser clivado apenas por uma MNAzima formada na presença de uma molécula facilitadora de combinação da MNAzima específica – neste caso, os Alvos 1 e 2 facilitam a auto-combinação das MNAzimas 1 e 2, respectivamente. Assim sendo, neste exemplo, a MNAzima 1 apenas se autocombina na presença do Alvo 1 e cliva apenas o Substrato 1. Similarmente, a MNAzima 2 apenas se autocombina

na presença do Alvo 2 e cliva apenas o Substrato 2. O sinal pode ser localizado pelo posicionamento do substrato sobre a superfície, permitindo assim a detecção de diferentes facilitadores de combinação.

A Figura 4 representa métodos exemplificativos para detecção de alvos; estão ilustrados exemplos de métodos que usam uma MNAzima para detectar analisado-alvo (An), por exemplo, incluindo, porém sem limitações, uma proteína ou molécula pequena. Este exemplo ilustra a geração de um sinal pela clivagem pela MNAzima de um substrato rotulado com um fluoróforo (F) e um *quencher* (Q). Desenhos gerais poderiam ser usados em outros formatos, pelos quais o sinal é gerado por uma modificação diferente da clivagem e/ou os quais a leitura não é fluorescente, mas, por exemplo, é colorimétrica, radioativa etc. Três estratégias genéricas estão ilustradas nesta figura. (i) Um aptâmero para ligar um analisado-alvo é ligado a uma *partizima* (uma *apta-partizima*). Esta molécula tem autocomplementaridade, e não consegue contribuir para ativar a combinação da MNAzima na ausência do analisado-alvo. Uma segunda *partizima*, um substrato e um facilitador de combinação também são fornecidos. Quando um analisado-alvo específico se liga ao domínio do aptâmero, as bases complementares dentro da *apta-partizima* se separam, permitindo que a *apta-partizima* adote uma conformação pela qual ela pode contribuir para a combinação da MNAzima ativa. A MNAzima ativa pode clivar o substrato e gerar fluorescência. (ii) Um aptâmero para ligar um analisado-alvo é ligado a um facilitador de combinação. Esta molécula tem autocomplementaridade, e não consegue direcionar as *partizimas* para se alinharem e combiner uma MNAzima ativa na ausência do analisado-alvo. Duas *partizimas* e um substrato também são fornecidos. Quando um analisado-alvo específico se liga ao domínio do aptâmero, as bases complementares dentro do facilitador de combinação se separam, permitindo que o facilitador de combinação adote uma conformação pela qual ele consegue direcionar a combinação das MNAzimas ativas. As MNAzimas ativas podem clivar o substrato e gerar fluorescência. (iii) Duas *apta-partizimas*, cada uma contendo uma parte de um aptâmero, são incubadas na presença de um substrato. Na ausência do analisado-alvo, as duas *apta-*

partizimas não conseguem se combinar para formar uma MNAzima ativa. Quando um analisado-alvo específico está presente, e se liga a ambos domínios que contêm uma parte do aptâmero, as duas *apta-partizimas* são aproximadas e podem se combinar em uma MNAzima ativa. A MNAzima ativa

5 pode clivar o substrato e gerar fluorescência.

A Figura 5 ilustra a ampliação por PCR de microRNAs e a detecção usando MNAzimas, ilustrando uma representação de uma estratégia de MNAzima para ampliação e detecção de seqüências curtas, tais como espécies micro-RNA (miR). O método usa um iniciador 3' que se liga

10 ao miR na extremidade 3' e que tem uma seqüência de extensão não-relacionada (ilustrada nos quadros tracejados) que pode (partes (i) e (ii), Iniciador de Alça, à esquerda), ou não pode (partes (iii) e (iv), iniciador Rotulado, à direita), formar uma estrutura tronco-alça na extremidade 5'. O iniciador 3' miR é estendido na presença de transcriptase reversa (partes (i) e (iii), e

15 em seguida, ampliação por intermédio de PCR usando iniciadores 5' e 3' com a seqüência específica de miR nas extremidades 3' e a seqüência de extensão não-relacionada nas extremidades 5' (partes (ii) e (iv)). Os amplicons podem ser detectados por MNAzimas, que hibridizam para o amplicon, incluindo a região entre os iniciadores de 5' e 3'. Um requisito para a complementaridade estrita dos braços sensores das MNAzimas e o ácido nucléico alvo

20 permite a discriminação de seqüências intimamente relacionadas. F: fluoróforo; Q: *quencher*.

A Figura 6 representa a detecção de MNAzima acoplada à ampliação de sinais mediada por enzima, ilustrando uma representação de uma

25 MNAzima para iniciar uma cascata de ampliação de sinais. Nesta modalidade, as MNAzimas disparam uma cascata de geração de sinais a jusante, onde (da esquerda para a direita, quadro de cima) uma MNAzima se forma apenas na presença de um alvo e depois libera uma enzima a partir de uma posição de amarração sobre um suporte. Como ilustrado no quadro de baixo, a enzima liberada, então, cliva uma molécula de substrato fluorescente. O substrato fluorescente é detectado facilmente. F: fluoróforo; Q: *quencher*.

30

A Figura 7 representa a detecção de analisados usando MNAzi-

mas e ampliação de sinais, onde uma MNAzima pode disparar uma cascata gerada usando DNAzimas espacialmente separadas. Como ilustrado nas etapas numeradas seqüencialmente, um episódio de clivagem inicial pela MNAzima, que ocorre apenas na presença de um alvo, pode clivar o substrato imobilizado, liberando uma primeira DNAzima amarrada A ("A") (etapas 1-3). DNAzima A, depois de liberada, cliva e libera a segunda DNAzima amarrada B ("B") (rotulada com fluoróforo) (etapas 4-6) que, por sua vez, cliva e libera uma DNAzima A adicional (etapas 7-8), resultando na iniciação de uma cascata. A ampliação exponencial dos sinais torna fácil a medição, pois a DNAzima B com fluoróforo é liberada na cascata ulterior. F: fluoróforo; Q: quencher.

A Figura 8 ilustra o desenho de MNAzimas para o alvo RPLPO: Quadro (i): Seqüências exemplificativas para os desenhos 1 (quadro superior) e 2 (quadro inferior) para MNAzimas; Quadro (ii): Resultados da clivagem dependente do alvo de um substrato repórter pela MNAzima dos desenhos 1 (quadro superior) e 2 (quadro inferior). N=A, G, C, T ou qualquer análogo; N'=qualquer nucleotídeo complementar a N; (N ou N')_x= qualquer número de nucleotídeos ou análogos; K=A, G ou AA; W=A ou T; rN= qualquer ribonucleotídeo e/ou qualquer número de ribonucleotídeos; *= base com oscilação ("wobble") no pareamento de bases.

A Figura 9 ilustra o desenho de MNAzimas para o alvo RPLPO: Quadro (i): Seqüência exemplificativa para o desenho 3 para uma MNAzima; Quadro (ii): Resultados para a clivagem dependente do alvo de um substrato repórter. As reações de controle ilustradas incluem controle de hibridização sem alvo, dois controles fora do alvo e reações que contêm os oligonucleotídeos da *partizima* A ou a *partizima* B, mas não ambas. N=A, G, C, T ou qualquer análogo; N'= qualquer nucleotídeo complementar a N; (N ou N')_x= qualquer número de nucleotídeos ou análogos; K=A, G ou AA; W=A ou T; rN= qualquer ribonucleotídeo e/ou qualquer número de ribonucleotídeos; * = base wobble.

A Figura 10 ilustra o desenho de MNAzima para o alvo RPLPO: Quadro (i): Seqüência exemplificativa para o desenho 4 para uma MNAzima;

Quadro (ii): Eficiência da clivagem dependente do alvo para os desenhos 3 e 4. Os resultados estão ilustrados para reações que contêm os oligonucleotídeos-alvo RPLPO, e os controles sem alvo. N=A, G, C, T ou qualquer análogo; N'= qualquer nucleotídeo complementar a N; (N ou N')_x= qualquer número de nucleotídeos ou análogos; K=A, G ou AA; W=A ou T; rN= qualquer ribonucleotídeo e/ou qualquer número de ribonucleotídeos; *= base *wobble*.

A Figura 11 ilustra o uso de MNAzimas para discriminar entre seqüências intimamente relacionadas: Quadro (i): Seqüências de DNA, homólogos de seqüências de hsa-miR-20 e miR relacionadas, usadas como seqüência-alvo nos experimentos nas Figuras 11 e 12 estão ilustradas. As diferenças em seqüência entre D-20 D-miRs relacionadas estão sublinhadas. A linha tracejada vertical em negrito separa as regiões dos oligonucleotídeos reconhecidos pelos dois braços sensores. Quadro (ii): Representa seqüências exemplificativas para uma MNAzima do desenho 4 para detecção de miR-20. Quadro (iii): Resultados para a clivagem dependente do alvo pela MNAzima D-20 de um substratorepórter. Reações de controle ilustradas: oligonucleotídeos "fora do alvo" (D-17-5p, D-106a, D-106b, D-93), e reações de controle "nenhum alvo" (dH₂O).

A Figura 12 ilustra a otimização com MgCl₂ do sistema de MNAzima MiR-20: Resultados obtidos usando um sistema de MNAzima com desenho exemplificativo 4 para detecção de miR-20. A clivagem dependente do alvo (D-20) de um substratorepórter. As reações de controle que contêm seqüências "fora do alvo" (D-17-5p, D-106a, D-106b, D-93) ou "sem alvo" (dH₂O), estão ilustradas para reações que contêm MgCl₂ (i) 5 mM, (ii) 25 mM ou (iii) 100 mM, respectivamente.

A Figura 13 ilustra o desenho de MNAzima para o alvo RPLPO: Quadro (i): Seqüências exemplificativas para os desenhos 5 e 6 para MNAzimas. Quadro (ii): Resultados para clivagem dependente do alvo de um substratorepórter, usando os desenhos 5 e 6, e seus controles "sem alvo". N=A, G, C, T ou qualquer análogo; N'= qualquer nucleotídeo complementar a N; (N ou N')_x= qualquer número de nucleotídeos ou análogos; R=A ou G; Y=C ou U; rN= base de ribonucleotídeo.

A Figura 14 ilustra a detecção de RPLPO ampliado por PCR: Resultados para a clivagem dependente do alvo de um substratorepórter e várias reações de controle pelo sistema de MNAzima do desenho 4 que assesta o gene de RPLPO humano. A reação de MNAzima de RPLPO continua (i) oligonucleotídeos RPLPO de controle, (ii) amplicons da PCR de RPLPO (5 µl) produzidos por ampliação do DNA genômico humano (100 ng), usando iniciadores complementares ao gene de RPLPO, (iii) reações de PCR de RPLPO "sem alvo" que carecem do DNA genômico ou (iv) DNA genômico humano não-ampliado (500 ng).

A Figura 15 ilustra a detecção de seqüências curtas ampliadas (22 meros): Quadro (i): Resultados para a clivagem dependente do alvo de um substratorepórter por um sistema de MNAzima do desenho 4 que assesta a seqüência de miR-20 humano. As reações da MNAzima MiR-20 foram realizadas com (i) 10^{12} (1 E+12) cópias do oligonucleotídeo de controle do Alvo D-20 (não ampliado); (ii) amplicons de PCR (5 µL) produzidos por ampliação de 2×10^7 (2 E+7) cópias do oligonucleotídeo-alvo D-20, usando iniciadores complementares às seqüências de miR-20; (iii) reações de PCR "sem alvo" que carecem do oligonucleotídeo-alvo D-20; (iv) 10^8 (1 E+8) cópias do oligonucleotídeo-alvo D-20 (não ampliado); e (v) um alvo-controle "fora do alvo" D-17-5p (2×10^7 (2 E+7) cópias ampliadas or PCR). Quadro (ii): Comparação da seqüência do Alvo D-20 e a seqüência fora do alvo, D-17-5p. O oligonucleotídeo D-17-5p tem um desemparelhamento na região de ligação do iniciador da PCR em relação à seqüência do Alvo D-20, e um desemparelhamento na região (localizada entre os iniciadores) que é interrogada pelos braços sensores das MNAzimas.

A Figura 16 ilustra a detecção de amplicons de miR-20 ampliados: Exemplo da detecção no ponto final de amplicons, usando MNAzimas após ampliação por PCR. A PCR foi usada para ampliar microRNA mir-20 presente no RNA total de células do timo humano, e detectados usando a metodologia de MNAzimas. As amostras ampliadas e os controles são como ilustrados.

A Figura 17 representa a análise quantitativa por PCR em tempo

real do éxon 5 de RPLPO pela MNAzima do desenho 6: Exemplo da detecção em tempo real e quantificação usando a metodologia de MNAzima, onde o gene de RPLPO foi detectado usando MNAzimas para monitorar a acumulação do éxon 5 de RPLPO. Quadro (i): desenho da MNAzima 6; Quadro (ii):

5 sinal de fluorescência que indica a PCR em tempo real para diferentes quantidades do modelo, como indicado; Quadro (iii): curva-padrão e quantificação do material ampliado. Os resultados indicam o aumento dependente do tempo na fluorescência para detecção por MNAzima do DNA genômico humano ampliado por intermédio de PCR. $R^2=0,995$; inclinação = -3,698.

10 A Figura 18 é uma representação esquemática de uma análise multiplex exemplificativa de múltiplos alvos: Dois ou mais alvos podem ser detectados simultaneamente usando dois ou mais substratos, cada um específico para uma MNAzima. Os substratos são rotulados, de preferência, com fluoróforos diferentes. Neste exemplo, o alvo 1 pode ser detectado monitorando o aumento na fluorescência FAM, e o Alvo 2 pode ser detectado

15 monitorando o aumento na fluorescência JOE. Q: *quencher*, FAM, JOE: fluoróforos.

A Figura 19 representa a detecção única e multiplex de seqüências de RPLPO e D-20: A detecção de RPLPO foi monitorada um substrato rotulado com JOE, e a detecção do Alvo D-20 foi monitorada usando um

20 substrato rotulado com FAM. Quadro (i): MNAzima do desenho 6 compreende *partizimas* para apenas um sistema de MNAzima, para RPLPO (quadro superior) ou D-20 (quadro inferior); Quadro (ii): MNAzima desenho 6 contém *partizimas* para MNAzimas que assestam RPLPO e também D-20.

25 A Figura 20 representa a detecção com MNAzima de alvos, usando um aptâmero: Uma estratégia exemplificativa para a detecção de um alvo está representada. Nesta estratégia, uma seqüência de aptâmero é incorporada na extremidade de uma *partizima* (*apta-partizima*) em uma configuração pela qual uma MNAzima ativa é formada apenas na presença do

30 alvo. Os componentes oligonucleotídeos necessários para a estratégia de detecção com MNAzima ilustrada incluem: (a) uma *partizima*-padrão; (b) uma *apta-partizima* que é uma *partizima* com um aptâmero incorporado em

uma das suas extremidades; (c) um facilitador de combinação que se liga à *apta-partizima* e também à *partizima*, permitindo a combinação de uma MNazima ativa (na presença do alvo); (d) uma sonda de substrato repórter; e (e) um inibidor de combinação que hibridiza para a *apta-partizima* em uma região que cobre pelo menos parte da sequência do aptâmero e parte do braço de ligação do substrato da sequência da *partizima*. Na ausência de um analisado-alvo (Quadro (i)), o inibidor de combinação se liga à *apta-partizima*, bloqueando assim a ligação (e a clivagem) do substrato de sonda repórter. Na presença de um analisado-alvo (Quadro (II)), o alvo se liga à sequência do aptâmero da *apta-partizima*, impedindo a ligação do inibidor de combinação e permitindo a ligação e a clivagem do substrato da sonda repórter. Assim sendo, as MNazimas apenas conseguem se formar e causar a geração de sinais fluorescentes na presença do alvo.

A Figura 21 ilustra a detecção com MNazima de moléculas pequenas usando um aptâmero: Um exemplo do uso de MNazimas para a detecção de alvos, especificamente ATP, está representado. A estratégia ilustrada na Figura 20 foi demonstrada usando o exemplo de detecção de uma molécula pequena, ATP. O Quadro (i) ilustra as sequências dos componentes oligonucleotídeos que foram usados para a detecção de ATP. Eles compreendem uma *partizima*, uma *apta-partizima* (que incorpora um aptâmero para ligar ATP), um inibidor da combinação aptâmero/MNazima, um substrato repórter e um facilitador de combinação. Quadro (ii) Análise da Clivagem SubBi-1-FB ilustra os resultados obtidos depois da incubação dos componentes oligonucleotídeos na presença, ou ausência, de ATP e outros nucleotídeos. Um aumento na fluorescência no decorrer do tempo foi observado na presença de ATP, e dATP, mas não na presença de GTP ou CTP. Além disso, nenhum aumento na fluorescência foi observado na ausência de qualquer alvo (controle com apenas água).

A Figura 22 ilustra a detecção de desemparelhamentos de apenas uma base usando MNazimas: Está representado um exemplo do uso de MNazimas para a detecção de desemparelhamentos de uma única base. O Quadro (i) ilustra as sequências dos componentes oligonucleotídeos que

foram usados para a detecção de desemparelhamentos de uma única base em uma sequência-alvo éxon 5 de RPLPO. O oligonucleotídeo ilustrado compreendia duas *partizimas* (A5 e B6), que são baseadas na MNAzima do desenho 7 (por exemplo, Exemplo 20), e um substratorepórter. A terceira

5 base (X) no braço sensor da *partizima* B é emparelhada ou desemparelhada com a sequência-alvo. When X = G, a *partizima* e o alvo estão completamente emparelhados. Quando X= C, há um desemparelhamento entre o braço sensor e o alvo RPLPO. O Quadro (II) indica os resultados obtidos depois da ampliação por PCR e a detecção em tempo real em reações que

10 contêm uma *partizima* B que é completamente emparelhada, ou é desemparelhada, em relação ao alvo RPLPO.

A Figura 23 representa a estratégia com MNAzima e os resultados para a detecção de SNP: O método usa um braço sensor da *partizima* B truncada é completamente emparelhada a uma versão de SNP, e um oligonucleotídeo estabilizador que facilita a combinação da MNAzima na presen-

15 ça do alvo completamente emparelhado. O requerimento para estrita complementaridade da braço sensor da *partizima* B e o ácido nucléico-alvo permite a discriminação de seqüências intimamente relacionadas. Quadro (i): Braço sensor de 5 bases completamente emparelhado mais oligonucleotídeo estabilizador; Quadro (ii): Braço sensor de 5 bases desemparelhado mais

20 oligonucleotídeo estabilizador; Quadro (iii): Nenhum controle do estabilizador; Quadro (iv): No controle do alvo; Quadro (v): Resultados da detecção da MNAzima SNP com alvo completamente emparelhado, alvo desemparelhado, nenhum controle do estabilizador e nenhum controle do alvo.

25 A Figura 24 representa uma adaptação da detecção com MNAzima para produzir uma reação de mudança de cor: O método usa partículas de ouro nanométricas com oligonucleotídeos anexados, as quais, quando ligadas por oligonucleotídeos em ponte, formam um agregado azul (quadro i). Os oligonucleotídeos em ponte incorporam uma seqüência de substrato.

30 Na presença do alvo (quadro ii), a MNAzima se combina e cliva a seqüência do substrato, liberando partículas de ouro individuais, e resultando em uma mudança de cor de azul para vermelho que é visível a olho nu.

A Figura 25 é um exemplo de uma cascata de MNAzimas, usando *partizimas* amarradas: MNAzimas podem ser usadas para iniciar cascatas de ampliação de sinais, como ilustrado neste diagrama. A reação contém os seguintes elementos: (i) *partizimas* para a MNAzima 1 que estão livres em solução; (ii) um facilitador de combinação para as MNAzimas 2 e 3 (que têm os mesmos braços sensores), que está livre em solução (como ilustrado) ou amarrado a um suporte insolúvel pelo substrato, Sub 1; (iii) *partizimas* para a MNAzima 2, que estão amarradas a um suporte insolúvel pelo substrato, Sub 1. Sub 1 pode ser clivado pela MNAzima 1 (na presença de um alvo) ou MNAzima 3 (na presença de um facilitador de combinação), e a clivagem resulta na liberação das *partizimas* para MNAzima 2 em solução; (iv) *partizimas* para a MNAzima 3, que estão amarradas a um suporte insolúvel pelo substrato, Sub 2. Sub 2 pode ser clivado pela MNAzima 2 (na presença de um facilitador de combinação) e a clivagem resulta na liberação das *partizimas* para a MNAzima 3 em solução; (v) Sub 2-FQ, que tem a mesma sequência que Sub 2, mas está livre em solução e é duplamente rotulado com um fluoróforo (F) e um *quencher* (Q). Sub 2-FQ pode ser clivado pela MNAzima 2 para gerar um sinal fluorescente. Na presença do alvo, a MNAzima 1 ativa se forma a partir de *partizimas* que estão livres em solução. A MNAzima 1 cliva seu Sub 1, liberando assim as *partizimas* para a MNAzima 2. Depois de livres, estas *partizimas* hibridizam com o facilitador de combinação e formam a MNAzima 2, que cliva Sub 2-FQ livre (gerando um sinal fluorescente), ou Sub 2 amarrado (liberando as *partizimas* para a MNAzima 3). Como a MNAzima 3 cliva os mesmos braços de substrato que a MNAzima 1, ela pode clivar também Sub1 amarrado, liberando assim mais *partizimas* para MNAzima 2. Isto resulta em uma cascata de geração enzimática dos componentes (*partizimas*) para mais enzimas (MNAzimas) e uma concomitante cascata de ampliação de sinais.

DEFINIÇÕES

São utilizados aqui certos termos cujos significados estão enunciados abaixo.

O termo "compreendendo" significa "incluindo principalmente,

mas não necessariamente unicamente". Além disso, as variações da palavra "compreendendo", tais como "compreender" e "compreende", têm significados correspondentemente variados.

Os termos "polinucleotídeo", "ácido nucléico" e "oligonucleotídeo" podem ser utilizados de forma intercambiável e referem-se a um polímero de filamento único ou filamento duplo de bases de desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo, ou análogos, derivados, variantes, fragmentos ou combinações deles, incluindo, porém sem limitações, DNA, DNA metilado, DNA alquilado, RNA, RNA metilado, microRNA, siRNA, shRNA, tRNA, mRNA, 10 NA, snoRNA, stRNA, smRNA, pré- e primicroRNA, outros RNAs não-codificadores, RNA ribossômico, derivados deles, amplicons deles, ou qualquer combinação deles. A título exemplificativo não-limitativo, a fonte de um ácido nucléico pode ser selecionada no grupo que compreende uma fonte sintética, mamífera, humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana, *Archaea*, 15 ou qualquer combinação delas.

Os termos "oligonucleotídeo" e "iniciador" denotam tipicamente um segmento de DNA ou uma molécula de ácido nucléico que contém DNA, ou RNA ou molécula que contém RNA, ou uma combinação deles. Os exemplos de oligonucleotídeos incluem alvos de ácidos nucléicos; substratos, 20 por exemplo, aqueles que podem ser modificados por uma MNAzima; iniciadores tais como aqueles usados para ampliação do alvo *in vitro* por métodos tais como PCR; e componentes de MNAzimas. Os facilitadores de combinação de MNAzimas, em certas modalidades, podem compreender oligonucleotídeos como aqui definidos. As *partizimas*, como aqui utilizadas, também 25 podem compreender oligonucleotídeos.

Os termos "polinucleotídeo", "ácido nucléico" e "oligonucleotídeo" incluem referência a qualquer seqüência especificada, bem como a seqüência complementar a ela, a menos que diferentemente indicado. Os oligonucleotídeos podem compreender pelo menos uma adição ou substituição, 30 incluindo, porém sem limitações, o grupo que compreende 4-acetilcitidina, 5-(carbóxi-hidróxi-metil)-uridina, 2'-O-metil-guanosina, inosina, N6-isopentenil-adenosina, 1-metil-adenosina, 1-metil-pseudouridina, 1-metil-

guanosina, 1-metil-inosina, 2,2-dimetil-guanosina, 2-metil-adenosina, 2-metil-
 guanosina, 3-metil-citidina, 5-metil-citidina, N6-metil-adenosina, 7-metil-
 guanosina, 5-metil-amino-metil-uridina, 5-metóxi-amino-metil-2-tiouridina,
 beta-D-manosil-metil-uridina, 5-metóxi-carbonil-metil-uridina, 5-metóxi-uridina,
 5 2-metil-tio-N6-isopentenil-adenosina, N-((9-beta-ribofuranosil-2-metil-tiopurin-
 6-il)-carbamoil)-treonina, N-((9-beta-ribofuranosil-purin-6-il)-N-metil-
 carbamoil)-treonina, uridino-5-oxoacetato de metila, ácido uridino-5-
 oxiacético (v), wibutosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-
 tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metil-uridina, N-((9-beta-ribofuranosil-
 10 purin-6-il)-carbamoil)-treonina, 2'-O-metil-5-metil-uridina, 2'-O-metil-
 uridina, wybutosina, 3-(3-amino-carbóxi-propil)-uridina, beta-D-arabinosil-
 uridina, beta-D-arabinosil-timidina.

Os termos "molécula de ácido nucléico catalítico", "ácido nucléi-
 co catalítico", "enzima de ácido nucléico" e "seqüência de ácido nucléico ca-
 15 talítico" são aqui utilizados de forma intercambiável e devem significar uma
 molécula de DNA ou molécula que contém DNA (conhecida também nessas
 técnicas como "enzima de DNA", "desoxirribozima" ou "DNAzima"), ou um
 RNA ou molécula que contém RNA (conhecida nessas técnicas também
 como uma "enzima de RNA" ou "ribozima"), ou uma combinação deles, sen-
 20 do uma molécula híbrida de DNA-RNA, que pode reconhecer um substrato e
 catalisam uma modificação do substrato. Os resíduos de nucleotídeos nos
 ácidos nucléicos catalíticos podem incluir as bases A, C, G, T, e U, bem co-
 mo derivados e análogos deles.

O termo "derivado", quando utilizado com relação a um ácido
 25 nucléico ou nucleotídeo da presente invenção inclui quaisquer ácidos nucléi-
 cos ou nucleotídeos funcionalmente equivalentes, incluindo quaisquer molé-
 culas de fusão produzidas integralmente (por exemplo, por meios recombi-
 nantes) ou adicionadas após a síntese (por exemplo, por meios químicos).
 Tais fusões podem compreender oligonucleotídeos da invenção com RNA
 30 ou DNA adicionados a elas ou conjugados a a um polipeptídeo (por exem-
 plo, puromicina ou outro polipeptídeo), uma molécula pequena (por exem-
 plo, psoraleno) ou um anticorpo.

O termo "análogo", quando utilizado com relação a um ácido nucléico ou nucleotídeo inclui um composto que tem uma estrutura física que está relacionada a uma molécula ou resíduo de DNA ou RNA, pode ser capaz de formar uma ponte hidrogênio com um resíduo de DNA ou RNA ou um análogo dele (isto é, ele é capaz de anelar com um resíduo de DNA ou RNA ou um seu análogo para formar um par de bases), mas tal ligação não é necessária para que o dito composto esteja englobado dentro do termo "análogo". Tais análogos podem possuir propriedades químicas e biológicas diferentes do resíduo de ribonucleotídeo ou desoxirribonucleotídeo ao qual eles estão estruturalmente relacionados. Os resíduos metilados, iodados, bromados ou biotinilados são exemplos de análogos. Foram descritas DNAzimas ativas que contêm análogos de nucleotídeos, incluindo desoxiinosina, C-5-imidazol desoxiuridina, 3-(amino-propinil)-7-desaza-dATP, 2'-O-metil-RNA, 2'-O-metil cap (Warashina *et al.*, 1999; Cairns *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2004; Sidorov *et al.*, 2004). Outros análogos são compatíveis com a atividade catalítica de DNAzimas. A alteração de uma sequência de ácido nucléico catalítico, por exemplo, pela substituição de uma base por outra, pela substituição de uma base por um análogo, ou alteração do componente açúcar ou da cadeia principal fosfodiéster, pode ser simples para os versados nessas técnicas. Por exemplo, alterações podem ser feitas durante a síntese, ou por modificação de bases específicas depois da síntese. Testes empíricos de ácidos nucléicos catalíticos que incorporam alterações, tais como mudanças ou análogos de bases permitem a avaliação do impacto das sequências alteradas, ou análogos específicos, sobre a atividade catalítica. Os análogos das bases A, C, G, T e U são conhecidos nessas técnicas, e um subconjunto está listado na Tabela 2.

Tabela 2

Exemplos análogos de nucleotídeos úteis nesta invenção

Abreviatura	Nome
ac4c	4-acetil-citidina
chm5u	5-(carbóxi-hidróxi-metil)-uridina
Cm	2'-O-metil-citidina
Cnm5s2u	5-carbóxi-metil-amino-metil-tiouridina
D	Diidrouridina
Fm	2'-O-metil-pseudouridina
Galq	beta,D-galactosilqueosina
Gm	2'-O-metil-guanosina
I	Inosina
i6a	N6-isopentenil-adenosina
m1a	1-metil-adenosina
m1f	1-metil-pseudouridina
m1g	1-metil-guanosina
MI1	1-metil-inosina
m22g	2,2-dimetil-guanosina
m2a	2-metil-adenosina
m2g	2-metil-guanosina
m3c	3-metil-citidina
m5c	5-metil-citidina
m6a	N6-metil-adenosina
m7g	7-metil-guanosina
mam5u	5-metil-amino-metil-uridina
mam5s2u	5-metóxi-amino-metil-2-tiouridina
Manq	beta,D-manosil-metil-uridina
mcm5s2u	5-metóxi-carbonil-metil-uridina
Mo5u	5-metóxi-uridina
Ms2i6a	2-metil-tio-N6-isopentenil-adenosina
Ms2t6a	N-((9-beta-ribofuranosyl-2-metil-tiopurin-6-il)-

	carbamoil)-treonina
Mt6a	N-((9-beta-ribofuranosil-purin-6-il)N-metil-carbamoil)-treonina
Mv	Uridino-5-oxiacetato de metila
o5u	Ácido uridino-5-oxiacético (v)
Osyw	Wibutosina
P	Pseudouridina
Q	Queosina
s2c	2-tiocitidina
s2t	5-metil-2-tiouridina
s2u	2-tiouridina
s4u	4-tiouridina
T	5-metil-uridina
t6a	N-((9-beta-D-ribofuranosil-purin-6-il)-carbamoil)-treonina
Tm	2'-O-metil-5-metil-uridina
Um	2'-O-metil-uridina
Yw	Wybutosina
X	3-(3-amino-3-carbóxi-propil)-uridina, (acp3)u
AraU	Beta,D-arabinosil-uridina
AraT	Beta,D-arabinosil-timidina

O termo "fragmento", quando utilizado com relação a um ácido nucléico refere-se a um constituinte deste ácido nucléico. Tipicamente, o fragmento possui atividade biológica qualitativa em comum com o ácido nucléico, embora isto não tenha de ser necessariamente o caso. Os fragmentos de um ácido nucléico não precisam necessariamente codificar polipeptídeos que retêm atividade biológica. Ao invés disso, um fragmento de ácido nucléico pode, por exemplo, ser útil como uma sonda de hibridização ou oligonucleotídeo de PCR. O fragmento pode ser derivado de um ácido nucléico da invenção ou alternativamente pode ser sintetizado por algum outro meio, por exemplo, síntese química.

O termo "variante", como aqui utilizado, refere-se a seqüências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos substancialmente similares. Geralmente, as variantes de seqüências possuem atividade biológica em comum. Além disso, tais variantes de seqüências podem compartilhar pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüências. Estão incluídos também dentro do significado do termo "variante" os homólogos, que são tipicamente um polipeptídeo ou ácido nucleico de species diferentes, mas que compartilham substancialmente a mesma função ou atividade biológica que o polipeptídeo ou ácido nucleico correspondente aqui descrito.

O termo "alta severidade", como aqui utilizado, refere-se às condições sob as quais dois ácidos nucleicos podem ser hibridizados, e podem incluir, por exemplo, a concentração de sais e/ou detergentes em uma solução, a temperatura de uma solução que é usada durante a hibridização dos dois ácidos nucleicos e o período de tempo da hibridização. Conseqüentemente, o termo "alta severidade", como aqui utilizado, refere-se a condições em uma solução, que levam à hibridização de dois ácidos nucleicos apenas quando tais ácidos nucleicos compartilham um alto grau de complementaridade. O grau de complementaridade pode incluir, porém sem limitações, uma faixa entre cerca de 50% e 99%. Assim sendo, as condições de "alta severidade" podem envolver, porém sem limitações, o uso de temperatura variada e um tampão que compreende várias concentrações de detergentes, sais, e cátions bivalentes.

Os termos "molécula facilitadora de combinação", "facilitador de combinação", "molécula facilitador de combinação de MNAzima", "facilitador" e "facilitador de combinação de MNAzima", como aqui utilizados, referem-se a entidades que podem facilitar a autocombinação de *partizimas* componentes para formar uma MNAzima cataliticamente ativa. Em modalidades preferidas, um facilitador de combinação é necessário para a autocombinação de uma MNAzima. Um facilitador de combinação, em algumas modalidades, compreende um alvo tal como um ácido nucleico ou analisado diferente de ácido nucleico. As moléculas facilitadoras de combinação podem compreen-

der uma ou mais regiões ou moléculas que podem formar um par ou se ligar a uma ou mais "*partizimas*" de oligonucleotídeos, que constituem componentes ou partes de uma "MNAzima". Não é necessário que o facilitador de combinação interaja com, forme par com, ou se ligue a cada componente

5 *partizima* ou oligonucleotídeo, desde que ele interaja com, forme par com, ou se ligue a pelo menos um dos componentes *partizimas* de uma MNAzima. Como aqui utilizadas, pretende-se que as moléculas facilitadoras de combinação de MNAzimas englobem a mais ampla faixa de constituintes que podem facilitar a autocombinação de uma MNAzima. Em algumas modalidades,

10 des, um facilitador de combinação pode compreender um ácido nucléico. Em outras modalidades, um facilitador de combinação pode compreender qualquer célula ou qualquer parte dela, por exemplo, qualquer célula eucariótica ou procariótica, um vírus, prion, levedura ou fungo, ou qualquer outra molécula, incluindo, porém sem limitações, uma proteína, polipeptídeo, peptídeo ou ácido nucléico. Em outras modalidades, um facilitador de combinação

15 pode compreender um vírus, prion, levedura ou fungo, ou qualquer outra molécula, incluindo, por exemplo, porém sem limitações, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, organismos inteiros, células, vírus, bactéria, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos,

20 nos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles.

O termo "alvo", como aqui utilizado, inclui qualquer entidade, constituinte, ou analisado natural ou sintético que se busca detectar, identificar ou quantificar por uma ou mais MNAzimas específicas. Os alvos, portanto,

25 englobam a mais ampla faixa de entidades, constituintes, ou analisados detectáveis para os quais os métodos de detecção, identificação e/ou quantificação sensível são desejáveis. Em algumas modalidades, um alvo compreende um facilitador de combinação. Alguns alvos exemplificativos incluem, porém sem limitações, proteínas, polipeptídeos, peptídeos ou ácidos

30 nucléicos, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, organismos inteiros, células, vírus, bactérias, *Archaea*, leveduras, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, políme-

ros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles. Outros alvos também são considerados para o uso em questão.

Os termos "substrato", "molécula de substrato" e "substrato químico", como aqui utilizados, incluem qualquer molécula que é capaz de ser reconhecida, e atuada ou quimicamente modificada por uma molécula catalítica. Em modalidades específicas, o substrato pode ser reconhecido e modificado por uma enzima. Em outras modalidades, um substrato pode ser reconhecido e modificado por uma molécula de ácido nucléico catalítico. A modificação química de um substrato pode ser medida pelo aparecimento de, ou um aumento em um produto da reação de modificação, ou pelo desaparecimento de, ou decréscimo em um substrato da reação ou reações de modificação. Uma molécula catalítica específica pode reconhecer uma ou mais moléculas de substrato diferentes, desde que cada molécula de substrato tenha pelo menos uma estrutura mínima que é reconhecível quanto à atividade catalítica pela molécula catalítica.

Um "substratorepórter", "sonda-repórter" ou "substrato de sonda-repórter", como aqui utilizado, é um substrato que é particularmente adaptado para facilitar a medição do desaparecimento de um substrato ou do aparecimento de um produto com relação a uma reação catalisada. Os substratos-repórteres podem estar livres em solução ou ligados (ou "amarrados"), por exemplo, a uma superfície ou a outra molécula. Um substratorepórter pode ser rotulado por qualquer um entre uma grande série de meios, incluindo, por exemplo, fluoróforos (com ou sem um ou mais componentes adicionais, tais como *quenchers*), rotuladores radioativos, marcação com biotina (por exemplo, biotinilação) ou rotuladores quimioluminescentes. Os substratos-repórteres para ácidos nucléicos para ácidos nucléicos catalíticos podem incluir também enzimas protéicas ou de ácidos nucléicos, por exemplo, afixadas de forma covalente aos seus terminais.

Como aqui utilizados, subatratos "genéricos" ou "universais" são, por exemplo, substratos-repórteres, que são reconhecidos e atuados cataiticamente por uma pluralidade de MNAzimas, cada uma das quais podendo

reconhecer um alvo diferente. O uso de tais substratos possibilita o desenvolvimento de ensaios separados para a detecção, identificação ou quantificação de uma ampla série de alvos, usando MNAzimas estruturalmente relacionadas, sendo que todas elas reconhecem um substrato universal. Este substratos universais podem ser rotulados independentemente com um ou mais rotuladores. Em modalidades preferidas, são usados rotuladores detectáveis independentemente para marcar um ou mais substratos genéricos a fim de permitir a criação de um sistema conveniente para detectar independentemente ou simultaneamente uma série de alvos usando MNAzimas.

10 Como aqui utilizados, os termos "*partizima*", "componente *partizima*" e "componente oligonucleotídeo" referem-se a um oligonucleotídeo que contém DNA ou que contém RNA ou que contém DNA-RNA, dois ou mais dos quais, apenas na presença de uma molécula facilitadora de combinação de MNAzima, podem em conjunto formar uma "MNAzima". Em certas
15 modalidades preferidas, um ou mais componentes *partizimas*, e de preferência pelo menos dois, podem compreender três regiões ou domínios: um domínio "catalítico", que forma parte do núcleo catalítico da MNAzima que catalisa uma modificação química; um domínio de "braço sensor", que pode se associar e/ou se ligar a um facilitador de combinação (por exemplo, um alvo); e um domínio de "braço de substrato", que pode se associar e/ou se
20 ligar a um substrato. Uma representação destas regiões ou domínios pode ser observada, por exemplo, na Figura 1. Uma *partizima* pode compreender uma ou mais moléculas. As *partizimas* podem compreender pelo menos um componente adicional, incluindo, porém sem limitações, um aptâmero, aqui
25 referido como "*apta-partizima*". Uma *partizima* pode incluir também um substrato, como pode ser observado, por exemplo, na Figura 25.

O termo "MNAzima", como aqui utilizado, refere-se a duas ou mais seqüências de oligonucleotídeo (por exemplo, *partizimas*) que, apenas na presença de uma molécula facilitadora da combinação de MNAzima (por
30 exemplo, um alvo), formam uma enzima de ácido nucléico ativa que é capaz de modificar cataliticamente um substrato. Uma MNAzima exemplificativa, que compreende a *partizima* A e a *partizima* B, está representada na Figura

1. Fazendo referência à Figura 1, as *partizimas* de DNA A e B se ligam a um alvo (por exemplo, através do pareamento de bases de Watson-Crick com um ácido nucléico-alvo). A MNAzima se forma apenas quando os braços sensores das *partizimas* A e B hibridizam proximamente uma da outra no
5 alvo. Os braços de substrato da MNAzima engatam no substratorepórter, cuja clivagem é catalisada pelo núcleo catalítico da MNAzima, formada pela interação dos domínios catalíticos das *partizimas* A e B. A MNAzima cliva o substrato entre um par de corantes fluoróforo e *quencher*, gerando assim um sinal. A clivagem de uma quimera DNA/RNA (substratorepórter) está exem-
10 plificada no desenho. Os termos "enzimas de ácido nucléico multicomponentes" e "MNAzima" são aqui utilizados de forma intercambiável e compreendem estruturas bipartidas, constituídas de duas moléculas, ou estruturas tri-
partidas constituídas de três moléculas de ácidos nucléicos, ou outras estruturas multipartidas, por exemplo, aquelas formadas por quatro ou mais mo-
15 léculas de ácidos nucléicos. Uma MNAzima pode compreender também um oligonucleotídeo estabilizador que proporciona estabilidade da MNAzima interagindo com um facilitador de combinação ou substrato. É evidente que a formação de uma MNAzima requer a combinação de pelo menos os compo-
nentes *partizimas* com o facilitador de combinação, bem como a ligação de
20 um substrato, para que a atividade catalítica seja detectável, e que a ausência de qualquer um destes componentes resulte em uma falta de atividade catalítica.

Como aqui utilizado, o termo "aptâmero" pode compreender uma estrutura que tem a capacidade de reconhecer um ou mais ligantes. Por e-
25 xemplo, o reconhecimento pode ter um alto grau de especificidade devido a uma estrutura de nível mais alto do aptâmero, tal como um domínio ou bolsa de ligação tridimensional. Os aptâmeros podem, portanto, se ligar a uma proteína, polipeptídeo, peptídeo ou ácido nucléico, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, antibocorpos, meta-
30 bólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos inteiros, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou qualquer derivado, parte ou combinação deles, ou qualquer outra entidade.

Os aptâmeros preferidos neste caso podem compreender oligômeros de DNA ou RNA curtos de filamento único, que podem ser isolados a partir de bibliotecas complexas de ácidos nucleicos sintéticos por um processo iterativo de adsorção, recuperação, ereampliação. Os aptâmeros podem, portanto, ser gerados contra qualquer alvo, desde moléculas pequenas tais como aminoácidos, ou antibióticos até estruturas de proteínas e ácidos nucleicos.

Como aqui utilizado, o termo "cascata" refere-se a sucessão de processos ou operações que ocorrem em estágios sucessivos, onde a ocorrência de cada estágio é tipicamente dependente da ocorrência de um estágio precedente. Uma cascata pode, portanto, incluir, porém sem limitações, uma cascata enzimática ou qualquer outra cascata de transdução de sinais. Em algumas modalidades, uma cascata pode compreender a ampliação de um sinal resultante da atividade catalítica de uma MNAzima. Em modalidades preferidas, tal cascata de ampliação pode envolver a ampliação repetida, e portanto, cíclica, de um sinal, onde a atividade catalítica de uma primeira MNAzima torna disponível uma molécula requerida para a atividade catalítica de uma segunda MNAzima, a qual, por sua vez, torna disponível uma molécula requerida para a atividade catalítica da primeira MNAzima. Em algumas modalidades, a molécula requerida pode compreender uma *partizima*, uma enzima, um facilitador de combinação, um substrato, um alvo, uma parte ou fragmento deles ou uma combinação deles. Em algumas modalidades, uma cascata pode, portanto, envolver a produção de um efeito cumulativo, e assim sendo, detectar um alvo de baixa abundância, gerando um sinal até um nível no qual ele pode ser detectado. Em outras modalidades, mais do que dois estágios catalíticos podem ser empregados. A cascata pode ser linear. Em uma modalidade preferida, a cascata pode ser exponencial.

Como aqui utilizados, os termos "inibidor" ou "inibidor de combinação" incluem, porém sem limitações, qualquer proteína, polipeptídeo, peptídeo ou ácido nucleico, RNA, DNA, análogos de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de peptídeos-ácidos nucleicos, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contami-

nantes, venenos, organismos inteiros, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, prions ou qualquer derivado, parte ou combinação deles, ou qualquer entidade ou molécula que interage com um ou mais componentes de uma MNazima como aqui definida, ou que interage com um substrato ou facilitador de combinação, de modo a impedir a combinação de uma MNazima. Um "inibidor" ou "inibidor de combinação" não precisa estar em proximidade física de uma MNazima, mas, a título exemplificativo não-limitativo, pode se ligar competitivamente a uma parte componente de uma MNazima, substrato ou facilitador de combinação, impedindo desta forma de ficarem disponíveis para a combinação da MNazima. Tal ligação pode incluir, por exemplo, um ácido nucléico inibitório que é complementar a um oligonucleotídeo que compreende uma parte componente de uma MNazima.

As seguintes abreviaturas são aqui utilizadas e neste relatório descritivo inteiro:

- 15 *MNAzima*: enima de ácido nucléico multicomponente, ou enzima de ácido nucléico multipartida;
- DNAzima*: enzima de ácido desoxirribonucleico;
- RNAzima*: enzima de ácido ribonucleico, ou ribozima;
- PCR*: reação de polimerase em cadeia;
- 20 *SDA*: ampliação por deslocamento de filamento;
- LAMP*: ampliação isotérmica mediada por alça;
- RCA*: ampliação *rotação circular*;
- TMA*: ampliação mediada por transcrição;
- 3SR*: replivação de seqüências auto-sustentada;
- 25 *NASBA*: ampliação baseada em seqüências de ácidos nucléicos;
- dH₂O*: água destilada desmineralizada;
- LNA*: locked nucleic acid;
- PNA*: ácido nucléico peptídico;
- bDNA*: ensaio de DNA ramificado;
- 30 *FCS*: espectroscopia por correlação de fluorescência;
- TSA*: ampliação por sinal de tiramida;
- An*: analisado ou alvo;

- F*: fluoróforo;
- Q*: *quencher*;
- miR*: microRNA;
- N*= A, C, T, G, ou qualquer análogo deles;
- 5 *N'*= qualquer nucleotídeo complementar a *N*, ou capaz de parear bases com *N*;
- (N)_x*: qualquer número de *N*;
- (N')_x*: qualquer número de *N'*;
- W*: A ou T;
- 10 *K*: A, G, ou AA;
- rN*: qualquer base de ribonucleotídeo;
- (rN)_x*: qualquer número de *rN*;
- rR*: A ou G;
- rY*: C ou U;
- 15 *M*: A ou C;
- H*: A, C, ou T;
- D*: G, A, ou T;
- JOE* ou *6-JOE*: 6-carbóxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetóxi-fluoresceína;
- FAM* ou *6-FAM*: 6-carbóxi-fluoresceína.
- 20 *BHQ1*: *Black Hole Quencher 1*
- BHQ2*: *Black Hole Quencher 2*
- M-MLV RT (H-)*: Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney, RNase H Menos
- shRNA*: RNA grampo curto
- 25 *siRNA*: RNA interferente curto
- mRNA*: RNA mensageiro
- tRNA*: RNA de transferência
- snoRNA*: RNA nucleolar pequeno
- stRNA*: RNA temporal pequeno
- 30 *smRNA*: RNA modulador pequeno
- pre-microRNA*: microRNA precursor
- primicroRNA*: microRNA primário

DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

Deve-se entender ao final que as figuras e os exemplos aqui fornecidos são para exemplificar e não para limitar a invenção e suas várias modalidades.

- 5 De acordo com a presente invenção, as composições, métodos e *kits* são fornecidos para a detecção, identificação e/ou quantificação de um alvo. Os métodos compreendem geralmente o uso de composições que compreendem enzimas de ácidos nucleicos multicomponentes ou multipartidas que são formadas, de preferência, enzimas de ácidos nucleicos que são
- 10 formadas, de preferência, por múltiplos componentes ácidos nucleicos que se autocombinam para formar uma enzima de ácido nucleico ativa na presença de um facilitador de combinação. Em modalidades preferidas, o facilitador de combinação é o alvo, e portanto, as enzimas de ácidos nucleicos multicomponentes se formam apenas na presença do alvo.

15 1. Composições - MNAzimas

- As enzimas de ácidos nucleicos multicomponentes (referidas aqui também igualmente como enzimas de ácidos nucleicos multipartidas ou "MNAzimas") são capazes de se autocombinar a partir de dois ou mais componentes oligonucleotídeos, aqui referidos também como *partizimas*. Os oligonucleotídeos *partizimas* se autocombinam na presença de um facilitador de autocominação de MNAzima para formar uma MNAzima. As MNAzimas são, portanto, enzimas de ácidos nucleicos cataliticamente ativas. Em algumas modalidades, a presença de uma MNAzima pode ser detectada, e é
- 20 indicativa da presença de um alvo, porque a MNAzima se forma apenas na presença do alvo, onde o alvo compreende o facilitador de combinação. Vários ensaios baseados nos princípios básicos delineados acima são aqui fornecidos. As composições que compreendem oligonucleotídeos capazes de formar MNAzimas, e MNAzimas com várias seqüências são também aqui fornecidas. Em algumas modalidades pelo menos um entre os componentes
- 25 oligonucleotídeos, o facilitador de combinação ou o substrato pode incluir/compreender também um aptâmero que é capaz de se ligar a um alvo.

Em modalidades preferidas, as estruturas de MNAzimas se ba-

seiam em uma ou mais DNAzimas e/ou ribozimas. As mais preferidas são aquelas estruturas de MNAzimas que se baseiam em uma estrutura de DNAzima específica. As estruturas preferidas atualmente se baseiam em DNAzimas que incluem as DNAzimas 10:23 e 8:17. Em várias modalidades,

5 as MNAzimas compreendem bases de ribonucleotídeos e também de desoxirribonucleotídeos. Em modalidades mais preferidas, uma estrutura de MNAzima baseia-se, pelo menos em parte, na estrutura de uma DNAzima. Em outras modalidades preferidas, as MNAzimas compreendem pelo menos algumas bases de desoxirribonucleotídeos ou seus análogos. Em modalidades

10 mais preferidas, o núcleo catalítico de uma MNAzima compreende uma ou mais bases de desoxirribonucleotídeos ou seus análogos. Em modalidades ainda mais preferidas, uma ou mais bases de desoxirribonucleotídeos ou seus análogos estão envolvidos na catálise de um substrato. Em outras modalidades, pelo menos uma base de desoxirribonucleotídeo, ou seu aná-

15 logo, no núcleo catalítico, melhora a atividade catalítica. Em ainda outras modalidades, há um requisito estrito para pelo menos uma base de desoxirribonucleotídeo, ou seu análogo, no núcleo catalítico da MNAzima, que a catálise ocorra em uma taxa mensurável, em relação àquela de uma MNAzima comparável sem a base de desoxirribonucleotídeo presente.

20 Como aqui estabelecido, as MNAzimas podem conter uma ou mais substituições, tais como análogos, derivados, bases modificadas ou alteradas, ribonucleotídeos, alterações da cadeia principal de açúcares ou fosfatos, várias deleções, inserções, substituições ou outras modificações, ou qualquer combinação delas, bem-conhecidas pelos versados nessas técnicas. Tais modificações, substituições, deleções, inserções, etc., podem ser

25 feitas nos braços sensores e/ou do substrato e/ou nas partes do núcleo catalítico, como aqui demonstrado, de tal modo que a molécula retenha a atividade catalítica. As substituições e modificações nos braços que ligam o substrato ou o facilitador de combinação podem ser bem-toleradas e, de fato, são a base para permitir a individualização das moléculas para diferentes

30 substratos/facilitadores de combinação. Por exemplo, uma modificação dos braços sensores permitirá individualizar para diferentes facilitadores de com-

binação, enquanto que a modificação dos braços do substrato permitirá a individualização para diferentes substratos.

Portanto, em certas modalidades preferidas, a invenção engloba MNazimas com atividade catalítica, que compreendem desoxirribonucleotídeos, ou que são derivadas a partir dessas moléculas por certas modificações/substituições, etc. Como regra geral, a substituição da molécula inteira, por exemplo, por ribonucleotídeos, tornará a molécula inativa porque sua atividade depende de certos desoxirribonucleotídeos fundamentais. De uma maneira correspondente, alguns ribonucleotídeos em uma ribozima podem ser substituídos por desoxirribonucleotídeos, mas a substituição da molécula inteira, por exemplo, por desoxirribonucleotídeos, tornará a molécula inativa.

Os versados nessas técnicas devem avaliar que as MNazimas compreendem desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, ou mesmo ambos. Estas MNazimas que compreendem pelo menos um, e mais preferivelmente, todos oligonucleotídeos de componentes desoxirribonucleotídeos, são atualmente preferidos. São também preferidas as MNazimas que compreendem pelo menos uma desoxirribonucleotídeo, ou seu análogo, dentro do núcleo catalítico da MNazima. São ainda mais preferidas as modalidades nas quais essa base é necessária para a atividade catalítica.

Os versados nessas técnicas devem avaliar também que as DNAzimas multipartidas têm vantagens sobre ribozimas multipartidas, por exemplo, com relação à estabilidade e facilidade de uso. Assim sendo, as MNazimas multicomponentes aqui fornecidas podem proporcionar uma alternativa atualmente preferida a ribozimas multicomponentes, que também são fornecidas de acordo com várias modalidades. Deve-se avaliar também que, em certas modalidades, as MNazimas oferecem vantagens sobre enzimas de ácidos nucléicos monomoleculares, por exemplo DNAzimas, que podem reconhecer apenas um substrato, enquanto que uma única MNazima pode reconhecer duas moléculas, a saber, um facilitador de combinação (por exemplo, um alvo) e um substrato. Por exemplo, estas propriedades de MNazimas as tornam adaptáveis, por exemplo, para a detecção de alvos, incluindo detecção *in situ*, *in vivo* ou *in vitro*.

2. Métodos que usam MNAzimas para detectar, identificar ou quantificar alvos

A presente invenção fornece vários métodos que empregam o uso de uma ou mais MNAzimas para a detecção, identificação ou quantificação de pelo menos um alvo. Em uma modalidade, o primeiro e o segundo componentes oligonucleotídeos se autocombinam apenas quando entram em contato com uma amostra que contém um facilitador de combinação, sendo que a dita autocombinação da MNAzima cataliticamente ativa indica desta forma a presença do facilitador de combinação, onde o facilitador de combinação é o alvo. Em outras modalidades, tais como, por exemplo, aquelas que envolvem um aptâmero, o facilitador de combinação pode não ser o alvo, e assim sendo pode compreender apenas um elemento necessário para a autocombinação da MNAzima.

Muitas das várias modalidades da invenção podem ser mais bem-entendidas por meio de representações pictóricas. Portanto, fazendo referência às figuras, e de acordo com as composições e métodos aqui enunciados, são fornecidos geralmente métodos baseados em MNAzimas, que permitem a detecção de pelo menos um alvo, usando apenas enzimas de ácidos nucléicos (por exemplo, Figuras 1, 3, 4, 7 – 13, 20, 21, 24, 25) sem a necessidade de enzimas protéicas tais como polimerases. Embora o uso de enzimas protéicas em conjunto com MNAzimas não esteja aqui excluído, e em certas modalidades desta invenção a inclusão de enzimas protéicas seja permissível, ou mesmo preferido, as condições de reação para os métodos que não requerem enzimas protéicas são geralmente menos restritivas e mais facilmente otimizadas, por exemplo, quanto à eficiência da clivagem da MNAzima. A falta de necessidade de enzimas protéicas diminui também geralmente o custo de reagentes.

Como aqui ainda fornecidos, alguns métodos de emprego de MNAzimas para a detecção de alvos não requerem termociclagem e/ou desnaturação de um alvo. Os métodos isotérmicos são mais flexíveis do que os métodos que requerem termociclagem e permitem também a diferenciação entre alvos que compreendem ácido nucléico de filamento único e filamento

duplo. Além disso, a falta de necessidade de termociclagem pode tornar esses métodos mais fáceis e menos onerosos. Os métodos fornecidos de acordo com esta invenção são métodos simples, rápidos, produtivos, isotérmicos, e flexíveis em termos procedimentais para detectar alvos de interesse em uma amostra, que pode ser sintética ou natural.

Certos exemplos aqui fornecidos demonstram a detecção de um ácido nucléico alvo pela combinação específica de alvo de uma MNAzima, levando à clivagem, mediada pela MNAzima, de, por exemplo, um substrato-repórter fluorescente. Além disso, devido à natureza da molécula da MNAzima, as reações podem ser realizadas em uma ampla faixa de temperaturas, sujeitas apenas aos requisitos para a combinação da MNAzima e da modificação catalítica (por exemplo, clivagem) do substrato utilizado.

Um exemplo básico da estrutura de uma MNAzima está representado na Figura 1. A estrutura ilustrada compreende a *partizima* A e a *partizima* B que têm pareamento de bases com um molécula de facilitador de combinação de MNAzima, aqui ilustrada simplesmente como "ALVO". As *partizimas* A e B, ao interagirem com o "ALVO", permitiram que o núcleo catalítico ficasse em estreita proximidade e desta forma se formasse. Os braços de substrato da MNAzima interagiram e parearam bases com um substrato, neste caso substrato-repórter. Assim sendo, a MNAzima se autocombinou e este processo é facilitado através da presença da molécula do facilitador de combinação, o "ALVO". Na ausência do "ALVO", nenhuma MNAzima se formará. A modificação (neste caso, a clivagem) do substrato é catalisada pelo núcleo catalítico da MNAzima no Sítio de Clivagem de MNAzima dentro do substrato, denotado pela seta vertical. O substrato nesta modalidade específica da invenção compreende uma parte detectável que tem um sinal detectável, por exemplo, o fluoróforo F, e uma parte *quencher* que tem um efeito ocultador sobre o sinal detectável F através da ação do *quencher* Q. Depois da clivagem no Sítio de Clivagem da MNAzima, há um aumento substancial no sinal detectável, neste caso a fluorescência, que é facilmente detectável ou quantificado.

A Figura 1 pode ser entendida ainda como representando um

exemplo de um método básico que usa MNAzimas para detectar um alvo, o qual, em algumas modalidades, compreende um facilitador de combinação. A Estratégia 1 (vide Figura 2) usa MNAzimas adaptadas para a detecção dos alvos que incluem DNA, RNA e proteínas. O substratorepórter pode estar livre em solução (Figura 1) ou ligado a um suporte (Figura 3). O sinal pode ser gerado por vários meios, tais como separação dos pares de corantes, fluoróforo F e *quencher* Q (Figuras 1 e 3).

Mais especificamente, a *partizima* A e a *partizima* B estão ilustradas na Figura 1, cada uma compreendendo uma parte ramificada de substrato, uma parte de núcleo catalítico, e uma parte ramificada de sensor. Na presença de um alvo, as partes de braços sensores da *partizima* A e da *partizima* B podem começar a hibridizar e parear bases com partes complementares do alvo, por exemplo, uma seqüência de DNA ou RNA. Depois de entrar em contato com o alvo desta maneira, a MNAzima se autocombina, formando um núcleo catalítico que pode modificar um substrato que está ligado pelos braços de substrato. De preferência, a presença da MNAzima é detectada através da detecção ou medição da sua atividade catalítica. Os braços de substrato da MNAzima assim combinada podem engatar um substrato, por exemplo, o substratorepórter ilustrado na Figura 1, através da interação das seqüências complementares nos braços de substrato e no substrato. Depois que o substrato está assim engatado nos braços de substrato, o núcleo catalítico pode promover a modificação (por exemplo, a clivagem) do substrato, a qual, por sua vez, pode ser medida ou detectada, direta ou indiretamente.

Fazendo referência adicional às figuras, a Figura 2 fornece uma visão geral estilizada de várias aplicações exemplificativas de um ensaio de MNAzima. A Estratégia 1 exemplifica uma aplicação básica do ensaio de MNAzima, como descrito acima. Uma MNAzima constituída de dois oligonucleotídeos separados com seqüências de reconhecimento para um alvo e também um substrato se forma quando os oligonucleotídeos reconhecem e se ligam a um alvo. O substrato, por exemplo, substratorepórter, é modificado pela ação catalítica da MNAzima e causa a geração de um sinal detectá-

vel, seja diretamente (Estratégia 1), durante ou após a ampliação do alvo (Estratégia 2) ou por uma cascata de sinais (Estratégia 3). Em algumas modalidades, a ampliação do alvo e do sinal ocorrem simultaneamente.

Os versados nessas técnicas devem reconhecer que as MNAzimas podem ser usadas em estratégias para a detecção, identificação ou quantificação de facilitadores de combinação que cobrem uma ampla faixa de áreas de aplicação. Estas áreas incluem, porém sem limitações, aplicações médicas, veterinárias, agrícolas, de tecnologia de alimentos, de reprodução de imagens e bioterrorismo.

Deve ficar facilmente evidente para os versados nessas técnicas que as MNAzimas podem ser usadas para detectar, identificar e/ou quantificar alvos em solução. Por exemplo, estratégias que envolvem a detecção, identificação e/ou quantificação de alvos individuais, usando um único substrato, são aplicáveis para tal detecção. Em algumas modalidades, isto pode envolver o uso de um substrato genérico. Múltiplos alvos também podem ser detectados em solução, usando múltiplas MNAzimas que modificam uma série de substratos genéricos, sendo que a modificação de cada substrato resulta em um sinal detectável distintamente, por exemplo, fluorescências diferentes.

3. Métodos que Usam Múltiplas MNAzimas

Os versados nessas técnicas devem reconhecer que os vários ensaios aqui fornecidos podem ser usados geralmente para detectar um único alvo por reação ou ensaio, ou para detectar múltiplos alvos em uma única reação ou ensaio. Quando múltiplos alvos vão ser detectados, uma ou mais MNAzimas podem ser usadas, dependendo do ensaio e do que vai ser detectado. Por exemplo, uma única MNAzima pode ser suficiente quando vão ser detectadas múltiplas estruturas relacionadas, por exemplo, um grupo de seqüências que compartilham uma seqüência crítica (reconhecida pela MNAzima) e que variam apenas, por exemplo, no comprimento ou em seqüência fora da seqüência crítica. Qualquer seqüência com a seqüência crítica poderia ser detectada. Múltiplas MNAzimas seriam úteis quando vão ser detectadas seqüências relacionadas que diferem minimamente, tal como em

apenas um único nucleotídeo ou mesmo quando alvos vastamente diferentes estão sendo detectados, e é desejável conhecer a presença ou ausência de cada um. Similarmente, em algumas modalidades, um único substrato será suficiente, enquanto que em outras, um substrato singular é necessário para detectar cada um entre vários alvos. Em alguns casos, para multiplex, o método requer o uso de um sinal detectável distinto ou singular para cada substrato, a fim de facilitar o desenho do método. Um sinal detectável distinto ou singular para cada substrato pode não ser necessário quando os substratos são afixados a um suporte ou suporte e pode ser distinguido em virtude da sua localização sobre o suporte ou suportes. Estas características do desenho devem ser facilmente entendidas pelos versados nessas técnicas. Em algumas modalidades, os métodos permitem a detecção de uma série de tipos diferentes de alvo em uma reação, por exemplo, um alvo ácido nucléico e uma proteína.

4. Métodos que Usam Ampliação de Alvos

Os versados nessas técnicas devem avaliar facilmente que os métodos aqui descritos podem envolver a ampliação de um alvo antes, durante ou depois da atividade catalítica da MNAzima. Tal ampliação de alvo encontra aplicação específica em modalidades da presente invenção nas quais a quantidade do alvo que se busca ser detectado, identificado ou quantificado é de um valor tal de modo a proporcionar um sinal que de outra forma não seria detectável. Tal ampliação pode compreender uma ou mais entre; reação de polimerase em cadeia (PCR), ampliação por deslocamento de filamento ("SDA"), ampliação isotérmica mediada por alça (LAMP), ampliação *rotação circular* ("RCA"), ampliação mediada por transcrição (TMA), replicação de seqüências auto-sustentada ("3SR"), ou ampliação baseada em seqüências de ácidos nucléicos (NASBA), ou reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR).

A Estratégia 2 (Figura 2) exemplifica o uso de uma MNAzima adaptada para monitorar a acumulação de amplicons durante, ou após a ampliação *in vitro* de alvos ácidos nucléicos. As técnicas para ampliação *in vitro* de seqüências de ácidos nucléicos são bem-conhecidas nesse campo.

Elas incluem técnicas mediadas por uma DNA polimerase, tal como a reação de polimerase em cadeia ("PCR") (vide, por exemplo, patente nº US 4.683.202; patente nº US 4.683.195; patente nº US 4.000.159; patente nº US 4.965.188; patente nº US 5.176.995) (Saiki *et al.*, 1985; Chehab *et al.*, 1987),
 5 ampliação por deslocamento de filamento ("SDA") (Walker *et al.*, 1992), ampliação *rotação circular* ("RCA") (Lizardi *et al.*, 1998), reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR) e ampliação isotérmica mediada com alça ("LAMP") (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002). Outras técnicas de ampliação de alvos são mediadas por uma RNA polimerase, por
 10 exemplo, ampliação mediada por transcrição ("TMA") (Jonas *et al.*, 1993), replicação de seqüências auto-sustentada ("3SR") (Fahy *et al.*, 1991) e ampliação baseada em replicação de seqüências de ácidos nucleicos ("NASBA") (Compton, 1991).

Os produtos da ampliação ("amplicons") produzidos por PCR, RT-PCR, SDA, RCA e LAMP são constituídos de DNA, enquanto que os
 15 amplicons de RNA são produzidos por TMA, 3SR e NASBA.

Fazendo referência adicional à Estratégia 2, como exemplificado na Figura 2, em um dos seus vários aspectos, a invenção fornece métodos para usar MNazimas em conjunto com métodos de ampliação de alvos, que
 20 incluem, por exemplo, as PCR, RT-PCR, SDA, RCA, LAMP, TMA, 3SR and NASBA supramencionadas. Os Exemplos 4, 5, 6, e 9 demonstram a detecção de amplicons de PCR. Nos Exemplos 4, 5, 6, e 9, o ponto final da análise após a PCR facilitou a rápida determinação da presença ou ausência dos ácidos nucleicos-alvos. Os Exemplos 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 19, e 20 e-
 25 xemplificam o monitoramento em tempo real da ampliação por PCR, permitindo assim a quantificação do ácido-nucleico-alvo. A acumulação de amplicons produzidos por PCR, usando razões assimétricas ou simétricas de iniciadores, pode ser monitorada usando MNazimas.

Como pode ser observado na Figura 2 (Estratégia 2), um ácido
 30 nucleico-alvo é ampliado de acordo com um procedimento para ampliar este ácido nucleico (isto é, DNA ou RNA). De preferência, são usados métodos padronizados para ampliação *in vitro*. Os amplicons gerados durante a am-

pliação servem como alvos para uma MNAzima, e assim sendo, a atividade da MNAzima é indicativa da presença do alvo. Os versados nessas técnicas devem avaliar que essa monitoração pode ser conduzida em um único vaso sob condições que permitem a ampliação e a combinação e atividade catalítica da MNAzima, ou o ensaio de MNAzima pode ser conduzido subsequen-

5 temente ou pontualmente no tempo durante a ampliação inteira, removendo amostras no final ou durante o curso das reações de ampliação.

Deve-se avaliar também que os métodos ou protocolos, que combinam ampliação de alvos com atividade catalítica de ácidos nucleicos, podem requerer condições específicas da reação. De preferência, as condi-

10 ções da reação são compatíveis com a atividade de polimerase (para ampliação), e com a modificação catalítica de ácidos nucleicos de um substrato (para detecção). Os protocolos para determinar as condições para a atividade catalítica e atividade de polimerase concomitantes em alta temperatura,

15 tais como durante a PCR, foram descritas para DNAzimas (Impey *et al.*, 2000). A influência de fatores que incluem comprimento dos braços de DNAzimas, tampão, temperatura, concentração de íons bivalentes, e os efeitos de aditivos, foram demonstrados neste trabalho. As enzimas de DNA são apropriadas para uso em combinação com estratégias de ampliação *in vitro*.

20 Por exemplo, elas não são desnaturadas irreversivelmente por exposição a altas temperaturas durante a ampliação.

5. Métodos que Usam Suportes Insolúveis e Sólidos

Deve-se entender também que geralmente os métodos, sejam eles multiplexados ou não, são aplicáveis em solução, ou combinados com

25 um suporte insolúvel ou um suporte sólido, sobre o qual um ou mais entre o substrato, a enzima ou parte deles, o facilitador de combinação de MNAzima e/ou o alvo estão ligados, afixados ou amarrados. Novamente, as características desses sistemas de ensaios serão entendidas geralmente pelos versados nessas técnicas munidos dos métodos e variações aqui exemplificadas

30 e nos exemplos experimentais. Assim sendo, a invenção não deve ser considerada como estando limitada aos ensinamentos literais aqui fornecidos, mas é capaz de ser modificada e variada consistentemente com os princí-

pios e com o âmbito dos ensinamentos aqui fornecidos e com os conhecimentos nessas técnicas.

Fazendo referência à Figura 3, no Quadro (i) está representado um método exemplificativo para detectar alvos usando uma MNazima e um substrato amarrado a um suporte. Nesta modalidade, o substrato é, de preferência, um substrato como ilustrado com uma parte detectável que compreende um sinal detectável, por exemplo, um fluoróforo, e uma parte *quencher* que diminui ou elimina o sinal detectável enquanto a parte detectável e a parte *quencher* do substrato permanecem em estreita proximidade, por exemplo, até que o substrato seja modificado, por exemplo, por clivagem. O substrato é afixado a um suporte. De preferência, o suporte é um material insolúvel, ou uma matriz que retém o substrato e o impede de se mover livremente no volume da mistura reativa. Tais suportes são bem-conhecidos nessas técnicas para imobilizar ou localizar substratos, incluindo ácidos nucleicos-alvo. Os versados nessas técnicas devem avaliar que o suporte pode ser selecionado entre uma ampla série de matrizes, polímeros, e similares, em uma série de formas, incluindo pérolas convenientes para uso em micro-ensaios, bem como outros materiais compatíveis com as condições da reação. Em certas modalidades preferidas, o suporte pode ser um material plástico, tais como pérolas ou bolachas de plástico, ou aquele da cavidade ou tubo no qual um ensaio específico é conduzido.

A afixação do substrato ao suporte é desenhada de tal modo que, depois da modificação, por exemplo, por clivagem, do substrato pela MNazima, a parte detectável ou a parte *quencher*, porém não ambas, permaneça afixada ao suporte, enquanto que a outra é liberada para se mover dentro do volume da mistura reativa, longe da parte remanescente afixada. Assim sendo, em um exemplo de clivagem, o sinal detectável aumenta enormemente à medida que a parte *quencher* e a parte detectável são separadas depois da clivagem. Na modalidade ilustrada na Figura 3, no Quadro (i), a parte detectável que contém fluoróforo permanece afixada depois da clivagem. Isto tem o benefício de permitir a localização do sinal sobre o suporte, mas em certos casos, o(s) fluoróforo(s) pode(m) ser liberado(s) para

dentro da solução. Em outra modalidade na qual, por exemplo, a ligação ocorre, o *quencher* pode ser ligado a um fluoróforo, diminuindo desta forma o sinal detectável.

Fazendo referência à Figura 3, no Quadro (ii), está ilustrado um método multiplexado que compreende múltiplos componentes de MNazimas para produzir múltiplas MNazimas (duas ilustradas) específicas para alvos diferentes. Esta modalidade engloba uma estrutura que compreende um substrato em uma posição específica conhecida, por exemplo, um "*chip*", onde múltiplas posições estão disponíveis para ligar inúmeros substratos, por exemplo, Substrato 1, Substrato 2. A parte detectável de cada substrato pode ser rastreada até sua posição e está amarrada nesse local. Para cada MNazima, por exemplo, MNazima 1, MNazima 2, caso o alvo, por exemplo, Alvo 1, Alvo 2, esteja presente, por exemplo, em uma solução de teste, a MNazima correspondente e específica para esse alvo se autocombinará e será capaz de catalisar a clivagem do seu substrato correspondente, resultando na produção de um sinal nesse local. A posição do sinal detectável identificará, assim, qual MNazima clivou seu substrato, e assim sendo, qual ou quais alvos estão presentes na solução do teste. Nesta modalidade, a modificação do substrato resulta em um sinal identificável em virtude da sua localização. O substrato não precisa de um mecanismo de detecção independentemente identificável, por exemplo, um fluoróforo diferente, embora os versados nas técnicas os versados nessas técnicas devam reconhecer que tal consideração está dentro do âmbito da presente invenção.

As modalidades da presente invenção que englobam um suporte insolúvel na forma de um "*chip*", conhecida de outra forma como um arranjo ou microarranjo compreendem tipicamente uma pluralidade de substratos acoplados, amarrados ou afixados de outra forma ao *chip*. Em modalidades específicas, os substratos compreendem um ácido nucléico. Uma pluralidade de ácidos nucléicos pode ser posicionada em cima do *chip* por qualquer método apropriado nessas técnicas, por exemplo, por pipeta, impressão com jato de tinta, impressão por contato ou fotolitografia. O *chip* pode compreender pelo menos um elemento, sendo que cada elemento compreende pelo

menos um ácido nucléico. Pelo menos um elemento pode compreender uma pluralidade de ácidos nucléicos com a mesma seqüência. O número de elementos que compreendem um *chip* pode ser qualquer número, e quando uma pluralidade de elementos está posicionada sobre um *chip*, os elementos podem ficar espaçados entre si em uma distância uniforme ou variável, ou uma combinação delas. Em algumas modalidades, os elementos podem ficar posicionados aleatoriamente, e a localização de cada elemento é então determinada. O tamanho e o formato dos elementos dependerão da aplicação específica da presente invenção, e elementos com tamanhos e formatos diferentes podem ser combinados em um único *chip*. A superfície do *chip* pode ser substancialmente plana ou pode ter características tais como depressões ou protuberâncias, e os elementos podem ficar posicionados dentro das depressões ou em cima das protuberâncias. Tais depressões podem proporcionar um reservatório para soluções dentro das quais os elementos são imergidos, ou tais protuberâncias podem facilitar a secagem dos elementos. Por exemplo, os elementos podem ser colocados dentro de cada cavidade de uma placa de 96 cavidades. Em algumas modalidades, o *chip* pode incluir identificadores singulares tais como inscrições, rotuladores de radiofrequência, dispositivos integrados tais como microprocessadores, códigos de barra ou outras marcações para identificar cada um dos elementos. Os identificadores singulares podem compreender adicionalmente ou alternativamente as depressões ou protuberâncias sobre a superfície do *array*. Além disso, os identificadores singulares podem proporcionar a orientação ou identificação correta do *chip*. Os identificadores singulares podem ser lidos diretamente por um dispositivo de captura de dados ou por um escaneador ou detector óptico.

6. Sistemas de Substratos-repórteres Usados nos Métodos

São fornecidos também de acordo com a presente invenção sistemas de substratos repórteres genéricos, que permitem o desenvolvimento rápido de ensaios, permitindo que mudanças fáceis de desenho criem novas MNAs que reconhecem diferentes alvos. Como aqui discutido, a parte dos braços de substrato e a parte do núcleo catalítico das *partizimas* podem

permanecer inalteradas, com mudanças apenas na parte dos braços sensores de uma ou mais *partizimas* necessárias para novos alvos. As seqüências de substratos genéricos são fornecidas e o mesmo substrato pode, portanto, ser incorporado em ensaios para muitos alvos diferentes. Além disso, o mesmo substrato pode ser incorporado nos métodos em várias modalidades desta invenção, incluindo ensaios nos quais o substrato está livre em solução ou está amarrado ou afixado a um suporte. Vários substratos genéricos podem ser usados em uma reação multiplex, permitindo a detecção simultânea de múltiplos alvos.

As estratégias com MNAzimas, usando substratos genéricos, oferecem uma vantagem importante sobre tecnologias tais como TaqMan® ou Beacons que requerem o desenho e o uso de sondas específicas para cada novo alvo.

7. Substratos Usados nos Métodos

Como descrito mais detalhadamente abaixo, as MNAzimas têm uma propriedade vantajosa em certas modalidades de serem capazes de utilizar um substrato universal ou genérico. Tal substrato está ilustrado na Figura 1 em uma configuração atualmente preferida, onde o substrato compreende uma parte detectável e uma parte *quencher*. A parte *quencher* é adaptada para diminuir ou eliminar um sinal detectável a partir da parte detectável do substrato até que o substrato seja clivado pela MNAzima. Por exemplo, a parte *quencher* pode compreender "Black Hole Quencher 1" (BHQ1) ou "Black Hole Quencher 2" (BHQ2).

Assim sendo, a MNAzima cliva o substrato entre a parte detectável e a parte *quencher*, permitindo que as duas partes se separem em solução, permitindo desta forma que o sinal detectável apareça ou aumente à medida que a parte *quencher* é distanciada ou efetivamente removida do ambiente local da parte detectável.

O uso do substrato genérico ou universal é habilitado através do desenho das *partizimas* componentes da MNAzima. Alterando apenas os braços sensores das *partizimas*, mas deixando os braços do substrato inalterados, uma grande variedade de MNAzimas específicas para cada um entre

uma pluralidade de alvos pode ser desenhada, todas utilizando um substrato universal para a detecção. Os versados nessas técnicas devem avaliar as vantagens que isto oferece em termos de eliminar a necessidade de substratos individualizados ou singulares para cada alvo. Cada novo alvo requer apenas uma ou mais mudanças em uma ou mais das partes de braços sensores; a parte ramificada de sensor e a parte do núcleo catalítico podem permanecer constantes. Assim sendo, um único substrato-repórter pode ser usado para um único alvo, usando uma MNAzima, e múltiplos alvos em uma série de ensaios, usando MNAzimas alteradas. Uma pluralidade de substratos-repórteres permite multiplexar para detectar múltiplos alvos em um único ensaio, usando múltiplas MNAzimas, uma para cada alvo. Tais métodos multiplexados de usar MNAzimas são realizados facilmente em solução (Figura 18) ou com afixação a um sistema de suporte (Figura 3). Contempla-se aqui que os ensaios multiplexados podem ser, assim, realizados em sistemas que envolvem afixar um ou mais entre o substrato, ou as *partizimas* da MNAzima ou o facilitador de combinação, ou atividades enzimáticas adicionais, a um suporte como aqui descrito.

Além disso, os substratos podem incorporar entidades adicionais, tais como ácidos nucleicos rotulados, nanopartículas, micropartículas, proteínas, anticorpos, RNA, DNA, análogos de ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos bloqueados, quimeras de peptídeos-ácidos nucleicos, ou qualquer combinação deles. Por exemplo, as nanopartículas podem ser nanopartículas de ouro, onde estas nanopartículas de ouro estão associadas com um pluralidade de alvos, tais como ácidos nucleicos.

Os substratos podem ser modificados por uma MNAzima, produzindo desta forma um efeito detectável. No processo de detecção, a modificação do substrato por uma MNAzima pode envolver, por exemplo, clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-carbono, ligações éster ou ligações amida. Como uma consequência da modificação do substrato por uma MNAzima, um efeito detectável é gerado e a magnitude do efeito pode ser, portanto, indicativa da quantidade do alvo que

se busca medir. O efeito detectável pode ser detectado por uma série de métodos, incluindo espectroscopia de fluorescência, ressonância de plasmônios superficiais, espectroscopia de massas, RMN, ressonância *spin* de elétrons, espectroscopia de polarização da fluorescência, dicroísmo circular, imunoensaio, cromatografia, radiometria, fotometria, cintilografia, métodos eletrônicos, UV, espectroscopia em luz visível ou no infravermelho, métodos enzimáticos, ou qualquer combinação deles.

Vários grupos relataram a detecção de ácidos nucleicos-alvo, e outros analisados com leituras colorimétricas (Elghanian *et al.*, 1997, Mirkin *et al.*, 1996, e Liu e Lu, 2004). A estratégia envolve a preparação de bateladas de nanopartículas de ouro, cada uma das quais tendo uma sequência de oligonucleotídeos de DNA distinta afixada à sua superfície. As partículas de ouro podem ser então agregadas pela adição de um "oligonucleotídeo-ponte", que tem complementaridade com as sequências que estão afixadas às partículas de ouro. A agregação das partículas resulta em uma mudança concomitante da cor de vermelho para azul (Mirkin *et al.*, 1996). Um trabalho mais recente demonstrou que a inclusão de uma sequência de DNAzima do substrato dentro do oligonucleotídeo-ponte pode proporcionar um mecanismo para reverter a agregação das partículas de ouro (Liu e Lu, 2004). A ativação das DNAzimas, e a subsequente clivagem do substrato/oligonucleotídeo-ponte, resultou na dissociação das partículas de ouro e uma mudança de cor de azul para vermelho.

Foi desenvolvido um detector simples de condução, baseado no conceito acima, que funcionava explorando a dependência de uma DNAzima sobre a condução para sua atividade catalítica. A DNAzima foi desenhada para clivar um oligonucleotídeo-ponte usado para agregar partículas de ouro (Liu e Lu, 2004). Similarmente, uma aptazima que contém um aptâmero específico para adenosina, e uma DNAzima capaz de clivar um oligonucleotídeo-ponte apenas na presença de adenosina, permitiu a detecção de adenosina em um formato colorimétrico.

8. Otimização dos Métodos

Os versados nessas técnicas devem entender facilmente que os

métodos aqui descritos podem ser otimizados usando uma série de parâmetros experimentais, para otimizar a detecção, identificação e/ou quantificação de um alvo. Os parâmetros experimentais específicos que são otimizados, e o nível de tal otimização, dependerão do método específico que está sendo empregado e do alvo específico que se busca detectar, identificar e/ou quantificar. Tais parâmetros incluem, porém sem limitações, o tempo, temperatura, concentração de sais, detergentes, cátions e outros reagentes que incluem, porém sem limitações, sulfóxido de dimetila (DMSO), e comprimento, complementaridade, teor de GC e ponto de fusão (T_m) de ácidos nucleicos.

Em algumas modalidades, por exemplo, os métodos que envolvem a detecção de variação de seqüências e/ou a detecção de DNA metilado, os parâmetros experimentais, e de preferência, incluindo a temperatura na qual o método é realizado, podem ser otimizados de modo a discriminar entre a ligação de um componente ácido nucleico da MNAzima para um ácido nucleico-alvo, que compreende ou não uma variação de seqüência ou um nucleotídeo metilado, respectivamente. A temperatura na qual esses métodos podem ser realizados pode ficar na faixa entre cerca de 20 °C e cerca de 96 °C, cerca de 20 °C a cerca de 75 °C, 20 °C a cerca de 60 °C ou cerca de 20 a cerca de 55 °C.

Em uma modalidade preferida, são aqui fornecidas as reações otimizadas para praticar os métodos para usar MNAzimas. Nessas reações otimizadas, a atividade catalítica é aumentada em até cerca de 10, 20, ou 30% acima das reações não-otimizadas. As condições mais preferidas da reação melhoram a atividade catalítica em pelo menos 35% ou 40%, e mais preferivelmente, em até 50% ou mais. Em modalidades ainda mais preferidas, as reações otimizadas têm um aumento da atividade catalítica de mais do que 50%, e até 66%, 75% ou mesmo 100%. Em modalidades ainda mais preferidas, um método de reação completamente otimizado deve proporcionar um aumento de 100, 200 ou mesmo 300% ou mais na atividade catalítica. Outras condições preferidas da reação podem melhorar a atividade catalítica em até 1.000% ou mais em comparação com os métodos praticados

com condições da reação não-otimizadas. Uma condição de reação altamente preferida para otimizar os métodos aqui fornecidos é a inclusão de certos cátions bivalentes. A atividade catalítica da maioria das enzimas de ácidos nucleicos pode ser influenciada de uma maneira dependente da concentração pela concentração de cátions bivalentes. As reações otimizadas preferidas são otimizadas para um ou mais entre Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , e Pb^{2+} .

9. Métodos que Usam Aptâmeros

Os versados nessas técnicas devem avaliar facilmente que os métodos aqui descritos podem ser realizados com aptâmeros, onde os ditos aptâmeros podem facilitar a detecção, identificação e/ou quantificação de alvos, incluindo alvos diferentes de ácidos nucleicos.

Fazendo referência às Figuras 4 e 20, lá está exemplificado um método para usar MNAzimas para detectar alvos, incluindo entidades diferentes de ácidos nucleicos. Este método usa aptâmeros que podem compreender um ácido nucleico ou proteína, polipeptídeo, ou peptídeo ou combinação deles, que tem a capacidade de reconhecer um ou mais ligantes. Os aptâmeros podem ligar, por exemplo, proteínas, polipeptídeos, peptídeos ou ácidos nucleicos, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactéria, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, organismos inteiros, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados, partes ou combinações deles, ou qualquer outra entidade (Lee *et al.*, 2004).

Os aptâmeros preferidos em questão podem compreender DNA curto de filamento único ou oligômeros de RNA ou peptídeos que podem ser isolados a partir de bibliotecas complexas de ácidos nucleicos ou peptídeos sintéticos por processo iterativo de adsorção, recuperação, e reampliação. Os aptâmeros podem ser, portanto, gerados contra quase qualquer alvo, desde moléculas pequenas, tais como aminoácidos ou antibióticos, até estruturas de proteínas e ácidos nucleicos. Em modalidades preferidas, os aptâmeros incluem, por exemplo, moléculas ligantes de ácidos nucleicos, que são geradas, de preferência, por técnicas de evolução e seleção. De prefe-

rência, os aptâmeros podem compreender moléculas de DNA ou RNA, ou uma combinação de ambas, incluindo, porém sem limitações, análogos de nucleotídeos, como por exemplo, indicado na Tabela 2 acima.

- As estratégias para combinar o uso de aptâmeros com MNAzi-
- 5 mas estão ilustradas nas Figuras 4 e 20. Fazendo referência à Figura 4, Quadro (i), os oligonucleotídeos de ácidos nucléicos necessários para esta estratégia de detecção de MNAzimas podem incluir: (a) uma *partizima*-padrão; (b) uma *apta-partizima* que é uma *partizima* que incorpora um aptâ-
- 10 mero (seqüência em negrito), bem como uma seqüência complementar capaz de formar um grampo e, portanto, inibir a combinação da MNAzima; (c) um facilitador de combinação que pode se ligar à *apta-partizima* e à *partizima*, permitindo assim a combinação de uma MNAzima ativa; e (d) um substrato. Na ausência de um analito-alvo (An), a *apta-partizima* adota uma estrutura de grampo que inibe a combinação de uma MNAzima ativa. Na pre-
- 15 sença do analisado-alvo, o analisado-alvo se liga ao domínio do aptâmero da *apta-partizima*, rompendo assim a estrutura de grampo e permitindo que a *apta-partizima* participe na combinação de uma MNAzima ativa. A MNAzima ativa pode então modificar um substrato, causando, por exemplo, a geração do sinal fluorescente.
- 20 Fazendo referência à Figura 4, Quadro (ii), os oligonucleotídeos de ácidos nucléicos para esta estratégia de detecção de MNAzima podem incluir; (a) duas *partizimas*-padrão; (b) um facilitador de combinação que incorpora um aptâmero (seqüência em negrito), bem como uma seqüência inibidora complementar capaz de formar uma estrutura de grampo; e (c) um
- 25 substrato. Na ausência de um analisado-alvo, o facilitador de combinação adota uma estrutura de grampo que inibe a capacidade deste componente de direcionar a combinação de MNAzimas ativas. Na presença do analisado-alvo, o analisado-alvo se liga ao domínio do aptâmero do facilitador de combinação, rompendo assim a estrutura de grampo e permitindo que o compio-
- 30 nente direcione a combinação de uma MNAzima ativa. A MNAzima ativa pode então modificar um substrato, causando, por exemplo, a geração do sinal fluorescente.

Os versados nessas técnicas devem avaliar que o aptâmero pode ser incorporado em qualquer uma das duas extremidades da molécula ou moléculas do facilitador de combinação. Além disso, deve-se avaliar que múltiplos aptâmeros poderiam ser incorporados em um ou mais dos componentes oligonucleotídeos de partizimas. O facilitador de combinação nas estratégias ilustradas na Figura 4, Quadros (i) e (ii) pode compreender DNA, RNA, LNA, PNA ou uma seqüência que contém um ou mais análogos de bases de nucleotídeos. Em outras modalidades, o alvo An é um ácido nucleico. Nessas modalidades, uma seqüência complementar ao ácido nucleico-alvo e substitui a seqüência de aptâmero em negrito na Figura 4.

Fazendo referência à Figura 4, Quadro (iii), os oligonucleotídeos de ácidos nucleicos necessários para esta estratégia de detecção de MNAzimas podem incluir duas *apta-partizimas*, cada uma das quais contendo uma parte de um aptâmero. Na ausência de um analisado-alvo, as MNAzimas ativas não podem se combinar. Na presença do analisado-alvo, o analisado-alvo serve como facilitador de combinação, juntando os componentes oligonucleotídeos, direcionando assim a combinação de uma MNAzima ativa. A MNAzima ativa pode então modificar um substrato, causando, por exemplo, a geração do sinal fluorescente.

Uma estratégia afim, que combina ligação de aptâmero e combinação de MNAzima, está ilustrada na Figura 20. Nesta estratégia, uma seqüência de aptâmero é incorporada na extremidade de uma *partizima* (*apta-partizima*) em uma configuração pela qual uma MNAzima ativa é formada apenas na presença do analisado-alvo. Os componentes oligonucleotídeos necessários para a estratégia ilustrada de detecção de MNAzimas, incluem: (a) uma *partizima*-padrão; (b) uma *apta-partizima* que é uma *partizima* com um aptâmero incorporado em uma das suas extremidades; (c) um facilitador de combinação que se liga à *apta-partizima* e também à *partizima*, permitindo a combinação de uma MNAzima ativa (na presença do alvo); (d) uma sonda de substratorepórter; e (e) um inibidor de combinação que hibridiza para a *apta-partizima* em uma região que cobre pelo menos parte da seqüência do aptâmero e parte do braço de ligação do substrato da seqüência

da *partizima*. Na ausência de um alvo (quadro do lado esquerdo), o inibidor de combinação se liga à apta-*partizima*, bloqueando assim a ligação (e a clivagem) da sonda de substratorepórter. Na presença de um alvo (quadro do lado direito), o alvo se liga à seqüência de aptâmero da apta-*partizima*, impedindo a ligação do inibidor de combinação e permitindo a ligação e a clivagem da sonda de substratorepórter. Assim sendo, uma MNazima ativa pode apenas se formar e causar a geração do sinal fluorescente na presença do alvo.

Além disso, deve ser avaliado pelos versados nessas técnicas que a estratégia ilustrada na Figura 20 é similar àquela ilustrada na Figura 4, Quadro (i), a diferença sendo que a seqüência inibidora complementar, que impede a formação da MNazima ativa, é incorporada em um componente oligonucleotídeo da *partizima* (Figura 4, Quadro (i)) ou em uma molécula separada (Figura 20). Assim sendo, uma seqüência inibidora pode ser uma molécula separada ou pode ser incorporada em um dos componentes que participam no complexo da MNazima.

Os versados na técnicas devem avaliar também que um ou mais aptâmeros poderiam ser incorporados em qualquer um dos componentes oligonucleotídeos, incluindo as *partizimas*, o facilitador de combinação ou o substrato. Além disso, o aptâmero poderia ser incorporado em qualquer uma das duas extremidades de qualquer um desses oligonucleotídeos.

A invenção pode ser mais bem entendida fazendo referência aos Exemplos 18 e 21, onde a estratégia aptâmero/MNazima é usada para detectar uma molécula pequena (ATP) e uma proteína (*Taq* polimerase), respectivamente.

10. Métodos para a Detecção, Identificação e Quantificação de microRNA

Os versados na técnica devem entender que a detecção, identificação e/ou quantificação de microRNA representa uma modalidade específica dos métodos aqui descritos. Fazendo referência à Figura 5, lá está exemplificada uma estratégia para a ampliação de seqüências curtas de ácidos nucléicos (por exemplo, microRNAs (miRs)) e a detecção de amplicons,

usando MNAsimas.

A detecção de seqüências curtas de ácidos nucléicos, tais como microRNAs (miRs) requer estratégias adicionais principalmente em virtude do tamanho pequeno desses alvos. Os MiRs são moléculas de RNA não-codificadoras com um comprimento de aproximadamente 22 nucleotídeos. Elas podem ser detectadas clonando ou por análise *Northern blot*, mas estes métodos são laboriosos e requerem quantidades maiores do RNA total do que as técnicas tais como RT-PCR. O tamanho pequeno de miRs fornece seqüência insuficiente para acomodar dois iniciadores de PCR com desenho-padrão. Além disso, mesmo se a ampliação de miR for realizada, é difícil distinguir amplicons genuínos de dímeros de iniciadores usando qualquer tamanho (determinado por eletroforese), ou fluorescência a partir da intercalação de corantes inespecíficos, tais como Sybr Green ou Brometo de Etídio. Esta limitação poderia ser superada sondando os amplicons de miR com sondas de hibridização internas, tais como as sondas TaqMan® ou Beacon; entretanto, novamente o tamanho pequeno dos amplicons proíbe o uso de sondas com desenhos-padrão.

Um método de RT-PCR com TaqMan® modificado (Chen *et al.*, 2005) para análise de miR inicia a transcrição reversa usando iniciadores 3' que têm terminais 3' específicos de miR e seqüências não-relacionadas adicionais em seus terminais 5' que podem formar *em* forma de alça ("stem-loop")s. O cDNA gerado é ampliado usando estes iniciadores 3' e iniciadores 5', que também têm terminais 3' específicos de miR e seqüências não-relacionadas adicionais nos seus terminais 5'. A ampliação é monitorada em tempo real usando sondas TaqMan® que se ligam a seqüências de miR e seqüências não-relacionadas introduzidas pelos iniciadores. Entretanto, em virtude do desenho dos iniciadores, e do tamanho e posicionamento da sonda TaqMan®, há ainda a possibilidade de que miR's específicos possam não ser distinguidos de seqüências intimamente relacionadas.

Como ilustrado na Figura 5, o método aqui empregado emprega, de preferência, um iniciador 3' que se liga a um miR na sua extremidade 3' e tem uma seqüência de prolongamento, não-relacionada ao miR, que pode

ou não formar um *em* forma de alça ("stern-loop") na extremidade 5'. Como está representado na Figura 5, a seqüência não-relacionada do iniciador pode criar uma estrutura de alça (Figura 5, lado esquerdo) ou pode meramente criar uma estrutura de rotulador (Figura 5, lado direito). Em qualquer um dos

5 dois exemplos, o iniciador 3' de miR é prolongado na presença de transcriptase reversa, e em seguida, por ampliação por PCR, usando iniciadores 5' e 3' com seqüência específica de miR na extremidade 3' com seqüência de prolongamento não-relacionada nas extremidades 5'. Os amplicons são detectados facilmente por MNazimas, que reconhecem e hibridizam para o

10 amplicon, incluindo a região entre os iniciadores 5' e 3'. O requerimento estrito de complementaridade entre o braço sensor da MNazima e o ácido nucleico-alvo permite a discriminação de seqüências mesmo intimamente relacionadas. O Exemplo 5 e o Exemplo 10 nos Exemplos abaixo demonstram os resultados de usar MNazimas para detectar amplicons gerados por am-

15 pliação de seqüências curtas de ácidos nucleicos (vide também Estratégia 2 na Figura 2 acima). Além disso, o Exemplo 5 demonstra a capacidade dos métodos que usam MNazimas para distinguir entre duas seqüências que têm apenas uma única diferença de nucleotídeos. Isto proporciona um vantagem importante pelo fato de que, mesmo quando o processo de ampliação

20 é incapaz de discriminar entre seqüências intimamente relacionadas, as MNazimas permitem a discriminação entre variações mínimas de seqüências nos amplicons resultantes.

11. Métodos que Usam Cascatas

Os versados nessas técnicas devem avaliar que os métodos aqui descritos podem ser usados para realizar uma cascata, como aqui definido. As modalidades específicas para realizar tais métodos, como aqui descrito, incluem, porém sem limitações, (1) o uso de uma MNazima para clivar um substrato apenas na presença de um alvo, onde o dito substrato é então tornado disponível para envolvimento em um Segundo episódio, tal como a

25 geração de um sinal detectável, como representado na Figura 6, onde a clivagem disponibiliza uma enzima que pode então clivar uma âncora, resultando desta forma em um rotulador fluorescente que se dissocia de um

30

quencher, ou (2) o uso de uma MNAzima para clivar um substrato apenas na presença de um alvo, onde o dito substrato é então tornado disponível para envolvimento em um Segundo episódio, onde o desempenho do dito segundo episódio, por sua vez, torna disponível um outro substrato para envolvimento em inúmeros episódios subseqüentes, de tal modo que um episódio subseqüente disponibilize um substrato para envolvimento no desempenho de um episódio anterior, criando desta forma uma cascata cíclica, tal como representado nas Figuras 7 e 25, onde tais cascatas cíclicas podem ser empregadas para ampliar um sinal, por exemplo, em aplicações nas quais a baixa abundância de um alvo pode não proporcionar de outra forma um sinal que é detectável.

Uma cascata de ampliação de efeito detectável pode compreender uma ou mais cascatas de ribozima/ligase, uma cascata de enzimas de ácidos nucléicos circular, uma cascata de enzimas protéicas, ou uma ou mais enzimas afixadas a um suporte, ou qualquer combinação delas.

Fazendo referência à Figura 2, a Estratégia 3 ilustra uma visão geral de um método para usar uma MNAzima para ampliar um sinal através do uso de uma cascata de sinais. Isto está discutido mais detalhadamente com relação às Figuras 6, 7 e 25.

A Figura 6 representa um método exemplificativo para a detecção por MNAzima de um alvo acoplado com ampliação de sinais mediada por enzimas. Como discutido acima, a invenção fornece métodos para usar a detecção por MNAzima, onde um alvo é ampliado, bem como métodos nos quais um sinal gerado é ampliado. Em algumas modalidades, combinando a tecnologia de MNAzima com estratégias de ampliação de sinais proporciona uma alternativa aos ensaios de MNAzimas combinados com ampliação de alvos, embora em alguns casos a ampliação do alvo e também a ampliação do sinal possam ser usadas conjuntamente. Os métodos preferidos para ampliar sinais envolvem mecanismos de cascata, os quais os versados nessas técnicas devem avaliar estão freqüentemente envolvidos em ampliação de sinais em sistemas biológicos.

Vários exemplos de cascatas de ampliação, que usam ácidos

nucléicos catalíticos, são conhecidos nessas técnicas e estão contemplados para o uso em questão. As cascatas de ligação (Paul e Joyce, 2004) usam uma primeira ribozima (A) que liga dois oligonucleotídeos que contêm RNA, para formar uma segunda ribozima (B). A ribozima (B), então, liga dois outros oligonucleotídeos que contêm RNA, para formar uma nova primeira ribozima (A), disparando assim uma reação em cascata.

Uma segunda cascata de ampliação, apropriada para o uso em questão, usa moléculas de DNAzima/substrato circularizadas (Levy e Ellington, 2003). Uma DNAzima (A) é inativa quando circular, mas torna-se ativa da por linearização por uma segunda DNAzima (B), que cliva a DNAzima (A) circular. Uma DNAzima (A) linear ativa, então, cliva as moléculas de DNAzima (B) circulares, e desta forma, linearizando-as e ativando-as. As duas DNAzimas capazes de clivar/linearizar reciprocamente resultam em uma cascata de atividade de ácidos nucléicos catalíticos.

Os versados nessas técnicas devem entender que outras abordagens estão disponíveis – por exemplo, combinar o uso de DNAzimas com a versatilidade de aptâmeros e/ou com a potência catalítica de enzimas proteicas tradicionais (vide, por exemplo, Zhang *et al.*, 2005). O método de Zhang resulta na liberação de uma enzima proteica que pode, por sua vez, catalisar a formação de moléculas detectáveis, e desta forma gerando e ampliando o sinal. A abordagem de Zhang permite a detecção sensível, mas ela é onerosa pois ela requer moléculas altamente individualizadas para cada ensaio. Os métodos para acoplar peptídeos a ácidos nucléicos são conhecidos nessas técnicas (vide, por exemplo, Cheng *et al.*, 1993), pois são métodos para afixar DNA a estruturas de suporte. Por exemplo, Asher (PCT/US96/02380) descreveu a amarração de uma enzima (ribozima) a um suporte insolúvel, o qual, depois da liberação, clivou um substrato, iniciando desta forma a ampliação de um sinal, usando duas ribozimas espacialmente separadas.

Outros exemplos de ampliação de sinais para métodos *in vitro* são conhecidos nessas técnicas, e ainda outras estratégias para ampliar sinais podem ser criadas, usando técnicas similares àquelas que demonstra-

ram ser exitosas. Por exemplo, o ensaio de DNA ramificado) (Urdea, 1993) amplia um sinal empregando uma molécula-repórter secundária (por exemplo, fosfatase alcalina) afixada a sondas rotuladas que medeiam a reação. A espectroscopia de correlação com fluorescência (FCS) emprega ampliação eletrônica do sinal (Eigen e Rigler, 1994). A ampliação de sinais com tiramida (TSA) (Bobrow *et al.*, 1989; Adams, 1992; Raap *et al.*, 1995; van Gijlswijk *et al.*, 1997), usa peroxidase de raiz-forte, para converter tiramisida em sua forma ativa, que se liga a resíduos de tirosina em proteínas. TSA é usada para várias aplicações de imunoquímica de células. O ensaio Invader (Hall *et al.*, 2000) emprega dois oligonucleotídeos que se ligam a uma sequência-alvo de uma maneira que permite a clivagem de nucleases, levando a mais do que 1.000 episódios de clivagem por molécula-alvo no decorrer do tempo, e a reação de clivagem pode ser acoplada a uma sonda fluorescente. Entretanto, há limitações aos métodos de ampliação de sinais conhecidos. Por exemplo, o ensaio de bDNA não é tão sensível quanto os métodos de ampliação de alvos.

Assim sendo, prestando mais atenção à Figura 6, lá está representado um exemplo de um método que emprega uma enzima liberada por MNazimas como parte de uma estratégia de ampliação de sinais. O sinal pode ser gerado, por exemplo, por clivagem por enzima de um substrato entre uma porção fluoróforo e uma porção *quencher*, permitindo assim que um sinal seja gerado. As enzimas contempladas para uso em questão incluem, porém sem limitações, DNazimas, MNazimas, ribozimas, e enzimas protéicas com atividade mensurável, tais como proteases, endonucleases de restrição e outras enzimas hidrolíticas. Os alvos preferidos são sequências de ácidos nucleicos que incluem, porém sem limitações, DNA ou RNA humano, animal, vegetal, viral, bacteriano. Outros alvos preferidos podem incluir prion, levedura ou fungo, ou qualquer outra molécula, por exemplo, incluindo, porém sem limitações, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, organismos inteiros, células, vírus, bactérias, *Archaea*, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons metálicos, sais metálicos, príons ou quaisquer derivados,

parte ou combinações deles.

Como pode ser observado na Figura 6, uma enzima exemplificativa, neste caso designada "Enzima" é afixada a um primeiro suporte insolúvel, através de uma molécula clivável, de preferência um ácido nucléico. Como ilustrado no exemplo da Figura 6, a molécula clivável que atua como fixação para a enzima "Enzima" é um substrato genérico ou universal de MNAzima. Está também afixado a um suporte insolúvel não em contato com o primeiro suporte insolúvel um substrato "âncora clivável" para a enzima "Enzima". A "Enzima" é uma enzima com uma atividade detectável, por exemplo, uma MNAzima, DNAzima, ribozima, ou enzima protéica, como descrito acima. Em modalidades preferidas, as MNAzimas ou DNAzimas são particularmente úteis. Na presença dos componentes oligonucleotídeos, ou *partizimas*, que se autocombinam para formar uma MNAzima capaz de clivar o substrato universal ou genérico, e na presença do alvo para a MNAzima, a MNAzima forma e cliva cataliticamente a "Enzima" do suporte, e desta forma liberando-a e permitindo que ela acesse o substrato "âncora clivável" e clive-o. A clivagem da "âncora clivável" libera a fluoróforo do substrato afixado. O fluoróforo é detectado e medido facilmente.

A separação física de uma enzima imobilizada ou afixada do seu substrato, que está, de preferência, imobilizado ou afixado a um suporte, é aqui algumas vezes referida como "separação espacial". Uma ou mais enzimas podem ser "separadas espacialmente" dos seus respectivos substratos, e umas das outras. Pode resultar uma cascata de ampliação de sinais, particularmente quando a clivagem do substrato para a primeira enzima libera a segunda enzima, a qual, por sua vez, libera mais primeira enzima quando o substrato para a segunda enzima é clivado (vide Figura 7).

Em modalidades preferidas, o substrato para a enzima "Enzima" é um substrato bifuncional como ilustrado, compreendendo uma parte *quencher* e também uma parte detectável. As modalidades particularmente preferidas são aquelas nas quais o substrato para a enzima "Enzima" é uma molécula sem qualquer sinal detectável, enquanto que no substrato não clivado, e cujo sinal detectável aumenta em muitas ordens de grandeza depois da

clivagem.

- Fazenda referência agora à Figura 7, está ilustrado um exemplo de um ensaio que usa MNAzimas e uma ampliação de sinal, usando duas enzimas "especialmente separadas". Uma cascata de ampliação de sinais
- 5 também pode ser gerada usando tais DNAzimas, como descrito acima. Um episódio inicial de clivagem por MNAzima cliva um substrato amarrado imobilizado, liberando desta forma a DNAzima A. A DNAzima A, então, migra para uma segunda onde uma segunda DNAzima B é amarrada. A DNAzima A libera a DNAzima B, a qual, por sua vez, libera mais DNAzima A. Uma
- 10 cascata é iniciada, resultando em uma ampliação de sinal. Em várias modalidades, o alvo pode ser seqüências de ácidos nucleicos, incluindo, porém sem limitações, DNA ou RNA humano, viral, bacteriano; ou o alvo pode ser proteínas, vírus, venenos, anticorpos, células inteiras ou moléculas pequenas.
- 15 Particularmente, pode-se observar a partir do exemplo na Figura 7 que a DNAzima A está afixada a um suporte através de um primeiro substrato universal ou substrato genérico de MNAzima, que também é clivado pela DNAzima B. A DNAzima B está afixada a um suporte insolúvel através de um segundo substrato genérico que é um substrato para a DNAzima A. Ambas
- 20 DNAzimas ficam retidas, de tal modo que seus respectivos substratos sejam inacessíveis a elas. Na presença das *partizimas* que se autocombinam para formar uma MNAzima que cliva o substrato universal, e na presença adicional do alvo, a MNAzima é formada e cliva o substrato universal da MNAzima, retendo a DNAzima A, liberando desta forma a DNAzima A. A
- 25 DNAzima A pode agora migrar para o segundo substrato genérico. Depois da clivagem do segundo substrato genérico pela DNAzima A, a DNAzima B é liberada junto com seu sinal detectável afixado, ilustrado neste caso como o fluoróforo F. O fluoróforo F é agora detectável pois ele se separa de uma parte *quencher* Q retida. A DNAzima B liberada, agora capaz de acessar seu
- 30 substrato assim o faz, clivando-o (o primeiro substrato genérico), e desta forma liberando mais DNAzima A, a qual, por sua vez, libera mais DNAzima B e o sinal detectável F. Assim sendo, uma cascata de ampliação de sinais

potente é estabelecida, com quantidades exponencialmente crescentes do sinal detectável F.

Um exemplo de uma cascata de MNAzima, que usa *partizimas* amarradas pode ser mais bem entendido fazendo referência à Figura 25. As MNAzimas podem ser usadas para iniciar cascatas de ampliação de sinais, como ilustrado neste diagrama. A reação contém os seguintes elementos: (i) *partizimas* para a MNAzima 1, que estão livres em solução; (ii) um facilitador de combinação para as MNAzimas 2 e 3 (que têm os mesmos braços sensores), que está livre em solução (como ilustrado) ou amarrado a um substrato insolúvel, Sub 1; (iii) *partizimas* para a MNAzima 2, que estão amarradas a um suporte insolúvel pelo substrato, Sub 1. Sub 1 pode ser clivado pela MNAzima 1 (na presença de um analisado-alvo) ou pela MNAzima 3 (na presença de um facilitador de combinação), e a clivagem resulta na liberação das *partizimas* para a MNAzima 2 dentro da solução; (iv) *partizimas* para a MNAzima 3, que estão amarradas a um suporte insolúvel pelo substrate, Sub 2. Sub 2 pode ser clivado pela MNAzima 2 (na presença de um facilitador de combinação) e a clivagem resulta na liberação das *partizimas* para a MNAzima 3 dentro da solução; (v) Sub 2-FQ, que tem a mesma seqüência que Sub 2, mas está livre em solução e rotulado duplamente com um fluoróforo (F) e um *quencher* (Q). Sub 2-FQ pode ser clivado pela MNAzima 2 para gerar um sinal fluorescente.

Na presença do analisado-alvo, a MNAzima 1 ativa forma as *partizimas* que estão livres em solução. A MNAzima 1 cliva seu Sub 1, liberando assim as *partizimas* para a MNAzima 2. Depois de livres, estas *partizimas* hibridizam com o facilitador de combinação e formam a MNAzima 2, que cliva liberando Sub 2-FQ (gerando um sinal fluorescente), ou Sub 2 amarrado (liberando *partizimas* para a MNAzima 3). Como a MNAzima 3 compartilha os mesmos braços de substrato que a MNAzima 1, ela também pode clivar Sub1 amarrado, liberando assim mais *partizimas* para a MNAzima 2. Isto resulta em uma cascata de geração enzimática dos componentes (*partizimas*) para mais enzimas (MNAzimas) e uma cascata concomitante de ampliação de sinais.

12. Métodos para a Detecção, Identificação e Quantificação de Ácido Nucléico Metilado

A geração de sinais mediada por MNAzima permite a discriminação entre seqüências de ácidos nucleicos completamente emparelhadas e aquelas que contêm desemparelhamentos. Esta capacidade permite que as MNAzimas sejam usadas para a detecção, identificação e quantificação de ácido nucleico metilado.

Alterações no padrão de metilação ocorrem freqüentemente em associação com doenças tais como câncer, diabetes, doenças auto-imunes, e distúrbios psiquiátricos. A vasta maioria de protocolos usados atualmente para análise de metilação começa com modificação por bissulfito de DNA genômico. A modificação com bissulfito converte citidinas não-metiladas, mas não as metiladas, em uridinas. Caso o ácido nucleico modificado com bissulfito venha a ser então ampliado, por exemplo, por PCR, as uridinas são substituídas por timidinas e a citidina metilada é substituída por citidina. Os amplicons modificados podem ser analisados por vários métodos que permitem a discriminação das seqüências que contêm T (em posições que originalmente contêm C não-metilado) e C (em posições que originalmente contêm C metilado).

A capacidade de as MNAzimas para discriminarem entre variantes de seqüências intimamente relacionadas torna esta tecnologia bem apropriada para discriminar entre seqüências modificadas com bissulfito, que eram originalmente metiladas ou não-metiladas. A abordagem pode ser mais bem entendida fazendo referência ao Exemplo 11.

Além disso, as MNAzimas podem proporcionar uma nova abordagem que permite a análise direta de DNA metilado e não-metilado, sem a necessidade de modificação com bissulfito. Isto proporciona uma vantagem significativa porque a modificação com bissulfito é laboriosa, morosa e destrutiva para o ácido nucleico a ser analisado.

O uso de um braço estabilizador com uma *partizima* que tem um braço sensor truncado foi realizado para demonstrar a capacidade de MNAzimas detectarem polimorfismos de nucleotídeos individuais presentes em

facilitadores de combinação (Exemplo 22). Sob as condições experimentais usadas nesse exemplo, uma *partizima* com um braço sensor truncado (cinco bases) foi funcional em uma temperatura bem acima da sua temperatura de fusão esperada. Os sistemas com braços estabilizadores, e com *partizimas* que têm braços sensores truncados, são muito sensíveis a pequenas mudanças no alvo, e aguentam o uso em temperaturas altamente severas. Esta estratégia de detecção pode ser estendida ainda mais para discriminar diretamente entre alvos, que são metilados ou não-metilados em resíduos específicos de citosinas, sem a necessidade de modificação prévia com bissulfito.

10 A presença de 5-metil-citosina(s) aumenta a temperatura de fusão do DNA em 1,3°C por base metilada, em relação a citosina(s) não-metilada(s). Quando *partizimas*, um braço estabilizador, e um substrato são incubados em uma temperatura que é apropriada para hibridização e combinação de MNAzima ativa na presença de um alvo metilado, mas que é alta demais para a combinação da MNAzima na presença de um alvo não-metilado, um sinal seria gerado apenas na presença do alvo metilado. Isto proporciona uma nova estratégia para a análise direta de padrões de metilação que podem proporcionar um método para a detecção de bases metiladas como rotuladores de câncer e outras doenças.

20 Os versados nessas técnicas devem, portanto, avaliar e entender facilmente que a otimização de parâmetros experimentais, incluindo a temperatura, como aqui descrito, é contemplada como estando dentro do âmbito dos métodos da presente invenção, e que tal otimização encontra particular aplicação no desempenho de métodos referentes à detecção de DNA metilado, seja diretamente ou depois de modificação com bissulfito.

25 13. Métodos para a Detecção e Identificação de Variantes de Ácidos Nucléicos

A presente invenção fornece ainda métodos para a detecção e identificação de variantes de seqüências na base de que a geração de sinais mediada por MNAzimas permite a discriminação entre seqüências de ácidos nucleicos completamente emparelhadas e aquelas que contêm desemparelhamentos.

As variações de seqüências capazes de detecção pelos métodos da presente invenção incluem, porém sem limitações, adições, deleções, substituições, conversões, duplicações, translocações, variantes de seqüências com deslocamento de estrutura, variantes de seqüências sem sentido, ou qualquer combinação delas.

Os métodos podem ser aplicados em qualquer situação na qual é desejável detectar e/ou identificar variação de seqüência de ácido nucléico, incluindo, porém sem limitações, o diagnóstico de doenças ou predisposições a elas, identificação de polimorfismos, ou avaliação da exatidão da replicação de ácidos nucléicos. Além disso, alterações maiores tais como translocações associadas com vários tipos de câncer, que resultam em transcritos de fusão, também podem ser detectadas. Elas ocorrem frequentemente em associação com leucemia. Por exemplo, transcritos da fusão *PML/RAR* estão associados com leucemia promielocítica aguda e transcritos da fusão *bcr/abl* estão associados com leucemia granulocítica crônica.

A detecção de alvos mediada por MNAzimas pode ocorrer por intermédio do reconhecimento de bases de Watson-Crick dos braços sensores de *partizimas* e do facilitador de combinação. O requisito de complementaridade pode ser explorado para detectar pequenas variações de seqüências, incluindo, porém sem limitações, desemparelhamentos de bases individuais entre o braço sensor de *partizima* e o facilitador de combinação. A capacidade de discriminação de variantes de seqüências pode ser mais bem entendida fazendo referência aos Exemplos 5, 19 e 22.

Esses exemplos todos demonstraam a capacidade de as MNAzimas discriminarem entre situações nas quais o braço sensor e o facilitador de combinação estão completamente emparelhados, e situações nas quais há pelo menos um desemparelhamento ou polimorfismo de bases individuais.

A capacidade de discriminar desemparelhamentos de bases individuais depende de vários fatores, incluindo (a) a severidade das condições da reação, que podem ser influenciadas por mitos fatores, incluindo a temperatura, concentração de sais, concentração de cátions, (b) o tipo de

desemparelhamento, (c) a posição do desemparelhamento dentro do braço da *partizima*, e (d) o comprimento do braço da *partizima*. Dependendo da aplicação, a severidade da reação pode ser individualizada para ser intolerante, ou tolerante, até algum grau de desemparelhamento entre o braço sensor e o facilitador de combinação. As condições severas permitem a discriminação de variantes de seqüências intimamente relacionadas, tais como uma diferença de um único nucleotídeo. As condições de mais baixa severidade podem não discriminar entre facilitadores de combinação e seqüências intimamente relacionadas. Portanto, isto poderia ser explorado para detectar simultaneamente um grupo de seqüências intimamente relacionadas em uma única reação com uma única MNAzima.

A discriminação de polimorfismos de um único nucleotídeo pode ser estendida pelo uso de *partizimas* com braços sensores truncados (Figura 23 e Exemplo 22). Os braços sensores truncados podem ser estabilizados por um componente oligonucleotídeo estabilizador, o qual, embora seja uma molécula separada, pode ser considerado como um segundo componente da *partizima* truncada, ao qual ele se liga adjacientemente.

14. MNAzimas para a Detecção, Identificação e/ou Quantificação de Bactérias e Vírus

A presente invenção engloba métodos para a detecção de bactérias, vírus ou qualquer outro microorganismo, por exemplo, através do desenho de braços sensores de MNAzimas, que são adaptados para hibridizar qualquer molécula, tal como um ácido nucléico que é singular para o microorganismo que se procura detectar, identificar e/ou quantificar. Adicionalmente ou alternativamente, uma classe de microorganismo pode ser detectada, por exemplo, incluindo, porém sem limitações, bactérias gram-positivas ou gram-negativas. Além disso, variações dos métodos, que estão dentro do âmbito da avaliação pelos versados na técnica, incluem, porém sem limitações, o uso de um aptâmero adaptado para se ligar a uma proteína, molécula pequena, célula, componente celular ou produto celular, tal como uma toxina que é singular para o microorganismo que se procura detectar, identificar e/ou quantificar.

As bactérias e vírus contêm DNA e/ou RNA que podem proporcionar um modelo para sua rápida e sensível identificação, detecção e/ou quantificação, usando a tecnologia de MNAs. A variação de sequência entre espécies e cepas bacterianas e virais pode ser usada para permitir a discriminação sensível entre espécies e cepas individuais. As abordagens com MNAs multiplex são particularmente preferidas para a detecção e/ou identificação simultânea de múltiplas espécies, cepas ou isolados bacterianos ou virais.

Alternativamente, as regiões com similaridade de sequência na totalidade de espécies e cepas bacterianas ou virais podem ser usadas para identificar a presença ou ausência de qualquer grupo de espécies ou cepas individuais em um único ensaio de MNA. Esta última abordagem está exemplificada no Exemplo 15, onde uma região conservada encontrada na sequência ribossômica 16S bacteriana foi usada como a base de um ensaio para um ensaio para substituir o teste bacteriano de uma cepa gram por um teste de liberação rápida quanto à esterilidade e/ou contaminação com micoplasma.

O Exemplo 16, que ilustra o uso de MNAs para a detecção e quantificação do RNA viral de HIV-1, demonstra o uso de MNAs como uma ferramenta sensível para a detecção e quantificação viral.

15. Kits

A presente invenção fornece também *kits* para praticar os métodos aqui descritos. Tipicamente, os *kits* para conduzir os métodos da presente invenção contêm todos os reagentes necessários para conduzir o método. Por exemplo, em uma modalidade, um *kit* pode compreender um primeiro recipiente que contém pelo menos um primeiro e um segundo componentes oligonucleotídeos que compreendem uma primeira e uma segunda *partizima*, e um segundo recipiente que compreende um substrato, onde a autocombinação da primeira e segunda *partizimas*, e do substrato, em uma MNA requer associação de um facilitador de combinação presente em uma amostra do teste. Conseqüentemente, nessa modalidade, a primeira e segunda *partizimas*, e o substrato, pode ser aplicada à amostra do teste pa-

ra determinar a presença do facilitador de combinação, onde o facilitador de combinação compreende o alvo.

Tipicamente, os *kits* da presente invenção devem compreender também um ou mais recipientes, que contêm, por exemplo, reagentes de lavagem, e/ou outros reagentes conforme necessário para o desempenho dos métodos da invenção.

No contexto da presente invenção, um *kit* compartimentalizado inclui qualquer *kit* no qual os reagentes ficam contidos em recipientes separados, e pode incluir pequenos recipientes de vidro, recipientes de plástico ou tiras de plástico ou papel. Tais recipientes podem possibilitar a transferência eficiente de reagentes de um compartimento para outro compartimento, e ao mesmo tempo, evitando contaminação cruzada das amostras e reagentes, e a adição de agentes ou soluções de cada recipiente de um compartimento para outro de uma maneira quantitativa. Tais *kits* podem incluir também um recipiente que deve comportar a amostra do teste, um recipiente que contém os reagentes usados no ensaio, recipientes que contêm reagentes de lavagem, e recipientes que contêm um reagente de detecção. Tipicamente, um *kit* da presente invenção deve incluir também instruções, usando os componentes do *kit* para conduzir os métodos apropriados. Os *kits* e métodos da invenção podem ser usados em conjunto com equipamentos e sistemas analíticos automatizados, incluindo, por exemplo, porém sem limitações, aparelhos de PCR em tempo real.

Para aplicação para detecção, identificação ou quantificação de diferentes alvos, um único *kit* da invenção pode ser aplicável, ou alternativamente, diferentes *kits*, por exemplo, contendo reagentes específicos para cada alvo, podem ser necessários. Os métodos e *kits* da presente invenção encontram aplicação em qualquer circunstância na qual é desejável detectar, identificar ou quantificar qualquer entidade.

A presente invenção será agora descrita adicionalmente com mais detalhe fazendo referência aos exemplos específicos que se seguem, que não devem ser interpretados de forma alguma como limitativos do âmbito da invenção.

EXEMPLOS

Nos exemplos que se seguem, vários desenhos de MNAzimas, baseados na divisão do núcleo catalítico da DNAzima 10:23 ou 8:17, foram adaptados para uma série de ácidos nucleicos-alvo e substratos-alvo (Tabela 3). Estes sistemas com substratos-alvo foram testados sob uma série de condições de reação e se comprovaram robustos.

Os desenhos exemplificativos de MNAzimas e as *partizimas* específicas usadas nos exemplos que se seguem estão listados na Tabela 3. As *partizimas* são denominadas de tal modo que o nome (por exemplo, RO4A1/1) incorpore a referência ao domínio do alvo (por exemplo, RO4 para RPLPO éxon 4), ao domínio necessário para a atividade catalítica da MNAzima (por exemplum A1) e ao domínio do substrato domain (por exemplo, 1 para SubBi-1).

Tabela 3: MNAzimas e Substratos Exemplificativos. *Partizimas* Específicas Usadas nos Exemplos Experimentais

Desenhos de MNAzimas (núcleo catalítico)	<i>Partizimas</i> A e B	Substratos-alvo de <i>Partizimas</i> Específicas	Exemplos (Figuras)
1 (8:17)	A1: B1	RO4A1/1: RO4B1/1 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (8)
2 (8:17)	A1: B2	RO4A1/1: RO4B2/1 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (8)
3 (8:17)	A1: B3	RO4A1/1: RO4B3/1 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 (9, 10)
4 (8:17)	A2: B3	RO4A2/1: RO4B3/1 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-1-FB (1)	1 e 4 (10, 14)
		miR20A2/1: miR20B3/1 MiR-20 SubBi-1-FB (1)	2, 5 e 6 (11, 12, 15, 16)
		AtpA2/1: Atp B3/1	18

		ATP and dATP SubBi-1-FB (1)	
		TaqA2/1: AtpB3/1 Taq polymerase SubBi-1-FB (1)	21
		miR143 A2/1: miR143 B3/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12
		miR143 A2/1: miR143 B3H/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12
		miR143 A2H/1: miR143 B3/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12
		miR143 A2H/1: miR143 B3H/1 miR143 SubBi-1-FB (1)	12
5 (10:23)	A3:B4	RO5A3/2: RO5B4/2 RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	3 (13)
6 (10:23)	A4:B5	RO5A4/2: RO5B5/2 RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	3 (13)
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-3-FB (3)	8 (17)

Tabela 3 (continuação): MNAzimas e Substratos Exemplificativos. *Partizimas* Específicas Usadas nos Exemplos Experimentais.

Desenhos de MNAzimas (núcleo catalítico)	<i>Partizimas</i> A e B	Substratos-alvo de <i>Partizimas</i> Específicas	Exemplos (Figuras)
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-3-Q6B2 (3)	13
		RO5A4/3-P: RO5B5/3-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-3-JB (3)	9 (19)
		RO5A4/4-P: RO5B5/4-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-4-JB (4)	14
		RO5A4/2-P: RO5B5(16)/2-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
		RO5A4/2-P: RO5B5/2-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2 (2)	24
		miR20A4/2: miR20B5/2 miR-20 SubBi-2-FB (2)	9 (19)
		PCR7aA4/2-P: P- CR7aB5/2-P Let-7a SubBi-2-FB (2)	10
		BaA4/2-P: BaB5/2-P B-actina SubBi-2-JB (2)	13

		BaA4/7-P: BaB5/7-P B-actina SubBi-7-FB (7)	14
		BCRA4/6-P: BCRB5/6-P BCR SubBi-6-TRB2 (6)	13 e 14
		HPRTA4/7-P: HPRTB5/7-P HPRT SubBi-7-FB (7)	13
		HPRTA4/2-P: HPRTB5/2-P HPRT SubBi-2-A350B (2)	14
		RO4A4/3-P: RO4B5/3-P RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-3-Q6B2 (3)	14
		RO4A4/3-5b: RO4B5/3-3b RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-3-FB (3)	24
		NefA4/6-P: NefB5/6-P HIV-1 Nef SubBi-6-TRB2 (6)	16
		XdA4/2-P: XdB5/2-P Xd SubBi-2-FB (2)	22 (23)
7 (10:23)	A5:B6	p16A5/3-P: p16B6/3-P p16 SubBi-3-FB (3)	11

Tabela 3 (continuação): MNAzimas e Substratos Exemplificativos. *Partizimas* Específicas Usadas nos Exemplos Experimentais.

Desenhos de MNAzimas (núcleo catalítico)	<i>Partizimas</i> A e B	Substratos-alvo de <i>Partizimas</i> Específicas	Exemplos (Figuras)
		16S1A5/2-P: 16S1B6/2-P SubBi-2-FB (2) bacteriano ribossômico 16S	15
		RO5A5/2(22)-P:RO5B6/2(11G)-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	19 (22)
		RO5A5/2(22)-P:RO5B6/2(11C)-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	19 (22)
		RO5A5/2(22)-P:RO5B6(16)/2-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
		RO4A5/2: RO4B6/2 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-G14A: RO4B6/2 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-A12T: RO4B6/2 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
		RO4A5/2-A11T: RO4B6/2	17

RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	
RO4A5/2-A9T: RO4B6/2 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
RO4A5/2: RO4B6/2-C7A RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
RO4A5/2: RO4B6/2-T4C RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	17
RO4A5(18)/2-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
RO4A5(18)/2-rA9-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
RO4A5(18)/2-rG14-P: RO4B6 (19)/2-P RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
RO4rA5(18)/2: RO4B6 (19)/2- P RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23

		RO4A5(18)/2-P: RO4rB6(19)/2 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
		RO4rA5(18)/2: RO4rB6(19)/2 RPLPO éxon 4 (RO4) SubBi-2-FB (2)	23
8 (10:23)	A6:B7	RO5A6(22)/2-P: RO5B7(16)/2-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
9 (10:23)	A7:B8	RO5A7(22)/2-P: RO5B8(16)/2-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
10 (10:23)	A8:B9	RO5A8(22)/2-P: RO5B9(16)/2-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20
11 (10:23)	A9:B10	RO5A9(22)/2-P: RO5B10(16)/2-P RPLPO éxon 5 (RO5) SubBi-2-FB (2)	20

Exemplo 1: Aplicação de MNazimas para a Detecção de um Ácido Nucleico-alvo (seqüência RPLPO humana).

1.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

- 5 Quatro desenhos de MNazimas (Figuras 8-10), baseados na DNAzima 8:17, foram testados. Os versados nessas técnicas devem avaliar que as seqüências dos braços sensores (ligação do alvo) designadas por "N" podem ser substituídas por seqüências específicas do alvo para qualquer ácido nucleico-alvo (Figuras 8-10). As seqüências de braços de sub-
- 10 trato, que se ligam ao substratorepóter, podem ser genéricas e usadas para muitos alvos. Os versados nessas técnicas devem avaliar que as seqüências de substrato designadas por "N" nas Figuras 8-10 podem ser substituídas por seqüências de DNA, RNA ou quiméricas de DNA/RNA, e aquelas desig-

nadas por "r" podem ser substituídas por outras seqüências e/ou um número diferente de seqüências de ribonucleotídeos.

Nos experimentos conduzidos para medir a atividade catalítica das MNAzimas RPLPO descritas nas Figuras 8-10, as *partizimas* de oligonucleotídeos A e B foram desenhadas para alvejar éxon 4 do gene de RPLPO. As seqüências das *partizimas* A e B estão listadas abaixo a partir de 5' até 3', onde as bases sublinhadas formam pelo menos parte do núcleo catalítico ativo da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato.

10 SEQ ID NO:1: Partizima A1 RO4A1/1: **GCTGGTCATCCAGC**ACGGTCGA-AATAGTGAGT

SEQ ID NO:2: Partizima A2 RO4A2/1: **GCTGGTCATCCAGC**AGCGGTC-GAAATAGTGAGT

15 SEQ ID NO:3: Partizima B1 RO4B1/1: CATCTCTTCTCCGTCGA-AGTGTTCGACAATGGC

SEQ ID NO:4: Partizima B2 RO4B2/1: CATCTCTTCTCCGGTGTT**CGACA**-ATGGC

SEQ ID NO:5: Partizima B3 RO4B3/1: CATCTCTTCTCCGAGCGTGTT**GACA**ATGGC

20 1.2. Substratorepórter

A atividade da MNAzima é monitorada pela clivagem de um substratorepórter de ácido nucléico rotulado duplamente. A seqüência do substrato é uma seqüência química que contém bases de RNA e também de DNA, que foi usada anteriormente como um substrato da DNAzima 8:17
25 (Li *et al.*, 2000). No presente exemplo, o substratorepórter é designado Sub-Bi-1-FB e tem rotuladores internos, a saber, 6-carbóxi-fluoresceína ("6-FAM") afixada a um nucleotídeo 5' em relação à base de RNA, e um e porção Black Hole Quencher 1 ("BHQ1") afixado a um nucleotídeo 3' em relação à base de RNA. A clivagem de SubBi-1-FB por MNAzimas foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485
30 nm (comprimento de onda FAM). A seqüência de SubBi-1-FB rotulada é como se segue, de 5' para 3', sendo que as bases sublinhadas indicam a posi-

çãodos porções 6-FAM e BHQ1. As bases em letra minúscula representam o RNA e as bases em letra maiúscula representam o DNA.

SEQ ID NO: 6: SubBi-1–FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATG

5 1.3. Sequência de MNAzima de Controle

O controle da hibridização (MNAzima inativa) foi inativado mudando uma única base no oligonucleotídeo A1 que é essencial para a formação do núcleo catalítico. Embora as seqüências do substratorepórter e do alvo ainda possam se ligar às MNAzimas, o substrato não pode ser clivado devido à modificação no núcleo catalítico da MNAzima. A ligação do substratorepórter às moléculas de *partizima* poderia em si gerar uma medida de fluorescência devido à mudança de conformação do substratorepórter depois da hibridização. Um controle que usa uma molécula de partizima A1 mutada (RO4A1mut) foi incluído e designado Controle de Hibridização. A seqüência de MNAzima mutada está ilustrada abaixo e a posição da base G que foi mudada está sublinhada.

SEQ ID NO: 7: Mutant Partizima A

RO4A1mut/1:GCTGGTCATCCAGCACGGTCAAATAGTGAGT

1.4. Alvo

20 A seqüência do alvo para este exemplo foi um oligonucleotídeo, RO4/1Target, que tem a mesma seqüência que uma seção de éxon 4 do gene de RPLPO humano. A seqüência de RO4/1Target é a seguinte, escrita de 5' para 3'.

SEQ ID NO: 8 RO4/1Target: GCCATTGTCGAACACCTGCTGGAT-
25 GACCAGC

Para assegurar que um sinal não possa ser detectado quando uma seqüência de alvo incorreta está presente, o efeito "fora do alvo" foi determinado usando 3 µg de lambda DNA (PROMEGA) ou um oligonucleotídeo de controle negativo sintético com seqüência não-relacionada (RO4/1mutTarget).

SEQ ID NO: 9 RO4/1mutTarget: CGACCATTAGGTCGTCCACA-
AGCTGTTACCG

1.5. Componentes da Reação

A detecção da sequência do alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado por clivagem do substrato repórter pela MNazima cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas as reações foi de 25 μ L. Todas reações foram conduzidas a 40°C em um termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A fluorescência de cada reação foi lida a cada 7 segundos por um total de 10 minutos. Todas reações na Tabela 4 continham a mistura em massa de 1 μ M SubBi-1-FB 1 μ M em Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) e MgCl₂ 25 mM.

10 Tabela 4: Componentes da Reação para a Detecção de um ácido nucleico

Dese- nho	Reação da MNazima	Partizimas		Alvo	Figura
		A	B		
1	Alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B1/1	1 μ M RO4/1Target	Figura 8
	Nenhum alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B1/1	H ₂ O	
2	Alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B2/1	1 μ M RO4/1Target	Figura 9
	Nenhum alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B2/1	H ₂ O	
3	Alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B3/1	1 μ M RO4/1Target	Figura 9
	Nenhum alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B3/1	H ₂ O	
	Fora do alvo 1	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B3/1	1 μ M RO4/1mutTa rget	
	Fora do alvo 2	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B3/1	3 μ g Lambda DNA	
	Controle da	1 μ M RO4A1mut/	1 μ M RO4B3/1	1 μ M RO4/1Target	

Hibridização

		1			
	Apenas <i>Parti-</i> <i>zima A</i>	1 μ M RO4A1/1	-	1 μ M RO4/1Target	
	Apenas <i>Parti-</i> <i>zima B</i>	-	1 μ M RO4B3/1	1 μ M RO4/1Target	
3	Alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B3/1	1 μ M RO4/1Target	Figura 10
	Nenhum alvo	1 μ M RO4A1/1	1 μ M RO4B3/1	H ₂ O	
4	Alvo	1 μ M RO4A2/1	1 μ M RO4B3/1	1 μ M RO4/1Target	
	Nenhum alvo	1 μ M RO4A2/1	1 μ M RO4B3/1	H ₂ O	
Todos	Fundo	-	-	-	-

Cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante um experimento foi primeiramente testado quanto a seu nível de fundo da fluorescência, pois isto reconhecidamente varia entre cavidades. Isto foi medido lendo a fluorescência da mistura em massa sozinha. Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

1.6. Resultados: Detecção da Clivagem do Substratorepórter SubBi-1-FB

As MNazimas com Desenhos 1 e 2 apresentaram pouca evidência de clivagem dependente do alvo do substratorepórter sob as condições deste experimento (Figura 8). A fluorescência foi similar para reações com e sem alvo oligonucleotídeo RPLPO-alvo. A adição do oligonucleotídeo RPLPO-alvo resultou em um aumento de fluorescência para o desenho 3 (Figuras 9 e 10) e desenho 4 (Figura 10). Isso é consistente com a formação de MNazimas ativas na presença do ácido nucléico-alvo, resultando na clivagem do substratorepórter entre o par de corantes fluoróforo e *quencher*, causando um aumento na fluorescência. A fluorescência dos controles sem

alvo foi mais baixa do que nas reações que contêm alvo, e nenhuma das reações de controle apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo (Figuras 8-10). Isto demonstra que o aumento na fluorescência produzido em reações que contêm alvo se deve à combinação dependente do
 5 alvo de uma MNAzima cataliticamente ativa que então clivou o substrato-repórter. A eficiência da clivagem do desenho 4 foi maior do que o desenho 3 para o sistema de RPLPO (Figura 10).

As reações de controle fora do alvo, de hibridização, apenas *Partizima A* e apenas *Partizima B* estão ilustradas para o desenho 3 (Figura
 10 9). Os níveis de fluorescência destes controles foram mais baixos ou similares àquele das reações sem alvo. Nenhuma das reações de controle apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo. Estes resultados demonstram ainda mais que a clivagem do substrato-repórter é dependente da presença dos oligonucleotídeos da *Partizima A* e da *Partizima B* que são
 15 necessários para a combinação de uma MNAzima ativa, bem como da sequência do ácido nucléico-alvo.

Exemplo 2: MNAzimas para a Detecção de miR-20 ou Sequências de DNA Curtas Homólogas a miR-20.

2.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

20 A detecção que usa MNAzimas pode ser usada também para a análise de miRs. Neste exemplo, a MNAzima se forma apenas quando a sequência correta de miR está presente. Esta MNAzima pode distinguir entre sequências de miR relacionadas, como por exemplo, hsa-miR-20 e hsa-miR-93.

25 Nos experimentos conduzidos para medir a atividade catalítica da MNAzima descrita na Figura 11, os oligonucleotídeos das *partizimas A* e *B* foram desenhados para acertar hsa-miR-20. As sequências dos oligonucleotídeos das *partizimas A* e *B* estão listadas abaixo de 5' para 3'. Nas sequências que se seguem, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e
 30 as bases em itálico hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 10: Partizima A2:

miR20A2/1:**TACCTGCACTACGGTCGAAATAGTGAGT**

SEQ ID NO: 11: Partizima B3:

miR20B3/1:**CATCTCTTCTCCGAGCTAAGCACTTTA**

2.2. Substratorepórter

5 A atividade da MNazima é monitorada pela clivagem de um substratorepórter de ácido nucléico duplamente rotulado. O substratorepórter para este exemplo é SubBi-1-FB com a seqüência, de 5' para 3', como abaixo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA. As bases sublinhadas indicam a posição de

10 uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3'. As mudanças na fluorescência em virtude da clivagem de SubBi-1-FB no ribonucleotídeo entre FAM e BHQ1 foram monitoradas a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM).

15 SEQ ID NO: 6: SubBi-1-FB:
ACTCACTATaGGAAGAGATG

2.3. Alvo

A seqüência do alvo para este exemplo foi um oligonucleotídeo de DNA, D-20, que tem uma seqüência homóloga à espécie RNA hsa-miR-20 (Figura 11 (i)). A seqüência de D-20Target é a seguinte, escrita de 5' para

20 3':

SEQ ID NO: 12: D-20Target:

TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

2.4. Seqüências de Controle

25 Qualquer ensaio desenvolvido para detectar microRNAs deve distinguir especificamente a seqüência de miR desejada, por exemplo, hsa-miR-20, de seqüências relacionadas, tal como hsa-miR-17-5p, que pode diferir do miR-alvo em uma ou mais bases (Figura 11(i)). Os oligonucleotídeos de miR "fora do alvo" relacionado a hsa-miR-20, 17-5p, 93, 106a e 106b miR também fo-

30 ram sintetizados como DNA e estão escritos de 5' para 3' abaixo.

SEQ ID NO: 13: D-17-5pTarget:

CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

SEQ ID NO: 14: D-93Target:

AAAGTGCTGTTCGTGCAGGTAG

SEQ ID NO: 15: D-106aTarget:

AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGC

5 SEQ ID NO: 16: D-106bTarget:

TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT

2.5. Condições de Reação

A detecção da sequência do alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substrato repórter pela MNAzima cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 25 μ L. Todas reações foram conduzidas a 40°C em um termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 7 segundos por um total de 4 minutos. Todas reações na Tabela 5 continham a mistura em massa que
10
15
consiste em 1 μ M SubBi-1-FB 1 μ M, Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) e MgCl₂ 25 mM.

Tabela 5: Componentes das Reações para a Detecção de um Ácido Nucleico-alvo como Ilustrado na Figura 11

Reação da MNAzima	Modelo	Partizima A	Partizima B
Alvo	D-20 1 μ M	1 μ M miR20A2/1	1 μ M miR20B3/1
Nenhum alvo	H ₂ O		
Fora do alvo17-5p	D-17-5p 1 μ M		
Fora do alvoD-93	D-93 1 μ M		
Fora do alvoD-106a	D-106a 1 μ M		
Fora do alvoD-106b	D-106b 1 μ M		
Partizima A apenas	D-20 1 μ M	1 μ M miR20A2/1	-
Partizima B apenas	D-20 1 μ M	-	1 μ M miR20B3/1

Cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante o experimento foi primeiramente testado
20
quanto a seu nível de fundo da fluorescência, pois isto reconhecidamente varia entre cavidades. Isto foi medido lendo a fluorescência da mistura em

massa sozinha. Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

As reações que contêm alvo, "nenhum alvo" e "fora do alvo" foram realizadas na presença de concentrações 5 mM e 100 mM de MgCl_2 e comparadas com MgCl_2 25 mM (Figura 12).

2.6. Resultados: Detecção da Clivagem do Substratorepórter SubBi-1-FB

Os oligonucleotídeos das *partizimas* A e B da MNAzima se combinam para dar uma MNAzima cataliticamente ativa para clivar o substratorepórter apenas na presença da seqüência do alvo. Neste exemplo os controles fora do alvo têm tão poucas quanto duas bases desemparelhadas com os braços sensores (seqüência de ligação do alvo miR-20). O "fora do alvo" D-17-5p tem duas bases desemparelhadas, sendo que apenas uma delas ocorre na região mais discriminatória localizada no meio da seqüência de miR-20. A reação de clivagem que contém a seqüência do alvo D-20 deu um aumento de 26 vezes no sinal em comparação com o controle nenhum alvo (Figura 11(iii)). Isto se compara com os controles fora do alvo, D-17-5p e D-106a, que dão um aumento de 3,5 vezes no sinal em comparação com controle nenhum alvo, e D-93 e D-106b que dão nenhum aumento no sinal em comparação com o controle nenhum alvo (Figura 11(iii)). Assim sendo, a diferenciação de D-20 de seqüências relacionadas demonstra a capacidade de o sistema de MNAzima discriminar seqüências que diferem em apenas poucas bases. Estudos anteriores que usam DNAzimas monomoleculares demonstraram que as DNAzimas têm a capacidade de distinguir mutações de bases individuais (Impey *et al.*, 2000). As MNAzimas permitem também a discriminação de mudanças de bases singulares (vide Exemplo 5 abaixo).

Os controles "*partizima* A apenas" e "*partizima* B apenas" tiveram uma fluorescência similar àquela da fluorescência do fundo (dados não ilustrados).

O uso de enzimas protéicas requer que outros reagentes na reação para estejam em concentrações ideais para a atividade de enzimas protéicas. Por exemplo, a concentração do cofator íon metálico que ajuda uma

DNAzima na clivagem do substratorepórter é mantida em um mínimo em protocolos que utilizam enzimas, tais como polimerases. A detecção direta que usa MNAzimas não requer quaisquer enzimas protéicas, e portanto, as condições da reação podem ser otimizadas para a clivagem rápida do substrato. Nestas reações o cofator íon metálico, por exemplo, Mg^{2+} , pode ser aumentado para otimizar a taxa catalítica da da MNAzima. A Figura 12 ilustra como a concentração de $MgCl_2$ pode ser aumentada até níveis que não podem ser normalmente tolerados em protocolos de detecção de alvos. Em altas concentrações de $MgCl_2$ (100 mM) a eficiência catalítica da MNAzima é mais alta. Além disso, quando se detecta D-20Target, um aumento no $MgCl_2$ não afetou a especificidade da reação, pois D-20Target ainda é claramente distinguível das seqüências relacionadas D-17-5p, Target D-106aTarget, D-93Target e D-106bTarget.

Exemplo 3: MNAzimas (desenhos 5 e 6) para Detecção Direta de um Ácido Nucléico-alvo

3.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

Os desenhos 5 e 6 para MNAzimas, baseados na DNAzima 10:23, foram testados quanto à atividade catalítica (Figura 13). Os versados na técnica devem avaliar que as seqüências dos braços sensores (ligação do alvo) designadas por "N" podem ser substituídas por seqüências específicas do alvo para qualquer ácido nucléico-alvo. As seqüências dos braços de substrato, que se ligam ao substratorepórter, podem ser genéricas e usadas para muitos alvos. Os versados nessas técnicas devem avaliar que as seqüências do substrato designadas por "N" na Figura 13 podem ser substituídas por seqüências de DNA, RNA ou quiméricas de DNA/RNA.

Nos experimentos conduzidos para medir a atividade catalítica das MNAzimas RPLPO MNAzimas descritas na Figura 13, as *partizimas* de oligonucleotídeos A e B foram desenhadas para acertar éxon 5 do gene de RPLPO. As seqüências das *partizimas* A e B *partizimas* estão listadas abaixo de 5' até 3', onde as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. As seqüências não estão nem

sublinhadas, nem negritadas ou nem italicizadas em SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 18 formam, de preferência, uma estrutura em forma de alça, tal como aquela representada na Figura 13 (vide, por exemplo, Desenho 5).

5 SEQ ID NO: 17 partizima A3 RO5A3/2: **CAAAC-GAGTCCTGGCCTTGTC**CGCACAACGAGAGGAAACCTT

SEQ ID NO: 18 partizima B4 RO5B4/2: TGCCCAGGGAGGC-TAGCTGCGGTGGAGACGGATTACACCTTC

SEQ ID NO: 19 partizima A4 RO5A4/2: **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTC-TACAACGAGAGGAAACCTT**

10 SEQ ID NO: 20 partizima B5 RO5B5/2: TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTG-GAGACGGATTACACCTTC

3.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-2 com a sequência, 5' até 3', como abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado na
15 extremidade com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3' e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM). As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.
20

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

3.3. Sequências-alvo

A sequência do alvo para este exemplo foi um oligonucleotídeo
25 sintético RO5/1Target com a sequência, de 5' até 3', como abaixo. Esta sequência-alvo tem a mesma sequência que uma seção do gene de RPLPO; éxon 5.

SEQ ID NO: 22 RO5/1Target: GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACA-AGGCCAGGACTCGTTTG

30 3.4. Componentes da Reação

A detecção da sequência-alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substratorepórter pela MNAzi-

ma cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 25 μ L. Todas reações foram conduzidas a 55°C em um termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 7 segundos por um total de 5 minutos. Todas reações na Tabela 6 continham 1 μ M SubBi-2-FB 1 μ M, Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) e $MgCl_2$ 25 mM.

Tabela 6: Componentes de Reações para a Detecção de um Ácido Nucleico-alvo como ilustrado na Figura 13

Desenho	Partizima A (1 μ M)	Partizima B (1 μ M)	Reação da MNAzima	Alvo
5	RO5A3/2	RO5B4/2	Alvo	RO5/1 1 μ M
			Nenhum alvo	H ₂ O
6	RO5A4/2	RO5B5/2	Alvo	RO5/1 1 μ M
			Nenhum alvo	H ₂ O

Cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante o experimento foi primeiramente testado quanto a seu nível de fundo da fluorescência, pois isto reconhecidamente varia entre cavidades. Isto foi medido lendo a fluorescência da mistura em massa sozinha. Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

3.5. Resultados: Detecção e Clivagem do Substrato

As reações que contêm o alvo, com as MNAzimas com os desenhos 5 e 6, apresentaram um aumento na fluorescência no decorrer do tempo em comparação com o controle sem alvo (Figura 13ii), quadros superior e inferior, respectivamente. Isto demonstra que os oligonucleotídeos de *partizimas* se combinam em uma MNAzima cataliticamente ativa e clivam o substrato repórter apenas na presença da sequência do alvo. Os controles sem alvo não apresentaram um aumento na fluorescência, indicando que nenhuma clivagem estava ocorrendo. A taxa da clivagem para o desenho 6 foi consideravelmente mais rápida do que para o desenho 5.

Exemplo 4: Detecção de Amplicons a partir da Ampliação *in vitro* por

PCR de uma seqüência de Ácidos Nucléicos Usando MNAzimas

4.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

As MNAzimas podem ser usadas também para detectar amplicons a partir de seqüência de ácido nucléico ampliada *in vitro*. Para este exemplo, a detecção de amplicons é realizada como um processo de duas etapas, mas pode ser realizada também em uma única reação. Neste caso, os oligonucleotídeos usados para detectar os amplicons basearam-se no desenho 4, usando os oligonucleotídeos RO4A2/1 e RO4B3/1 (Figura 10), que detectam o gene de RPLPO humano. Os oligonucleotídeos das *partizimas* A e B estão listados abaixo. Nas seqüências que se seguem, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 2 Partizima A2 RO4A2/1: **GCTGGTCATCCAGCAG**CGGTC-
15 GAAATAGTGAGT

SEQ ID NO: 5 Partizima B3 RO4B3/1: **CATCTCTTCTCCGAGCGTGTTC**-
GACAATGGC

4.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-1-FB com a seqüência, de 5' para 3', como abaixo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as base em letras maiúsculas representam DNA. As bases sublinhadas indicam a posição de uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3'. A clivagem de SubBi-1-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em
25 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM).

SEQ ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATG

4.3. Iniciadores para a Ampliação do gene de RPLPO humano por PCR

30 A seqüência-alvo para este exemplo foi gerada por ampliação por PCR *in vitro* da seqüência a partir do éxon 4 do gene de RPLPO do DNA genômico humano extraído da linhagem de células K562 (PROMEGA), u-

sando os iniciadores de PCR listados abaixo.

SEQ ID NO: 23 Iniciador 5RO4/3:

CAAGACTGGAGACAAAGTG

SEQ ID NO: 24 Iniciador 3RO4/2:

5 GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

4.4. Oligonucleotídeo-alvo de Controle

Um oligonucleotídeo foi sintetizado e usado como um controle positivo para a sequência RPLPO. O oligonucleotídeo de controle não foi ampliado por PCR nestes experimentos.

10 SEQ ID NO: 8 RO4/1Target:

GCCATTGTGGAACACCTGCTGGATGACCAGC

4.5. Componentes da Reação: Ampliação por PCR do Gene de RPLPO

A ampliação por PCR do gene de RPLPO foi realizada no volume total da reação de 25 µL. Todas as reações de ampliação foram conduzidas em um termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os parâmetros da ciclagem foram 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 5 segundos e 65°C por 30 segundos (com um decréscimo de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 5 segundos e 55°C por 30 segundos. Todas reações continham 5RO4/3 40 nM e 200 nM de 3RO4/2, MgCl₂ 3 mM, 200 µM de cada dNTP, 1x Immobuffer (Bioline) e 1 unidade de Immolase (Bioline) com ou sem 500 ng de DNA genômico humano K562 (PROMEGA).

4.6. Componentes da Reação: Detecção de Sequência-alvo

25 A detecção da sequência-alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substratorepórter pela MNzima cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 25 µL. Todas reações foram conduzidas a 40°C em um termociclador SmartCycler[®] System (Cepheid). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 7 segundos por um total de 10 minutos. Todas reações na Tabela 7 continham a mistura em massa de 1 µM SubBi-1-FB, Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) e MgCl₂ 25 mM. As concentrações

de oligonucleotídeo *Partizimas* A e B são 1 μ M.

Tabela 7: Componentes da Reação para a Detecção de Amplicons do DNA de RPLPO após PCR in vitro. Os Sistemas de MNazima Usaram o Desenho 4 (RO4A2/1:RO4B3/1)

Reação da MNazima RPLPO	Alvo
Alvo—oligo (Controle Positivo RPLPO)	10 ¹² cópias RO4/1Alvo Oligo
Produto-alvo da PCR RPLPO (Teste)	5 μ L de produto da PCR R-PLPO (equivalente a 100 ng do DNA genômico)
Nenhum Alvo (Controle Negativo RPLPO)	5 μ L de H ₂ O
DNA genômico não-ampliado (Controle Negativo)	5 μ L contendo 500 ng de DNA genômico

- 5 Cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante um experimento foi primeiramente testado quanto a seu nível de fundo da fluorescência, pois isto reconhecidamente varia entre cavidades. Isto foi medido lendo a fluorescência da mistura em massa sozinha. Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

4.7. Resultados: Detecção de Clivagem do Substratorepórter SubBi-1-FB

- 15 O desenho 4 de MNazima para a detecção de RPLPO, éxon 4, apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo RPLPO foi ampliada a partir do DNA genômico humano por PCR (Figura 14). O aumento na fluorescência observado para os amplicons RPLPO foi similar àquele observado para 10¹² cópias dos oligonucleotídeos de controle positivo RO4/1Target. A fluorescência dos controles sem alvo foi mais baixa do que aquela nas reações que contêm alvo, e nenhuma das reações de controle negativo apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo. Isto demonstra que o aumento na fluorescência produzido nas reações que contêm alvo deve-se à combinação dependente do alvo de uma MNazima cataliticamente ativa que depois clivou o substratorepórter.

Exemplo 5: Uso de MNAzimas para a Detecção de Amplicons Produzidos por Ampliação por PCR *in vitro* de Sequências de Ácidos Nucléicos Curtas.

5.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

5 As MNAzimas podem ser usadas para detectar amplicons a partir de sequência de ácidos nucleicos ampliada *in vitro*. Neste exemplo, a ampliação e a detecção são realizadas em um processo de três etapas (Figura 5), mas transcrição reversa, ampliação por PCR e detecção poderiam ser realizadas também concomitantemente em um único tubo de reação. Para
10 este exemplo, os oligonucleotídeos usados para detectar os amplicons usaram o desenho 4, oligonucleotídeos miR de *partizimas* A e B (Figura 11), que são desenhados para detectar hsa-miR-20. Os oligonucleotídeos de *partizimas* da MNAzima estão listados abaixo, de tal modo que as bases sublinhadas façam parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em
15 negrito hibridizem com o alvo, e as bases em itálico hibridizem para o substrato.

SEQ ID NO: 10 Partizima A2 miR20A2/1:

TACCTGCACTACCGGTCGAAATAGTGAGT

SEQ ID NO: 11 Partizima B3 miR20B3/1:

20 **CATCTCTTCT**CCGAGCTAAGCACTTTA

5.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-1-FB com a sequência, de 5' para 3', abaixo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA. As bases sublinhadas indicam a posição de uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma
25 porção BHQ1 na extremidade 3'. A clivagem de SubBi-1-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM).

SEQ ID NO: 6 SubBi-1-FB:

30 ACTCACTATaGGAAGAGATG

5.3. Iniciadores da PCR para Ampliação de Sequências-alvo de Oligonucleotídeos D-20 com 22 Meros

A seqüência-alvo para este exemplo foi gerada por ampliação *in vitro* do oligonucleotídeo D-20, usando os iniciadores de PCR oligonucleotídeos listados abaixo.

SEQ ID NO: 25 Iniciador 5miR20/1:

5 ACGTGACGCTAAAGTGCT

SEQ ID NO: 26 Iniciador 3miR20/L1:

CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

SEQ ID NO: 27 Iniciador 3miR20/P1:

CGAATGACGTACCTGCAC

10 5.4. Seqüências-alvo e Controles

A seqüência de DNA (D-20Target) com homologia a miR-20 foi usada como modelo para demonstrar a ampliação e detecção de uma seqüência curta usando PCR e MNAzimas.

SEQ ID NO: 12 D-20Target:

15 TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

Além disso, para assegurar que quaisquer seqüências "fora do alvo" intimamente relacionadas ampliadas erroneamente não possam ser detectadas com o sistema miR-20, o oligonucleotídeo de DNA-alvo de controle D-17-5pTarget também foi estado com o sistema de oligonucleotídeos miR-20 de *partizimas* A e B.

SEQ ID NO: 13 D-17-5pTarget:

CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT

5.5 Componentes da Reação: Ampliação de Seqüência-alvo

A ampliação da seqüência-alvo foi realizada em um volume total da reação de 25 µL. Todas reações de ampliação foram conduzidas em um termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os parâmetros da ciclagem para as etapas 1 e 2 (transcrição reversa e PCR) foram 42°C por 30 minutos, 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 5 segundos e 30°C por 30 segundos (mais 2°C por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 5 segundos e 50°C por 30 segundos. As reações inicialmente continham apenas 3miR20/L1 10 nM, depois 42°C por 30 minutos, a reação foi pausada e adicionou-se 3miR20/P1 30 nM e 200 nM de 5miR20/1. Todos

os outros reagentes listados estavam na mistura de reação inicial, MgCl_2 3 mM, 200 μM de cada dNTP, 1 x Immobuffer (Bioline) e 1 unidade de Immobilase (Bioline), e (a) 10^8 cópias de D-20Target, ou (b) nenhum alvo (dH_2O) ou (c) 10^8 cópias de DNA fora do alvo (D-17-5pTarget).

5 5.6. Componentes da Reação: Detecção de Sequência-alvo

A detecção da sequência-alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substrato-repórter pela MNzima cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 25 μL . Todas reações foram conduzidas a 40°C em um termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 7 segundos por um total de 10 minutos. Todas reações na Tabela 8 continham a mistura em massa de 1 μM SubBi-1-FB, Tris HCl (pH 9,0 a 25°C) e MgCl_2 25 mM. As concentrações de *Partizimas* A e B foram 1 μM .

15 Table 8: Componentes da Reação para a Detecção de Sequências de Ácidos Nucléicos Curta (20-25 meros) Ampliadas *in vitro*. O Sistema de MNazima Usou o Desenho 4 (miR20A2/1:miR20B3/1).

Reação de MNazima	Alvo
miR-20 Alvo-oligonucleotídeo (Controle Positivo miR20)	10^{12} cópias D-20Target em 5 μL (não ampliado)
miR-20 Alvo-produto da PCR (Teste)	D-20 produto da PCR (5 μL da reação de 25 μL) (equivalente a 2×10^7 cópias de D-20Target ampliado por PCR)
miR-20 Alvo-oligonucleotídeo (Controle não-ampliado D-20)	10^8 cópias D-20Target em 5 μL (não ampliado)
Nenhum alvo (Controle Negativo miR20)	5 μL de H_2O
Fora do alvo (Controle fora do alvo para miR20)	D-17-5p produto da PCR (5 μL da reação de 25 μL) (equivalente a 2×10^7 cópias de D-17-5pTarget ampliado por PCR)

Cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante um experimento foi primeiramente testado quanto a seu nível de fundo da fluorescência. Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

5.7. Resultados: Detecção da Clivagem do Substratorepórter SubBi-1-FB

O desenho 4 de MNAzima para a detecção de miR-20 apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo usada foi D-20Target ampliada por PCR (Figura 15(i)).

A fluorescência dos controles sem alvo foi mais baixa do que nas reações que contêm alvo, e nenhuma das reações de controle negativo apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo. Isto demonstra que o aumento na fluorescência produzido em reações que contêm alvo se deve à combinação dependente do alvo de MNAzimas cataliticamente ativas que então clivaram o substratorepórter.

O controle fora do alvo (D-17-5p) neste exemplo também foi ampliado com os iniciadores miR-20 pois ele tem apenas um desemparelhamento na posição terminal dentro das regiões que hibridizam com os iniciadores miR-20. A ampliação de D-20Target e D-17-5pTarget foi confirmada por eletroforese. Como ambos amplicons incorporam as seqüências dos iniciadores nos seus terminais, eles agora diferem apenas em uma única base no meio dos amplicons. A MNAzima discriminou exitosamente entre os amplicons D-20 e D-17-5p. Esta discriminação é um resultado da diferença do único nucleotídeo nos amplicons D-20 e D-17-5p na região que fica entre os iniciadores, como ilustrado na Figura 15(ii). A MNAzima requer que as quatro bases entre os iniciadores estejam presentes (permitindo assim a discriminação entre dímero de iniciador e amplicons genuínos) e estas quatro bases devem ser exatas com nenhuma substituição tolerada. Este exemplo ilustra a capacidade de as MNAzimas discriminarem entre seqüências intimamente relacionadas, incluindo aquelas que diferem em apenas um único polimorfismo de nucleotídeo.

Exemplo 6: Uso de MNAzimas para a Detecção de Amplicons de microRNA Produzidos por Ampliação por PCR *in vitro* do RNA total

6.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

As MNAzimas podem ser usadas para detectar amplicons a partir de seqüências de ácidos nucleicos ampliadas *in vitro*. Neste exemplo, a ampliação e a detecção são realizadas em um processo de duas etapas (Figura 5), onde a transcrição reversa e a ampliação por PCR ocorrem em um primeiro tubo, e em seguida, por detecção mediada por MNAzimas em um segundo tubo. Para este exemplo os oligonucleotídeos usados para detectar os amplicons foram do Desenho 4, oligonucleotídeos miR de *partizimas* A e B (Figura 11), que são desenhados para detectar hsa-miR-20. Os oligonucleotídeos de *partizimas* de MNAzima estão listados abaixo, de tal modo que as bases sublinhadas façam parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizem com o alvo, e as bases em itálico hibridizem para o substrato.

SEQ ID NO: 10 Partizima A2 miR20A2/1:

TACCTGCACTACGGTCGAAATAGTGAGT

SEQ ID NO: 11 Partizima B3 miR20B3/1:

CATCTCTTCTCCGAGCTAAGCACTTTA

6.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-1-FB com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA. As bases sublinhadas indicam a posição de uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3'. A clivagem de SubBi-1-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM).

SEQ ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATG

6.3. Iniciadores da PCR para Ampliação de hsa-miR-20

A seqüência-alvo para este exemplo foi gerada por ampliação *in vitro* do RNA total do timo humano (Ambion), usando os iniciadores de PCR

oligonucleotídeos listados abaixo.

SEQ ID NO: 25 Iniciador 5miR20/1:

ACGTGACGCTAAAGTGCT

SEQ ID NO: 26 Iniciador 3miR20/L1:

5 CGTCCGAATGACGTACCTGCAC

6.4. Seqüências-alvo e controles

O RNA total do timo humano (Ambion) foi usado como modelo para a ampliação de miR-20, e os amplicons foram detectados subsequentemente usando MNazimas (seção 6.6).

10 A seqüência de RNA (R-20Target) com homologia a miR-20 foi usada como um controle positivo para demonstrar a ampliação de seqüências curtas, e em seguida, por detecção dos amplicons resultantes usando MNazimas.

SEQ ID NO: 28 R-20Target:

15 uaaagugcuuauagugcaggua

6.5. Componentes da Reação: Ampliação de Seqüência-alvo

A transcrição reversa e a ampliação por PCR da seqüência-alvo foi realizada em um volume total da reação de 25 µL. Todas reações de ampliação foram conduzidas em um termociclador GeneAmp[®] PCR System 20 9700 (Applied Biosystems). Os parâmetros da ciclagem foram 40°C por 30 minutos, 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 5 segundos e 30°C por 30 segundos (com um aumento de 2°C na temperatura por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 5 segundos e 50°C por 30 segundos. As reações continham 3miR20/L1 40 nM e 200 nM de 5miR20/1, MgCl₂ 3 mM, 200 25 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina (Promega), 30 unidades de T-transcriptase Reversa MMLV(-H) (Promega), 1 x Immobuffer (Bioline) e 0,5 unidade de Immolase (Bioline), e (a) 1 µg de RNA total, ou (b) nenhum alvo (dH₂O) ou (c) 10¹⁴ cópias (5 µM) de oligonucleotídeo R-20Target.

6.6. Componentes da Reação: Detecção de Seqüência-alvo

30 A detecção da seqüência-alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substratorepórter pela MNzima cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e

o volume total de todas reações foi de 25 µL. Todas reações foram conduzidas a 40°C em um termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 30 segundos por um total de 5 minutos. Todas reações na Tabela 9 continham a mistura em massa de 1 µM SubBi-1-FB, partizima A 1 µM, partizima B 1 µM, Tris HCl 50 mM (pH 9,0 a 25°C), MgCl₂ 25 mM e alvo (como indicado na Tabela 9).

Tabela 9: Componentes da Reação para a Detecção do RNA total Ampliado *in vitro*. O Sistema de MNAzima Usou o Desenho 4 (miR20A2/1:miR20B3/1).

Reação da MNAzima	Alvo
miR-20 Target - oligonucleotídeo de RNA (Controle Positivo miR-20)	R-20Target produto da PCR (5 µL a partir de uma reação de 25µL) (equivalente a 2×10^{13} cópias de R-20Target oligonucleotídeo ampliado)
miR-20 Target – RNA total (Teste)	Produto da PCR (5µL a partir de uma reação de 25µL) (equivalente a 200ng RNA total ampliado)
RNA Nenhum alvo (Controle Negativo miR20)	Produto da PCR (5µL a partir de uma reação de 25µL) a partir da reação do "controle sem alvo" que contém dH ₂ O.
RNA total não-ampliado (Controle Negativo miR20)	RNA Total (1µg) em um volume total de 5 µl

O nível de fundo da fluorescência foi medido para cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid). Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

6.7. Resultados: Detecção da Clivagem do Substratorepórter SubBi-1-FB

O Desenho 4 de MNAzima para a detecção de miR-20 apresen-

tou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a seqüência-alvo usada era RNA total ampliado por PCR (Figura 16).

A fluorescência do controle sem alvo RNA foi mais baixa do que aquela nas reações que contêm alvo RNA, e nenhuma das reações de controle negativo apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo. Isto demonstrata que o aumento na fluorescência produzido em reações que contêm alvo se deve à combinação dependente do alvo ampliado por PCR de MNAzimas cataliticamente ativas que então clivaram o substrato-repórter. Embora este experimento tivesse sido realizado em duas etapas (transcrição reversa/PCR e depois detecção final da MNAzima), todas etapas poderiam ser realizadas concomitantemente em um único tubo de reação, permitindo que a reação fosse monitorada em tempo real.

Exemplo 7: Detecção de Alvos por MNAzimas Acopladas a uma Cascata de Sinais de Ácidos Nucléicos.

7.1. Cascatas de Ampliação de Sinais Iniciada por MNAzimas

É possível baixar o limite de detecção de ácidos nucleicos acoplando a detecção por MNAzima a uma reação de cascata de ampliação de sinais, como ilustrado na Figura 7. As MNAzimas possibilitam também um mecanismo disparador altamente específico para iniciação de uma cascata.

7.2. Cascata de DNAzimas Espacialmente Separadas

As DNAzimas podem ser amarradas a um suporte, usando uma série de métodos que incluem a afixação de bolachas de plástico revestidas com estreptavidina que permitem a afixação de DNAzimas rotuladas com biotina. As seqüências usdas para a afixação podem server também como substratos genéricos de MNAzymas/DNAzimas. Os alvos (por exemplo, seqüências de ácidos nucleicos) podem ser detectados depois da hibridização para seqüências de *partizimas* que permitem a formação de MNAzimas ativas. As MNAzimas podem então clivar substratos genéricos amarrados, liberando assim a DNAzima A. A DNAzima A pode então migrar para uma segunda seqüência genérica sobre uma segunda superfície sólida, onde a DNAzima B está amarrada. A DNAzima A pode então clivar a segunda seqüência genérica, liberando assim a DNAzima B. A clivagem deste substrato

entre os pares de corantes fluoróforo/*quencher* pode resultar em maior fluorescência. A DNAzima B liberada, por sua vez, pode clivar mais do primeiro substrato, liberando assim mais da DNAzima A, e iniciando uma cascata de sinais que resulta na ampliação do sinal (Figura 7).

5 Este exemplo descreve um mecanismo para gerar uma cascata de sinais, usando DNAzimas espacialmente separadas; entretanto, existem outros métodos que também possibilitariam a ampliação de sinais usando ácidos nucleicos catalíticos. Os versados nessas técnicas devem avaliar que qualquer um desses métodos poderia ser inteiramente funcional neste caso, desde que por algum meio de afixação ou separação física, um substrato seja mantido "inacessível" para uma enzima que poderia atuar sobre ele. Outros exemplos de ampliação de sinais de ácidos nucleicos que poderiam ser acoplados a reações iniciadas por MNAzimas incluem, porém sem limitações, cascatas de ligação (Paul e Joyce, 2004) e cascatas circulares de DNAzimas (Levy e Ellington, 2003), cada um dos quais envolvendo o princípio básico de manter uma "separação" de uma enzima do seu substrato, após o que a enzima e o substrato se conectam, de tal modo que a atividade catalítica possa resultar, direta ou indiretamente, em um sinal ampliado, or resulte em uma cascata de sinais.

20 **Exemplo 8: Uso de MNAzimas para a Quantificação de um Ácido Nucleico-alvo.**

8.1. **Oligonucleotídeos de Partizimas**

As MNAzimas podem ser usadas para monitorar a ampliação de ácidos nucleicos-alvo em tempo real, usando métodos de ampliação de alvos *in vitro*, tal como PCR. Além disso, o monitoramento em tempo real permite que a quantidade de alvo inicialmente presente na reação seja quantificada. Neste exemplo, a ampliação e a detecção são realizadas em um processo de uma etapa, onde a ampliação por PCR e a detecção mediada por MNAzima ocorrem simultaneamente em um único tubo. Os oligonucleotídeos A e B de *partizimas* usaram o Desenho 6 com braços sensores complementares a éxon 5 do gene de RPLPO humano (Figura 17(i)). Os oligonucleotídeos de *partizimas* estão listados abaixo, sendo que o "-P" indica

fosforilação de 3' do oligonucleotídeo.

SEQ ID NO: 29 Partizima A4 RO5A4/3-P: **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTC-TACAACGAGGTTGTGCTG-P**

5 SEQ ID NO: 30 Partizima B5 RO5B5/3-P: **CGGTTGGTGAGGC-TAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P**

8.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-3 com a sequência, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-3-FB foi rotulado na extremidade com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1
10 na extremidade 3'. A clivagem de SubBi-3-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM). As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 31 SubBi-3-FB:

15 CAGCACAACCGuACCAACCG

8.3. Iniciadores da PCR para a Ampliação de RPLPO éxon 5

A sequência-alvo para este exemplo foi gerada por ampliação *in vitro* do DNA genômico humano, usando os iniciadores de PCR oligonucleotídeos listados abaixo.

20 SEQ ID NO: 32 Iniciador 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEQ ID NO: 33 Iniciador 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

8.4. Sequência-alvo

25 O DNA genômico humano extraído da linhagem de células K562 (Promega) foi usado como modelo para a ampliação do gene de RPLPO.

8.5. Componentes da Reação: Ampliação e Quantificação de Sequência-alvo

30 A ampliação e a quantificação em tempo real da sequência-alvo foram realizadas em um volume total da reação de 25 µL. Todas reações foram conduzidas em um termociclador ABI7700 (Applied Biosystems). Os parâmetros da ciclagem foram 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 5

segundos e 60°C por 30 segundos (com decréscimo de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 5 segundos e 50°C por 30 segundos. As reações continham 5RO5/1 40 nM e 200 nM de 3RO5/1, RO5A4/3-P 200 nM e RO5B5/3-P 200 nM, SubBi-3-FB 200 nM, MgCl₂ 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina (Promega), 1 x referência ROX (Invitrogen), 1 x Immobuffer (Bioline) e 0,25 unidade de Immolase (Bioline), e modelo de DNA genômico (20.000 pg, 4.000 pg, 800 pg, 160 pg, 32 pg e 6,4 pg) ou nenhum alvo (dH₂O).

8.6. Resultados: Ampliação de Alvo e Clivagem do Substratorepórtter SubBi-3-FB

O desenho 6 de MNazima para a detecção e quantificação em tempo real de RPLPO éxon 5 apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo usada foi o DNA genômico humano ampliado por PCR (Figura 17(ii)).

A fluorescência do controle sem alvo de DNA foi mais baixa do que nas reações que contêm alvo de DNA e não aumentou durante a reação. Isto demonstra que o aumento na fluorescência produzido nas reações que contêm alvo deve-se à combinação dependente do alvo de MNazimas cataliticamente ativas, que então clivaram o substratorepórtter. Uma curva-padrão foi gerada plotando o log das concentrações de DNA contra o ciclo-limite, resultando em uma plotagem linear com um coeficiente de correlação de 0,995. Na reação que contém 6,4 pg de DNA genômico, aproximadamente 10 cópias do alvo estariam presentes. Este exemplo demonstra a alta sensibilidade desta abordagem.

Embora este experimento tenha usado razões assimétricas de iniciadores, os experimentos subsequentes com PCR em tempo real (dados não ilustrados) demonstraram que a detecção por MNazimas foi compatível também com PCR que usa razões assimétricas de iniciadores.

Exemplo 9: Reação Multiplex com Múltiplas MNazimas que Assestam Múltiplos Alvos Simultaneamente.

9.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

Múltiplos alvos podem ser detectados simultaneamente em uma

reação multiplexada que compreende múltiplas MNAzimas singulares. Cada MNAzima tem braços sensores específicos para um alvo e braços de substrato específicos para um membro singular de uma série de substratos genéricos, cada um deles sendo rotulado com um fluoróforo diferente (Figura 18).

- 5 No exemplo que se segue, as MNAzimas foram desenhadas para detectar dois alvos diferentes, a saber, as seqüências de RPLPO e D-20. Deve-se avaliar que inúmeros alvos podem ser usados de acordo com o método. As seqüências das *partizimas* A e B estão listadas abaixo, de 5' até 3'. Nas seqüências que se seguem as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo e as bases em itálico hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 29 Partizima A4 RO5A4/3-P: **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTC-TACAACGAGGTTGTGCTG-P**

- 15 SEQ ID NO: 30 Partizima B5 RO5B5/3-P: **CGGTTGGTGAGGC-TAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P**

SEQ ID NO: 34 Partizima A4 miR20A4/2: **TACCTGCACTAACAACGAGAG-GAAACCTT**

SEQ ID NO: 35 Partizima B5 miR20B5/2: **TGCCCAGGGAGGCTAGCTTA-AGCACTTTA**

20 9.2. Substratos-repórter

- Os dois substratos-repórter usados neste exemplo foram SubBi-2 e SubBi-3 com as seqüências, de 5' para 3', como abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado Sub-
- 25 Bi-2-FB. SubBi-3 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-JOE na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado Sub-Bi-3-JB.

- A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM) e a clivagem de SubBi-3-JB foi monitorada a 548 nm (comprimento de onda de emissão JOE) com excitação em 520 nm (comprimento de onda de excitação JOE). As bases em letras minúsculas

representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

SEQ ID NO: 36 SubBi-3-JB:

5 CAGCACAACCguCACCAACCG

9.3. Sequências-alvo

As seqüências-alvo para este exemplo foram os oligonucleotídeos sintéticos RO5/1Target e D-20Target com as seqüências, de 5' para 3', como abaixo. A seqüência de RO5/1Target tem a mesma seqüência que
10 uma seção do gene de RPLPO, éxon 5, e a seqüência de D-20Target é um homólogo de DNA do RNA hsa-miR-20.

SEQ ID NO: 22 RO5/1Target:

GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

SEQ ID NO: 12 D-20Target:

15 TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA

9.4. Condições da Reação

A detecção das seqüências-alvo foi medida monitorando o aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem dos substratos-repórter pelas MNAs cataliticamente ativas. As reações foram iniciadas pela adi-
20 ção de substrato, e o volume total de todas reações foi de 25 µL. Todas reações foram conduzidas a 55°C em um termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 7 segundos por um total de 5 minutos. Todas reações na Tabela 10 continham o tampão PCR II (Applied Biosystems) e MgCl₂ 25 mM.

Tabela 10: Componentes de Reações para a Detecção Simultânea de Dois Ácidos Nucléicos-alvo Diferentes.

Tipo de Reação	Partizimas A (1 μ M)	Partizimas B (1 μ M)	Alvo
Singleplex D-20	miR20A4/2	miR20B5/2	D-20Target 1 μ M
			Nenhum alvo (H ₂ O)
Singleplex RPLPO	RO5A4/3-P	RO5B5/3-P	RO5/1Target 1 μ M
			Nenhum alvot (H ₂ O)
Multiplex D-20 e RPLPO	miR20A4/2 e RO5A4/3-P	miR20B5/2 e RO5B5/3-P	D-20Target 1 μ M e RO5/1Target 1 μ M
			Nenhum alvo (H ₂ O)

Cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante um experimento foi primeiramente testado quanto a seu nível de fundo da fluorescência, pois isto reconhecidamente varia entre cavidades. Isto foi medido lendo a fluorescência da mistura em massa sozinha. Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

9.5. Resultados: Detecção e Clivagem do Substrato

As reações "uniplex" que contêm o alvo D-20 ou RPLPO apresentaram um aumento na fluorescência no decorrer do tempo em comparação com o controle sem alvo (Figura 19 (i)). Isto demonstra que as *partizimas* se combinam em uma MNAzima cataliticamente ativa e clivam o substrato repórter apenas na presença da sequência-alvo. Os controles "sem alvo" (dH₂O) não aumentaram em fluorescência, indicando que nenhuma clivagem ocorreu na ausência do alvo. A reação multiplex para a detecção simultânea de RPLPO e D-20 (Figura 19 (ii)) produziu resultados similares para cada alvo àqueles observados nas reações uniplex para cada alvo. Nenhum aumento na fluorescência foi observado na reação de controle "sem alvo". Estes resultados demonstram a detecção simultânea de múltiplos alvos em uma única reação, sem perda de especificidade.

Exemplo 10: Uso de MNAzimas para a Quantificação de Amplicons

Produzidos por Ampliação *in vitro* de microRNA.

10.1. Partizima Oligonucleotídeos de *Partizimas*

As MNAzimas podem ser usadas para monitorar a ampliação de ácidos nucléicos-alvo em tempo real, usando métodos de ampliação de alvos *in vitro*, tal como RT-PCR. Além disso, o monitoramento em tempo real permite que a quantidade de alvo inicialmente presente na reação seja quantificada. Neste exemplo, a ampliação e a detecção são realizadas em um processo de duas etapas, onde a primeira etapa envolve a produção de cDNA por intermédio de transcrição reversa, e depois a ampliação por PCR e a detecção mediada por MNAzima do cDNA ocorrem simultaneamente na segunda etapa. Os oligonucleotídeos de *partizimas* A e B usaram o desenho 6 com braços sensores complementares ao microRNA humano hsa-let-7a. Os oligonucleotídeos de *partizimas* estão listados abaixo, sendo que "-P" indica a fosforilação em 3' do oligonucleotídeo. Nas seqüências que se seguem as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 37 Partizima A4 PCR7aA4/2-P: **GACCGTGAGG****TAGTAACA-**
ACGAGAGGAAACCTT-P

20 SEQ ID NO: 38 Partizima B5 PCR7aB5/2-P: **TGCCCAGGGAGGC-**
TAGCTGGTTGTATAGTTGTC-P

10.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-2 com a seqüência, de 5' para 3', como abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 516 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 492 nm (comprimento de onda de excitação FAM). Na seqüência que se segue as bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:
AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

10.3. Seqüências-alvo

A curva-padrão para este exemplo foi gerada por uma RT-PCR em duas etapas de um oligonucleotídeo de RNA sintético, R-let7a, que tem uma seqüência homóloga à espécie RNA hsa-let-7a. A seqüência de R-let7a, escrita de 5' para 3', é a seguinte:

SEQ ID NO: 39 R-let7a:
ugagguaguagguuguauaguu

As amostras do RNA total humano de células do cólon (Ambion), células leucêmicas K562, células de câncer cervical HeLa (Ambion) e células do baço (Clontech) foram ampliadas e analisadas quanto à abundância de hsa-let-7a.

10.4. Iniciadores de PCR para Ampliação de hsa-let-7a

Os iniciadores que se seguem foram usados para a ampliação de hsa-let-7a. O iniciador 3let7a foi usado para a transcrição reversa, e os iniciadores 5let7a e 3PCR7a foram usados para a ampliação por PCR.

SEQ ID NO: 40 Iniciador 3let7a:
AGCGAAGCTGAGACAACTATACAA

SEQ ID NO: 41 Iniciador 5let7a:
CGACGTGACCGTGAGGTAG

SEQ ID NO: 42 Iniciador 3PCR7a:
CATGGCACAAGCGAAGCTGA

10.5. Componentes da Reação: Transcrição Reversa de Seqüência-alvo

A transcrição reversa da seqüência-alvo foi realizada em um volume total da reação de 25 µL. As reações foram incubadas em um termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) por 20 minutos a 20°C, e em seguida 20 minutos a 30°C, e depois 20 minutos a 40°C. As reações continham 3let7a 10 nM, MgCl₂ 5 mM, 300 µM de cada dNTP, 20 unidades de RNAsina (Promega), 1 x Immobuffer (Bioline), 100 unidades de M-MLV RT(H-) e 5 µL de R-let7a (6 x 10¹¹ cópias) ou RNA total humano do cólon normal (0,1 µg), K562 (0,1 µg), HeLa (0,2 µg) ou baço (0,2 µg). Uma reação de controle continha todos reagentes acima, mas sem RNA-alvo, contendo

em vez dele 5 μL de dH_2O apenas.

10.6. Componentes da Reação: Ampliação e Quantificação de Sequência-alvo

A ampliação e quantificação em tempo real da sequência-alvo foram realizadas em um volume total da reação de 25 μL . Todas reações foram conduzidas em um Sistema Mx3005P® QPCR (Stratagene). Os parâmetros da ciclagem foram 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 40°C por 30 segundos (com um aumento de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 50°C por 30 segundos. As reações continham 200 nM 3PCR7a e 40 nM de 5let7a, 400nM PCR7aA4/2-P e 400nM PCR7aB5/2-P, 200 nM SubBi-2-FB, 10 mM MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 20 unidades de RNAsina (Promega), 1 x Immobuffer (Bioline), 1 unidade de Immolase (Bioline) e 5 μL de cDNA de R-let7a (contendo 5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 cópias) ou modelo de RNA total humano (cólon normal, 0,5 μg ; K562, 0,5 μg ; HeLa, 1 μg ; baço, 1 μg) ou nenhum alvo (dH_2O).

10.7. Resultados: Ampliação de Alvo e Clivagem do Substratorepórtter SubBi-2-FB

A MNAzima para a detecção e quantificação em tempo real de hsa-let-7a apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo usada foi o cDNA gerado a partir do oligonucleotídeo de RNA sintético ou o RNA total humano. Não houve qualquer sinal detectado no caso da reação de controle sem alvo (Tabela 11). Isto demonstra que o aumento na fluorescência produzido em reações que contêm alvo deveu-se à combinação dependente do alvo de MNAzimas cataliticamente ativas que depois clivaram o substratorepórtter. Uma curva-padrão foi gerada plotando o log das concentrações iniciais do RNA contra o ciclo limite, resultando em uma plotagem linear com um coeficiente de correlação de 0,999. Quatro amostras do RNA total humano também foram ampliadas e a quantidade de hsa-let-7a em cada uma foi estimada extrapolando a partir da curva-padrão (Tabela 11).

Tabela 11: Resultados de Reações para a Ampliação e Detecção de Amplicons de hsa-let-7a.

Amostra	Limite (Ct) Média de Duplicatas	Número de Cópias Padrão Conhecido (S) ou Estimado (E)	Comentários
Padrão 1	19,4	5×10^8 (S)	Curva-padrão (média de reações em duplicata) $R^2 = 0,999$ Inclinação = -3,829 Eficiência = 83%
Padrão 2	23,1	5×10^7 (S)	
Padrão 3	26,9	5×10^6 (S)	
Padrão 4	30,9	5×10^5 (S)	
Padrão 5	34,7	5×10^4 (S)	
Nenhum controle do alvo de RNA	Nenhum sinal	0	Nenhum sinal
RNA do Cólon	20	4×10^8 (E)	hsa-let-7a detectado e quantificado em todas amostras do teste
RNA de K562	31	$3,5 \times 10^5$ (E)	
RNA de HeLa	22	$1,3 \times 10^8$ (E)	
RNA do baço	22	$7,6 \times 10^7$ (E)	

Este exemplo demonstra a capacidade de as MNAzimas detectarem e quantificarem amplicons gerados pela ampliação por RT-PCR de espécies de microRNA humano. Os MicroRNA's são difíceis de ampliar e detectar em virtude do seu tamanho pequeno de cerca de 22 bases. As MNAzimas são apropriadas para esta aplicação.

Exemplo 11: Uso de MNAzimas para Detectar Metilação de DNA

11.1. Oligonucleotídeos de Partizimas

Está demonstrado no Exemplo 19 que a PCR em tempo real e a geração de sinal mediada pela MNAzima possibilitam a discriminação entre seqüências de ácidos nucleicos completamente emparelhadas e aquelas que contêm desemparelhamentos com C oposto a C. Esta capacidade possibilita que as MNAzimas sejam usadas para a análise do estado da metilação de células. As alterações no padrão de metilação ocorrem frequente-

mente em associação com câncer. A maioria dos protocolos para a análise da metilação começa com a modificação por bissulfito do DNA genômico, que converte citidinas não-metiladas, porém não as metiladas, em uridinas. A ampliação por PCR do DNA modificado, então, substitui as uridinas por

5 timidinas, e vários métodos podem ser usados para distinguir as seqüências que contêm T (originalmente C não-metilado) e C (originalmente C metilado). No exemplo que se segue, uma MNAzima foi usada para determinar o estado de metilação de supletos de CpG específicos na região promotora do gene p16 no DNA modificado com bissulfito.

10 Neste exemplo, as *partizimas* foram designadas para equivaler à seqüência produzida depois da modificação com bissulfito de um gene p16 metilado. As seqüências das *partizimas* estão listadas abaixo (de 5' para 3'). Nas seqüências que se seguem, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com

15 o alvo modificado por bissulfito, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. O "-P" indica a fosforilação em 3' do oligonucleotídeo.

SEQ ID NO: 43 Partizima A5 p16A5/3-P: **GCCCCG**CCTCCAACTACAAC
GAGGTTGTGCTG-P

SEQ ID NO: 44 Partizima B6 p16B6/3-P: *CGGTTGGTGAGGCTAGCA*-
20 **ACGCCCGCACCTC**-P

11.2. Substratorepórter

O substratorepórter usado neste exemplo foi SubBi-3. No presente exemplo, SubBi-3 foi rotulado nas extremidades com um grpamento 6-FAM na extremidade 5', e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-3-FB. A clivagem de SubBi-3-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM). A seqüência de SubBi-3-FB está ilustrada abaixo (de 5' para 3'); as bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

25

30 SEQ ID NO: 31 SubBi-3-FB:
CAGCACAACCGuCACCAACCG

11.3. Iniciadores de PCR iniciadores para Ampliação de p16 modi-

ficado com bissulfito

Neste exemplo, os iniciadores da PCR foram desinados para equivaler ao alvo modificado com bissulfito, que era originalmente metilado. A sequência-alvo para este exemplo foi gerada por ampliação *in vitro* do DNA genômico humano modificado com bissulfito, usando os iniciadores de PCR oligonucleotídeos listados abaixo (de 5' para 3').

SEQ ID NO: 45 Iniciador 5p16:

GTTGGTTACGGTCGCGGTTC

SEQ ID NO: 46 Iniciador 3p16:

10 CCGACCGTAACTATTCGATACG

11.4. Sequências-alvo e Controles.

O DNA genômico humano extraído da linhagem de células K562 foi usado como um DNA genômico de controle negativo que contém um promotor do gene p16 não-metilado. O DNA genômico metilado CpG universal (Chemicon) foi usado como um controle para o promotor do gene p16 metilado. O DNA genômico foi modificado com bissulfito de um dia para o outro, usando o *kit* MethylEasy (Human Genetic Signatures), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA metilado e o DNA não-metilado foram então diluídos serialmente para produzir amostras que contêm proporções variadas de DNA metilado no promotor do gene p16, a saber: 100%, 20%, 4%, 0,8%, 0,16% e 0,032%. Usou-se dH₂O isenta de nuclease no lugar do DNA genômico como um controle sem alvo.

11.5. Componentes da Reação: Ampliação e Quantificação de Sequência-alvo

25 A ampliação e quantificação em tempo real da sequência-alvo foram realizadas em um volume total da reação de 25 µl. Todas reações foram conduzidas em um Sistema Stratagene MX3005p QPCR. Os parâmetros da ciclagem foram 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 56°C por 30 segundos, e finalmente 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 52°C por 30 segundos. As reações continham 5p16 200 nM e a40 nM de 3p16, p16A5/3-P 200 nM e p16B6/3-P 200 nM, SubBi-3-FB 200 nM, Mg-Cl₂ 7,5 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina (Promega), 1 x

Immobuffer (Bioline), 1 unidade de Immolase (Bioline) e 150 ng de DNA genômico modificado com bissulfito (contendo 100%, 20%, 4%, 0,8%, 0,16% ou 0,032% de DNA metilado) ou dH₂O apenas (nenhuma reação de controle do alvo). Todas reações foram realizadas em duplicata.

5 11.6. Resultados: Detecção da Metilação por uma MNAzima

10 A MNAzima específica de metilação apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a amostra-alvo continha 100% descendo até 0,16 % de DNA metilado (Tabela 12). Em contraste, quando a amostra-alvo continha 0,032% e 0% de DNA metilado, a reação apresentou um baixo nível de fluorescência, similar àquele observado no controle sem alvo, e a fluorescência não aumentou no decorrer do tempo. Como a porcentagem de alvo metilado diminuiu, o Ct da reação aumentou e uma curva-padrão foi plotada com um valor de R^2 de 0,996. Os resultados experimentais estão resumidos na Tabela 12 abaixo.

15 **Tabela 12. Uso de MNAzimas para Detectar a Metilação de DNA em Amostras de DNA Genômico Modificado com Bissulfito.**

% de Metilação	Ct (media de duplicatas)	Comentários
100	19,36	A curva-padrão gerada usando estes valores tiveram um $R^2 = 0,996$, uma eficiência de 133% e uma inclinação de -2,72.
20	20,94	
4	23,33	
0.8	24,83	
0.16	27,02	
0,032	Nenhum Ct	Não detectado
0 (100% não-metilado)	Nenhum Ct	Nenhum sinal para controle não-metilado
Nenhum controle de alvo	Nenhum Ct	Nenhum sinal para controle sem alvo

Os iniciadores específicos de p16 metilado e a MNAzima foram capazes de discriminar entre um alvo metilado e não-metilado, sob as condições usadas neste exemplo. Além disso, o sistema permitiu a detecção de

alvo 0,16% metilado em um fundo de alvo não-metilado. 100% de eficiência em uma reação de PCR infere uma duplicação em cada ciclo. A eficiência observada neste experimento de 133% indica que há ampliação do alvo (por PCR) e também detecção de amplicons ampliada pela atividade catalítica da MNAzima.

Exemplo 12: MNAzimas que se Combinam a Partir de *Partizimas* que Têm Braços Sensores que Formam Estruturas Grampo.

A estrutura de *partizimas*, que são capazes de se combinarem para dar MNAzimas ativas, é flexível. Este exemplo demonstra estruturas adicionais que são compatíveis com a atividade de MNAzima.

12.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

A detecção usando MNAzimas pode ser realizada também quando a região dos braços sensores da *partizima* A, ou da *partizima* B, ou da *partizima* A e também da B, é seguida de uma sequência grampo arbitrária. Nos experimentos que se seguem, as *partizimas* A e B foram desenhadas para acertar a sequência de um microRNA humano, hsa-miR-143. As sequências dos oligonucleotídeos da *partizima* A e da *partizima* B estão listadas abaixo, de 5' para 3'. Nas sequências que se seguem, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, as bases em itálico hibridizam para o substrato e as bases em letras normais formam a grampo.

SEQ ID NO: 142 Partizima A2 miR143 A2/1: **TGAGCTACAGT**CGGTC-GAAATAGTGAGT

SEQ ID NO: 143 Partizima B3 miR143 B3/1: *CATCTCTTCTCC*-GAGCGCTTCATCTCA

SEQ ID NO: 144 Partizima A2 miR143 A2H/1: GGCCTAACGTGCCT-**GAGCTACAGT**CGGTCGAAATAGTGAGT

SEQ ID NO: 145 Partizima B3 miR143 B3H/1: *CATCTCTTCTCC*-GAGCGCTTCATCTCACGACGATAACGTCG

12.2. Substratorepórter

A atividade da MNAzima foi monitorada pela clivagem de um substratorepórter de ácidos nucleicos rotulado duplamente. O substratore-

pórtter para este exemplo foi SubBi-1-FB com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA. As bases sublinhadas indicam a posição de uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3'. As mudanças na fluorescência em virtude da clivagem de SubBi-1-FB no desoxirribonucleotídeo entre FAM e BHQ1 foram monitoradas a 530 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação FAM).

SEQ ID NO: 6 SubBi-1-FB:

10 ACTCACTATaGGAAGAGATG

12.3. Alvo

A seqüência do alvo para este exemplo foi um oligonucleotídeo de DNA, D-143Target, que tem uma seqüência homóloga ao microRNA humano, hsa-miR-143. A seqüência de D-143Target foi a seguinte, de 5' para 3':

SEQ ID NO: 146 D-143Target:

TGAGATGAAGCACTGTAGCTCA

12.4 Condições da Reação

A detecção da seqüência-alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substratorepórtter pela MNAzi-
ma cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 25 µL. Todas reações foram conduzidas a 40°C em um termociclador SmartCycler® System (Cepheid). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 7 segundos por um total de 10 minutos. Todas reações na Tabela 13 continham a mistura em massa que consiste em SubBi-1-FB 1 µM, Tris HCl 10 mM (pH 9,0 a 25°C) e MgCl₂ 25 mM.

Tabela 13: Componentes de Reações para a Detecção de um Ácido Nucleico-alvo.

Tipo de Reação	<i>Partizima</i> A miR143 (0,8 μ M)	<i>Partizima</i> B miR143 (0,8 μ M)	Reação da MNA- zima	Modelo (D-143 Tar- get)
Nenhuma das <i>partizimas</i> teve um grampo	A2/1	B3/1	Alvo	0,1 μ M
			Nenhum alvo	Zero (apenas H ₂ O)
Uma <i>partizima</i> continha um grampo	A2H/1	B3/1	Alvo	0,1 μ M
	A2/1	B3H/1	Alvo	0,1 μ M
Ambas <i>partizimas</i> continham um grampo	A2H/1	B3H/1	Alvo	0,1 μ M
			Nenhum alvo	Zero apenas H ₂ O)

Cada cavidade da reação no termociclador SmartCycler® System (Cepheid) utilizado durante um experimento foi primeiramente testado quanto a seu nível de fundo da fluorescência, pois isto reconhecidamente varia entre cavidades. Isto foi medido lendo a fluorescência da mistura em massa sozinha. Este valor foi então subtraído de todas as outras reações realizadas nessa cavidade para permitir comparações entre cavidades.

12.5. Resultados: Detecção da Clivagem do Substratorepórter SubBi-1-FB

As várias combinações de desenhos das *partizimas* A e B foram todas capazes de serem combinadas para dar MNAzimas ativas. Estas últimas clivaram o substratorepórter, como evidenciado por um aumento na fluorescência, apenas na presença da seqüência-alvo. Neste exemplo, os braços sensores das *partizimas* tinham sido estendidos com a seqüência que formou um grampo. As reações, que continham uma *partizima* com um grampo (*partizima* A ou *partizima* B), ou onde ambas *partizimas* (A e B) continham grampos, deram sinais fluorescentes similares àquele observado quando as *partizimas* que careciam de grampos foram usadas. Nenhum au-

mento no sinal foi observado em qualquer uma das reações de controle que careciam de alvo.

O desenho de *partizimas* que contêm grampos proporciona uma estratégia apropriada para a detecção de seqüências curtas, tal como microRNA. O oligonucleotídeo de DNA detectado neste experimento tinha apenas 22 bases. Esta seqüência foi detectada usando *partizimas*, as quais contêm ou não grampos. O desenho de grampo proporciona uma estrutura mais estável e proporciona flexibilidade adicional no desenho de *partizimas* que reconhecidamente são compatíveis com a combinação e a atividade catalítica da MNAzima.

Exemplo 13: Uso de MNAzimas para a Quantificação Simultânea de Quatro Seqüências de Ácidos Nucléicos por Intermédio de RT-PCR

13.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas* para um Ensaio Quádruplo de RT-PCR

Múltiplos alvos podem ser ampliados simultaneamente em tempo real, usando métodos de ampliação de alvos *in vitro*, tal como RT-PCR. Além disso, a ampliação dos alvos pode ser monitorada simultaneamente em tempo real, em uma reação multiplexada que compreende múltiplas MNAzimas singulares. Cada MNAzima tem braços sensores específicos para um alvo, e braços de substrato específicos para um membro singular de uma série de substratos genéricos, cada um deles sendo rotulado com um fluoróforo diferente (Figura 18). Neste exemplo, as MNAzimas foram desenhadas para detectar quatro alvos diferentes, a saber, transcritos de BCR humano, RPLPO, β -actina e HPRT. Deve-se avaliar que inúmeros alvos podem ser usados de acordo com o método. As seqüências das *partizimas* A e B para cada alvo estão listadas abaixo, de 5' para 3'. Nas seqüências que se seguem as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 51 Partizima A4 BaA4/2-P: **AGATCAAGATCATTGCTCCACA-ACGAGAGGAAACCTT**-P

SEQ ID NO: 52 Partizima B5 BaB5/2-P: **TGCCCAGGGAGGCTAGCTTCCT-**

GAGCGCAAGTACTC-P

SEQ ID NO: 29 Partizima A4 RO5A4/3-P: **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTC-TACAACGAGGTTGTGCTG-P**

SEQ ID NO: 30 Partizima B5 RO5B5/3-P: **CGGTTGGTGAGGC-TAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P**

SEQ ID NO: 55 Partizima A4 BCRA4/6-P: **AGTTCAAATCTGTACTGCAC-CACAACGAGAGGCGTGAT-P**

SEQ ID NO: 56 Partizima B5 BCRB5/6-P: **CTGGGAGGAAGGC-TAGCTCTGGAGGTGGATTCCTTTGG-P**

10 SEQ ID NO: 57 Partizima A4 HPRTA4/7-P: **ACTGAATAGAAATAGTGATAGATACAACGAGTGCCATGTTAA-P**

SEQ ID NO: 58 Partizima B5 HPRTB5/7-P: **TATCACAGCCAAGGC-TAGCTCCATTTCCTATGACTGTAGATT-P**

13.2. Substratos-repórter

15 Para este exemplo, foram usados quatro substratos repórter diferentes, cada um rotulado com um fluoróforo diferente. As seqüências dos substratos estão indicadas, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-JOE na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-JB.

20 A clivagem de SubBi-2-JB foi monitorada a 555 nm com excitação em 535 nm. SubBi-3 foi rotulado nas extremidades com uma porção Quasar 670 na extremidade 5' e uma porção BHQ2 na extremidade 3', e foi designado SubBi-3-Q6B2. A clivagem de SubBi-3-Q6B2 foi monitorada a 665 nm com uma excitação em 635 nm. SubBi-6 foi rotulado nas extremidades com uma porção Texas Red na extremidade 5' e uma porção BHQ2 na extremidade 3', e foi designado SubBi-6-TRB2. A clivagem de SubBi-6-TRB2 foi monitorada a 610 nm com excitação em 585 nm. O quarto substrato, SubBi-7, foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-7-FB. A clivagem de SubBi-

25 7-FB foi monitorada a 516 nm com uma excitação em 492 nm. As bases em

30 letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 59 SubBi-2-JB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

SEQ ID NO: 60 SubBi-3-Q6B2:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

5 SEQ ID NO: 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

SEQ ID NO: 62 SubBi-7-FB:

TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

13.3. Seqüências-alvo e Iniciadores de PCR para a Ampliação dos

10 Quatro Amplicons

O RNA total humano de células leucêmicas K562 foi usado como modelo para a ampliação *in vitro* de todos quatro transcritos do alvo. Os amplicons foram gerados por RT-PCR usando os iniciadores de PCR oligonucleotídeos listados abaixo.

15 SEQ ID NO: 32 5' Iniciador 5RO5/1:

CATTCTATCATCAACGGGTA

SEQ ID NO: 33 3' Iniciador 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

SEQ ID NO: 63 5' Iniciador 5Bactin:

20 CATTGCCGACAGGATGCAGA

SEQ ID NO: 64 3' Iniciador 3Bactin:

GAGCCGCCGATCCACACG

SEQ ID NO: 65 5' Iniciador 5BCR14:

CACTCAGCCACTGGATTAA

25 SEQ ID NO: 66 3' Iniciador 3BCR15/6:

GCGCGTCTTTGCTTTATTC

SEQ ID NO: 67 5' Iniciador 5HPRT/5:

CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

SEQ ID NO: 68 3' Iniciador 3HPRT/8:

30 CCTGTTGACTGGTCATTACAA

13.4. Componentes da Reação: Ampliação e Quantificação de Seqüência-alvo

A ampliação e quantificação em tempo real das seqüências-alvo foram realizadas em um volume total da reação de 25 µL. Todas reações foram conduzidas em um Sistema Mx3005P® QPCR (Stratagene). Os parâmetros da ciclagem foram 50°C por 30 minutos, 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 30 segundos (com um decréscimo de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, e 54°C por 30 segundos. As reações continham 40 nM de cada iniciador 5' e 200 nM de cada iniciador 3', 200 nM de cada *partizima* A e 200 nM de cada *partizima* B, 200 nM de cada substrato, MgCl₂ 10 mM, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina (Promega), 20 unidades de M-MLV RT (H-), 1 x Immobuffer (Bioline), 1,5 unidade de Immolase (Bioline), e modelo de RNA total (100 ng, 20 ng, 4 ng, 800 pg, 160 pg ou 32 pg) ou nenhum alvo (dH₂O).

Tabela 14: Componentes de Reações para a Detecção Simultânea de Quatro Ácidos Nucléicos-alvo.

Tipo de Reação	Iniciadores 5'(40 nM) 3'(200 nM)	Partizima A (200 nM)	Partizima B (200 nM)	Substrato (200 nM)	Alco
Multiplex	5Bactin 3Bactin	BaA4/2-P	BaB5/2-P	SubBi-2-JB	RNA total humano
β-actina	5RO5/1 3RO5/1	RO5A4/3-P	RO5B5/3-P	SubBi-3-Q6B2	100 ng 20 ng 4 ng
RPLPO	5BCR14 3BCR15/6	BCRA4/6-P	BCRB5/6-P	SubBi-6-TRB2	800 pg 160 pg 32 pg
BCR	5HPRT/5 3HPRT/8	HPRTA4/7-P	HPRTB5/7-P	SubBi-7-FB	ou nenhum RNA (H ₂ O)
HPRT					

13.5. Resultados: Ampliação Simultânea de Quatro Seqüências-alvo Diferentes e Detecção por Intermédio da Clivagem de Quatro Substratos-repórter Diferentes

As quatro MNAzimas usadas para a detecção e quantificação em tempo real de transcritos de β -actina, RPLPO, BCR, e HPRT apresentaram um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo usada era RNA total humano ampliado por intermédio de RT-PCR (Tabela 15). A fluorescência do controle do alvo sem RNA para todas as quatro reações foi mais baixa do que aquela nas reações que contêm alvo RNA e não aumentou durante a reação (Tabela 15). Isto demonstra que o aumento na fluorescência produzido em reações que contêm o alvo deveu-se à combinação dependente do alvo de MNAzimas cataliticamente ativas que então clivaram o substratorepórter.

Foram geradas curvas-padrão para todos os quatro alvos, plotando o log das concentrações de RNA contra o ciclo limite, resultando em uma plotagem linear. O limite (Ct) de cada padrão está indicado na Tabela 15. Os valores de Ct indicados na tabela são uma média dos resultados para reações em duplicata. O coeficiente de correlação (R^2), a inclinação e a eficiência da reação para cada alvo também estão indicados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados de Reações para a Ampliação e Detecção Simultânea de Quatro Ácidos Nucléicos-alvo Diferentes

Modelo (RNA total)	Limite (Ct)			
	β -actina (JOE)	RPLPO (Quasar 670)	BCR (Texas Red)	HPRT (FAM)
100 ng	11,2	12,8	17,6	16,2
20 ng	13,8	15,2	19,9	18,5
4 ng	16,7	17,5	22,4	20,9
800 pg	19,1	20,1	25,0	23,5
160 pg	21,5	22,7	27,1	26,0
32 pg	23,8	25,2	29,1	27,7
no-RNA control	Nenhum Ct	Nenhum Ct	Nenhum Ct	Nenhum Ct
Cruva pa- drão	$R^2 = 0,998$ Inclinação = - 3,599 Eficiência = 90%	$R^2 = 1,000$ Inclinação = - 3,561 Eficiência = 91%	$R^2 = 0,998$ Inclinação = - 3,320 Eficiência = 100%	$R^2 = 0,997$ Inclinação = - 3,370 Eficiência = 98%

- A reação da MNAzima RTPCR neste exemplo permitiu a detecção e geração simultânea de curvas-padrão para a quantificação de quatro alvos em uma única reação multiplex que incluiu quatro substratos genéricos. Estes substratos genéricos são apropriados para monitorar outras combinações de quatro alvos em uma única reação.

Exemplo 14: Uso de MNAzimas para a Quantificação de Cinco Sequências de Ácidos Nucléicos em uma RT-PCR Multiplex em Tempo Real

14.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas* para um Ensaio Quintuplo de RT-PCR

- Múltiplos alvos podem ser ampliados simultaneamente em tempo real, usando métodos de ampliação de alvos *in vitro*, tal como RT-PCR. Além disso, a ampliação dos alvos pode ser monitorada simultaneamente em tempo real, em uma reação multiplexada que compreende múltiplas MNAzimas singulares. Cada MNAzima tem braços sensores específicos para um alvo, e braços de substrato específicos para um membro singular de uma série de substratos genéricos, cada um deles sendo rotulado com um fluoróforo diferente (Figura 18). Neste exemplo, as MNAzimas foram desenhadas para detectar cinco alvos diferentes, a saber, BCR, RPLPO éxon 4, β -actina, RPLPO éxon 5 e seqüências de RNMM HPRT. Deve-se avaliar que inúmeros alvos podem ser usados de acordo com o método. As seqüências das *partizimas* A e B estão listadas abaixo, de 5' para 3'. Nas seqüências que se seguem, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 69 Partizima A4 BaA4/7-P: **AGATCAAGATCATTGCTCCACA-ACGAGTGCCATGTTAA**-P

SEQ ID NO: 70 Partizima B5 BaB5/7-P: *TATCACAGCCAAGGC-TAGCTTCCTGAGCGCAAGTACTC*-P

SEQ ID NO: 71 Partizima A4 RO5A4/4-P: **CAAACGAGTCCTGGCCTTGTC-TACAACGAGTGCGCCATG**-P

SEQ ID NO: 72 Partizima B5 RO5B5/4-P: *TACTTCTCCCAAGGC-TAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC*-P

SEQ ID NO: 55 Partizima A4 BCRA4/6-P: **AGTTCAAATCTGTACTGCAC-
CACAACGAGAGGCGTGAT-P**

SEQ ID NO: 56 Partizima B5 BCRB5/6-P: **CTGGGAGGAAGGC-
TAGCTCTGGAGGTGGATTCCTTTGG-P**

5 SEQ ID NO: 75 Partizima A4 HPRTA4/2-P: **ACTGAATAGAAATAGTGA-
TAGATAACAACGAGAGGAAACCTT-P**

SEQ ID NO: 76 Partizima B5 HPRTB5/2-P: **TGCCCAGGGAGGCTAGCTC-
CATTCCCTATGACTGTAGATT-P**

10 SEQ ID NO: 77 Partizima A4 RO4A4/3-P: **GCTGGTCATCCAGCAGACA-
ACGAGGTTGTGCTG-P**

SEQ ID NO: 78 Partizima B5 RO4B5/3-P **CGGTTGGTGAGGC-
TAGCTGTGTTTCGACAATGGC-P**

14.2. Substratos-repórter

Para este exemplo, foram usados cinco substratos-repórter dife-
rentes, cada um deles tendo sido rotulados com um entre cinco fluoróforos
diferentes. As seqüências dos substratos estão grafadas de 5' para 3'. No
presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção
Alexa 350 na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi
designado SubBi-2-A350B. A clivagem de SubBi-2-A350B foi monitorada a
440 nm com excitação em 350 nm. SubBi-3 foi rotulado nas extremidades
com uma porção Quasar 670 na extremidade 5' e uma porção BHQ2 na ex-
tremidade 3', e foi designado SubBi-3-Q6B2. A clivagem de SubBi-3-Q6B2
foi monitorada a 665 nm com excitação em 635 nm. SubBi-6 foi rotulado nas
extremidades com uma porção Texas Red na extremidade 5' e uma porção
BHQ2 na extremidade 3', e foi designado SubBi-6-TRB2. A clivagem de
SubBi-6-TRB2 foi monitorada a 610 nm com excitação em 585 nm. SubBi-7
foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e
uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-7-FB. A cliva-
gem de SubBi-7-FB foi monitorada a 516 nm com excitação em 492 nm.
SubBi-4 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-JOE na extreni-
dade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-4-JB.
A clivagem de SubBi-4-JB foi monitorada a 555 nm com excitação em 535

nm. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 79 SubBi-2-A350B:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

5 SEQ ID NO: 60 SubBi-3-Q6B2:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

SEQ ID NO: 61 SubBi-6-TRB2:

ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

SEQ ID NO: 62 SubBi-7-FB:

10 TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA

SEQ ID NO: 83 SubBi-4-JB:

CATGGCGCACguTGGGAGAAGTA

14.3. Seqüências-alvo e Iniciadores de PCR para Ampliação de Cinco Seqüências-alvo de MRNa.

15 O RNA total humano extraído de células K562 foi usado como modelo para a ampliação *in vitro* de todos os cinco alvos. Os amplicons foram gerados por ampliação *in vitro*, usando os iniciadores de PCR oligonucleotídeos listados abaixo.

SEQ ID NO: 32 5' Iniciador 5RO5/1:

20 CATTCTATCATCAACGGGTA

SEQ ID NO: 33 3' Iniciador 3RO5/1:

CAAAGGCAGATGGATCAG

SEQ ID NO: 63 5' Iniciador 5Bactin:

CATTGCCGACAGGATGCAGA

25 SEQ ID NO: 64 3' Iniciador 3Bactin:

GAGCCGCCGATCCACACG

SEQ ID NO: 65 5' Iniciador 5BCR14:

CACTCAGCCACTGGATTAA

SEQ ID NO: 66 3' Iniciador 3BCR15/6:

30 GCGCGTCTTTGCTTTATTC

SEQ ID NO: 67 5' Iniciador 5HPRT/5:

CTTTGCTGACCTGCTGGATTA

SEQ ID NO: 68 3' Iniciador 3HPRT/8:

CCTGTTGACTGGTCATTACAA

SEQ ID NO: 84 5' Iniciador 5R04/3:

CAAGACTGGAGACAAAGTG

5 SEQ ID NO: 85 3' Iniciador 3R04/2:

GCAGAGTTTCCTCTGTGATA

14.4. Componentes da Reação: Ampliação e Quantificação de Sequência-alvo

A ampliação e quantificação em tempo real das seqüências-alvo foram realizadas em um volume total da reação de 25 µL. Todas as reações foram conduzidas em um Sistema Mx3005P® QPCR (Stratagene). Os parâmetros da ciclagem foram 50°C por 30 minutos, 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 30 segundos (com um decréscimo de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 54°C por 30 segundos. As reações continham 40 nM de 5Bactin, 5BCR14, 5HPRT/5 e 80 nM 5RO4/3, 5RO5/1 e 200 nM 3Bactin, 3BCR15/6, 3HPRT/8 e 400 nM 3RO4/2 e 3RO5/1. Havia 200 nM de cada *partizima* A e *partizima* B para α -actin, BCR, RPLPO éxon 4 e HPRT e 400 nM de cada *partizima* A e *partizima* B para RPLPO éxon 5. Havia 200 nM de SubBi-2-A350B, SubBi-3-Q6B2, SubBi-6-TRB2 e SubBi-7-FB, e 400 nM de SubBi-4-JB. Além disso, havia 10 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina (Promega), 20 unidades de M-MLV RT (H-) (Promega), 1 x Immo-buffer (Bioline), 2 unidades de Immolase (Bioline) e 5 µl de modelo de RNA total (100ng, 20 ng, 4 ng, 800 pg, ou 160 pg) ou nenhum alvo (dH₂O).

Tabela 16: Componentes de Reações para a Detecção Simultânea de Cinco Ácidos Nucléicos-alvo Diferentes

Tipo de Reação	Iniciadores	Partizima A & B	Substrato	Quantidade de Partizima/substrato	Quantidade de Iniciador 3'/5'
β-actina, RPLPO éxon 5,	5Bactin 3Bactin	BaA4/7-P BaB5/7-P	SubBi-7-FB	200 nM/200 nM	200 nM/40 nM
	5RO5/1 3RO5/1	RO5A4/4-P RO5B5/4-P	SubBi-4-JB	400 nM/400 nM	400 nM/80 nM
BCR,	5BCR14 3BCR15/6	BCRA4/6-P BCRB5/6-P	SubBi-6-TRB2	200 nM/200 nM	200 nM/40 nM
	5HPRT/5 3HPRT/8	HPRTA4/2-P HPRTB5/2-P	SubBi-2-A350B	200 nM/200 nM	200 nM/40 nM
HPRT, RPLPO éxon 4.	5RO4/3 3RO4/2	RO4A4/3-P RO4B5/3-P	SubBi-3-Q6B2	200 nM/200 nM	400 nM/80 nM

14.5. Resultados: Ampliação Simultânea de Cinco Sequências-alvo Diferentes e Detecção por Intermédio da Clivagem de Cinco Substratos-repórter Diferentes

As cinco MNAzimas usadas para a detecção e quantificação em tempo real de sequências de RNA dentro de RPLPO éxon 4, BCR, β-actina, RPLPO éxon 5 e HPRT apresentaram um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo usada foi o RNA total humano ampliado por RT-PCR (Tabela 17). A fluorescência do controle sem alvo RNA para todas as cinco reações foi mais baixa do que aquela nas reações que contêm o alvo de RNA e não aumentou durante a reação (Tabela 17). Isto demonstra que o aumento na fluorescência em reações que contêm alvo deveu-se à combinação dependente do alvo de MNAzimas cataliticamente ativas que então clivaram o substratorepórter.

- Curvas-padrão foram geradas para todos os cinco alvos plotando o log das concentrações de RNA contra o ciclo limite, resultando em uma plotagem linear. O limite (Ct) de cada padrão está indicado na Tabela 17. Os valores de Ct são a média das reações em duplicata. O coeficiente de correlação (R^2), a inclinação e a eficiência da reação para cada alvo também estão indicadas na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados de Reações para a Ampliação e Detecção Simultânea de Cinco Ácidos Nucleicos-alvo Diferentes

	Limite (Ct)				
	β -actina (FAM)	RPLPO éxon 5 (JOE)	BCR (Texas Red)	HPRT (Alexa 350)	RPLPO éxon 4 (Quasar 670)
100 ng de RNA	13,8	13,7	17,2	21,4	17,2
20 ng de RNA	16,3	17,0	19,5	23,5	19,8
4 ng de RNA	19,0	20,8	22,0	25,8	23,2
800 pg de RNA	21,9	24,0	24,3	28,6	26,0
160 pg de RNA	24,1	26,8	26,8	30,8	28,8
Controle sem RNA	Nenhum	Nenhum sinal	Nenhum sinal	Nenhum sinal	Nenhum sinal
Curva-padrão	$R^2 = 0,998$ Inclinação = 3,729 Eficiência = 85%	$R^2 = 0,997$ Inclinação = 4,750 Eficiência = 62%	$R^2 = 1,000$ Inclinação = 3,425 Eficiência = 96%	$R^2 = 0,997$ Inclinação = 3,440 Eficiência = 95%	$R^2 = 0,999$ Inclinação = 4,192 Eficiência = 73%

- A reação RT-PCR de MNAzima neste exemplo possibilitou a detecção e geração simultânea de curvas-padrão para a quantificação de cinco alvos em uma única reação multiplex que incluiu cinco substratos genéricos. Estes substratos genéricos são apropriados para monitorar outras combinações de cinco alvos em uma única reação.

Exemplo 15: Uso de MNAzimas para a Quantificação de 16S Ribossô-

mico em Bactérias

Para substituir o teste bacteriano de uma mancha de Gram, MNazimas podem ser usadas para um teste de liberação rápida quanto à esterilidade e/ou contaminação micoplasmática, baseado em seqüências de ácidos nucleicos conservadas encontradas em espécies bacterianas. As MNazimas podem ser usadas para monitorar a ampliação de ácidos nucleicos-alvo bacterianos em tempo real, usando métodos de ampliação de alvos *in vitro*, tal como RT-PCR. Neste exemplo, uma região conservada na seqüência de 16S ribossômico bacteriano é usada, onde a transcrição reversa, a ampliação por PCR e a detecção mediada por MNazima ocorrem simultaneamente no único tubo.

Foi desenhado um sistema para acertar uma região da seqüência de 16S ribossômico que é comum a várias espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter woffii*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*.

15.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

Os oligonucleotídeos de *partizimas* A e B usaram o desenho com braços sensores complementares a uma região conservada entre espécies bacterianas. Os oligonucleotídeos de *partizimas* estão listados abaixo, sendo que "-P" indica fosforilação em 3' do oligonucleotídeo. Nas seqüências que se seguem as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNazima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em *itálico* hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 86 Partizima A5 16S1A5/2-P: **GGTTGTCGTCAGCTCGTGTA**
CAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 87 Partizima B6 16S1B6/2-P: *TGCCCAGGGAGGC*
TAGCTCGTGAGATGTTGGGTTAAG-P

30 15.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-2 com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas ex-

tremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 516 nm (comprimento de onda de emissão FAM) com excitação em 492 nm (comprimento de onda de excitação FAM). As bases em

5 letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

10 15.3. Iniciadores de PCR para Ampliação de 16S Ribossômico em Bactérias

A sequência-alvo para este exemplo foi gerada por ampliação *in vitro* de *Bacillus Subtilis* usando os iniciadores de PCR oligonucleotídeos listados abaixo.

SEQ ID NO: 88 5' Iniciador 516S1-1:

15 TGGTGCGATGGTTGTCGTC

SEQ ID NO: 89 3' Iniciador 316S1-1:

TTGCGCTCGTTGCGGGA

15.4. Sequência-alvo e Controle

O RNA ribossômico bacteriano foi extraído de células de *Bacillus*

20 *Subtilis* e foi usado como modelo para a ampliação da região de 16S. Usou-se dH₂O isenta de nuclease no lugar de RNA como um controle sem alvo.

15.5. Componentes da Reação: Ampliação e Quantificação de Sequência-alvo

A ampliação e quantificação em tempo real da sequência-alvo

25 foram realizadas em um volume total da reação de 25 µL. Todas as reações foram conduzidas em um Sistema Mx3005p QPCR (Stratagene). Os parâmetros da ciclagem foram 50°C por 30 minutos, 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 30 segundos (com um decréscimo de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 40 ciclos de 95°C por 5 se-

30 gundos e 55°C por 30 segundos. As reações continham 40 nM 516S1-1 e 200 nM de 316S1-1, 200 nM 16S1A5/2-P e 200 nM 16S1B6/2-P, 200 nM SubBi-2-FB, 7,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina

(Promega), 1 x Immobuffer (Bioline), 1 unidade de Immolase (Bioline) e modelo de RNA (500 ng, 50 ng, 5 ng ou 500 pg) ou nenhum alvo (dH₂O).

15.6. Resultados: Ampliação de Alvo e Clivagem do Substratorepórter SubBi-2-FB

5 A MNAzima para a detecção e quantificação em tempo real de 16S ribossômico bacteriano apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo usada foi o RNA bacteriano ampliado por RT-PCR. A fluorescência do controle sem modelo foi mais baixa do que aquela nas reações que contêm RNA e não aumentou durante a
10 reação. Isto demonstra que o aumento na fluorescência em reações que contêm alvo deve-se à combinação dependente do alvo de MNAzimas cataliticamente ativas que depois clivaram o substratorepórter. Uma curva-padrão foi gerada plotando o log das concentrações de RNA contra o ciclo limite, resultando em uma plotagem linear com um coeficiente de correlação de
15 0,992.

Tabela 18: Resultados de Reações para a Ampliação e Detecção de Amplicons de 16S Ribossômico Bacteriano

Amostra (pg)	Ciclo Limite (Ct) Média de duplicatas	Resultados
500.000	12,5	Curva-padrão (média de reações em duplicata) $R^2 = 0,992$ Inclinação = - 4,461 Eficiência = 68%
50.000	16,4	
5.000	20,5	
500	26,0	
Nenhum controle de alvo RNA	Nenhum sinal	Nenhum sinal

Este exemplo demonstra a capacidade de MNAzimas detectar e quantificar amplicons gerados pela ampliação por RT-PCR do RNA de 16S ribossômico bacteriano. As MNAzimas usadas neste exemplo assess-
20 tam uma região de 16S bacteriano que é 100% conservada entre *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staph-*

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter woffii*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*. Assim sendo, tal única MNAzima e substratorepórter poderiam ser usados para triar uma amostra quanto à presença de qualquer uma das bactérias acima. A detecção de um sinal (por exemplo, FAM) seria indicativa da presença de uma ou mais destas espécies bacterianas na amostra.

Exemplo 16: Uso de MNAzimas para a Detecção e Quantificação de RNA Viral por Intermédio de RT-PCR em um Único Tubo

As MNAzimas podem ser usadas para monitorar a ampliação de ácidos nucleicos-alvo em tempo real, usando métodos de ampliação de alvos *in vitro*, tal como RT-PCR. Além disso, o monitoramento em tempo real permite que a quantidade de alvo inicialmente presente na reação seja quantificada. Este exemplo ilustra o uso de MNAzima para a detecção e quantificação do RNA viral de HIV. A transcrição reversa, a ampliação por PCR e a detecção por MNAzima foram realizadas em uma reação em um tubo.

16.1. Oligonucleotídeos de Partizimas

As *partizimas* foram desenhadas para se ligar especificamente ao gene Nef de HIV-1. Nas seqüências que se seguem as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. O "-P" indica a fosforilação em 3' do oligonucleotídeo.

SEQ ID NO: 90 Partizima A4 NefA4/6-P: **GAAGAGGCCAATAAAGGAGAGACAACGAGAGGCGTGAT-P**

SEQ ID NO: 91 Partizima B5 NefB5/6-P: **CTGGGAGGAAGGCTAGCTAACACCAGCTTGTTACACC-P**

16.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-6 com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-6 foi rotulado nas extremidades com uma porção Texas Red na extremidade 5' e uma porção BHQ2 na extremidade 3', e foi designado SubBi-6-TRB2. A clivagem de SubBi-6-TRB2 foi monitorada a 610 nm (comprimento de onda de emissão

de Texas Red) com excitação em 585 nm (comprimento de onda de excitação de Texas Red). Na sequência que se segue as bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 61 SubBi-6-TRB2:

5 ATCACGCCTCguTCCTCCCAG

16.3. Sequências-alvo

A curva-padrão neste experimento foi gerada pela ampliação por RT-PCR do RNA viral de HIV-1. Um kit QIAGEN Ultrasens Virus Kit HIV-1 foi usado para isolar o RNA viral do meio coletado a partir de células CEMT4
10 humanas infectadas com HIV-1. Usou-se água isenta de nuclease (NF) no lugar de RNA viral como um controle sem alvo.

16.4. Iniciadores de PCR para Ampliação dos Transcritos de Nef de HIV-1

Os iniciadores que se seguem foram usados para a ampliação
15 de transcritos de *Nef* de HIV-1. O iniciador em 3', Nef/3PCR, foi usado para a transcrição reversa e depois este iniciador e o iniciador em 5', Nef/5PCR, possibilitaram a ampliação por PCR.

SEQ ID NO: 92 Iniciador Nef/3PCR:

CAGGGTCATCCATTCCATGCAG

20 SEQ ID NO: 93 Iniciador Nef/5PCR:

GCTAGTACCAGTTGAGCCAG

16.5. Componentes da Reação: Ampliação e Quantificação de Sequência-alvo

A ampliação e quantificação em tempo real da sequência-alvo
25 foram realizadas em um volume total da reação de 25 µL. Todas as reações foram conduzidas em um Sistema Mx3005p QPCR (Stratagene). Os parâmetros da ciclagem foram 50°C por 30 minutos, 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 30 segundos (com um decréscimo de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 15 se-
30 gundos e 55°C por 30 segundos. As reações continham 200 nM do iniciador de 3' Nef/3PCR e 40 nM do iniciador de 5' Nef/5PCR, 200nM da *partizima* NefA4/6-P e 200nM da *partizima* NefB5/6-P, 200 nM SubBi-6-TRB2, 10 mM

MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina (Promega), 1 x Im-mobuffer (Bioline), 0,5 unidade de Immolase (Bioline), 10 unidades de MMLV RT (H-) e 5 µL de modelo de RNA total (contendo 45.000 pg, 4.500 pg, 450 pg, 45 pg, 4,5 pg, ou 0,45 pg) ou nenhum alvo (apenas água).

5 16.6. Resultados: Ampliação de Alvo e Clivagem do Substratorepórtter SubBi-6-TRB2

10 A MNAzima para a detecção e quantificação em tempo real de transcritos de *Nef* de HIV-1 apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a sequência-alvo usada foi o RNA viral de HIV-1 ampliado por RT-PCR. Não houve aumento no sinal para a reação de controle sem alvo (apenas água). Isto demonstra que o aumento na fluorescência em reações que contêm alvo deve-se à combinação dependente do alvo de MNAzimas cataliticamente ativas que depois clivaram o substratorepórtter.

15 Uma curva-padrão foi gerada plotando o log da quantidade de modelo de RNA em cada reação contra o ciclo limite (Ct), resultando em uma plotagem linear. O Ct de cada padrão, junto com o coeficiente de correlação (R²), a inclinação e a eficiência da reação indicados na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados da Ampliação e Detecção de Transcritos de Nef de HIV

Amostra	Ciclo Limite (Ct) (média de reações em duplicata)	RNA viral de HIV (pg)	Resultados
Padrão 1	5,22	45.000	Curva de Calibração R ² = 0,996 Inclinação = - 4,271 Eficiência = 71,4%
Padrão 2	9,96	4.500	
Padrão 3	13,78	450	
Padrão 4	17,22	45	
Padrão 5	22,09	4,5	
Padrão 6	27,15	0,45	
Controle sem alvo	Nnhum signal	0	Nenhum sinal

usadas para a detecção e quantificação de seqüências virais, incluindo HIV-1.

Exemplo 17: Requisitos de Seqüências da Atividade Catalítica de MNAzimas.

5 17.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

O núcleo catalítico da DNAzima 10:23, como originalmente descoberta, compreende 15 nucleotídeos (Santoro & Joyce, 1997). Estudos posteriores das bases críticas dentro do núcleo catalítico demonstraram que certas substituições de bases específicas diminuíram significativamente a
10 atividade catalítica, enquanto que outras são bem-toleradas (Zaborowska *et al*).

Neste exemplo, várias *partizimas* foram desenhadas e testadas para investigar a tolerância do núcleo catalítico das MNAzimas a uma variação de seqüência dentro dos núcleos parciais das duas *partizimas*. As *partizimas* A e B não-modificadas para a MNAzima detectar o gene de RPLPO humano foram usadas como controle e foram comparadas com várias seqüências de *partizimas* mutadas nas quais uma substituição de uma única
15 base tinha sido feita na região do núcleo catalítico parcial. Os oligonucleotídeos de *partizimas* usados para detectar o alvo basearam-se no desenho 7
20 (vide Exemplo 20) e estão listados abaixo, de 5' para 3'. Nas seqüências que se seguem as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases que estão sublinhadas, em itálico e em negrito são mutadas em comparação com as seqüências do núcleo parcial de controle (não-mutadas), as bases em negrito hibridizam com o alvo e as bases
25 em itálico hibridizam para o substrato.

SEQ ID NO: 94 partizima A5 RO4A5/2: GGGCTGGTCATCCAGCAGTACA-
ACGAGAGGAAACCTT

SEQ ID NO: 95 partizima A5 RO4A5/2-G14A: GGGCTGGTCATCCAGCAG-
TACAACAAGAGGAAACCTT

30 SEQ ID NO: 96 partizima A5 RO4A5/2-A9T: GGGCTGGTCATCCAG-
CAGTTCAACGAGAGGAAACCTT

SEQ ID NO: 97 partizima A5 RO4A5/2-A12T: GGGCTGGTCATCCAGCAG-

TACATCGAGAGGAAACCTT

SEQ ID NO: 98 partizima A5 RO4A5/2-A11T: GGGCTGGTCATCCAGCAG-TACTACGAGAGGAAACCTT

SEQ ID NO: 99 partizima B6 RO4B6/2: TGCCCAGGGAGGC-

5 TAGCGTGTTCGACAATGGCAGCA

SEQ ID NO: 100 partizima B6 RO4B6/2-C7A: TGCCCAGGGAGGCTA-GAGTGTTCGACAATGGCAGCA

SEQ ID NO: 101 partizima B6 RO4B6/2-T4C: TGCCCAGGGAGGC-CAGCGTGTTCGACAATGGCAGCA

10 17.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-2 com a sequência, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão de FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação de FAM). Na sequência que se segue as bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:

20 AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

17.3. Sequência-alvo

Um oligonucleotídeo de DNA sintético foi usado como modelo de alvo neste experimento. A sequência do alvo está indicada abaixo, de 5' para 3'.

25 SEQ ID NO: 102 RO4/2Target: ATGCTGCCATTGTGGAACACCTGCTG-GATGACCAGCCCAA

17.4. Condições da Reação

A análise da atividade catalítica de vários pares de *partizimas* foi realizada usando um termociclador SmartCycler System (Cepheid). As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 25 µL. Cada reação continha 1 x Tampão II de PCR (Applied Biosystems), 10 mM MgCl₂, 0,2 µM de SubBi-2FB, 2 µM de RO4/2Target e um

par de *partizimas* A e B, cada uma a 2 μ M. Os pares de *partizimas* em cada reação foram como indicados na Tabela 20 abaixo.

Tabela 20: Componentes de Reações para a Detecção de um Ácido Nucleico-alvo

Reação	Partizima A	Partizima B	Número de replicações
partizimas A e B de controle (não-mutadas)	RO4A5/2	RO4B6/2	6
partizima A mutada (G14A) e partizima B de controle	RO4A5/2-G14A	RO4B6/2	3
partizima A mutada (A12T) e partizima B de controle	RO4A5/2-A12T	RO4B6/2	3
partizima A mutada (A11T) e partizima B de controle	RO4A5/2-A11T	RO4B6/2	3
partizima A mutada (A9T) e partizima B de controle	RO4A5/2-A9T	RO4B6/2	3
partizima A de controle e partizima B mutada (C7A)	RO4A5/2	RO4B6/2-C7A	3
partizima A de controle e partizima B mutada (T4C)	RO4A5/2	RO4B6/2-T4C	3

- 5 As reações foram incubadas a 54 °C por 20 minutos e os dados fluorescentes foram coletados em intervalos de 12 segundos. Como a fluorescência inicial pode variar entre cavidades individuais no termociclador SmartCycler System, o valor da fluorescência inicial foi subtraído da fluorescência em cada ponto no tempo para cada reação, a fim de permitir a
- 10 comparação entre reações em cavidades diferentes. As médias de reações replicadas, contendo uma partizima A mutada ou uma partizima B mutada, foram então expressas como uma porcentagem da fluorescência para as replicações de controle.

17.5. Resultados: Detecção da Clivagem do Substrato repórter SubBi-2-FB.

A clivagem do substrato pelos vários pares de *partizimas* foi medida pela mudança na fluorescência no decorrer do tempo. Os valores fluorescentes normalizados para cada reação foram então expressos como uma porcentagem da fluorescência observada em reações de controle no ponto no tempo equivalente (Tabela 21).

Tabela 21: Atividade de Clivagem de Variantes de Sequências de Partizimas (* este exemplo) e Comparação com a Atividade da Variante DNAzimas 10:23 (Zaborowska).**

Número da Posição dentro do núcleo catalítico, de 5' até 3'	Sequências do núcleo parcial de partizimas (controle)		Núcleo da sequência 10:23 (Santor & Joyce 1997)	Base substituída (& nome) dentro (*) da partizima A ou B ou dentro da DNAzima 10:23 (**)	Atividade de clivagem (porcentagem do controle) para enzimas de DNA com substituições	
	Partizima B	Partizima A			*MNAzimas (54 °C por 10 min)	**10:23 DNAzima (37 °C por 20 min)
1	G		G			
2	G		G			
3	C		C			
4	T		T	C (T4C)	17%	< 10%
5	A		A			
6	G		G			
7	C		C	A (C7A)	40 %	< 80%
8		T	T			

Número da Posição dentro do núcleo catalítico, de 5' até 3'	Sequências do núcleo parcial de partizimas (controle)	Núcleo da sequência 10:23 (Santor & Joyce 1997)	Base substituída (& nome) dentro (*) da partizima A ou B ou Dentro da DNAzima 10:23 (**)	Atividade de clivagem (porcentagem do controle) para enzimas de DNA com substituições	
9	A	A	T (A9T)	70 %	90%
10	C	C			
11	A	A	T (A11T)	86 %	80%
12	A	A	T (A12T)	80 %	80%
13	C	C			
14	G	G	A (G14A)	3 %	< 10%
15	A	A			

O experimento ilustra que várias substituições no núcleo catalítico parcial da *partizima* A ou B foram compatíveis com a formação de MNAzima ativa. Em contraste, outras substituições não foram bem-toleradas e produziram estruturas com pouca ou nenhuma atividade catalítica. Quando os resultados obtidos usando MNAzimas foram comparados com aqueles relatados para a substituição equivalente dentro do núcleo catalítico da DNAzima 10:23 (Zaborowska *et al.*), um padrão similar foi observado (Tabela 21) acima. Por exemplo, uma substituição de A por G na posição 14 (G14A) dentro da *partizima* A, ou dentro do núcleo de 10:23, resultou em > 90% de perda de atividade de clivagem. Em contraste, a substituição de T por A na posição 12 (A12T) dentro da *partizima* A, ou dentro do núcleo de 10:23, resultou em moléculas que retinham aproximadamente 80% da atividade de clivagem em comparação com as seqüências de controle.

Assim sendo, as informações na literatura sobre outras substituições de seqüências, que são compatíveis com a atividade de DNAzima (por exemplo, DNAzima 10:23 ou DNAzimas 8:17), poderiam prever a atividade catalítica esperada quando a mesma variação de seqüência é introduzida em uma das *partizimas*. Além disso, os versados nessas técnicas poderiam usar testes empíricos para identificar variantes adicionais do núcleo catalítico parcial de *partizimas*, que são compatíveis com a formação de MNAzimas ativas.

Exemplo 18: Aplicação de MNAzimas para Detectar Alvos que Incluem Moléculas Pequenas tal como 5'-trifosfato de adenosina

Os aptâmeros são moléculas de DNA ou RNA de filamento único desenvolvidas *in vitro* a partir de grandes coleções de oligonucleotídeos com seqüências aleatórias quanto à sua capacidade de se ligarem a alvos com alta afinidade e especificidade. Os aptâmeros foram selecionados quanto à sua capacidade de se ligarem especificamente a muitos tipos de alvos, incluindo proteínas, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, células inteiras e vírus. Neste exemplo, uma seqüência de aptâmero foi incorporada na extremidade de uma *partizima* (apta-*partizima*) em uma configuração pela qual uma MNAzima ativa se formou apenas na presença do alvo. Há várias maneiras

para atingir este objetivo, incluindo as estratégias delineadas na Figura 4 e a estratégia usada no exemplo que se segue que está ilustrado na Figura 20.

Os oligonucleotídeos de ácidos nucléicos, necessários para a estratégia de detecção de MNAzimas, ilustrada na Figura 20, incluem: uma

5 *partizima*-padrão;

a) uma *apta-partizima* que é uma *partizima* com um aptâmero incorporado em uma das suas extremidades;

b) um facilitador de combinação que é um oligonucleotídeo que se liga à *apta-partizima* e também à *partizima*, permitindo a combinação de uma

10 MNAzima ativa;

c) Um substrato de sonda repórter; e

d) um oligonucleotídeo inibidor que hibridiza para a *apta-partizima* em uma região que cobre pelo menos parte da sequência do aptâmero e parte do braço ligante de substrato da sequência da *partizima*.

15 Na ausência de um alvo que se liga ao aptâmero (quadro à esquerda na Figura 20), o oligonucleotídeo inibidor se liga à *apta-partizima*, bloqueando assim a ligação (e a clivagem) do substrato de sonda repórter. Na presença de um alvo que se liga ao aptâmero (quadro à direita na Figura 20), o alvo se liga à sequência do aptâmero da *apta-partizima*, impedindo a
20 ligação do oligonucleotídeo inibidor e permitindo a ligação e a clivagem do substrato de sonda repórter. Assim sendo, as MNAzimas podem se formar e causar a geração de sinal fluorescente apenas na presença do alvo.

A estratégia foi demonstrada usando a detecção de uma molécula pequena, ATP. A sequência de aptâmero com 27 nucleotídeos de comprimento, usada neste exemplo, foi relatada anteriormente como sendo altamente específica para a ligação de ATP e dATP (Achenbach, 2005; Hui-
25 zenga e Szostak, 1995).

18.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*, Combinação e Oligonucleotídeos Inibitórios

30 Neste exemplo a sequência de aptâmero de ATP foi colocada adjacente ao braço de substrato da *apta-partizima* A (Figura 20). Os braços sensores da *apta-partizima* A e *partizima* B foram desenhados para se liga-

rem a um facilitador de combinação. As seqüências da apta-*partizima* AtpA2/1 e *partizima* Atp B3/1 (Figura 21) estão indicadas abaixo (de 5' para 3'). Nas seqüências que se seguem as bases em negrito hibridizam com o facilitador de combinação, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. Além disso, as bases em letras normais na *partizima* AtpA2/1 indicam seqüências de aptâmero de DNA, que se ligam a ATP ou dATP.

5 SEQ ID NO: 103 Apta-Partizima A2 AtpA2/1:
 AACGTACACTGCACGCGGTCGAAATAGTGAGTACCTGGGGGAGTATTG
 10 CGGAGGAAGGT
 SEQ ID NO: 104 Partizima B3 AtpB3/1: *CATCTCTTCT*CCGAGCGTCTG-
 TACCGTGTAC

A seqüência do facilitador de combinação está indicada abaixo (de 5' para 3'):

15 SEQ ID NO: 105 Assembly facilitator AtpC/1: GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

A seqüência do oligonucleotídeo inibidor está indicada abaixo (de 5' para 3'):

SEQ ID NO: 106 Inibidor AtpR/1:
 20 CCAGGTACTCACTATTT

18.2. Substratorepórter

A atividade da MNAzima foi monitorada pela clivagem do substratorepórter de ácido nucleico rotulado duplamente. O substratorepórter para este exemplo é SubBi-1-FB com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA. As bases sublinhadas indicam a posição de uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3'. As mudanças na fluorescência em virtude da clivagem de SubBi-1-FB no ribonucleotídeo entre FAM e BHQ1 foram monitoradas a 520 nm (comprimento de onda de emissão de FAM) com excitação em 490 nm (comprimento de onda de excitação de FAM).

SEQ ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTIATaGGAAGAGATG

18.3. Alvos

As moléculas-alvo para este exemplo foram 5'-trifosfato de adenosina(ATP) e 5'-trifosfato de desoxiadenosina (dATP). 5'-trifosfato de guanosina (GTP) e 5'-trifosfato de citosina (CTP) foram usados como controles negativos. Todas moléculas foram adquiridas na Bioline. Água isenta de nuclease foi usada como um controle sem alvo.

18.4. Condições da Reação

A detecção do alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substratorepórter pela MNAzima cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 50 µL. Antes da injeção do substrato, todas reações foram pré-incubadas a 60°C por 5 minutos (para reduzir a estrutura secundária). As reações foram conduzidas a 47°C em um FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 3 segundos por um total de 10 minutos. Cada reação continha uma concentração final 200 nM de AtpA2/1, 200 nM de AtpB3/1, 200 nM de AtpC/1, 200 nM de AtpR/1, 200 nM de SubBi-1-FB, 25 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris HCl pH 7,5 e 2 mM de ATP, dATP, GTP, CTP, ou nenhum alvo (água).

18.5. Resultados : Detecção e Clivagem do Substratorepórter SubBi-1-FB

Na ausência de ATP ou dATP, foi observado um baixo nível de fluorescência que não aumentou no decorrer do tempo, demonstrando que o oligonucleotídeo inibidor foi capaz de impedir a combinação de uma MNAzima ativa (Figura 21). Na presença de ATP ou dATP, o sinal fluorescente foi mais alto e ele aumentou no decorrer do tempo. Isto indica que o oligonucleotídeo inibidor foi deslocado por dATP e ATP, e formou-se uma MNAzima ativa. A combinação da MNAzima foi dependente do alvo, pois o sinal fluorescente na presença de GTP e CTP foi igual àquele na ausência de ATP ou dATP, isto é, no controle com água sem analisado. Este exemplo demonstra que as MNAzimas podem ser acopladas a aptâmeros para a detecção de alvos que incluem alvos ácidos nucléicos e diferentes de ácidos nucléicos,

em uma abordagem que é altamente específica para o alvo.

Os versados nessas técnicas devem reconhecer que o desenho desta estratégia pode ser flexível. O aptâmero pode ser incorporado em qualquer uma das duas extremidades (5' ou 3') de qualquer uma das duas *partizimas* que contêm seqüências de núcleos catalíticos parciais. Assim sendo, o oligonucleotídeo inibidor pode se ligar à região do aptâmero e ao braço de substrato (que se liga ao substratorepórter) ou ao braço sensor (que se liga ao facilitador de combinação). No primeiro desenho (Figura 20; este exemplo), o inibidor bloqueia a ligação do substratorepórter. No último desenho, o inibidor impediria a ligação do facilitador de combinação com as *partizimas*, e portanto, impediria a formação da MNAzima ativa.

A literatura contém seqüências para inúmeros aptâmeros capazes de detectar muitos tipos de alvos. Eles incluem proteínas, carboidratos, lipídeos, príons, nucleotídeos, células inteiras e vírus. Os aptâmeros para todos estes tipos de alvos poderiam ser ligados a *partizimas* para detectar uma faixa muito diversa de moléculas. As condições da reação (tampão, temperatura, concentração de cátion bivalente, etc.), que são compatíveis com a ligação de alvos a aptâmeros (ou *apta-partizimas*) e com a clivagem de um substratorepórter por uma MNAzima, podem ser determinadas por testes empíricos. Além disso, como os aptâmeros são desenvolvidos *in vitro* sob condições de reação selecionadas pelo pesquisador, seria possível individualizar o desenvolvimento molecular para permitir o desenvolvimento de aptâmeros para qualquer alvo desejado que se ligará sob condições compatíveis com a clivagem por MNAzimas. Como as MNAzimas são ativas em uma faixa muito ampla de condições, os versados nessas técnicas poderiam determinar facilmente as condições compatíveis com a clivagem por MNAzimas.

Exemplo 19: Uso de MNAzimas para a Detecção de Dsemparelhamentos de uma Única Base

As MNAzimas podem ser usadas para detectar e quantificar ácidos nucléicos-alvo em tempo real, usando métodos de ampliação de alvos *in vitro*, tal como PCR. As MNAzimas podem ser usadas também para gerar

resultados qualitativos, por exemplo, detectando mudanças em seqüências de ácidos nucleicos. A detecção de alvos mediada por MNAsimas pode ocorrer por reconhecimento de bases de Watson-Crick dos braços sensores e da seqüência-alvo. Neste exemplo, as MNAsimas são usadas para detectar um desemparelhamento de uma única base explorando este requisito para complementaridade entre o braço sensor da *partizima* e a seqüência de ácidos nucleicos-alvo.

19.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

Os oligonucleotídeos de *partizimas* foram desenhados para serem completamente complementares à seqüência-alvo, ou desemparelhados em relação à seqüência-alvo (Figura 22(i)). As seqüências da *partizima* A completamente emparelhada (RO5A5/2(22)-P), da *partizima* B completamente emparelhada (RO5B6/2(11G)-P) e da *partizima* B desemparelhada (RO5B6/2(11C)-P) estão listadas abaixo (de 5' para 3'). Nas seqüências que se seguem as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAsima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. A base desemparelhada na *partizima* RO5B6/2(11C)-P está em negrito e sublinhada. O "-P" indica a fosforilação em 3' do oligonucleotídeo.

SEQ ID NO: 107 Partizima A5 RO5A5/2(22)-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 108 Partizima B6 RO5B6/2(11G)-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGA-P

SEQ ID NO: 109 Partizima B6 RO5B6/2(11C)-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTC**GAGACGGA-P**

19.2. Substratorepórter

O substratorepórter usado neste exemplo foi SubBi-2. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5', e com uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão de FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação de FAM). A seqüência de SubBi-2-FB

está listada abaixo (de 5' para 3'); as bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

5 19.3. Iniciadores de PCR para Ampliação de RPLPO éxon 5

A seqüência-alvo para este exemplo foi gerada por ampliação *in vitro* do DNA genômico humano, usando os iniciadores de PCR oligonucleotídeos listados abaixo (de 5' para 3').

SEQ ID NO: 32 Iniciador 5RO5/1:

10 CATTCTATCATCAACGGGTA

SEQ ID NO: 110 Iniciador 3RO5/2:

AGCAGCCACAAAGGCAGA

19.4. Seqüências-alvo e Controles

15 O DNA genômico humano extraído da linhagem de células K562 humanas foi usado como modelo para ampliação do gene de RPLPO. Água isenta de nuclease (NF) foi usada no lugar do DNA genômico como um controle sem alvo.

19.5. Componentes da Reação: Ampliação e Detecção de Seqüência-alvo

20 A ampliação e detecção em tempo real da seqüência-alvo foram realizadas em um volume total de reação de 25 µl. Todas reações foram conduzidas em um termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems). Os parâmetros da ciclagem foram 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 30 segundos (com um decréscimo de 1°C na temperatura por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 47°C por 30 segundos. As reações continham 40 nM 5RO5/1, 200 nM de 3RO5/2, 200 nM RO5A5/2(22)-P e 200 nM RO5B6/2(11G)-P ou 200 nM RO5B6/2(11C)-P, 200 nM SubBi-2-FB, 10 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de RNAsina (Promega), 1 x ROX referência (Invitrogen), 1 x Immobuffer (Bioline), 1 unidade de Immolase (Bioline) e 100 ng de modelo de DNA genômico ou água isenta de nuclease.

19.6. Resultados: Detecção de um Único Desemparelhamento de

Bases Usando uma MNAzima

A MNAzima que compreende o braço sensor B completamente emparelhado apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando a seqüência-alvo foi o DNA genômico humano ampliado por PCR (Figura 22(ii)). Em contraste, a MNAzima que contém o braço sensor B desemparelhado apresentou um baixo nível de fluorescência com o alvo genômico, similar àquele observado no controle sem alvo, e a fluorescência não aumentou no decorrer do tempo. Assim sendo, o único desemparelhamento, três bases da junção das *partizimas* A e B, foi suficiente para impedir a formação da MNAziyma ativa.

Este exemplo demonstra que as MNAzimas podem ser usadas para detectar desemparelhamentos de bases individuais entre o alvo e os braços sensores. Como as MNAzimas são capazes de detectar alterações tão pequenas quanto mudanças de uma única base, ficaria óbvio para os versados nessas técnicas que as MNAzimas poderiam ser usadas também para discriminar seqüências que diferem em pequenas deleções ou pequenas inserções. Além disso, alterações maiores tais como translocações associadas com vários tipos de câncer, que resultam em transcritos de fusão, também poderiam ser detectadas. Elas ocorrem freqüentemente em associação com leucemia, por exemplo, transcritos de fusão de *PML/RAR* e estão associadas com leucemia promielocítica aguda, e transcritos de fusão de *bcr/abl* associados com leucemia granulocítica crônica.

Embora este exemplo demonstre que desemparelhamentos individuais podem ser suficientes para impedir a combinação de MNAzima ativa, experimentos adicionais demonstraram que nem todos desemparelhamentos de bases individuais rompem completamente a combinação de MNAzima ativa sob todas condições. A capacidade de discriminar desemparelhamentos de bases individuais depende de vários fatores, incluindo: (a) a severidade das condições da reação, que podem ser influenciadas por muitos fatores que incluem temperatura, concentração de sais, concentração de cátions, (b) o tipo de desemparelhamento, por exemplo, desemparelhamentos G/T versus C/C, (c) a posição do desemparelhamento dentro do braço de *partizima*,

(d) o comprimento do braço de *partizima*.

Estratégias adicionais podem ser usadas para aumentar a capacidade de a MNAzima detectar polimorfismos de bases individuais. Elas incluem, por exemplo, o uso de um braço sensor de *partizima* truncado, como demonstrado no Exemplo 22.

Exemplo 20: Teste da Atividade de MNAzima a Partir de uma Série de Pares de Partizimas que Contêm Seqüências de Núcleos Catalíticos Parciais Variantes Derivadas do Núcleo Catalítico 10:23

Podem ser produzidas enzimas de ácidos nucléicos multicomponentes (MNAzimas) que incorporam seqüências parciais de uma série de DNAzimas desenvolvidas *in vitro*. As MNAzimas ativas, baseadas em seqüências parciais das DNAzimas 8:17 e 10:23, foram demonstradas. Além disso, vários desenhos alternativos de *partizimas* baseados em DNAzimas 8:17 e 10:23 demonstraram ter (Exemplos 1, 3, Figuras 9, 10 e 13), ou não ter (Exemplo 1, Figura 8), atividade. Este exemplo estende ainda mais estes estudos e identifica seqüências de *partizimas* ativas e inativas, baseadas em seqüências de núcleos catalíticos parciais a partir da DNAzima 10:23. Além disso, o exemplo fornece um protocolo genérico para as etapas necessárias para identificar o lugar ou lugares ideais para dividir uma seqüência de núcleo catalítico de tal modo que, quando as seqüências de núcleos catalíticos parciais são incorporadas em *partizimas*, sejam geradas MNAzimas ativas funcionais.

20.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

O método neste exemplo foi usado para investigar quais posições dentro da seqüência do núcleo catalítico são apropriadas para se dividir em seqüências de núcleos catalíticos parciais, as quais, depois da incorporação em *partizimas*, resultam em MNAzimas funcionalmente ativas. A seqüência 10:23 foi dividida em vários pontos e depois as duas seqüências parciais foram incorporadas em uma série de pares de *partizimas* que foram desenhadas para clivar um substrato na presença do alvo (gene de RPLPO humano). Os núcleos catalíticos parciais para cada par de *partizimas* que foram testados estão indicados na Tabela 22 com referência à seqüência do

núcleo catalítico completo da DNAzima 10:23 (Santoro e Joyce, 1997).

Tabela 22: Bases e posição na DNAzima 10:23 eem uma série de pares de *partizimas* variantes onde as bases nas posições 1 a 15 do núcleo foram distribuídas diferentemente entre duas *partizimas* A e B.

Posição nº		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
DNAzima 10:23 (Santoro & Joyce, 1997)		G	G	C	T	A	G	C	T	A	C	A	A	C	G	A
Desenho 6 A4:B5 (T8-A9)	Partizima A									A	C	A	A	C	G	A
	Partizima B	G	G	C	T	A	G	C	T							
Desenho 7 A5:B6 (C7-T8)	Partizima A								T	A	C	A	A	C	G	A
	Partizima B	G	G	C	T	A	G	C								
Desenho 8 A6:B7 (A11-A12)	Partizima A												A	C	G	A
	Partizima B	G	G	C	T	A	G	C	T	A	C	A				
Desenho 9 A7:B8 (A9-C10)	Partizima A										C	A	A	C	G	A
	Partizima B	G	G	C	T	A	G	C	T	A						
Desenho 10 A8:B9 (G6-C7)	Partizima A							C	T	A	C	A	A	C	G	A
	Partizima B	G	G	C	T	A	G									
Desenho 11 A9:B10 (A5-G6)	Partizima A						G	C	T	A	C	A	A	C	G	A
	Partizima B	G	G	C	T	A										

- 5 Todas seqüências estão grafadas de 5' para 3'. O desenho das MNAzimas e a nomenclatura das *partizimas* é continuada a partir da série na Tabela 3 e estendida nesta tabela para identificar a localização da divisão dentro do núcleo. Por exemplo, o Desenho 6 é uma MNAzima derivada de 10:23 com o desenho da *partizima* A4 e *partizima* B5 (A4:B5), onde o núcleo foi dividido
- 10 entre T na posição 8 e A na posição 9 (T8-A9).

Neste experimento, os vários pares de *partizimas* foram todos sintetizados com braços sensores desenhados para hibridizar para éxon 5 de gene de RPLPO humano, e com braços de substrato direcionados contra

- o substrato, SubBi-2. Os pares de *partizimas* usados neste experimento foram sintetizados por Sigma-Prologo e suas seqüências estão listadas abaixo (de 5' para 3'). As bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNazima combinada, as bases em negrito hibridizam com o ácido nucléico-alvo e as bases em itálico hibridizam para o substrato. O "-P" indica a fosforilação em 3' do oligonucleotídeo.

Par de Partizimas RPLPO A4:B5

SEQ ID NO: 147 RO5A4/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAAACCTT -P

- 10 SEQ ID NO: 112 RO5B5(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACA -P

Par de Partizimas RPLPO A5:B6

SEQ ID NO: 107 RO5A5/2(22)-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTTACAACGAGAGGAAACCTT -P

- 15 SEQ ID NO: 114 RO5B6(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGGAGACGGATTACA -P

Par de Partizimas RPLPO A6:B7

SEQ ID NO: 115 RO5A6(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACGAGAGGAAACCTT -P

- 20 SEQ ID NO: 116 RO5B7(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCTACAGTGGAGACGGATTACA -P

Par de Partizimas RPLPO A7:B8

SEQ ID NO: 117 RO5A7(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTCAACGAGAGGAAACCTT -P

- 25 SEQ ID NO: 118 RO5B8(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCTAGTGGAGACGGATTACA -P

Par de Partizimas RPLPO A8:B9

SEQ ID NO: 119 RO5A8(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTCTACAACGAGAGGAAACCTT -P

- 30 SEQ ID NO: 120 RO5B9(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGGTGGAGACGGATTACA -P

Par de Partizimas RPLPO A9:B10

SEQ ID NO: 121 RO5A9(22)/2-P

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTGCTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 122 RO5B10(16)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGTGGAGACGGATTACA -P

5 20.2. **Substratorepórter**

O substratorepórter para este exemplo é SubBi-2 com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB
10 foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação de FAM). As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB

15 **AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA**

20.3. Iniciadores de PCR para a Ampliação de éxon 5 do Gene de RPLPO humano.

As seqüências dos iniciadores estão ilustradas, de 5' para 3', abaixo.

20 SEQ ID NO: 123 5' Iniciador 5RO5/2

GCTACCCAACTGTTGCATC

SEQ ID NO: 110 3' Iniciador 3RO5/2

AGCAGCCACAAAGGCAGA

20.4. Modelo do Alvo

25 O DNA genômico humano extraído de células K562 foi usado como modelo na reação de PCR.

20.5. Condições da Reação

A ampliação em tempo real da seqüência-alvo e a detecção da atividade catalítica dos pares de *partizimas* foram conduzidas em uma reação de 25 µL em um termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems). Os pa-
30 râmetros da ciclagem foram 95°C por 7 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 30 segundos (com um decréscimo de 1 °C na tempera-

- tura por ciclo), e finalmente 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 50°C por 30 segundos. Cada reação continha 0,04 μM 5RO5/1 e 0,2 μM de 3RO5/2, 10 mM MgCl_2 , 50 μM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1x Immobuffer (Bioline), 0,2 μM SubBi-2-FB, 1x corante referencial Rox (Invitrogen), 10 Unidades de RNAsina (Progema) e 1 Unidade de Immolase Polimerase (Bioline) e 100 ng de DNA genômico. Além disso, cada reação continha um par de *partizimas*, 0,2 μM de *partizima* A e 0,2 μM de *partizima* B (Par de *Partizimas* RPLPO A4:B5 ou A5:B6 ou A6:B7 ou A7:B8 ou A8:B9 ou A9:B10).

10 20.6. Resultados

- Usando um método de PCR de MNAzima em tempo real, foi detectada a atividade catalítica de três dos seis pares de *partizimas* RPLPO. O par de *partizimas* A4:B5 e A5:B6 apresentou altos níveis de atividade catalítica, permitindo a detecção do alvo em $\square$ 22 ciclos (Tabela 23). O par de *partizimas* A7:B8 também era ativo, embora menos ativo do que A4:B5 e A5:B6. Nenhuma atividade catalítica foi detectada a partir dos pares de *partizimas* A6:B7, A8:B9 ou A9:B10 sob as condições deste experimento.

Tabela 23: Valores do Ciclo Limite (Ct) Obtidos Usando Vários Pares de *Partizimas*

Divisão do Núcleo (vide tabela acima, este exemplo)	Ct	Comentário
A4:B5 (T8-A9)	19,3	Esta combinação de seqüências de núcleos catalíticos parciais nestas <i>partizimas</i> é compatível com a formação de MNAzimas ativas.
A5:B6 (C7-T8)	21,6	Esta combinação de seqüências de núcleos catalíticos parciais nestas <i>partizimas</i> é compatível com a formação de MNAzimas ativas.
A6:B7 (A11-A12)	Nenhum sinal em 50 ciclos	Esta combinação de seqüências de núcleos catalíticos parciais nestas <i>partizimas</i> não é compatível com a formação de MNAzimas ativas, sob estas condições experimentais.

Divisão do Núcleo (vide tabela acima, este exemplo)	Ct	Comentário
A7:B8 (A9-C10)	31,7	Esta combinação de seqüências de núcleos catalíticos parciais nestas partizimas é compatível com a formação de MNAzimas ativas.
A8:B9 (G6-C7)	Nenhum sinal em 50 ciclos	Esta combinação de seqüências de núcleos catalíticos parciais nestas partizimas não é compatível com a formação de MNAzimas ativas, sob estas condições experimentais.
A9:B10 (A5-G6)	Nenhum sinal em 50 ciclos	Esta combinação de seqüências de núcleos catalíticos parciais nestas partizimas não é compatível com a formação de MNAzimas ativas, sob estas condições experimentais.

Os valores de Ct volumes são a média de reações em triplicata, quando o nível de fluorescência limite foi estabelecido em 0,2 e a fluorescência referencial do fundo foi subtraída entre os ciclos 1 e 14.

5 Exemplo 21: Aplicação de MNAzimas para Detectar Proteínas-alvo.

Como demonstrado no Exemplo 18, as MNAzimas podem ser usadas para detectar alvos incorporando seqüências sobre a extremidade de uma *partizima* (apta-*partizima*). Neste exemplo, foi usada a mesma estratégia de detecção de MNAzimas (Figura 20) para detectar a proteína *Taq* polimerase, usando uma seqüência de aptâmero com um comprimento de 46 nucleotídeos, que foi relatada como se ligando a *Taq* polimerase com alta especificidade (Yakimovich, 2003). O facilitador de combinação e o oligonucleotídeo da *partizima* B foram iguais àqueles usados no Exemplo 18, onde ATP foi detectado usando uma MNAzima.

15 21.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*, Combinação e Oligonucleotídeos Inibidores

Neste exemplo a seqüência de aptâmero de *Taq* polimerase foi colocada adjacente ao braço de substrato da apta-*partizima* A (Figura 20). Os braços sensores da apta-*partizima* A e *partizima* B foram desenhados para se ligarem a um facilitador de combinação. As seqüências da apta-*partizima* TaqA2/1 e *partizima* AtpB3/1 estão indicadas abaixo (de 5' para

3'). Nas seqüências que se seguem as bases em negrito hibridizam com o facilitador de combinação, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. Além disso, as bases em letras normais na apta-*partizima* A2 TaqA2/1 indicam seqüências de aptâmero de DNA que se ligam a Taq polimerase.

SEQ ID NO: 124 Apta-Partizima A2 TaqA2/1:

AACGTACACTGCACGCGGTCGAAATAGTGAGTGCGGTCGGCTCGGGG
CATTCTTAGCGTTTTGCCCGAGCCGACCGC

SEQ ID NO: 104 Partizima B3 AtpB3/1:

10 **CATCTCTTCTCCGAGCGTCTGTACCGTGATC**

A seqüência do facilitador de combinação está indicada abaixo (de 5' para 3'):

SEQ ID NO: 105 Facilitador de combinação AtpC/1:

GTACACGGTACAGACCGTGCAGTGTACGTT

15 A seqüência do oligonucleotídeo inibidor está indicada abaixo (de 5' para 3'):

SEQ ID NO: 125 Inibidor TaqR/1:

TGCCCCGAGCCGACCGAACTCACTATTT

21.2. Substratorepórter

20 A atividade da MNAzima é monitorada pela clivagem de um substratorepórter de ácido nucléico duplamente rotulado. O substratorepórter para este exemplo é SubBi-1-FB com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA. As bases sublinhadas indicam a posição de uma porção 6-FAM na extremidade 5' e de uma porção BHQ1 na extremidade 3'.

25 As mudanças na fluorescência em virtude da clivagem de SubBi-1-FB no ribonucleotídeo entre FAM e BHQ1 foram monitoradas a 520 nm (comprimento de onda de emissão de FAM) com excitação em 490 nm (comprimento de onda de excitação de FAM).

30 SEQ ID NO: 6 SubBi-1-FB:

ACTCACTATaGGAAGAGATG

21.3. Alvo

A molécula-alvo neste exemplo foi *Taq* DNA Polimerase (Amersham Biosciences), e a polimerase Klenow (Amersham Biosciences) foi usada como um controle negativo. Usou-se água isenta de nuclease como um controle "sem alvo".

5 **21.4. Condições da Reação**

A detecção da sequência-alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substratorepórter pela MNAzima cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 50 µL. As reações foram conduzidas a 40°C em um FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). A fluorescência para cada reação foi lida a cada 6 segundos por um total de 15 minutos. Cada reação continha uma concentração final 200 nM de *Taq*A2/1, 200 nM de *Atp*B3/1, 200 nM de *Atp*C/1, 200 nM de *Taq*R/1, 200 nM de *Sub*Bi-1-FB, 25 mM de *MgCl*₂, 25 mM de Tris HCl pH 6,8 e 5 Unidades de *Taq* DNA polimerase ou 5 Unidades de polimerase Klenow ou nenhuma proteína (apenas água).

21.5. Resultados : Detecção e Clivagem do Substratorepórter *Sub*Bi-1-FB

Na ausência de *Taq* polimerase, foi observado um baixo nível de fluorescência que aumentou apenas ligeiramente no decorrer do tempo, demonstrando que o oligonucleotídeo inibidor foi capaz de impedir a combinação de uma MNAzima ativa. Na presença de *Taq* polimerase, o sinal fluorescente foi mais alto e aumentou no decorrer do tempo. Isto indica que o oligonucleotídeo inibidor foi deslocado pela *Taq* polimerase e formou-se uma MNAzima ativa. A combinação da MNAzima foi dependente do alvo, pois o sinal fluorescente na presença da polimerase Klenow foi similar ao sinal na ausência de *Taq* polimerase, isto é, no controle com água "sem alvo". Isso é consistente com as observações de Yakimovich *et al.* (2003) que demonstraram que a sequência de aptâmero de *Taq* polimerase é específica para *Taq* polimerase e não se liga a Klenow. Este exemplo de MNAzima acima demonstra que as MNAzimas podem ser acopladas a aptâmeros para a detecção de proteínas específicas.

Exemplo 22: Detecção de um Único Polimorfismo de Nucleotídeo (SNP) Usando uma Partizima Truncada e um Oligonucleotídeo Estabilizador

A detecção de alvos mediada por MNAzimas pode ocorrer por intermédio do reconhecimento com bases de Watson-Crick dos braços sensores das *partizimas* e da sequência-alvo. No Exemplo 19, este requisito de complementaridade foi usado para detectar um único desemparelhamento de bases entre o braço sensor da *partizima* e a sequência de ácidos nucleicos do alvo. No exemplo que se segue, o requisito de complementaridade foi explorado novamente para detectar um único polimorfismo de nucleotídeo (SNP), usando uma estratégia que utilizou uma *partizima* com um braço sensor truncado, que pode se estabilizar por um oligonucleotídeo estabilizador. A estratégia de detecção com MNAzima e usada neste exemplo está ilustrada na Figura 23 e os oligonucleotídeos requeridos estão descritos abaixo:

- a) *partizima*-padrão;
- b) uma *partizima* com um braço sensor truncado (por exemplo, 5 bases) que é desenhado para emparelhar competamente com uma forma do SNP, mas não com a outra;
- c) um oligonucleotídeo estabilizador (por exemplo, 15 bases), que hibridiza para o alvo adjacente ao braço sensor truncado da *partizima*. O estabilizador é desenhado para facilitar a combinação da MNAzima quando o braço sensor com 5 nucleotídeos é hibridizado para o alvo; e
- d) um substrato de sonda repórter.

22.1. Oligonucleotídeos de Partizimas e Oligonucleotídeo Estabilizador

Neste exemplo, o braço sensor da *partizima* B foi desenhado para ter um comprimento de apenas 5 nucleotídeos para discriminar um SNP que ocorre no oligonucleotídeo-alvo. O braço sensor da *partizima* B foi desenhado para hibridizar para a forma "T" do SNP, mas não para a forma "C" do SNP. As seqüências das *partizimas* A e B e o oligonucleotídeo estabilizador estão ilustrados abaixo (de 5' para 3'). Nas seqüências que se seguem as bases em negrito hibridizam com o alvo, as bases sublinhadas fa-

zem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. O "-P" indica a fosforilação em 3' do oligonucleotídeo.

SEQ ID NO: 126 Partizima A4 XdA4/2-P:

5 **ACTGGATGTCCATCTGTCTGACAACGAGAGGAAACCTT-P**

SEQ ID NO: 127 Partizima B5 XdB5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTTATAC-P

SEQ ID NO: 128 Stabiliser XdF/2-P:

CTTCGTGAGGGTGAG-P

10 **22.2. Substratorepórter**

O substratorepórter usado neste exemplo foi SubBi-2. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5', uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 520 nm (comprimento de onda de emissão de FAM) com excitação em 490 nm (comprimento de onda de excitação de FAM). A sequência de SubBi-2-FB está listada abaixo (de 5' para 3'); as bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:

20 **AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA**

22.3. Alvo

As moléculas do alvo para este exemplo foram oligonucleotídeos sintéticos derivados do gene Xd. Um dos alvos correspondia à forma "T" do SNP (XdC/2(52)) e era completamente emparelhada com o braço sensor da *partizima* B. O outro alvo correspondia à forma "C" do SNP e era desemparelhado com o braço sensor da *partizima* B. Os oligonucleotídeos sintéticos foram ordenados a partir de Sigma-Proligo, e usou-se água isenta de nucle-
ase no lugar do alvo como um controle "sem alvo". As sequências de ambos alvos estão listadas abaixo (de 5' para 3') com o SNP sublinhado.

30 SEQ ID NO: 129 Alvo XdC/2(52):

**TGCCCCCTCACCTCACGAAGGTATACAGACAGATGGACATCCAGTTG
GTGA**

SEQ ID NO: 130 Alvo (desemparelhamento) XdC/2(1M52):

TGCCCCCTCACCTCACGAAGGCATACAGACAGATGGACATCCAGTTG
GTGA

22.4. Condições da Reação

- 5 A detecção da sequência do alvo foi medida por um aumento no sinal fluorescente causado pela clivagem do substratorepórter pela MNAzi-
ma cataliticamente ativa. As reações foram iniciadas pela adição de substrato, e o volume total de todas reações foi de 50 µL. As reações foram condu-
zidas a 55°C em um FLUOstar OPTIMA (BMG Biotech). A fluorescência para
10 cada reação foi lida a cada 2 segundos por um total de 5 minutos. Todas reações continham 200 nM XdA4/2-P, 200 nM XdB5/2-P, 1x Tampão II de PCR (Applied Biosystem) e MgCl₂ 25 mM. Além disso, a reação continha os oligonucleotídeos listados na Tabela 24.

Tabela 24. Reagentes Adicionais em Reações de MNAzimas.

Reação	Alvo	Estabilizador
A	200 nM de XdC/2(52)	200 nM de XdF/2-P
B	200 nM de XdC/2(1M52):	200 nM de XdF/2-P
C	200 nM de XdC/2(52)	Nenhum estabilizador
D	Nenhum alvo	200 nM de XdF/2-P

15 22.5. Resultados : Detecção e Clivagem do Substratorepórter SubBi-2-FB

- A MNAzima apresentou um aumento na fluorescência no decorrer do tempo quando o modelo de SNP completamente emparelhado foi usado (Reação A: Figura 23). Em contraste, quando o modelo era desemparelhado (continha um SNP), o sinal fluorescente não aumentou no decorrer do tempo (Reação B: Figura 23). Similarmente, não houve qualquer aumento na fluorescência na ausência do oligonucleotídeo-alvo (Reação D: Figura 23). A presença do oligonucleotídeo estabilizador demonstrou ser essencial para estabilizar o complexo de MNAzima. Uma reação que contém todos os
20 componentes da reação, incluindo o alvo completamente emparelhado, mas na qual faltava o oligonucleotídeo estabilizador, não deu qualquer aumento
25

na fluorescência no decorrer do tempo (Reação C: Figura 23). Assim sendo, 5 bases do braço sensor foram insuficientes para formar um complexo de MNAzima estável, mas a presença de um oligonucleotídeo estabilizador pôde compensar o comprimento curto do braço sensor da *partizima* (5 bases) e

5 permitir a formação da MNAzima estável sob condições severas de temperatura (55 °C neste exemplo). O oligonucleotídeo estabilizador pode ser considerado uma terceira *partizima* neste sistema, pois ele é necessário para a formação da MNAzima estável.

Este exemplo demonstra que as MNAzimas podem ser usadas

10 para discriminar entre dois alvos que diferem em apenas um SNP. Além disso, ele demonstra a aplicação de *partizimas* com braços sensores truncados, e seu uso na combinação com oligonucleotídeos estabilizadores.

15 **Exemplo 23: Atividade Catalítica de MNAzimas com Substituições de Ribonucleotídeos.**

Diferentemente de ribozimas, as DNAzimas não foram descobertas na natureza. As DNAzimas são desenvolvidas *in vitro* a partir de grandes bibliotecas de oligonucleotídeos. A substituição de certos ribonucleotídeos por certos desoxirribonucleotídeos em ribozimas conhecidas foi tentada sob

20 certas condições (McCall *et al.*, 1992). As ribozimas que foram completamente convertidas em DNA não têm qualquer atividade em virtude de diferenças de conformação de RNA e DNA (Perreault *et al.*, 1990). Estes estudos demonstram que enzimas de RNA não podem ser transformadas em enzimas de DNA funcionais meramente substituindo ribonucleotídeos por

25 desoxirribonucleotídeos. Os experimentos foram realizados para investigar a tolerância de MNAzimas à substituição de ribonucleotídeos por desoxirribonucleotídeos.

23.1. Oligonucleotídeos de *Partizimas*

Neste exemplo, várias *partizimas* foram sintetizadas, onde um

30 ou mais desoxirribonucleotídeos foram substituídos por ribonucleotídeos dentro das regiões que constituem o núcleo catalítico parcial. Foram sintetizadas *partizimas* que tinham uma única substituição de ribonucleotídeo, ou

que tinham a região do núcleo catalítico parcial inteira substituída por ribonucleotídeos. Os oligonucleotídeos das *partizimas* A e B tinham braços sensores complementares a uma região de éxon 4 do gene *RPLPO* humano. Os oligonucleotídeos de *partizimas* estão listados abaixo, de 5' para 3'. Nas seqüências que se seguem, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNazima combinada, as bases em negrito hibridizam para o alvo, e as baem itálico hibridizam para o substrato. As bases em letras minúsculas representam bases de RNA que substituíram bases de DNA.

SEQ ID NO: 131 partizima A (Control) RO4A5(18)/2-P

10 **GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACGAGAGGAAACCTT-P**

SEQ ID NO: 132 partizima B (Control) RO4B6 (19)/2-P

TGCCCAGGGAGGCTAGCGTGTTCGACAATGGCAGCA-P

SEQ ID NO: 133 Partizima A (ribo-14g): RO4A5(18)/2-rG14-P

GGGCTGGTCATCCAGCAGTACAACgAGAGGAAACCTT-P

15 SEQ ID NO: 134 Partizima A (ribo-9a): RO4A5(18)/2-rA9-P

GGGCTGGTCATCCAGCAGTaCAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 135 Partizima A (ribo x 8): RO4rA5(18)/2

GGGCTGGTCATCCAGCAGuacaacgaGAGGAAACCTT

SEQ ID NO: 136 Partizima B (ribo x 7): RO4rB6(19)/2

20 **TGCCCAGGGAggcuaggGTGTTCGACAATGGCAGCA**

23.2. Substratorepórter

O substratorepórter para este exemplo foi SubBi-2 com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-2 foi rotulado nas duas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e com uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-2-FB. A clivagem de SubBi-2-FB foi monitorada a 530 nm (comprimento de onda de emissão de FAM) com excitação em 485 nm (comprimento de onda de excitação de FAM). Na seqüência que se segue as bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

30 SEQ ID NO: 21 SubBi-2-FB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

23.3. Seqüência-alvo

Um oligonucleotídeo de DNA sintético foi usado como o modelo de alvo neste experimento. A sequência do alvo está indicada abaixo, de 5' para 3'.

SEQ ID NO: 8 RO4/1Target

5 GCCATTGTCGAACACCTGCTGGATGACCAGC

23.4. Condições da Reação

A análise da atividade catalítica de vários pares de *partizimas* foi realizada usando um termociclador SmartCycler System (Cepheid). Os volumes totais das reações foram de 25 μ L, e cada reação continha 1 X Tampão II de PCR (Applied Biosystems), 10 mM $MgCl_2$, 0.2 μ M de SubBi-2-FB, 2 μ M de RO4/1Target e um par de *partizimas* A e B, cada uma 2 μ M. Os pares de *partizimas* em cada reação estão indicados na Tabela 24.

Tabela 24: Partizimas em Várias Reações.

Reação	Partizima A	Partizima B	Número de réplicas
partizimas A e B de controle (apenas DNA)	RO4A5(18)/2-P	RO4B6(19)/2-P	4
Partizima A (ribo - 9a) & partizima B de controle	RO4A5(18)/2-rA9-P	RO4B6 (19)/2-P	3
Partizima A (ribo - 14g) & partizima B de controle	RO4A5(18)/2-rG14-P	RO4B6 (19)/2-P	3
Partizima A (ribo x 8) & partizima B de controle	RO4rA5(18)/2	RO4B6 (19)/2-P	3
partizima A de controle e Partizima B (ribo x 7)	RO4A5(18)/2-P	RO4rB6(19)/2	3
Partizima A (ribo x 8) & Partizima B (ribo x 7)	RO4rA5(18)/2	RO4rB6(19)/2	3

As reações foram incubadas a 54°C por 20 minutos e os dados de fluorescência foram coletados em intervalos de 12 segundos.

Visto que início da fluorescência pode variar por cavidades individuais no sistema termociclo Smartcycler, o valor da fluorescência inicial foi subtraído da fluorescência de cada ponto de tempo para cada reação para permitir a comparação entre as reações em diferentes cavidades.

20 **23.5. Resultados: Atividade Catalítica de MNAs com Substituições de Ribonucleotídeos Dentro das Sequências de Núcleos Catalí-**

ticos Parciais de Partizimas.

A clivagem catalítica do substrato por MNAzimas constituídas de vários pares de *partizimas* foi monitorada como uma mudança na fluorescência no decorrer do tempo (Tabela 25).

5 **Tabela 25: Resultados Obtidos Usando Várias Combinações de *Partizimas*.**

Reação	Resultado
Reação de Controle com apenas DNA partizimas A e B	Rápido aumento na fluorescência; a fluorescência atingiu um patamar depois de 5 minutos de incubação.
Partizima A (ribo - 9a) & partizima B de controle	Aumento na fluorescência; a fluorescência não tinha atingido um patamar depois de 20 minutos de incubação.
Partizima A (ribo - 14g) & partizima B de controle	Rápido aumento na fluorescência; a fluorescência atingiu um patamar depois de 5 minutos de incubação.
Partizima A (ribo x 8) & partizima B de controle	Nenhum aumento na fluorescência no decorrer do tempo.
partizima A e Partizima B de controle (ribo x 7)	Nenhum aumento na fluorescência no decorrer do tempo.
Partizima A (ribo x 8) & Partizima B (ribo x 7)	Nenhum aumento na fluorescência no decorrer do tempo.

O experimento demonstra que algumas substituições de ribonucleotídeos dentro do núcleo catalítico das *partizimas* são compatíveis com a formação de MNAzimas ativas. Embora uma única substituição (*partizima A* (ribo 14g)) tivesse tido atividade similar àquela de *partizimas* inteiramente de DNA sob estas condições, uma única substituição alternativa (*partizima A* (ribo9a)), ao mesmo tempo ainda compatível com a formação de MNAzimas ativas, clivou o substrato em uma velocidade mais lenta do que o controle. A MNAzima não tolerou a substituição de todos nucleotídeos no domínio do núcleo catalítico parcial da *partizima A* e/ou *partizima B*.

Exemplo 24: Ativação de uma MNAzima pela Liberação de Partizimas Amarradas como um Mecanismo para Iniciar uma Cascata de Ampliação de Sinais.

24.1. Cascatas de Ampliação de Sinais Mediadas por MNAzimas

20 As MNAzimas podem ser usadas para iniciar cascatas de ampli-

ação de sinais. Uma estratégia para essa cascata de ampliação de sinais está ilustrada na Figura 25. Na presença do alvo, a MNAzima 1 ativa se forma a partir de *partizimas* que estão livres em solução. A MNAzima 1 cliva seu substrato amarrado, Sub1, liberando assim componentes *partizimas* para a MNAzima 2. Uma vez liberadas, estas *partizimas* hibridizam com o facilitador de combinação e formam a MNAzima 2 que cliva o substrato Sub 2. Sub 2 rotulado duplamente, que está livre em solução, é clivado pela MNAzima 2 e um sinal fluorescente é gerado. Além disso, a MNAzima 2 cliva Sub 2 amarrado, liberando *partizimas*, que têm os mesmos braços sensores que a MNAzima 2 e quando hibridizadas para o facilitador de combinação, formam a MNAzima 3 (o facilitador de combinação pode estar amarrado ou pode estar livre em solução). Como a MNAzima 3 compartilha os mesmos braços de substrato que a MNAzima 1, ela pode clivar também Sub1 amarrado, liberando assim mais componentes *partizimas* para a MNAzima 2. Isto resulta em uma cascata de geração enzimática dos componentes (*partizimas*) para mais enzimas (MNAzimas) e concomitante ampliação de sinal.

24.2. Ativação de MNAzima Amarrada Capaz de Clivar Substratos Rotulados de Forma Fluorescente

Este exemplo demonstra a primeira etapa da cascata de ampliação de sinais, como ilustrado na Figura 25. Nesta etapa iniciadora, o alvo se liga a *partizimas*, que estão livres em solução, e forma a MNAzima 1 ativa. A MNAzima 1 cliva seu substrato amarrado, Sub 1, liberando assim os componentes *partizimas* para a MNAzima 2. Uma vez liberadas, estas *partizimas* hibridizam com o facilitador de combinação e formam a MNAzima 2. Sub 2 - FQ rotulado duplamente (especificamente SubBi-3-FB neste exemplo), que está livre em solução, é clivado pela MNAzima 2, e um sinal fluorescente é gerado.

24.3. Oligonucleotídeos de Partizimas

Nas seqüências que se seguem, as bases sublinhadas fazem parte do núcleo catalítico da MNAzima combinada, as bases em negrito hibridizam com o alvo, e as bases em itálico hibridizam para o substrato. As bases que estão em itálico e também sublinhadas representam as seqüên-

5 cias de substrato que estão acopladas a *partizimas* a serem amarrar. O "-P" indica a fosforilação do oligonucleotídeo e "(Biotin)" indica biotinação do oligonucleotídeo. As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA. Todas seqüências listadas abaixo estão grafadas de 5' para 3'.

As *partizimas* da MNAzima 1 livres em solução foram desenhadas para se ligarem especificamente ao éxon 5 do gene RPLPO humano, e as *partizimas* da MNAzima 2 amarradas foram desenhadas para hibridizarem para o facilitador de combinação.

10 SEQ ID NO: 147 Partizima A4 RO5A4/2-P:

CAAACGAGTCCTGGCCTTGTCTACAACGAGAGGAAACCTT-P

SEQ ID NO: 148 Partizima B5 RO5B5/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTGTGGAGACGGATTACACCTTC-P

SEQ ID NO: 138 Substrato 1 amarrado/Partizima A4 RO4A4/3-5b:

15 (Bio-

tin)AAAAAAAAGGTTTCCTCguCCCTGGGCAGCTGGTCATCCAGCAGACA
ACGAGGTTGTGCTG

SEQ ID NO: 139 Substrato 1 Amarrado/Partizima B5 RO4B5/3-3b:

CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGTTGACAATGGCAAGGTTTCCTCguCCC

20 TGGGCAAAAAA(Biotin)

24.4. Substrat-repórter

O substratorepórter (Sub 2; Figura 25) para este exemplo é SubBi-3 com a seqüência, de 5' para 3', abaixo. No presente exemplo, SubBi-3 foi rotulado nas extremidades com uma porção 6-FAM na extremidade 5' e com uma porção BHQ1 na extremidade 3', e foi designado SubBi-3-FB. A clivagem de SubBi-3-FB foi monitorada a 516 nm (comprimento de onda de emissão de FAM) com excitação em 492 nm (comprimento de onda de excitação de FAM). As bases em letras minúsculas representam RNA e as bases em letras maiúsculas representam DNA.

30 SEQ ID NO: 31 SubBi-3-FB:

CAGCACAACCGuCACCAACCG

4.5. Alvo Sintético e Seqüências Facilitadoras

Nas seqüências qu se seguem, "(Biotin)" indica biotinilação do oligonucleotídeo.

SEQ ID NO: 140 Facilitador de combinação RO4/2-3b:

5 GCCATTGTCGAACACCTGCTGGATGACCAGC-(Biotin)

SEQ ID NO: 141 RPLPO 5 alvo sintético (RO5):

GAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTG

24.6. Amarração de *Partizimas* Biotiniladas a Placas de Microtitulação Revestidas com Estreptavidina

10 A amarração de *partizimas* biotiniladas e facilitador de combinação foi conduzida à temperatura ambiente em um volume total da reação de 100 µl. A mistura de ligação continha 200 nM de *partizima* RO4A4/3-5b, 200nM de *partizima* RO4B5/3-3b e 200nM do facilitador de combinação RO4/2-3b em solução de PBS Amressco (sem Ca⁺ e Mg⁺). A mistura de
15 ligação (100 µl) foi fracionada em cada cavidade de uma placa de microtitulação revestida com estreptavidina (Roche Diagnostics). O tempo de ligação foi de 30 minutos, e em seguida, 3 lavagens usando PBS, cada uma com 15 minutos de incubação antes da lavagem.

24.7. Clivagem de MNAzima Amarrada e Detecção de Substrato Rotulado de Forma Fluorescente

20 A clivagem do substrato rotulado de forma fluorescente, SubBi-3-FB, foi monitorada isotermicamente a 55 °C por 4 minutos no fluorômetro FluoStar Optima (BMG LabTech) em um volume total da reação de 100 µL. As reações continham 200 nM de *partizima* RO5A4/2-P, 200 nM da *partizima*
25 RO5B5/2-P, 200 nM do substrato SubBi-3-FB, 25 mM MgCl₂, 1x Tampão II de PCR (Applied Biosystems) e 200 nM de alvo sintético RO5. Usou-se água isenta de nuclease em vez do alvo sintético RO5 nos controles "sem alvo" controls. A reação foi iniciada com adição do substrato SubBi-3-FB.

24.8. Resultados: Mudança no Nível de Fluorescência na Presença do Alvo RO5 Versus Controle "sem alvo"

30 Há um aumento na fluorescência na presença do alvo RO5 em comparação com reações sem alvo (controle com água). A mudança na fluo-

rescência depois de 4 minutos foi de cerca de 36.000 unidades na presença do alvo, comparado com < 1.000 unidades para o controle sem alvo. Isto demonstra a capacidade de a MNAzima 1 (constituída das *partizimas* RO5A4/2-P e RO5B5/2-P) clivar o substrato amarrado e liberar as *partizimas* que constituem a MNAzima 2. Além disso, adicionalmente, isto demonstra que uma vez liberadas, as *partizimas* podem formar um complex de MNAzima ativa com o facilitador de combinação que é capaz de clivar o substrato, levando à geração do sinal.

Exemplo 25: Discriminação Direta entre Citosinas Metiladas e Citosinas em DNA.

O uso de um braço estabilizador com uma *partizima* que tem braços sensores truncados foi utilizado para demonstrar a capacidade de as MNAzimas detectarem polimorfismos de nucleotídeos individuais (SNPs) presentes em facilitadores de combinação de alvos (Exemplo 22). Sob a condição experimental usada nessa exemplo, um braço sensor com cinco bases foi usado como uma sonda para SNPs a 55 °C, bem acima da sua temperatura de fusão esperada. Os sistemas com braços estabilizadores, e *partizimas* que têm braços sensores truncados, são muito sensíveis a pequenas mudanças no alvo. Esta estratégia de detecção pode ser estendida ainda mais para discriminar diretamente entre alvos, que são metilados ou não-metilados em resíduos de citosina específicos, sem a necessidade de modificação anterior com bissulfito (vide Exemplo 11).

A presença de 5-metil-citosina(s) aumenta a temperatura de fusão do DNA em 1,3°C por base metilada, em relação a citosina(s) não-metilada(s). Assim sendo, uma *partizima* com, por exemplo, um braço sensor com um comprimento de cinco nucleotídeos seria capaz de se ligar a um alvo que contém três 5-metil-citosinas em uma temperatura quase 4 °C mais alta do que do que ele seria capaz de se ligar a um alvo não-metilado da mesma sequência.

Quando *partizimas*, um braço estabilizador, e um substrato são incubados em uma temperatura, que é apropriada para hibridização e formação de MNAzima na presença de um alvo metilado, mas que é alta de-

mais para a formação de MNAzima na presença de um alvo não-metilado, um sinal seria gerado apenas na presença do alvo metilado.

- Isto proporciona uma nova estratégia para a análise de padrões de metilação que pode fornecer um método para a detecção de bases de metilação como rotuladores de câncer e outras doenças.

Exemplo 26: Uso de MNAzim a para Induzir uma Mudança de Core m Resposta a um Alvo

- Uma estratégia para usar MNAzimas em um formato colorimétrico está ilustrada na Figura 24. Nesta abordagem, um substrato de MNAzima seria incorporado em um oligonucleotídeo-ponte. O oligonucleotídeo-ponte tem complementaridade a oligonucleotídeos afixados a partículas de ouro. Caso nenhum facilitador de combinação esteja presente, o oligonucleotídeo-ponte permaneceria intacto e as partículas de ouro se agregariam tornando a reação azul. Caso um facilitador de combinação, por exemplo, um ácido nucléico-alvo, estivesse presente, então MNAzimas ativas se combinariam a partir de *partizimas* presentes em solução, e clivariam o substrato (e assim sendo, o oligonucleotídeo-ponte). Isto levaria à dispersão dos agregados de partículas de ouro, o que, por sua vez, causaria uma mudança na cor de azul para vermelho.

- Esta estratégia de MNAzima proporciona um sistema que incorpora vários componentes genéricos, e assim sendo, ela fornece um método que pode ser rapidamente adaptado para qualquer alvo novo. Isto proporciona uma vantagem sobre outros sistemas que usam DNAzimas e partículas de ouro que requerem moléculas mais more complexas. Nesta estratégia com MNAzimas, o substrato de MNAzima e as partículas de ouro com oligonucleotídeos afixados poderiam ser genéricas e usadas para a análise de qualquer ácido nucléico-alvo. Novos sistemas analíticos requereriam meramente a síntese de novas *partizimas* com braços sensores complementares ao novo alvo. Além disso, a reação colorimétrica pode ser usada também em conjunto com sistemas de MNAzimas sensíveis à ativação por ácidos nucléicos, proteínas ou outros alvos.

REFERÊNCIAS

Patentes e Publicações de Patentes:

Publicação Internacional PCT Nº WO 99/45146

Publicação Internacional PCT Nº IB99/00848

- 5 Publicação Internacional PCT Nº WO 99/50452

Publicação Internacional PCT Nº WO 00/58505

Pedido PCT PCT/US96/02380 ("Asher")

Pedido U.S. Nº 4.683.202

Pedido U.S. Nº 4,683,195

- 10 Pedido U.S. Nº 4,000,159

Pedido U.S. Nº 5,176,995

Pedido U.S. Nº 4,965,188

Pedido U.S. Nº 6,140,055

Pedido U.S. Nº 6,201,113

- 15 **Outras Referências:**

Achenbach, J., Nutiu, R. and Li, Y. (2005) Structure-switching allosteric deoxyribozymas. *Analytica Chimica Acta*. 534(1): 41-51.

Adams, J. (1992) Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem*. Oct;40(10): 1457-63.

- 20 Bobrow, M., Harris, T., Shaughnessy, K. and Litt, G. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. Dec 20(125(1-2)): 279-85.

Breaker, R. (1997) DNA enzimas. *Nat Biotech*. 15: 427-431.

Breaker, R.R. and Joyce, G.F. (1994) A DNA enzima that cleaves RNA.

- 25 *Chem Biol*. Dec;1(4): 223-9.

Brown, A., Li, J., Pavot, C. and Lu, Y. (2003) A lead-dependent DNazima with a two-step mechanism. *Biochem*. Jun 17;42(23): 7152-61.

Cairns, M., King, A. and Sun, L. (2000) Nucleic acid mutation analysis using catalytic DNA. *Nucl Acids Res*. 28(3): e9.

- 30 Cairns, M., King, A. and Sun, L. (2003) Optimisation of O 10-23 DNazima-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucl Acids Res*. Jun 1;31(11): 2883-9.

- Carmi, N., Shultz, L.A. and Breaker, R.R. (1996) In vitro selection of self-cleaving DNAs. *Chem Biol.* 3(12): 1039-46.
- Chehab, F.F., Doherty, M., Cai, S.P., Kan, Y.W., Cooper, S. and Rubin, E.M. (1987) Detection of sickle cell anaemia and thalassaemias [letter] [published
5 erratum appears in *Nature* 1987 Oct 22-28;329(6141):678]. *Nature*. 329(6137): 293-4.
- Chen, C., Ridzon, D., Broomer, A., Zhou, H., Barbish, M., Lao, K. and Livak, K. (2005) MicroRNA quantitation by looped RT-PCR. AACR. poster.
- Cheng, S., Merlino, G.T. and Pastan (1993) A versatile method for coupling
10 of proteins to DNA:synthesis of α 2-macroglobin-DNA conjugates. *Nucleic Acid Research*: 11, 659-669.
- Compton, J. (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 350(6313): 91-2.
- Cruz, R.P., Withers, J.B. and Li, Y. (2004) Dinucleotide junction cleavage
15 versatility of 8-17 deoxyribozyme. *Chem Biol.* Jan;11(1): 57-67.
- Cuenoud, B. and Szostak, J.W. (1995) A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*. 375(6532): 611-4.
- Eigen, M. and Rigler, R. (1994) Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(13):
20 5740-7.
- Elghanian, R., Storhoff, J., Mucic, R., Letsinger, R. and Mirkin, C. (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on O distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*. 277: 1078-1079.
- Fahy, E., Kwoh, D. and Gingeras, T. (1991) Self-sustained sequence replication
25 (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Appl.* Aug;1(1): 25-33.
- Hall, J.G., Eis, P.S., Law, S.M., Reynaldo, L.P., Prudent, J.R., Marshall, D.J., Allawi, H.T., Mast, A.L., Dahlberg, J.E., Kwiatkowski, R.W., de Arruda, M., Neri, B.P. and Lyamichev, V.I. (2000) From O Cover: Sensitive detection of
30 DNA polymorphisms by O serial invasive signal amplification reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(15): 8272-8277.
- Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and

- highly specific endoribonuclease activities. *Nature*. Aug 18; 334(6183): 585-91.
- Huizenga, D. and Szostak, J. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*. 34: 656-665
- 5 Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T. and Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science*. 267(5198): 643-7.
- Impey, H., Applegate, T., Haughton, M., Fuery, C., King, J. and Todd, A. (2000) Factors that influence deoxyribozyme cleavage during polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. Nov 15; 286(2): 300-3.
- 10 Jonas, V., Alden, M., Curry, J., Kamisango, K., Knott, C., Lankford, R., Wolfe, J. and Moore, D. (1993) Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2410-2416.
- Kuwabara, T., Warashina, M., Nakayama, A., Ohkawa, J. and Taira, K. (1999) tRNA^{Val}-heterodimeric maxizymes with high potential as gene inactivating agents: Simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(5): 1886-1891.
- 15 Kuwabara, T., Warashina, M. and Taira, K. (2000) Allosterically controllable maxizymes cleave mRNA with high efficiency and specificity. *TIBTECH*. Nov 20 (18): 462-468.
- Lee, J.F., Hesselberth, J.R., Meyers, L.A. and Ellington, A.D. (2004) Aptamer Database. *Nucl Acids Res*. 32(90001): D95-100.
- Levy, M. and Ellington, A. (2003) Exponential growth by cross-catalytic cleavage of deoxyribozymogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(11): 6416-21.
- 25 Li, J., Zheng, W., Kwon, A.H. and Lu, Y. (2000) In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme. *Nucl Acids Res*. 28(2): 481-488.
- Li, Y. and Sen, D. (1996) A catalytic DNA for porphyrin metallation [letter]. *Nat Struct Biol*. 3(9): 743-7.
- 30 Liu, J. and Lu, Y. (2004) Adenosine-dependent assembly of aptazyme-functionalized gold nanoparticles and its application as a colorimetric biosensor. *Analytical Chemistry*. 76: 1627-1632.

- Lizardi, P., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. and Ward, D. (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* Jul;19(3): 225-32.
- Lohse, P.A. and Szostak, J.W. (1996) Ribozima-catalysed amino-acid transfer reactions. *Nature.* 381(6581): 442-4.
- 5 McCall, M., Hendry, P. and Jennings, P. (1992) Minimal Sequence Requirements for Ribozima Activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(13): 5710-5714.
- Mirkin, C., Letsinger, R., Mucic, R. and Storhoff, J. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature.* 382: 607-609.
- 10 Nagamine, K., Kuzuhara, Y. and Notomi, T. (2002) Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 290(4): 1195-1198.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Acids Res.* Jun 15;28(12): E63.
- 15 Oshima, K., Kawasaki, H., Soda, Y., Tani, K., Asano, S. and Taira, K. (2003) Maxizimas and Small Grampo-Type RNAs That Are Driven by a tRNA Promoter Specifically Cleave a Chimeric Gene Associated with Leukemia in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 63(20): 6809-6814.
- 20 Paul, N. and Joyce, G. (2004) Minimal self-replicating systems. *Current Opinion in Chemical Biology.* 8(6): 634-639.
- Perreault, J., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. and Cedergren, R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in O hammerhead RNA domain: a model for ribozima catalysis. *Biochemistry.* 30(16): 4020-5.
- 25 Perreault, J., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. and Cedergren, R. (1990) Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity. *Nature.* 344(6266): 565-7.
- Perriman, R., Delves, A. and Gerlach, W.L. (1992) Extended target-site specificity for a hammerhead ribozima. *Gene.* 113(2): 157-63.
- 30 Raap, A., van de Corput, M., Vervenne, R., van Gijlswijk, R., Tanke, H. and Wiegant, J. (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated depositi-

- on of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet.* Apr;4(4): 529-34.
- Raillard, S.A. and Joyce, G.F. (1996) Targeting sites within HIV-1 cDNA with a DNA-cleaving ribozima. *Biochemistry.* 35(36): 11693-701.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and
 5 Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732): 1350-4.
- Santoro, S. and Joyce, G. (1997) A general purpose RNA cleaving DNA enzima. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 4262-4266.
- 10 Santoro, S.W. and Joyce, G.F. (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzima. *Biochem.* 37(38): 13330-42.
- Schubert, S., Furste, J., Werk, D., Grunert, H., Zeichhardt, H., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2004) Gaining target access for deoxyribozimas. *J Mol Biol.* May 28;339(2): 355-63.
- 15 Sidorov, A., Grasby, J. and Williams, D. (2004) Sequence-specific cleavage of RNA in O absence of divalent metal ions by a DNAzima incorporating imidazolyl and amino functionalities. *Nucl Acids Res.* Mar 5;32(4): 1591-601.
- Silverman, S. (2004) Breaking up is easy to do (if you're a DNA enzima that cleaves RNA). *Chem Biol.* Jan;11(1): 7-8.
- 20 Tarasow, T.M., Tarasow, S.L. and Eaton, B.E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature.* 389(6646): 54-7.
- Todd, A.V., Fuery, C.J., Impey, H.L., Applegate, T.L. and Haughton, M.A. (2000) DzyNA-PCR: use of DNAzimas to detect and quantify nucleico acid sequences in a real-time fluorescent format. *Clin Chem.* May;46(5): 625 -630.
- 25 Urdea, M. (1993) Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. *Clin Chem.* 39: 725-726.
- van Gijlswijk, R., Zijlmans, H., Wiegant, J., Bobrow, M., Erickson, T., Adler, K., Tanke, H. and Raap, A. (1997) Fluorochrome-labeled tyramides: use in
 30 immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* Mar;45(3): 375-82.
- Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. and Ma-

- linowski, D.P. (1992) Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucl Acids Res.* 20(7): 1691-6.
- Warashina, M.; Kuwabara, T., Nakamatsu, Y. e Taira, K. (1999). Extremely high and specific activity of DNA enzimas in cells with a Philadelphia chromosome. *Chem Biol.* Apr;6(6): 237-50.
- 5 Yakimovich, O., Alekseev, Y., Maksimenko, A., Voronina, O. and Lunin, V. (2003) Influence of DNA aptamer structure on O specificity of binding to *Taq* DNA polymerase. *Biochemistry (Moscow)*. 68(2): 228-235.
- Zaborowska, Z., Furste, J., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2002) Sequence requirements in O catalytic core of O "10-23" DNA enzima. *J Biol Chem.* 277(43): 240617-22.
- 10 Zhang, S., Scharadin, N., Purohit, P. and Chasin, L. (2005) Aptamer-based multiplexed amplified real-time biochemical detector. *Indiana Biosensor Symposium*. Poster.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Johnson & Johnson Research Pty Limited

<120> Enzimas de ácidos nucleicos multicomponentes e métodos para seu uso

<130> 774711C

<160> 176

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 1

gctgggtcatc cagcacgggc gaaatagtga gt 32

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 2

gctgggtcatc cagcagcggc cgaaatagtg agt 33

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 3

catctcttct ccgtcgaagt gttcgacaat ggc 33

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 4

catctcttct ccggtgttcg acaatggc 28

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 5

catctcttct ccgagcgtgt tcgacaatgg c 31

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Sintético

<220>

<221> RNA

<222> (10)..(10)

<400> 6

actcactata ggaagagatg 20

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 7

gctgggtcatc cagcacgggc taaatagtga gt 32

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 8

gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c 31

<210> 9	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 9	
cgaccattag gtcgtccaca agctgttacc g	31
<210> 10	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 10	
tacctgcact acggtcgaaa tagtgagt	28
<210> 11	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 11	
catctcttct ccgagctaag cacttta	27
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 12	
taaagtgcctt atagtgcagg ta	22
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 13	
caaagtgcctt acagtgcagg tagt	24
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 14	
aaagtgcctg tcgtgcagg ag	22
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 15	
aaaagtgcctt acagtgcagg tagc	24
<210> 16	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 16	
taaagtgcctg acagtgcaga t	21
<210> 17	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 17	
caaacgagtc ctggccttgt ccgcacaacg agaggaaacc tt	42
<210> 18	
<211> 42	
<212> DNA	

<213> Sintético
 <400> 18
 tgcccagggg ggctagctgc ggtggagacg gattacacct tc 42

<210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 19
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt 40

<210> 20
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 20
 tgcccagggg ggctagctgt ggagacggat tacaccttc 39

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (12)..(13)
 <400> 21
 aaggtttcct cguccctggg ca 22

<210> 22
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 22
 gaaggtgtaa tccgtctcca cagacaaggc caggactcgt ttg 43

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 23
 caagactgga gacaaagtg 19

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 24
 gcagagtttc ctctgtgata 20

<210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 25
 acgtgacgct aaagtgct 18

<210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 26
 cgtccgaatg acgtacctgc ac 22

<210> 27
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Sintético
 <400> 27
 cgaatgacgt acctgcac 18

<210> 28
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Sintético
 <400> 28
 uaaagugcuu auagugcagg ua 22

<210> 29
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (39)..(39)
 <400> 29
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag gttgtgctg 39

<210> 30
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (39)..(39)
 <400> 30
 cggttggtga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc 39

<210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)
 <400> 31
 cagcacaacc guaccaacc g 21

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 32
 cattctatca tcaacgggta 20

<210> 33
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 33
 caaaggcaga tggatcag 18

<210> 34
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 34
 tacctgcact aacaacgaga ggaaacctt 29

<210> 35
 <211> 28

<212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 35
 tgcccaggga ggctagctaa gcacttta 28

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)
 <400> 36
 cagcacaacc gucaccaacc g 21

<210> 37
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Phosphorylation
 <222> (33)..(33)
 <400> 37
 gaccgtgagg tagtaacaac gagaggaaac ctt 33

<210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (33)..(33)
 <400> 38
 tgcccaggga ggctagctgg ttgtatagtt gtc 33

<210> 39
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Sintético
 <400> 39
 ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 40
 agcgaagctg agacaactat acaa 24

<210> 41
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 41
 cgacgtgacc gtgaggtag 19

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 42
 catggcacia gcgaagctga 20

<210> 43

```

<211> 33
<212> DNA
<213> Sintético

<220>
<221> Fosforilação
<222> (33)..(33)
<400> 43
gccccgcct ccaactacaa cgagggttg ctg 33

<210> 44
<211> 31
<212> DNA
<213> Sintético

<220>
<221> Fosforilação
<222> (31)..(31)
<400> 44
cggttggtga ggctagcaac gcccgcacct c 31

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Sintético
<400> 45
gttggttacg gtcgcggttc 20

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> Sintético
<400> 46
ccgaccgtaa ctattcgata cg 22

<210> 47
<400> 47
000

<210> 48
<400> 48
000
<210> 49
<400> 49
000

<210> 50
<400> 50
000

<210> 51
<211> 37
<212> DNA
<213> Sintético
<220>
<221> Fosforilação
<222> (37)..(37)
<400> 51
agatcaagat cattgctcca caacgagagg aaacctt 37

<210> 52
<211> 36
<212> DNA
<213> Sintético

<220>
<221> Fosforilação

```

<222> (36)..(36)
 <400> 52
 tgcccaggga ggctagcttc ctgagcgcaa gtactc 36

<210> 53
 <400> 53
 000

<210> 54
 <400> 54
 000

<210> 55
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Phosphorylation
 <222> (38)..(38)
 <400> 55
 agttcaaatc tgtactgcac cacaacgaga ggcgtgat 38

<210> 56
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (38)..(38)
 <400> 56
 ctgggaggaa ggctagctct ggaggtggat tcctttgg 38

<210> 57
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (42)..(42)
 <400> 57
 actgaataga aatagtgata gatacaacga gtgccatggt aa 42

<210> 58
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (41)..(41)
 <400> 58
 tatcacagcc aaggctagct ccatttcctat gactgtagat t 41

<210> 59
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (12)..(13)
 <400> 59
 aaggtttcct cguccctggg ca 22

<210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sintético

 <220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)
 <400> 60
 cagcacaacc guaccaacc g 21

 <210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sintético

 <220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)
 <400> 61
 atcacgcctc gutcctccca g 21

 <210> 62
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sintético

 <220>
 <221> RNA
 <222> (13)..(14)
 <400> 62
 ttaacatggc acgutggctg tgata 25

 <210> 63
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 63
 cattgccgac aggatgcaga 20

 <210> 64
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 64
 gagccgccga tccacacg 18

 <210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 65
 cactcagcca ctggatttaa 20

 <210> 66
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 66
 gcgcgtcttt gctttattc 19

 <210> 67
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 67
 ctttgctgac ctgctggatt a 21

<210> 68
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 68
 cctgttgact gggtcattaca a 21

<210> 69
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (38)..(38)
 <400> 69
 agatcaagat cattgctcca caacgagtgc catgttaa 38

<210> 70
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (38)..(38)
 <400> 70
 tatcacagcc aaggctagct tcctgagcgc aagtactc 38

<210> 71
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (39)..(39)
 <400> 71
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag tgcgccatg 39

<210> 72
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (41)..(41)
 <400> 72
 tactttctccc aaggctagct gtggagacgg attacacctt c 41

<210> 73
 <400> 73
 000

<210> 74
 <400> 74
 000

<210> 75
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação

<222> (41)..(41)
 <400> 75
 actgaataga aatagtgata gatacaacga gaggaaacct t 41

<210> 76
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (39)..(39)
 <400> 76
 tgcccagggga ggctagctcc attcctatga ctgtagatt 39

<210> 77
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (33)..(33)
 <400> 77
 gctgggtcatc cagcagacaa cgaggttggtg ctg 33

<210> 78
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (33)..(33)
 <400> 78
 cgggttggtga ggctagctgt gttcgacaat ggc 33

<210> 79
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (12)..(13)
 <400> 79
 aagggttcct cguccctggg ca 22

<210> 80
 <400> 80
 000

<210> 81
 <400> 81
 000

<210> 82
 <400> 82
 000

<210> 83
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(12)

<400> 83
 catggcgcac gutgggagaa gta 23

<210> 84
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 84
 caagactgga gacaaagtg 19

<210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 85
 gcagagtttc ctctgtgata 20

<210> 86
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (37)..(37)
 <400> 86
 ggttgctgctc agctcgtgta caacgagagg aaacctt 37

<210> 87
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (37)..(37)
 <400> 87
 tgcccaggga ggctagctcg tgagatgttg ggttaag 37

<210> 88
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 88
 tgggtgcatgg ttgtcgtc 18

<210> 89
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 89
 ttgcgctcgt tgcggga 17

<210> 90
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (38)..(38)
 <400> 90
 gaagaggcca ataaaggaga gacaacgaga ggcgtgat 38

<210> 91
 <211> 37
 <212> DNA

<213> Sintético

<220>

<221> Fosforilação

<222> (37)..(37)

<400> 91

ctgggaggaa ggctagctaa caccagcttg ttacacc 37

<210> 92

<211> 22

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 92

cagggtcattc cattccatgc ag 22

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 93

gctagtacca gttgagccag 20

<210> 94

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 94

gggctggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

<210> 95

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 95

gggctggtca tccagcagta caacaagagg aaacctt 37

<210> 96

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 96

gggctggtca tccagcagtt caacgagagg aaacctt 37

<210> 97

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 97

gggctggtca tccagcagta catcgagagg aaacctt 37

<210> 98

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 98

gggctggtca tccagcagta ctacgagagg aaacctt 37

<210> 99

<211> 36

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 99

tgcccaggga ggctagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 100

<211> 36

<212> DNA

<213> Sintético

<400> 100
 tgcccaggga ggctagagtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 101
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 101
 tgcccaggga ggccagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 102
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 102
 atgctgcat tgtcgaacac ctgctggatg accagcccaa 40

<210> 103
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 103
 aacgtacact gcacgcggtc gaaatagtga gtacctgggg gagtattgcg gaggaaggt 59

<210> 104
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 104
 catctcttct ccgagcgtct gtaccgtgta c 31

<210> 105
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 105
 gtacacggta cagaccgtgc agtgtacgtt 30

<210> 106
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 106
 ccaggtactc actatatt 17

<210> 107
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (41)..(41)
 <400> 107
 caaacgagtc ctggccttgt cttacaacga gaggaacct t 41

<210> 108
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (28)..(28)
 <400> 108
 tgcccaggga ggctagcgtg gagacgga 28

<210> 109
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Phosphorylation
 <222> (28)..(28)
 <400> 109

tgcccaggga ggctagcgtc gagacgga

28

<210> 110
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 110

agcagccaca aaggcaga

18

<210> 111
 <400> 111
 000

<210> 112
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (34)..(34)
 <400> 112

tgcccaggga ggctagctgt ggagacggat taca

34

<210> 113
 <400> 113
 000

<210> 114
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (33)..(33)
 <400> 114

tgcccaggga ggctagcgtg gagacggatt aca

33

<210> 115
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (37)..(37)
 <400> 115

caaacgagtc ctggccttgt ctacgagagg aaacctt

37

<210> 116
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (37)..(37)

<400> 116
 tgcccaggga ggctagctac agtggagacg gattaca 37

<210> 117
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (39)..(39)
 <400> 117
 caaacgagtc ctggccttgt ctcaacgaga ggaaacctt 39

<210> 118
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (35)..(35)
 <400> 118
 tgcccaggga ggctagctag tggagacgga ttaca 35

<210> 119
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (42)..(42)
 <400> 119
 caaacgagtc ctggccttgt ctctacaacg agaggaaacc tt 42

<210> 120
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (32)..(32)
 <400> 120
 tgcccaggga ggctaggttg agacggatta ca 32

<210> 121
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (43)..(43)
 <400> 121
 caaacgagtc ctggccttgt ctgctacaac gagaggaaac ctt 43

<210> 122
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (31)..(31)
 <400> 122

tgcccagggga ggctagtgga gacggattac a 31

<210> 123
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 123
 gctacccaac tgttgcatc 19

<210> 124
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 124
 aacgtacact gcacgcgggc gaaatagtga gtgcgggctcg ctcggggcat tcttagcggt 60
 ttgccccgag ccgaccgc 78

<210> 125
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 125
 tgccccgagc cgaccgaact cactattt 28

<210> 126
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (38)..(38)
 <400> 126
 actggatgtc catctgtctg acaacgagag gaaacctt 38

<210> 127
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (23)..(23)
 <400> 127
 tgcccagggga ggctagctta tac 23

<210> 128
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (15)..(15)
 <400> 128
 cttcgtgagg gtgag 15

<210> 129
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 129
 tgccccctca ccctcacgaa ggtatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52

<210> 130
 <211> 52
 <212> DNA

<213> Sintético

<400> 130

tgccccctca ccctcacgaa ggcatacaga cagatggaca tccagttggt ga 52

<210> 131

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<220>

<221> Fosforilação

<222> (37)..(37)

<400> 131

gggctggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

<210> 132

<211> 36

<212> DNA

<213> Sintético

<220>

<221> Fosforilação

<222> (36)..(36)

<400> 132

tgcccaggga ggctagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 133

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<220>

<221> RNA

<222> (25)..(25)

<220>

<221> Fosforilação

<222> (37)..(37)

<400> 133

gggctggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

<210> 134

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<220>

<221> RNA

<222> (20)..(20)

<220>

<221> Fosforilação

<222> (37)..(37)

<400> 134

gggctggtca tccagcagta caacgagagg aaacctt 37

<210> 135

<211> 37

<212> DNA

<213> Sintético

<220>

<221> RNA

<222> (19)..(26)

<400> 135

gggctggtca tccagcagua caacgagagg aaacctt 37

<210> 136

<211> 36

<212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (11)..(17)
 <400> 136
 tgcccaggga ggcuaagcgtg ttcgacaatg gcagca 36

<210> 137
 <400> 137
 000

<210> 138
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Biotina
 <222> (1)..(1)
 <220>
 <221> RNA
 <222> (18)..(19)
 <400> 138
 aaaaaaagg tttcctcguc cctgggcagc tggcatcca gcagacaacg aggttggtgct g 61

<210> 139
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (45)..(46)
 <220>
 <221> Biotina
 <222> (61)..(61)
 <400> 139
 cggttggtga ggctagctgt gttcgacaat ggcaagggtt cctcguccct gggcaaaaaa a 61

<210> 140
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Biotin
 <222> (31)..(31)
 <400> 140
 gccattgtcg aacacctgct ggatgaccag c 31

<210> 141
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 141
 gaaggtgtaa tccgtctcca cagacaaggc caggactcgt ttg 43

<210> 142
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 142
 tgagctacag tcggtcgaaa tagtgagt 28

<210> 143

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 143
 catctcttct ccgagcgctt catctca 27

<210> 144
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 144
 ggactaaccg tgcctgagct acagtcgggc gaaatagtga gt 42

<210> 145
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 145
 catctcttct ccgagcgctt catctcacga cgataacgct g 41

<210> 146
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 146
 tgagatgaag cactgtagct ca 22

<210> 147
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (40)..(40)
 <400> 147
 caaacgagtc ctggccttgt ctacaacgag aggaaacctt 40

<210> 148
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> Fosforilação
 <222> (39)..(39)
 <400> 148
 tgcccaggga ggctagctgt ggagacggat tacaccttc 39

<210> 149
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Sintético

<220>
 <221> RNA
 <222> (2)..(2)
 <400> 149
 tacaacga 8

<210> 150
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Sintético
 <400> 150
 cggtcgaa 8

<210> 151	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 151	
acaacga	7
<210> 152	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 152	
tacaacga	8
<210> 153	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<220>	
<221> RNA	
<222> (7)..(7)	
<400> 153	
tacaacga	8
<210> 154	
<400> 154	
000	
<210> 155	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 155	
tacaacaa	8
<210> 156	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 156	
ttcaacga	8
<210> 157	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 157	
tacatcga	8
<210> 158	
<400> 158	
000	
<210> 159	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 159	
tactacga	8
<210> 160	
<400> 160	
000	
<210> 161	
<211> 6	

<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 161	
caacga	6
<210> 162	
<400> 162	
000	
<210> 163	
<400> 163	
000	
<210> 164	
<400> 164	
000	
<210> 165	
<400> 165	
000	
<210> 166	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 166	
ccgagc	6
<210> 167	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 167	
ggctagct	8
<210> 168	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 168	
ggctagc	7
<210> 169	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 169	
ggctaga	7
<210> 170	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 170	
ggccagc	7
<210> 171	
<400> 171	
000	
<210> 172	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Sintético	
<400> 172	
ggctagcta	9

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos dois ou mais componentes oligonucleotídeos, em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de um facilitador de combinação MNAzima para formar uma enzima de ácido nucléico multicomponente cataliticamente ativa (MNAzima), em que cada um do dito pelo menos primeiro e dito segundo componentes oligonucleotídeos compreendem uma parte ramificada de substrato, uma parte nuclear catalítica, e uma parte ramificada de sensor;

em que após a autocombinação, a parte ramificada de sensor dos ditos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos atuam como ramificações de sensores da MNAzima, a parte ramificada de substrato dos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos atuam como ramificações de substrato da MNAzima, e a parte nuclear catalítica dos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos atuam como um núcleo catalítico de MNAzima;

e em que as ramificações de sensores da MNAzima interagem com o dito facilitador de combinação de MNAzima de modo a manter o primeiro e o segundo componentes oligonucleotídeos em proximidade para associação das suas respectivas partes nucleares catalíticas para formar o núcleo catalítico da MNAzima, sendo o dito núcleo catalítico capaz de modificar pelo menos um substrato, e em que as ditas ramificações de substratos da dita MNAzima engatam em um substrato, de tal modo que o dito núcleo catalítico da dita MNAzima possa modificar o dito substrato.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito facilitador de combinação é um alvo a ser identificado, detectado ou quantificado.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o dito alvo é um ácido nucléico.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um ter-

ceiro componente oligonucleotídeo que atua para estabilizar pelo menos um entre as ditas partes ramificadas de substrato ou partes ramificadas de sensor.

5 5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o dito facilitador de combinação, os ditos componentes oligonucleotídeos ou substratos ou uma combinação dos mesmos, compreende mais do que uma molécula.

10 6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que as partes de núcleo catalítico do primeiro componente oligonucleotídeo são selecionadas a partir do grupo que compreende SEQ ID NOs: 149 - 153, 155 - 157, 159 e 161, e as partes de núcleo catalítico do segundo componente oligonucleotídeo são selecionadas a partir do grupo que compreende SEQ ID NOs: 166 - 170 e 172.

15 7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos ou facilitador de combinação ou substrato ou uma combinação dos mesmos compreende ainda pelo menos um aptâmero ou parte do mesmo.

20 8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o dito aptâmero ou parte do mesmo compreende pelo menos um entre ácido nucléico, peptídeo, polipeptídeo ou proteína, ou um derivado ou combinação dos mesmos.

25 9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um iniciador da dita autocombinação da dita MNazima.

30 10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre o dito primeiro ou o dito segundo componente oligonucleotídeo, ou o dito facilitador de combinação, ou o dito substrato, compreende ainda pelo menos uma parte de sequência autocomplementar capaz de formar uma estrutura do tipo prendedor de cabelo (hairpin).

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o dito facilitador de combinação é um ácido nucléico ou uma proteína.

5 12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, facilitador de combinação, substrato, ou inibidor é afixado a um suporte insolúvel.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o dito suporte insolúvel compreende pelo menos uma nanopartícula ou micropartícula, ou uma combinação das mesmas.

10 14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de que o dito substrato compreende uma parte detectável e uma parte bloqueadora (quencher), em que após a modificação do dito substrato pela dita MNazima, um efeito detectável proporcionado pela dita parte detectável é aumentado ou diminuído.

15 15. Composição de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a dita modificação do dito substrato pela dita MNazima proporciona um efeito detectável.

20 16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que o dito facilitador de combinação e o dito substrato são ácidos nucléicos que são completa ou parcialmente complementares a pelo menos parte dos ditos primeiro ou segundo componentes oligonucleotídeos.

25 17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que compreende ainda pelo menos um terceiro componente oligonucleotídeo e um quarto componente oligonucleotídeo que se autocombinam na presença de pelo menos um facilitador de combinação adicional para formar pelo menos uma MNazima cataliticamente ativa adicional, em que cada um dos ditos pelo menos terceiro e quarto componentes oligonucleotídeos compreende uma parte ramificada de substrato, uma parte de núcleo catalítico, e uma parte ramificada de sensor;

30 em que, após a autocombinação de pelo menos um terceiro componente oligonucleotídeo e um quarto componente oligonucleotídeo, a

parte ramificada de sensor do dito pelo menos terceiro e do dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos formam ramificações de sensores da dita pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, a parte ramificada de substrato do dito pelo menos terceiro e do dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos formam ramificações de substrato da dita pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, e a parte de núcleo catalítico do dito pelo menos terceiro e do dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos formam um núcleo catalítico da dita pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional;

5 e em que as ramificações de sensores da dita pelo menos uma MNAzima adicional interagem com o dito pelo menos um facilitador de combinação adicional de modo a manter o dito pelo menos terceiro e o dito pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos em proximidade para associação das suas respectivas partes de núcleo catalítico para formar o núcleo catalítico da dita pelo menos uma MNAzima adicional, sendo o dito núcleo catalítico capaz de atuar sobre pelo menos um substrato adicional, e em que as ramificações de substrato da dita pelo menos uma MNAzima adicional engatam pelo menos um substrato adicional, de tal modo que o núcleo catalítico da dita pelo menos uma MNAzima adicional possa atuar sobre o dito
15 pelo menos um substrato adicional.

18. Composição de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que cada um dos substratos adicionais são iguais, diferentes ou uma combinação dos mesmos.

19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada pelo fato de que pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, facilitador de combinação, substrato, ou inibidor, é selecionado do grupo compreendendo DNA, RNA, análogos de ácido nucléico, ácidos nucléicos peptídicos, ácidos nucléicos bloqueados, quimeras de ácidos nucléicos peptídicos, ou uma combinação dos mesmos.

20. Método para detectar a presença de pelo menos um facilitador de combinação, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos,

em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de pelo menos um primeiro facilitador de combinação, para formar pelo menos uma enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa;

5 (b) disponibilizar pelo menos um primeiro substrato, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita primeira MNAzima, em que a dita modificação do dito substrato pela dita MNAzima proporciona um efeito detectável;

(c) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em
10 contato com uma amostra que contém putativamente o dito pelo menos primeiro facilitador de combinação sob condições que permitem:

(i) a autocombinação da dita pelo menos primeira MNAzima; e

(ii) a atividade catalítica da dita pelo menos primeira MNAzima;

e

15 (d) detectar o dito efeito detectável, deste modo detectando a presença do dito pelo menos um facilitador de combinação.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que compreende ainda disponibilizar pelo menos um terceiro e um quarto componentes oligonucleotídeos, em que o dito pelo menos terceiro e
20 o pelo menos quarto componentes oligonucleotídeos são capazes de se autocombinarem na presença de pelo menos um facilitador de combinação adicional para formar pelo menos uma MNAzima cataliticamente ativa adicional, e

em que pelo menos um substrato adicional está presente na
25 amostra, sendo o dito substrato adicional capaz de ser modificado apenas pela MNAzima adicional, em que a dita modificação proporciona um efeito detectável adicional.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que um substrato adicional é afixado a pelo menos um suporte
30 insolúvel, de tal modo que um efeito detectável seja produzido quando este substrato é modificado por sua respectiva MNAzima.

23. Método para detectar a presença de pelo menos um alvo,

caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5 (a) disponibilizar um substrato e dois ou mais componentes oligonucleotídeos, em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e pelo menos um segundo componente oligonucleotídeo são capazes de se autocombinarem na presença do dito alvo, para formar uma enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa; e em que pelo menos um entre o dito primeiro e o dito segundo componentes oligonucleotídeos compreende ainda pelo menos uma parte de aptâmero;
 - 10 c (b) colocar os ditos componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que contém putativamente o dito pelo menos um alvo, sob condições que permitem:
 - (i) a ligação do dito alvo à dita pelo menos uma parte de aptâmero; e
 - (ii) a modificação catalítica do dito substrato através da dita
 - 15 MNAzima; e
 - (c) determinar a presença da modificação catalítica através da MNAzima, em que a presença da modificação catalítica é indicativa da presença do dito alvo.
24. Método para detectar a presença de pelo menos um alvo,
- 20 caracterizado pelo fato de que compreende:
- (a) disponibilizar pelo menos um substrato, pelo menos um primeiro facilitador de combinação e dois ou mais componentes oligonucleotídeos, em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo são capazes de se autocombinarem
 - 25 na presença do dito primeiro facilitador de combinação e o dito alvo, para formar uma enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa; e
 - em que pelo menos um entre o dito primeiro ou o dito segundo componentes oligonucleotídeos ou o dito primeiro facilitador de combinação
 - 30 ou o dito substrato compreende ainda um aptâmero ou parte do mesmo e em que o dito alvo é capaz de se ligar a pelo menos uma parte do dito aptâmero ou parte do mesmo; e

em que o dito substrato é capaz de ser modificado pela dita pelo menos primeira MNAzima, em que a dita modificação do dito substrato através da dita MNAzima disponibiliza um efeito detectável;

5 (b) disponibilizar pelo menos um primeiro inibidor o qual é capaz de inibir a dita autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa na ausência do dito alvo;

(c) colocar os ditos componentes oligonucleotídeos, o dito facilitador de combinação, o dito substrato e o dito inibidor em contato com uma amostra que contém putativamente o dito alvo, sob condições que permitem:

10 (i) a ligação do dito alvo ao dito aptâmero ou parte do mesmo; e
(ii) a remoção da dita inibição da dita autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa; e

(iii) a atividade catalítica da MNAzima; e

(e) determinar a presença do dito efeito detectável de modo a
15 detectar a presença do dito alvo.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre os ditos componentes oligonucleotídeos, facilitador de combinação, aptâmero, ou parte de aptâmero compreende ainda o dito inibidor.

20 26. Método de acordo com a reivindicação 24 ou 25, caracterizado pelo fato de que a dita inibição da autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa é removida após o contato do dito aptâmero ou parte de aptâmero com o alvo.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que o dito inibidor é capaz de se ligar a pelo menos um do dito aptâmero ou parte do mesmo.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, ou 24 a 27, caracterizado pelo fato de que o dito efeito detectável é medido quantitativamente ou qualitativamente.

30 29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que compreende ainda disponibilizar pelo menos um facilitador de combinação adicional e pelo menos um terceiro e

um quarto componente oligonucleotídeo, em que o dito pelo menos terceiro e pelo menos quarto componente oligonucleotídeo são capazes de se auto-combinarem na presença do dito pelo menos um facilitador de combinação adicional e pelo menos um alvo adicional, para formar pelo menos uma

5 MNAzima cataliticamente ativa adicional, e

em que pelo menos um substrato adicional está presente na amostra, sendo o dito substrato adicional capaz de ser modificado pela MNAzima adicional, em que a dita modificação proporciona um efeito detectável adicional;

10 e em que pelo menos um dos ditos terceiro ou quarto componentes oligonucleotídeos ou o dito facilitador de combinação adicional ou o dito substrato adicional compreende ainda pelo menos um aptâmero adicional ou parte do mesmo que se liga a pelo menos um alvo adicional;

em que pelo menos uma molécula inibidora adicional entra em
15 contato com uma parte do dito aptâmero adicional, inibindo desta forma a dita autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa adicional na ausência do dito alvo adicional; e

em que o dito pelo menos um facilitador de combinação adicional entra em contato com pelo menos uma parte dos ditos componentes oligonucleotídeos adicionais.
20

30. Método para detectar a presença de pelo menos uma variante de seqüência de ácidos nucleicos, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos,
25 em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo são capazes de se autocombinarem na presença de uma variante de seqüência de um ácido nucleico para formar uma enzima de ácido nucleico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa;

(b) disponibilizar pelo menos um substrato, sendo o dito substrato capaz de ser modificado pela dita primeira MNAzima, em que a dita modificação do dito substrato pela dita MNAzima proporciona um efeito detectável;
30

(c) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que contém putativamente a dita variante de sequência, sob condições que permitem:

- (i) a autocombinação da dita MNAzima cataliticamente ativa; e
- 5 (ii) a atividade catalítica da dita MNAzima; e
- (d) determinar a presença do dito efeito detectável, detectando desta forma a presença da dita pelo menos uma variante de sequência.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a variante de sequência é selecionada a partir do grupo que
10 compreende polimorfismos de nucleotídeos individuais, múltiplos polimorfismos de nucleotídeos, inserções, deleções, duplicações, translocações, variantes de sequências com deslocamento de estrutura, variantes de sequência sem sentido, ou qualquer combinação das mesmas.

32. Método de acordo com a reivindicação 30 ou 31, caracterizado
15 do pelo fato de que qualquer um dos dois ou ambos entre o dito primeiro componente oligonucleotídeo e o dito segundo componente oligonucleotídeo compreendem mais do que uma molécula.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que a dita amostra que contém a dita variante de sequência é selecionada a partir do grupo que compreende DNA não-metilado ou metilado modificado com bissulfito, RNA não-metilado ou metilado modificado com bissulfito, pelo menos um amplicon de DNA não-metilado ou metilado modificado com bissulfito, pelo menos um amplicon de RNA não-metilado ou metilado modificado com bissulfito, ou uma combinação dos mesmos.
25

34. Método para detectar a presença de uma variante de sequência de um ácido nucléico, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, compreendendo pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um
30 segundo componente oligonucleotídeo capazes de se autocombinarem na presença de um ácido nucléico, para formar pelo menos uma primeira enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa;

(b) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que contém putativamente o ácido nucléico, na presença de pelo menos um primeiro substrato modificável através da dita pelo menos uma primeira MNAzima, em que o substrato compreende uma parte detectável capaz de proporcionar pelo menos um primeiro efeito detectável após a modificação do substrato através da dita pelo menos primeira MNAzima, sob condições que permitem:

- (i) a autocombinação da MNAzima; e
- (ii) a atividade catalítica da MNAzima; e
- 10 (c) em que a ausência da atividade catalítica é indicativa da presença de uma variante de seqüência no dito ácido nucléico.

35. Método para detectar a presença de pelo menos um ácido nucléico metilado, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de um ácido nucléico metilado, para formar pelo menos uma enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa;

- (b) disponibilizar pelo menos um primeiro substrato, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita primeira MNAzima, em que a dita modificação do dito substrato pela dita MNAzima proporciona pelo menos um primeiro efeito detectável;

- (c) colocar os dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que contém putativamente o ácido nucléico metilado, sob condições que permitem:

- (i) autocombinação da MNAzima cataliticamente ativa; e
- (ii) a atividade catalítica da MNAzima; e
- (d) determinar a presença do dito pelo menos um efeito detectável, detectando desta forma a presença do dito pelo menos um ácido nucléico metilado.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que as ditas condições compreendem ainda uma temperatura que

facilita a hibridização da dita MNAzima com o dito ácido nucléico metilado, mas não com o ácido nucléico não-metilado.

37. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22 ou 24 a 35, caracterizado pelo fato de que compreende ainda ampliar o efeito detectável pelo uso de uma cascata de ampliação de efeitos detectáveis.

38. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que a cascata de ampliação de efeitos detectáveis compreende uma ou mais entre uma cascata de ribozima/ligase, uma cascata enzimática de ácidos nucléicos circular, uma cascata enzimática de proteínas, ou uma ou mais enzimas afixadas a um suporte, ou qualquer combinação das mesmas.

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 38, caracterizado pelo fato de que o dito substrato compreende uma parte detectável e uma parte bloqueadora (quencher), em que após a modificação do dito substrato pela dita MNAzima, um efeito detectável proporcionado pela dita parte detectável é aumentado ou diminuído.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 39, caracterizado pelo fato de que a dita modificação é selecionada a partir do grupo que compreende clivagem, ligação, metalação da porfirina, formação de ligações carbono-carbono, ligações éster ou ligações amida.

41. Método de acordo com a reivindicação 21, 22, ou 29, caracterizado pelo fato de que o dito pelo menos um efeito detectável adicional é detectável independentemente.

42. Método de acordo com a reivindicação 21 ou 29, caracterizado pelo fato de que cada um dos ditos substratos adicionais é igual, diferente ou uma combinação dos mesmos.

43. Método de acordo com a reivindicação 21 ou 29, caracterizado pelo fato de que pelo menos um entre o dito substrato adicional é afixado a um suporte insolúvel, de tal modo que apenas uma entre uma parte detectável e uma parte bloqueadora (quencher) do substrato adicional permanece afixada ao suporte quando o dito substrato adicional é modificado

pela dita MNAzima adicional.

44. Método para detectar pelo menos um facilitador de combinação usando uma cascata de ampliação, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, compreendendo pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e pelo menos um segundo componente oligonucleotídeo que se autocombinam na presença de pelo menos um primeiro facilitador de combinação, para formar pelo menos uma primeira enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa;

10 (b) disponibilizar um suporte insolúvel que tem pelo menos um primeiro substrato afixado a ele, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita MNAzima, em que o dito primeiro substrato compreende pelo menos uma terceira molécula que compreende pelo menos uma primeira enzima cataliticamente ativa, que é liberada após a modificação do dito primeiro substrato pela dita primeira MNAzima;

20 (c) colocar os ditos dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que contém putativamente o dito facilitador de combinação, na presença do dito suporte insolúvel que tem o dito primeiro substrato afixado a ele, sob condições que permitem:

(i) autocombinação da dita MNAzima; e

(ii) a atividade catalítica da dita MNAzima; e

25 (d) disponibilizar um suporte insolúvel que tem pelo menos um segundo substrato afixado a ele, sendo o dito segundo substrato clivável pela dita primeira enzima cataliticamente ativa, em que o dito segundo substrato compreende pelo menos uma quarta molécula que compreende pelo menos uma porção detectável que é liberada após a modificação do dito segundo substrato pela dita primeira enzima; e

30 (e) em que a dita primeira enzima cataliticamente ativa modifica uma pluralidade de ditos segundos substratos, liberando desta forma uma pluralidade de porções detectáveis.

(f) em que as ditas porções detectáveis são detectáveis após a

modificação do dito segundo substrato pela dita primeira enzima cataliticamente ativa; e

(g) em que a detecção das ditas porções detectáveis é indicativa da presença do dito facilitador de combinação.

5 45. Método para detectar pelo menos um facilitador de combinação, usando uma cascata de ampliação, caracterizado pelo fato de que compreende:

10 (a) disponibilizar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, compreendendo pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e pelo menos um segundo componente oligonucleotídeo que se autocombinam na presença de pelo menos um primeiro facilitador de combinação, para formar pelo menos uma primeira enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa;

15 (b) disponibilizar um suporte insolúvel que tem pelo menos um primeiro substrato afixado a ele, sendo o dito primeiro substrato capaz de ser modificado pela dita MNAzima, em que o dito primeiro substrato compreende pelo menos uma terceira molécula que compreende pelo menos uma primeira enzima cataliticamente ativa, que é liberada após a modificação do dito primeiro substrato pela dita primeira MNAzima;

20 (c) colocar os ditos dois ou mais componentes oligonucleotídeos em contato com uma amostra que contém putativamente o dito facilitador de combinação, na presença do dito suporte insolúvel que tem o dito primeiro substrato afixado a ele, sob condições que permitem:

 (i) autocombinação da dita MNAzima; e

25 (ii) a atividade catalítica da dita MNAzima;

 (d) em que a atividade catalítica da dita MNAzima é indicativa da presença do dito pelo menos um facilitador de combinação.

30 46. Método de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que as ditas porções detectáveis compreendem ainda uma segunda enzima cataliticamente ativa adicional capaz de modificar o dito primeiro substrato, liberando desta forma a enzima cataliticamente ativa adicional.

 47. Método de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pe-

lo fato de que pelo menos uma entre a dita primeira ou a dita segunda enzima cataliticamente ativa é selecionada a partir do grupo que compreende MNazimas, DNazimas, ribozimas, enzimas hidrolíticas, endonucleases de restrição, exonucleases, proteases, proteinases, hidrolases, liticas, peptidases, dipeptidases, esterases, caspases, catepsinas, dessulfidrases, amidasas, glicosidasas.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 27 ou 29, caracterizado pelo fato de que o dito alvo é para ser identificado, detectado ou quantificado.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 27 ou 29 ou 48, caracterizado pelo fato de que o dito alvo é selecionado a partir do grupo que compreende ácidos nucleicos, proteínas, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas, células, vírus, bactérias, Archaea, fungos, anticorpos, metabólitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, moléculas pequenas, polímeros, íons de metais, sais de metais, príons, ácidos nucleicos ou quaisquer derivados, partes, ou combinações dos mesmos.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de amplificar o ácido nucleico.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que compreende ainda detectar um efeito detectável durante ou após a dita amplificação.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 34, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de amplificar o ácido nucleico contendo a dita variante de sequência.

53. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a determinação da presença da dita variante de sequência de ácido nucleico durante ou após a amplificação.

54. Método para fabricar uma pluralidade de enzimas de ácido nucleico multicomponentes (MNazimas), em que cada uma reconhece pelo menos um facilitador de combinação e modifica um substrato, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) disponibilizar uma pluralidade de facilitadores de combinação

a serem identificados, detectados ou quantificados;

(b) projetar dois ou mais componentes oligonucleotídeos, em que pelo menos um primeiro componente oligonucleotídeo e um segundo componente oligonucleotídeo se autocombinam na presença de um facilitador de combinação para formar uma enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima) cataliticamente ativa, em que cada um dos pelo menos primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos compreende uma parte ramificada de substrato, uma parte de núcleo catalítico, e uma parte ramificada de sensor;

em que, após a autocombinação, a parte ramificada de sensor do primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos forma ramificações de sensores da MNAzima, a parte ramificada de substrato do primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos formam ramificações de substrato da MNAzima, e a parte de núcleo catalítico do primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos formam um núcleo catalítico da MNAzima;

e em que as ramificações sensores da MNAzima interagem com um facilitador de combinação de modo a manter o primeiro e o segundo componentes oligonucleotídeos em proximidade para associação de suas respectivas partes de núcleo catalítico para formar o núcleo catalítico da MNAzima, sendo o dito núcleo catalítico capaz de atuar sobre pelo menos um substrato, e em que as ramificações de substrato da MNAzima engatam em um substrato de tal modo que o núcleo catalítico da MNAzima possa modificar o dito substrato;

(c) alterar os ditos dois ou mais componentes oligonucleotídeos de tal modo que a parte ramificada de substrato e a parte de núcleo catalítico do primeiro e segundo componentes oligonucleotídeos sejam constantes, e a parte ramificada de sensor de pelo menos um entre o primeiro e o segundo componentes oligonucleotídeos seja adaptado para reconhecer outra entre a pluralidade de facilitadores de combinação, e

(d) repetir a etapa de alteração para cada um da pluralidade de facilitadores de combinação.

55. Uso de pelo menos um oligonucleotídeo, caracterizado pelo

fato de que é como um substrato da enzima de ácido nucléico multicomponente (MNAzima), em que o dito substrato é modificado pela dita MNAzima seguindo o encaixe do dito substrato pela ramificação do substrato da dita MNAzima.

5 56. Método para fabricar MNAzimas que incorpora seqüências parciais de uma DNAzima, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(a) seleccionar posições no interior da dita seqüência de DNAzima para dividir em seqüências de núcleo catalítico parcial;

10 (b) incorporar as ditas seqüências de núcleo catalítico parcial em partzimas; e

(c) detectar a atividade catalítica dos pares de partzima para determinar qual combinação das ditas seqüências de núcleo catalítico parcial nas ditas partzimas é compatível com a formação de MNAzimas ativas.

15 57. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um substrato de MNAzima, o dito substrato compreendendo ácidos nucléicos que são completa ou parcialmente complementares a pelo parte do primeiro ou segundo componente de oligonucleotídeo de uma MNAzima como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 19.

20 58. Composição de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que o dito substrato é um substrato universal.

 59. Composição de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que o dito substrato tem uma seqüência seleccionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID
25 NO: 62 e SEQ ID NO: 83.

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÃO DE ENZIMAS DE ÁCIDO NUCLÉICO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), MÉTODOS PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO, UM**
 5 **ALVO, UMA VARIANTE DE SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLÉICOS, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE PELO MENOS UM ÁCIDO NUCLÉICO METILADO E PARA DETECTAR PELO MENOS UM FACILITADOR DE COMBINAÇÃO USANDO UMA CASCATA DE AMPLIAÇÃO, MÉTODOS PARA FABRICAR UMA PLURARIDADE DE ENZIMAS DE ÁCIDO NU-**
 10 **CLÉICO MULTICOMPONENTES (MNAZIMA), E USO DE PELO MENOS UM OLIGONUCLEOTÍDEO".**

A presente invenção refere-se a Enzimas de Ácido Nucléico Multicomponentes (MNAzimas) e métodos para seu uso. AS MNAzimas compreendem dois ou mais componentes oligonucleotídeos que se autocombinam na presença de uma ou mais moléculas facilitadoras de combinação de
 15 MNAzimas, para formar uma estrutura cataliticamente ativa. São fornecidos também métodos para usar MNAzimas na detecção, identificação e/ou quantificação de um ou mais alvos. Os métodos podem ser praticados em ensaios baseados em solução ou em ensaios nos quais um ou mais componentes
 20 da reação estão afixados a uma estrutura de suporte. Os métodos permitem multiplexar a detecção de MNAzimas para detectar múltiplos alvos em uma única reação. São fornecidos também kits para fabricar as composições, e para praticar os métodos aqui fornecidos.