

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96.081

REQUERENTE: AKTIEBOLAGET ASTRA, sueca, com sede em
S-151 85 Södertälje, Suécia,

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA
SONDA DE HIBRIDAÇÃO"

INVENTORES: K Ayyanayhan,
P. Bhat,
S.Datta,
V.S.N.K. Francis,
G. Padmanaban,
H. Srinivasa,

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Suécia, 05 de Dezembro de 1989, sob o Nº 8904100-8

AKTIEBOLAGET ASTRA

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA Sonda DE HIBRIDAÇÃO"

Antecedentes da presente Invenção e Técnica Anterior

A malária é originada por parasitas protozoários que pertencem ao género Plasmodium. O ciclo de vida dos parasitas decorre em duas fases - a fase assexuada nos vertebrados e a fase sexuada no mosquito (habitualmente do género Anopheles). As quatro espécies de Plasmodium responsáveis pela malária nos seres humanos são P. falciparum, P. vivax, P. malariae e P. ovale.

Entre estes, os dois primeiros são os mais usuais. O Plasmodium falciparum origina a forma mais grave de malária que nalguns casos se torna fatal. Para além disso, este parasita também desenvolve resistência aos fármacos anti-maláricos que se utilizam habitualmente. A frequência de casos originados pelo P. vivax varia de país para país e está compreendida entre cerca de 50 e 80%. A ocorrência de P. malariae e P. ovale é rara.

O método actual para o diagnóstico da malária consiste no exame de uma amostra de sangue. Este método é trabalhoso e também requer perícia. Para além disso, um especialista em microscopia examina no máximo sessenta lâminas por dia. Também

se pode efectuar um diagnóstico serológico, mas devido à persistência de anticorpos não se pode efectuar a distinção entre as infecções actuais e as infecções passadas. A pesquisa de uma nova geração de ensaios de diagnóstico incluiu a possibilidade de se detectar ácidos nucleicos de parasitas como um indicativo da presença do parasita. Um tal tipo de ensaio necessita de uma quantidade muito pequena de sangue (5-50 μ l) que se pode obter a partir de uma picada num dedo, é sensível e rápido. Podem detectar-se pelo menos 50 parasitas em 10 μ l de sangue por hibridação de ácido nucleico (1). Podem analisar-se diariamente centenas de amostras apenas com algum treino inicial. A sensibilidade dos ensaios possibilita a utilização deste tipo de experiência nos bancos de sangue para se efectuar um rastreio do sangue que se pretende utilizar para transfusão.

Também se pode efectuar a hibridação de ácido nucleico em amostras de tecido de insecto, no sentido de se identificar a espécie vector como um veículo. Tal informação seria de grande auxílio na intensificação das medidas de controlo de vectores no sentido de limitar a dispersão geográfica da malária. De um modo alternativo, poder-se-ia adoptar a quimioprofilaxia em tais áreas e poder-se-ia avaliar esta estratégia utilizando a hibridação de ácidos nucleicos.

O ADN de cordão duplo possui uma natureza complementar. Sob determinadas condições de temperatura e de concentração salina, os cordões complementares do ADN podem ser desnaturados ou dissociados e reassociados de um modo reprodutível. A reassociação, também pode ocorrer entre o ADN e o ARN que lhe é complementar. Pode marcar-se a reassociação do ADN e do ARN

com dispositivos de detecção (isotópicos ou não isotópicos) e podem empregar-se métodos de detecção adequados.

No caso do Plasmodium vivax, não existe referência a quaisquer sequências sondas de ADN potenciais. O desenvolvimento de sequências de ácidos nucleicos específicas para se detectar o Plasmodium vivax poderia ser importante tendo em vista a determinação da incidência do Plasmodium vivax numa área geograficamente definida. O termo sonda utiliza-se para se referir um conjunto de sequências de ADN obtidas biológica ou sinteticamente.

Pode efectuar-se a hibridação do ácido nucleico em qualquer amostra biológica suspeita de abrigar o parasita. O sangue, por exemplo, pode ser retirado directamente, solubilizado num alcali e efectuar-se uma mancha sobre nitrocelulose ou sobre suportes sólidos semelhantes de acordo com métodos normalizados (2). Imobiliza-se o ADN nos suportes e põe-se em contacto com a sonda específica sob condições adequadas de temperatura, força iónica, etc. (3) que favoreçam a complementarização específica da sonda e dos ácidos nucleicos alvo. Se a sonda for portadora de uma marca isotópico (habitualmente ^{32}P), faz-se a radioautografia para se efectuar o despiste das amostras positivas das negativas. Se a sonda for portadora de uma marca não-isotópica, como, por exemplo, biotina (4), utiliza-se, por exemplo, um sistema enzimático avidina-fosfatase alcalina, após o que se utiliza uma série de provas para desenvolvimento de cor nas amostras que se apresentaram positivas para o ensaio.

Ainda de acordo com uma outra técnica (5), podem re-

colher-se directamente o sangue ou as amostras tecidulares que se pretende analisar no sangue caotrópico, tal como tiocianato de guanidina 4M. Efectua-se o processo de hibridação numa solução e depois filtra-se a mistura através de um suporte sólido sob condições que facilitem a ligação apenas das sondas híbridas marcadas, enquanto o excesso de sondas não se liga à matriz. Pode efectuar-se a radioautografia ou a detecção colorimétrica nesta matriz. Este modo de hibridação é especialmente útil quando se utilizam sondas de ARN de cordão único.

Pormenores da Presente Invenção

A presente invenção refere-se à identificação de sequências de ADN específicas para P. vivax e às sequências nucleotídicas destas sondas para P. vivax. Com base nestas características desenvolveu-se um procedimento de diagnóstico para a detecção específica de P. vivax empregando a hibridação de ácido nucleico. Este ensaio é rápido, sensível e pode ser utilizado em larga escala com finalidades epidemiológicas.

A presente invenção refere-se a:

1. Novas construções ou plasmídeos, pARC 117, pARC 145 e pARC 1153, que se depositaram sob a forma de E. coli transformada na National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, Aberdeen (NCIB) nas datas e com os números de depósito que se indicam a seguir:

pARC 117: NCIB 40114, E. Coli RR1 M15 pARC 117, Fev. 15, 1989
pARC 145: NCIB 40110, E. Coli RR1 M15 pARC 145, Fev. 7, 1989
pARC 1153: NCIB 40108, E. Coli RR1 M15 pARC 1153, Fev. 7, 1989

2. As sequências de ADN de pARC 117, pARC 145, e de pARC 1153 e as suas estruturas que compreendem pelo menos 20 nucleótidos consecutivos.

3. Uma sonda de ADN para a detecção de P. vivax, constituída por uma sequência nucleotídica identificada adiante por pARC 117.

4. Uma sonda de ADN para a detecção de P. vivax, constituída por uma sequência nucleotídica que se identifica adiante por pARC 145.

5. Uma sonda de ADN para a detecção de P. vivax, constituída por uma sequência nucleotídica que se identifica adiante por pARC 1153.

6. Um método para a detecção de P. vivax numa amostra biológica de vertebrados ou invertebrados por hibridação de uma sonda que é constituída por uma sequência nucleotídica, tal como a identificada para pARC 117, pARC 145 ou para pARC 1153, numa forma marcada radioactivamente ou não radioactivamente com as sequências homólogas respectivas no genoma do P. vivax, e detecção da sonda marcada que se liga ao genoma do P. vivax.

A presente invenção encontra-se exemplificada mas não limitada ao diagnóstico de doenças. A presente invenção pode abranger o rastreio epidemiológico e as investigações forenses,

a determinação da contaminação alimentar, saúde pública, medicina preventiva, veterinária e aplicações agrícolas no que se refere ao diagnóstico de agentes infecciosos.

Identificação de sequências de ADN específicas para *P. vivax*

Uma vez que ainda não se efectuou a cultura in vitro de *P. vivax*, o ADN genómico deste parasita obtém-se a partir de sangue de um paciente infectado. Após remoção máxima possível da película de revestimento, prepara-se o ADN genómico de acordo com métodos normalizados (6), efectua-se a sua digestão com o enzima Sau 3A e efectua-se a sua clonagem no sítio Bam H1 do vector plasmídico conhecido, pUC 18. Identificaram-se espécies de sequências de ADN específicos por rastreio de filtro^s duplicados com ADN de *P. Vivax* marcado radioactivamente e com ADN de ser humano normal marcado radioactivamente no rastreio de características diferenciais. Obtiveram-se três sondas específicas de *P. vivax* que se designaram por pARC 117, pARC 145 e pARC 1153 e que se subclonaram nos vectores M13 tendo-se determinado a sua sequência de ADN pelo método de terminação de cadeia di-desoxi (7). Nenhuma delas possuía quaisquer elementos característicos repetitivos na região sequenciada. Uma pesquisa de homologia num computador que utilizava um banco de dados actualizado, tal como Genbank e EMBL revelou não existir uma homologia significativa com qualquer das sequências nucleotídicas publicadas. Obteve-se a homologia mais elevada com pARC 117 e com a parvalbumina de ratazana (cerca de 41%). Este dado é insignificante para qualquer finalidade prá-

tica.

As referidas sondas de P. vivax, mostraram-se específicas e não reagiram de modo cruzado com isolados de P. falciparum (Fig. 1).

Descrição do procedimento de detecção utilizando as sondas específicas de P. vivax

Existem dois procedimentos principais para hibridação de ácidos nucleicos. De acordo com um dos métodos imobiliza-se a amostra de ácido nucleico no suporte sólido enquanto a sequência sonda fica em solução (2). De acordo com outro método, tanto a amostra de ácido nucleico como a sequência sonda estão em solução (5).

Deste modo, o ensaio de hibridação de ácido nucleico envolve a colocação de uma amostra de sangue ou de tecido num suporte sólido como, por exemplo, nitrocelulose, que depois se hibrida com a sonda (marcada isotópica/ou não isotopicamente) sob condições adequadas de temperatura, etc. (3). Este método encontra-se bem documentado e no contexto do diagnóstico da malária tem sido utilizado por diversos investigadores (8). No entanto, tem de processar-se a amostra tecidular para extração do ADN do parasita e depois tem de ser utilizada num ensaio de manchas pontuais. Não é isto o pretendido quando se concebe um ensaio de diagnóstico que se destina a ser utilizado para rastreios em massa. Segundo a experiência da Requerente, a colocação directa de sangue infectado na matriz não foi satisfatória. Quando se utilizam as proteínas das membranas dos eri-

trócitos e de outros componentes plasmáticos sanguíneos, presumivelmente proteínas, e outros tecidos, impedem estericamente a ligação do ADN do parasita à matriz. Como consequência, durante o processo de hibridação a amostra manchada destaca-se da matriz levando a uma perda de sinal específico. Pode ultrapassar-se o problema lavando previamente as amostras para remover os constituintes plasmáticos interferentes, o que tornará o ensaio trabalhoso, ou efectuando manchas muito pequenas de sangue o que iria contribuir para uma perda de sensibilidade na detecção.

A Requerente adoptou, portanto, uma solução de hibridação que não necessita de processamento e que é mais rápida de efectuar do que a hibridação dos filtros. O ensaio compreende os seguintes passos:

a) Recolhe-se directamente a amostra de tecido numa solução de sal caotrópico ou num agente de desnaturação como, por exemplo, 25 μ l de sangue em 50 μ l de tiocianato de guanidina 6M. Se a sonda possuir um marcador isotópico, pode utilizar-se como sal caotrópico o tiocianato de guanidina numa concentração de 4M. Se a sonda for não isotópica (como, por exemplo, biotina) e se destinar a ser detectada por uma reacção enzimática, não se pode utilizar o tiocianato de guanidina, uma vez que este se liga aos filtros de nitrocelulose, aos filtros de difluoreto de polivinilideno (PVDF) e a outras matrizes semelhantes e desnatura o conjugado enzimático utilizado subsequentemente na reacção. No entanto, pode utilizar-se tiocianato de guanidina com sondas não isotópicas, desde que se tratem previamente as matrizes.

Na presente invenção, quando se utilizou cloridrato de guanidina como um agente de solubilização, descobriu-se que este era tão eficaz como o tiocianato de guanidina. Possui a vantagem adicional de não se ligar à matriz sólida, pelo que se pode utilizar em sondas não isotópicas.

b) Adiciona-se a sonda (1 ng). A sonda adicionada é, de preferência, um ácido nucleico de cordão único, ADN ou ARN que se pode obter biológica ou sinteticamente de acordo com métodos bem documentados na especialidade. O ARN é a sonda preferida.

c) Aquece-se a amostra à temperatura de 85°C durante 5 minutos e deixa-se arrefecer até à temperatura ambiente (cerca de 28° a 35°C) durante 2 horas.

d) Depois dilui-se a amostra pelo menos dez vezes, com uma solução salina que contem ARNase A e incuba-se durante mais 15 minutos. Quando se utiliza um ADN de cordão único como sonda, pode remover-se a sonda não hibridada por cromatografia de hidroxilapatite.

e) Depois filtra-se a amostra através da matriz, por exemplo filtros de nitrocelulose ou de fluoreto de polivinilideno, e lavam-se duas vezes os filtros numa solução salina contendo ARNase A durante 15 minutos de cada vez.

f) Depois utiliza-se o método de detecção adequada.

Preparação de sondas de hibridação

Podem preparar-se as sondas de hibridação por clonagem dos elementos genómicos em vectores adequados. Estes vecto

res podem ser plasmídeos (plasmídeos de E. coli), fagos filamentosos (M13), bacteriófagos lambdóides, cosmídeos, fagos de salmonelas e leveduras. Pode utilizar-se quaisquer vectores conhecidos na especialidade.

Podem marcar-se radioactivamente as sondas de hibridação por "nick-translation" de ADN com ^{32}P utilizando ADN Polimerase e $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-dNTP}$. Para a marcação não-radioactiva pode utilizar-se Bio-dUTP nas reacções de "nick-translation". Podem marcar-se as extremidades de pequenas sondas oligonucleotídicas com $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ou com $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$, respectivamente nas suas extremidades 5' ou 3'.

Podem obter-se sondas de ADN de cordão simples marcadas com ^{32}P utilizando o sistema vector M13 (9). Podem marcar-se com biotina sondas de ADN de cordão simples, de acordo com a reacção em cadeia de polimerase na presença de Bio-dUTP, de outros desoxi-ribonucleótidos e de ADN-polimerase Taq. (10).

Nos ensaios de hibridação em que se utilizou a hibridação de ARN preparou-se ARN marcado complementar do ADN. Os métodos para a construção de tais sistemas encontram-se bem documentados na especialidade (11). A presente invenção abrange também estes ensaios. Deste modo, a presente invenção também abrange a utilização de ADN de cordão duplo, de ADN de cordão simples e de ARN como sondas para a detecção do genoma de P. vivax.

EXEMPLO 1

Neste exemplo apresenta-se um método segundo o qual se obtiveram espécies de sondas específicas para P. vivax.

1. Isolou-se o ADN total de sangue infectado com P. vivax, efectuou-se a sua digestão com o enzima Sau 3A e efectuou-se a sua clonagem no sítio Bam H1 do vector plasmídeo, PUC 18.

2. Efectuou-se a mancha de replicação dos clones sobre dois filtros de nitrocelulose. Efectuou-se o rastreio de um dos filtros com ADN humano marcado radioactivamente por "nick-translation" e efectuou-se o rastreio do outro filtro com ADN de P. vivax marcado radioactivamente por "nick-translation".

3.- Efectuou-se a autoradiografia das réplicas hibridadas para se produzirem sinais de hibridação.

4. Os clones que reagiram com o ADN de P. vivax e não reagiram com o ADN humano foram considerados como específico da espécie e foram seleccionados para serem utilizados como sondas de hibridação para P. vivax.

5. Deste modo, identificaram-se três clones. Designaram-se estes clones, respectivamente, por pARC 117, pARC 145 e pARC 1153. Determinou-se a sequência nucleotídica de cada um dos clones de acordo com métodos normalizados tendo-se obtido o resultado seguinte.

Sequência Nucleotídica de pARC 117:

```
5'-----AT GTA AGA GCA CAT
GAG ATT TTA TAA GGA TTT CAT TTT
ACT CAG GGT GAA ATG AAG AAG CAC
TAA AAG ATT TTG AGT AGA GTT TCA
T-----3'
```

Sequência Nucleotídica de pARC 145:

```
5'-----CC AAG TGA AGA AAG
GTG GAA GGG CCA GCA GGA GAG CTG
GTC ACT GCA TTG TCT CTC TGA GGT
CTG TAG GCC AGA AGC TCC CCA GGA
CTT AGA CCC TAC TAA ATG GGG TAG
AGA GTA AGG GGC AGC CAT CAC TTA
TCA CTG GCT GTC CTG AGG GTT TGG
TGT ACA GCA TGG CTT GTG GTC AGA
GGC CTG TCA GCT GGG CTC CAA GAG
TCC TAG TGA ATG TAA ACA GTG CAG
ACC TTT TCT GGG GGG AAG G-----3'
```

Sequência Nucleotídica de pARC 1153:

5'-----TTT GTG TGA TTT TTG TGA TTT TTG ATG
GAA ACC TGA ATA TTT GGG GTA ATT ATG TGA TTA GAC
TCA GGA TTT TAT TTA AAT CTT CTG TTT TAG CTA GCC
TCC TCT GAC ACT AGC TTG GCA GGA ACG AGG GCA GGA
GAG CAT TGC TGA TGC ATT CCT GCC TCT TTT CTT CCT
TGT TAC TCC CAA GTG GGT GTA AAA ATC CAC GTT TCC
CAC TGT TTC CTC CTT TAA ATT AAT TAA TTA ATT TTT
AAT GTT GGC AAA TAA AAA TTA TAT ATT GTG TAT ATT
TAT GGG GTA CAA CAT GAT ATT TTG ATA TAT GTA TAC
ATT GCA GAA TGG CTA AAT TAA GCT AAT TAA CAT ACA
TAT TAC CTC ACA TAA TCA ATT TTT TTG TGG TGA GAG
CAC CTG CAA TCT ACT CTT TTA GCA ATT TTC AAG TAT
ATA AAA CAT TGT TAT TAA CTA TGG TCA CCT CAT TGT
ACA ATA TGT TTT TTG AAC TTA TTC CTC CTA AGT ATA
ATT TTG TAC TCT TTG ACC AAC ATC TCC CCA GAC CCC
TCA ATG CCC ACC CTC TGG TAA CCA ACA TTC TAC TCT
TTG CTT TTC AAC TTT TAT AGA TTC CAT ATG AAG TAG
GAT CAT GCT GTA TTT GTC TTT GTG CCT GGC TTA TTT
CCT TTA CAT ACT GTT CTC TAG GTC -----3'

EXEMPLO 2

Neste exemplo, apresenta-se a preparação de sondas de hibridação específicas.

Obtiveram-se as sondas de hibridação por marcação do ADN inserido em pARC 117, pARC 145 e pARC 1153 por marcação radioactiva na presença de ADN polimerase de E. coli ou de ADN polimerase T4 e de γ - ^{32}P -dNTPs o que proporcionou uma actividade específica de 10^7 cpm a 5×10^7 cpm/ μg de ADN. Pode marcar-se o ADN de cordão simples ou derivado de síntese, nas extremidades 5', utilizando polinucleotidoquinase e γ - ^{32}P -ATP. Também se podem marcar as extremidades 3' utilizando transferase terminal e γ - ^{32}P -dNTPs.

Pode sintetizar-se ADN de cordão simples tratado com biotina de acordo com a reacção em cadeia de polimerase utilizando o ADN polimerase Taq e Bio-dUTP.

Podem tratar-se com biotina os ácidos nucleicos de cordão simples ou duplo utilizando biotina fotoactivada. Também se pode efectuar o tratamento químico com biotina, dos ácidos nucleicos.

Pode gerar-se o ARN de cordão simples por fusão do ADN de interesse com um fragmento do promotor do bacteriófago Salmonela Sp6 num vector adequado. Pode propagar-se o vector na E. coli. Pode transcrever-se o ADN deste vector in vitro utilizando ARN polimerase SP6. Durante este processo pode obter-se ARN radioactivo de actividade específica elevada utilizando γ - ^{32}P -UTP. É também possível tratar este ARN com biotina.

EXEMPLO 3

Este Exemplo ilustra a especificidade de espécie de três clones de P. vivax descritos no Exemplo 1, viz. pARC 117, pARC 145 e pARC 1153.

Prepararam-se os ADNs genômicos de 9 isolados diferentes de P. vivax e efectuaram-se manchas sobre filtros de nitrocelulose. Sondaram-se os filtros com as respectivas sondas específicas de P. vivax que eram radioactivas. As sondas reagiram apenas com as amostras de P. vivax e não com o ADN de P. falciparum nem de seres humanos (Fig. 1).

EXEMPLO 4

Neste Exemplo apresenta-se um ensaio para o Plasmodium vivax utilizando uma solução de hibridação.

Recolheu-se o sangue (20 µl) ou o tecido infectados, directamente em 50 µl de tiocianato de guanidina contendo 1 ng de ARN sonda de pARC 117 marcada radioactivamente tal como se descreveu no Exemplo 2.

Aqueceu-se esta amostra à temperatura de 85°C durante 5 minutos e deixou-se, em repouso, à temperatura ambiente, durante 2 horas.

Depois, diluiu-se 10 vezes a amostra em 2 x SSC que continha 10 ng de ARNase A e incubou-se à temperatura ambiente durante mais 15 minutos.

Depois filtrou-se a amostra através de um filtro matriz de nitrocelulose ou de PVDF e lavou-se o filtro duas ve-

zes em 2 x SSC que continha tampão ARNase A durante 15 minutos de cada vez.

Secou-se o filtro e efectuou-se a sua autoradiografia para se registar na película o desenvolvimento dos sinais de hibridação.

O ensaio descrito é fácil de realizar e requer muito pouco equipamento de laboratório, tal como o que estará possivelmente presente nas situações de carácter periférico durante os exames em massa.

EXEMPLO 5

Este Exemplo ilustra o procedimento de hibridação em solução empregando cloridrato de guanidina em vez de tiocianato de guanidina, tal como se descreveu no Exemplo 4.

O tiocianato de guanidina 4M como o agente caotrópico e as sondas não radioactivas que se detectaram por conjugados de proteínas são incompatíveis. O sal caotrópico liga-se aos filtros de nitrocelulose e de PVDF e desnatura os conjugados de proteínas que se utilizam para o desenvolvimento da cor.

O cloridrato de guanidina quando utilizado como agente de solubilização é tão eficaz como o tiocianato de guanidina. Uma vez que não se liga à matriz (filtros de nitrocelulose ou de PVDF), possibilita a utilização de sondas não radioactivas que são detectadas por conjugados de proteínas.

Pode utilizar-se o tiocianato de guanidina conjuntamente com sondas não radioactivas, tal como anteriormente se

descreveu apenas nos casos em que o filtro foi previamente tratado, por exemplo com BSA a 3%, antes de se filtrar através dele a solução de tiocianato de guanidina.

REFERÊNCIAS

1. Pollack, Y., Metzger, S., Shemer, R., Landau, D., Spira, D.T. e Golenser, J., Am. J.Trop.Med.Hyg. 34, (1985) 663.
2. Kafatos, F.C., Jones, C.W. e Efstratiadis, A., Nucl. Acids. Res. 7, (1979) 1541.
3. Maniatis, T., Fritsch, E.F. e Sambrook, J., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, N.Y. 1982.
4. Langer, P.R., Waldorp, A.A. e Ward, D.C., Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. 78, (1981) 6633.
5. Thompson, J. e Gillespie, D., Anal.Biochem. 163, (1987) 281.
6. Panyim, S., Wilairat, P. e Yuthavong, Y., Application of Genetic Engineering to Research on Tropical Disease Pathogens with special reference to Plasmodia - Publicação da WHO.
7. Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.G.H. e Roe, B.A., J.Mol.Biol. 143, (1980) 161.
8. Holmberg, M., Bjorkmann, A., Franzen. L., Aslund, L., Lebbad., M., Pettersson U. e Wigzell, H. Bull, W.H.O. 64, (1980) 579.
9. Burke, J.F., Gene 30, (1984) 63.
10. Saiki, R.K., et al, Science 239, (1988) 487.
11. Green, M.R., Maniatis, T. e Melton, D.A., Cell 32, (1983) 681.

LEGENDA DA FIGURA

Figura 1: Especificidade das sondas pARC 117 (A), pARC 145 (B) e pARC 1153 (C) de P. vivax. Ensaaiaram-se como sondas as inserções de cordão duplo dos três clones. De Pv1 a Pv9 representam-se as preparações de ADN de nove amostras de sangue infectado por P. vivax. FCK 2 e T9 representam preparações de ADN de P. falciparum. NH representa ADN humano normal.

4

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de uma sonda de hibridação, constituída pela sequência de nucleotídeos:

```
5'-----AT GTA AGA GCA CAT
GAG ATT TTA TAA GGA TTT CAT TTT
ACT CAG GGT GAA ATG AAG AAG CAC
TAA AAG ATT TTG AGT AGA GTT TCA
T-----3'
```

ou um seu segmento adjacente que hibrida especificamente o genoma *P.vivax*, caracterizado pelo facto de se clonar a referida sequência em um vector.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o fragmento de ADN possuir a sequência:

...



5'-----CC AAG TGA AGA AAG
GTG GAA GGG CCA GCA GGA GAG CTG
GTC ACT GCA TTG TCT CTC TGA GGT
CTG TAG GCC AGA AGC TCC CCA GGA
CTT AGA CCC TAC TAA ATG GGG TAG
AGA GTA AGG GGC AGC CAT CAC TTA
TCA CTG GCT GTC CTG AGG GTT TGG
TGT ACA GCA TGG CTT GTG GTC AGA
GGC CTG TCA GCT GGG CTC CAA GAG
TCC TAG TGA ATG TAA ACA GTG CAG
ACC TTT TCT GGG GGG AAG G-----3'

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o segmento de ADN possuir a sequência:

...

5'-----TTT GTG TGA TTT TTG TGA TTT TTG ATG
GAA ACC TGA ATA TTT GGG GTA ATT ATG TGA TTA GAC
TCA GGA TTT TAT TTA AAT CTT CTG TTT TAG CTA GCC
TCC TCT GAC ACT AGC TTG GCA GGA ACG AGG GCA GGA
GAG CAT TGC TGA TGC ATT CCT GCC TCT TTT CTT CCT
TGT TAC TCC CAA GTG GGT GTA AAA ATC CAG GTT TCC
CAC TGT TTC CTC CTT TAA ATT AAT TAA TTA ATT TTT
AAT GTT GGC AAA TAA AAA TTA TAT ATT GTG TAT ATT
TAT GGG GTA CAA CAT GAT ATT TTG ATA TAT GTA TAC
ATT GCA GAA TGG CTA AAT TAA GCT AAT TAA CAT ACA
TAT TAC CTC ACA TAA TCA ATT TTT TTG TGG TGA GAG
CAC CTG CAA TCT ACT CTT TTA GCA ATT TTC AAG TAT
ATA AAA CAT TGT TAT TAA CTA TGG TCA CCT CAT TGT
ACA ATA TGT TTT TTG AAC TTA TTC CTC CTA AGT ATA
ATT TTG TAC TCT TTG ACC AAC ATC TCC CCA GAC CCC
TCA ATG CCC ACC CTC TGG TAA CCA ACA TTC TAC TCT
TTG CTT TTC AAC TTT TAT AGA TTC CAT ATG AAG TAG
GAT CAT GCT GTA TTT GTC TTT GTG CCT GGC TTA TTT
CCT TTA CAT ACT GTT CTC TAG GTG -----3'

4.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de o referido vector ser seleccionado entre plasmídeos de E.coli, fagos filamentosos, (M13), bacteriofagos lamboides, cosmidos, fagos de Salmonella e leveduras.



5.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de o referido vector ser um plasmídeo de E.coli.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o referido plasmídeo de E.coli ser pUC 18 ou pUC 19.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o referido vector conter um promotor de fago SP₆ ou um promotor de fago T7 de salmonella.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de se marcar a sonda de hibridação com ³²P, ¹²⁵I, um grupo cromofórico ou um grupo relator.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de o referido grupo relator ser biotina.

10.- Método para detectar P.vivax em uma amostra biológica de vertebrados ou invertebrados, caracterizado pelo facto de se hibridar uma sonda obtida pelo processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9 com as respectivas sequências homólogas no genoma de P.vivax e por se detectar a sonda que está ligada ao genoma de P.vivax.

11.- Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de a referida sonda de hibridação ser constituída por um vector contendo a referida sequência de ADN, ADN complementar (cordão único) ou ARN.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial,

4

R E S U M O"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA SONDA DE HIBRIDAÇÃO"

A presente invenção diz respeito a sequências de ADN de sondas específicas para Plasmodium vivax e aos métodos para a sua obtenção.

Estas sequências de ácido nucleico provaram ser úteis na detecção da malária no homem provocada por P.vivax por ensaios de hibridação de ácido maleico.

A elevada sensibilidade destes ensaios e a facilidade da sua execução permite a sua utilização em análises de sangue e outros tecidos de vertebrados e invertebrados.

O processo para a preparação das referidas sondas de hibridação é caracterizado pelo facto de se clonar a sequência em questão com um vector.

© Agente Oficial da Propriedade Industrial

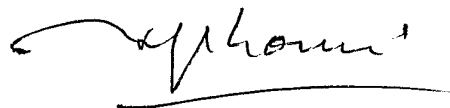


Fig.1.

