



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112012000604-5 A2



(22) Data do Depósito: 08/06/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) **Título:** MÉTODO ISOTÉRMICO RÁPIDO ALTAMENTE SENSÍVEL PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES PONTUAIS E SNPS, CONJUNTO DE INICIADORES E KIT DELES

(51) **Int. Cl.:** C12Q 1/68.

(30) **Prioridade Unionista:** 10/07/2009 EP 09165252.9.

(71) **Depositante(es):** BIOTRIN INTERNATIONAL LIMITED.

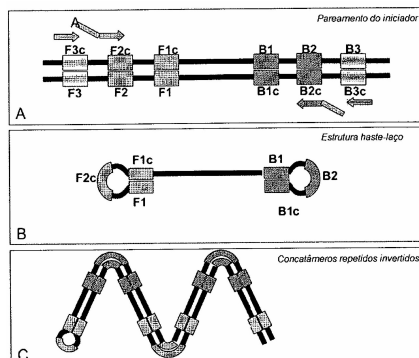
(72) **Inventor(es):** DANIEL ADLERTEIN; GIULIA AMICARELLI; GIULIA MINNUCCI.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2010058022 de 08/06/2010

(87) **Publicação PCT:** WO 2011/003690 de 13/01/2011

(85) **Data da Fase Nacional:** 10/01/2012

(57) **Resumo:** Método isotérmico rápido altamente sensível para a detecção de mutações pontuais e SNPs, conjunto de iniciadores e kit deles. O presente invento se refere a um método para detectar uma mutação pontual de uma sequência de nucleotídeos por um aperfeiçoamento do método de amplificação LAMP (amplificação isotérmica mediada por laço), bem como a um conjunto de iniciadores e a um kit para eles. Como uma forma não limitativa de realização do presente invento, o invento se refere à mutação G1849T do gene JAK2.



Método isotérmico rápido altamente sensível para a detecção de mutações pontuais e SNPs, conjunto de iniciadores e kit deles.

Refere-se o presente invento a um método para detectar uma mutação pontual ou SNP em uma sequência de nucleotídeos por meio de um método de amplificação LAMP (amplificação isotérmica mediada por laço) aperfeiçoado, bem como a um conjunto de iniciadores e a um kit para executar o método do presente invento. De acordo com uma forma não limitativa de realização do presente invento, o método, o conjunto de iniciadores e o kit são adequados para detectar a mutação G1849T (V617F) no gene JAK2.

Desordens mieloproliferativas (MPD) são desordens clonais de progenitores hematopoiéticos e incluem as MPDs clássicas: leucemia mieloide crônica (CML), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (ET) e mielofibrose primária (PMF), bem como leucemia eosinofílica crônica (CEL), leucemia mielomonocítica crônica (CMML) e mastocitose sistêmica (SM), e outras. Nas duas décadas passadas, foram identificados alelos mutantes em CML, CMML, CEL e SM2-5, e em cada caso a mutação causadora resulta em ativação constitutiva de sinalização de tirosina quinase. As causas genéticas das MPDs mais comuns permaneceram desconhecidas até a identificação de mutações que ativam a sinalização Janus quinase 2 (JAK2) na maioria dos pacientes com PV, ET ou PMF (1, 2, 3, 4). JAK2 é um membro da família Janus de não-receptores tirosina quinases citoplásmicos, que também inclui JAK1, JAK3 e TYK2. A mutação é uma substituição guanina-timidina na posição 1849 na sequência de codificação JAK2 (GenBank no. NM_004972, SEQ ID NO: 1), numeração iniciando no códon de partida ATG, correspondendo à posição 2343 de SEQ ID NO: 1. Tal mutação resulta numa substituição de valina por fenilalanina no aminoácido 617 da proteína JAK2 (JAK2V617F), dentro do domínio pseudoquinase JH2 (5). A perda de autoinibição JAK2 resulta na ativação constitutiva da quinase, análoga a outras mutações nas MPDs e leucemia que aberrantemente ativam tirosina quinases (6, 7, 8).

O sequenciamento direto é sensível somente a cerca de 20% de DNA mutante num fundo selvagem (9, 10). Esta questão é muito relevante às desordens mieloides crônicas, em que o sangue e medula são frequentemente compostos de uma mistura de elementos neoplásicos e hematopoiéticos normais residuais. Este é especialmente o caso de ET e MDS, em que mutações genéticas fenotipicamente aparentes podem estar presentes em clones muito pequenos compreendendo menos de 10% da população celular total da medula. James et al. (11) exploraram essa questão especificamente com relação a JAK2 1849 G-T realizando uma série de experimentos de mistura com células de eritroleucemia HEL, que têm a mutação JAK2, misturadas com células de eritroleucemia TF-1, que não têm. Eles falharam em

detectar alelos quando estava presente em < 5% do DNA total. Com DNA de pacientes mutantes homozigotos diluído em DNA de uma pessoa saudável, o sequenciamento foi ainda menos sensível (10%) que foi com as linhagens celulares (12).

Um método comum usado para a detecção de mutações em ácidos nucleicos é a amplificação alelo específica (ARMS – Amplification Refractory Mutation System). Ela explora o fato de que os iniciadores oligonucleotídeos devem estar perfeitamente pareados nas suas extremidades 3' por uma DNA polimerase para estender estes iniciadores durante a PCR (12). Ao projetar iniciadores oligonucleotídeos que correspondem somente a uma mutação pontual específica de DNA, tal como a que codifica JAK2 V617F, a ARMS pode distinguir entre alelos polimórficos. Portanto, estas técnicas são conhecidas pelos nomes alternativos de PCR alelo específica (AS-PCR) ou PCR de iniciador específico de sequência. A sensibilidade da ARMS é de até 1 a 2% (13) de DNA mutante num fundo selvagem.

O monitoramento em tempo real da acumulação de produto PCR durante o termociclo pode ser valiosa como um método semiquantitativo e ensaios de curva DNA-fusão podem ser usados em conjunto com a PCR em tempo real. Da mesma forma, James et al. (14) compararam o sequenciamento por corante fluorescente com dois sistemas diferentes de detecção de mutação baseados em PCR em tempo real, um usando um instrumento LightCycler (Roche Diagnostics) e o outro usando uma máquina Taqman ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Estas técnicas de PCR em tempo real detectaram de 0,5 a 1% de DNA de linhagem celular HEL diluído em DNA de linhagem celular TF-1 e de 2 a 4% de DNA de paciente homozigoticamente mutado diluído em DNA de uma pessoa saudável.

Uma análise de polimorfismo por restrição de comprimento de fragmento (RFLP) é possível uma vez que a mutação G-T de JAK2 1849 abole um motivo na sequência JAK2 selvagem que é reconhecido pela enzima de restrição *BsaXI*. Embora a abolição de um sítio de restrição não seja tão satisfatória quanto a criação de um novo sítio, porque a reação de clivagem enzimática negativa poderia ser devida ou à ausência da mutação ou à falha do procedimento de digestão, ela pode ser útil como uma primeira análise de passagem. A sensibilidade proporcional relatada depende em parte do método usado para detectar os fragmentos e é de aproximadamente 20% de DNA mutante em fundo selvagem (15, 16).

O pirosequenciamento é um método de genotipação rápida que depende da liberação de pirofosfato (PPi) quando um dNTP é incorporado numa cadeia de DNA em crescimento durante a polimerização de DNA por gabarito (17). O pirosequenciamento de JAK2 usando o sistema automatizado PSQ HS 96 (Biotage, Upsala, Suécia) foi tentado por vários grupos (17, 18) com experimentos de diluição

similares àqueles descritos acima mostrando uma sensibilidade de ensaio relatada de 5 a 10% de alelos mutantes em um fundo selvagem.

Várias outras técnicas de detecção de mutação foram descritas, incluindo análise de polimorfismo conformacional de fita única (SSCP), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), cromatografia líquida de alto desempenho de desnaturação (DHPLC), ensaios de extensão de iniciadores de nucleotídeo único (Pronto), e outros. De fato, a DHPLC pode detectar confiavelmente a mutação genômica subjacente do DNA JAK2 V617F, e pode detectar mutações numa proporcionalidade de <1 a 2%. Entretanto, a DHPLC e as outras técnicas são ou tecnicamente desafiadoras ou trabalhosas, ou ambos. Elas não permitem uma alta produtividade a um custo adequado para um laboratório clínico (SSCP e DGGE) ou exigem um investimento inicial considerável em equipamento (DHPLC).

Teoricamente, as técnicas baseadas em proteínas também poderiam ser usadas para detectar a mutação JAK2 V617F, mas elas são geralmente incômodas, e o acesso a tais recursos é limitado. Portanto, os ensaios baseados em proteínas são usualmente não preferidos se forem praticáveis testes baseados em DNA ou RNA.

O pedido de patente europeia EP A 1692281 descreve um método para a detecção da mutação G1849T JAK2 baseada em amplificação por PCR.

O método do estado da técnica exibe várias limitações. Primeiramente, o baixo nível de sensibilidade, que no melhor dos casos permite a detecção da sequência mutante JAK2 até 1% da amostra. Tal sensibilidade exige o enriquecimento dos mutantes via isolamento de granulócitos antes da extração. Esta é uma etapa trabalhosa que consome tempo resultando em cerca de 2 horas adicionais aos procedimentos já demorados (de 2 a 5 horas) exigidos para o diagnóstico. Além disso, todos os métodos previamente ilustrados são relativamente trabalhosos e caros, frequentemente exigindo equipamento especializado que nem sempre pode estar prontamente disponível.

Os inventores estabeleceram um novo método LAMP de detecção de mutação pontual ou SNP em uma molécula de ácido nucleico, que é particularmente seletivo e rápido. Os inventores também estabeleceram um novo conjunto de iniciadores e um kit para executar o método do presente invento. O método para detectar uma mutação pontual em ácido nucleico ou SNP e o conjunto de iniciadores e seu kit são caracterizados pelas características definidas nas reivindicações anexas, que formam uma parte integral da descrição.

O método do presente invento difere da tecnologia LAMP convencional que é descrita no pedido de patente EP A 1020534 e que é ilustrado aqui na

Fig. 1. O método do presente invento permite a amplificação e detecção seletiva simultânea de uma única substituição de base em uma amostra de ácido nucleico. Além disso, o método do presente invento é fácil de ser executado, uma vez que requer instrumentação simples e os resultados podem ser gerados num único tubo de reação. Por estas razões, ele também é menos caro em comparação com os métodos do estado da técnica.

O método do presente invento supera as limitações e desvantagens das técnicas do estado da técnica, resultando numa sensibilidade maior (até 0,01% de sequências mutantes num fundo selvagem); ele é isotérmico e rápido, completando o diagnóstico em uma hora de reação. Em adição, o método do presente invento permite avaliar se a quantidade do alelo mutante, tal como por exemplo o alelo JAK2 mutante, que está presente na amostra testada, é superior ou inferior a 50%, provendo uma indicação de se o sujeito testado é heterozigótico ou homozigótico para a mutação pontual de ácido nucleico ou SNP de interesse.

Portanto, um primeiro aspecto do presente invento é um método para detectar a presença de uma mutação pontual numa molécula alvo de ácido nucleico com um fundo de moléculas de ácido nucleico selvagens, o método compreendendo as etapas de:

- 1) prover uma amostra de ácido nucleico
- 2) contatar dita amostra de ácido nucleico, sob condições de reação apropriadas, com uma solução compreendendo uma mistura de oligonucleotídeos e uma DNA polimerase tendo atividade de deslocamento de fita sob condições de hibridização, em que dita mistura de oligonucleotídeos consiste de iniciadores adequados para amplificação isotérmica mediada por laço da região da molécula alvo de ácido nucleico incluindo a posição no ácido nucleico da mutação pontual a ser detectada, ditos iniciadores compreendendo:
 - i. um primeiro iniciador externo F3 e um segundo iniciador externo B3;
 - ii. um primeiro iniciador interno FIP e um segundo iniciador interno BIP, em que FIP consiste de uma sequência F2 de ácido nucleico 3' e uma sequência F1c de ácido nucleico 5', e BIP consiste de uma sequência B2 de ácido nucleico 3' e uma sequência B1c de ácido nucleico 5', em que F2 é capaz de reconhecer e hibridizar-se a uma região da molécula alvo de ácido nucleico designada como F2c e B2 é capaz de reconhecer e hibridizar-se a uma região da molécula alvo de ácido nucleico designada como B2c, em que F2c e B2c são regiões diferentes situadas em fitas opostas da molécula alvo de ácido nucleico,

em que B2c está a jusante da mutação pontual ou F2c está a montante da mutação pontual, e em que

se B2c está a jusante da mutação pontual, então dita mutação pontual está situada na sequência F2c ou a jusante da sequência F2c e a montante da sequência F1c, ou

se F2c está a montante da mutação pontual, então dita mutação pontual está situada na sequência B2c ou a montante da sequência B2c e a jusante da sequência B1c.

iii. um iniciador extensível mutante haste-laço compreendendo:

- uma sequência de laço central capaz de reconhecer seletivamente e hibridizar-se a uma região da molécula alvo de ácido nucleico compreendendo a mutação pontual, de modo que a sequência de laço central seja capaz de reconhecer e hibridizar-se à molécula alvo de ácido nucleico somente se a mutação pontual estiver presente, e

- uma sequência terminal 5' e uma sequência terminal 3' que são complementares uma à outra para formar uma haste com a hibridização intramolecular,

a afinidade de hibridização da sequência do laço central à região da molécula alvo de ácido nucleico compreendendo a mutação pontual sendo maior que a afinidade de hibridização intramolecular da sequência 5' à sequência 3' de modo que, se o ponto de hibridização estiver presente, a sequência de laço central pareia e amplifica a região da molécula alvo de ácido nucleico compreendendo o ponto de mutação;

iv. uma porção não extensível que é capaz de seletivamente reconhecer e hibridizar-se às moléculas de ácido nucleico selvagem;

3) incubar a mistura resultante a temperatura constante;

4) detectar um sinal indicativo de amplificação da região da molécula alvo de ácido nucleico compreendendo a mutação pontual.

A primeira etapa do método implica em obter a amostra de ácido nucleico a ser testada, tal como por exemplo de um paciente suspeito de portar a mutação pontual de interesse, seja na forma heterozigótica ou na forma homozigótica.

Numa forma preferida de realização do presente invento, os dois iniciadores internos FIP e BIP são projetados sobre uma região da molécula alvo de ácido nucleico compreendendo a posição no ácido nucleico da mutação pontual a ser detectada de modo que a mutação pontual esteja situada na região entre a sequência F2c e a sequência F1c ou entre a sequência B2c e a sequência B1c. Numa forma de realização alternativa, a mutação pontual está situada na região sondada por B2 ou F2,

ou seja dentro da sequência F2c ou dentro da sequência B2c.

5 Numa outra forma preferida de realização, a sequência na extremidade 5' e a sequência na extremidade 3' do iniciador extensível mutante haste-laço tem comprimento de pelo menos 3 nucleotídeos. O iniciador extensível mutante haste-laço pode alternativamente ser designado como um "iniciador extensível mutante auto-pareado", ou mais simplesmente como um "iniciador extensível auto-pareado" (LB ou LF).

10 Numa outra forma preferida de realização do método de acordo com o presente invento, a porção não extensível é um ácido nucleico peptídico (PNA), que tem preferencialmente pelo menos 10 nucleotídeos de comprimento. Os DNAs e RNAs consistem respectivamente de uma cadeia principal de açúcar desoxirribose e ribose, enquanto a cadeia principal de PNA é feita de unidades de repetição N-(2-aminoetil)-glicina ligadas por ligações peptídicas. As bases purina e pirimidina são ligadas à cadeia principal por ligações metileno-carbonila. Os PNAs são
15 ilustrados como peptídeos, com o terminal N na primeira (esquerda) posição e o terminal C na direita. Uma vez que a cadeia principal de PNA não contém qualquer grupo fosfato, a ligação entre fitas PNA/DNA é mais forte que entre fitas DNA/DNA devido à falta de repulsão eletrostática.

20 Numa forma de realização mais preferida do presente invento, o ácido nucleico peptídico (PNA) compreende uma sequência de bases que é capaz de hibridizar com a região da molécula de ácido nucleico que inclui a mutação pontual putativa (ou seja, que inclui a posição de ácido nucleico da mutação pontual a ser detectada), resultando com isso na formação de duas estruturas de dupla fita, uma com a molécula alvo de ácido nucleico selvagem e a outra com a molécula alvo de ácido
25 nucleico mutada. A temperatura de fusão da estrutura de dupla fita resultante da hibridização do PNA com a molécula alvo de ácido nucleico na ausência da mutação pontual (i.e., com a sequência selvagem) é designada como $(T_m) = X$ e a temperatura de fusão da estrutura de dupla fita resultante da hibridização do PNA com a molécula alvo de ácido nucleico na presença do ponto de mutação (i.e., com a sequência mutada) é designado como $(T_m) = Y$. De acordo com uma forma preferida de realização, $Y <$
30 Temperatura de Incubação $\leq X$, e X é pelo menos 5°C maior que Y .

Numa forma alternativa de realização do presente invento, a porção não extensível é um iniciador não extensível selvagem haste-laço, que compreende:

- 35 – uma sequência central de laço capaz de seletivamente reconhecer e hibridizar a uma região da molécula de ácido nucleico selvagem compreendendo a posição do ácido nucleico da mutação pontual a ser detectada;

- uma sequência terminal 5' e uma sequência terminal 3' sendo complementares uma à outra para formar uma haste,

de modo que dita sequência do laço central tenha uma maior afinidade de hibridização à região compreendendo a sequência selvagem da molécula de ácido nucleico que a afinidade de hibridização da sequência terminal 5' à sequência terminal 3', de modo que resulte no pareamento e bloqueamento da amplificação da sequência selvagem. Os técnicos da área sabem do fato que a hibridização entre a sequência terminal 5' e a sequência terminal 3' é uma hibridização intramolecular.

Numa forma preferida de realização do presente invento, a DNA polimerase tendo atividade de deslocamento de fita sob as condições de reação é a polimerase de fragmento grande Bst; alternativamente, é um fragmento ou uma combinação de fragmentos de Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago ϕ 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, Klenow.

Numa forma preferida de realização, a temperatura de reação constante está compreendida entre 62 e 67°C.

Numa forma preferida de realização do presente invento, o sinal indicativo de amplificação da molécula nucleotídeo compreendendo a mutação pontual é detectado por turbidimetria. Alternativamente, o sinal indicativo de amplificação da molécula nucleotídeo compreendendo a mutação pontual é detectado por fluorescência ou por quaisquer outros meios adequados de detecção.

Numa outra forma preferida de realização do presente invento, a molécula alvo de ácido nucleico compreende a região do gene humano JAK2 (GenBank no. NG_009904, SEQ ID NO: 2) contendo a substituição putativa guanidina-timidina na base 93526 de SEQ ID NO: 2, correspondendo à posição de nucleotídeo 1849 a partir do códon de início na sequência de codificação JAK2 (GenBank no. NM_004972, SEQ ID NO: 1), que por sua vez corresponde à posição 2343 de SEQ ID NO: 1.

Preferencialmente, os primeiro e segundo iniciadores externos F3 e B3 estão situados respectivamente nas regiões de introns flanqueando o éxon 14 do gene humano JAK2 (GenBank no. NG_009904, SEQ ID NO: 2) que contém a substituição putativa de base G → T na posição 93526. Mais preferencialmente, F3 consiste de uma sequência de nucleotídeo abrangendo as posições de 93367 a 93388 de SEQ ID NO: 2 e B3 consiste de uma sequência de nucleotídeos que é complementar à região de nucleotídeos entre as posições 93561 e 93582 de SEQ ID NO: 2. Preferencialmente, os primeiro e segundo iniciadores internos FIP e BIP são projetados como segue: o iniciador FIP consiste de uma sequência F2 situada na região íntron a montante do éxon 14 de JAK2 (preferencialmente entre as posições 93408 e 93425 de

SEQ ID NO: 2) e de uma sequência F1c que é complementar aos nucleotídeos de 93445 a 93470 de SEQ ID NO: 2; o iniciador BIP consiste de uma sequência B2 complementar a uma região compreendendo os nucleotídeos de 93538 a 93559 de SEQ ID NO: 2, que inclui as primeiras dezoito bases do íntron a jusante, e de uma sequência B1c situada na
 5 posição de 93486 a 93515 de SEQ ID NO: 2. A sequência central do laço do iniciador extensível mutante haste-laço consiste preferencialmente de nucleotídeos 93516 a 93529 de SEQ ID NO: 2. A sequência de bases PNA consiste preferencialmente dos nucleotídeos de 93518 a 93534 de SEQ ID NO: 2.

Mais preferencialmente, os iniciadores adequados para
 10 amplificação isotérmica mediada por laço, que são empregados para executar o método de acordo com o presente invento, consistem das seguintes sequências:

F3 5'-GCATCTTTATTATGGCAGAGAG-3' (SEQ ID NO: 3);

B3 5'-TGCTCTGAGAAAGGCATTA-3' (SEQ ID NO: 4);

FIP 5'-GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC-3' (SEQ ID NO: 5);

15 BIP 5'-GCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC-3' (SEQ ID NO: 6);

Iniciador extensível mutante haste laço: 5'-GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC-3' (SEQ ID NO: 8).

20 Numa forma de realização mais preferida, a porção não extensível é uma molécula PNA, preferencialmente tendo a estrutura $\text{NH}_2\text{GAGTATGTGTCTGTGGA}^{\text{CONH}_2}$. (SEQ ID NO: 9).

O método do presente invento também é adequado para avaliar quantitativamente a quantidade de alelos mutantes (p.ex. dos alelos mutantes JAK2 presentes) numa amostra de ácido nucleico, p.ex., para avaliar se a mutação
 25 pontual está numa forma homozigótica ou heterozigótica. Isto é alcançado pela comparação quantitativa do sinal indicativo de amplificação da região da molécula alvo do ácido nucleico compreendendo a mutação pontual obtida a partir da amostra, com o dito sinal obtido a partir de pelo menos um calibrador. Numa forma preferida de realização, o pelo menos um calibrador consiste de uma percentagem predeterminada (%) de
 30 moléculas alvo de ácidos nucleicos num fundo de moléculas de ácido nucleico selvagens, em que dita percentagem predeterminada (%) é preferencialmente de cerca de 10%. Por exemplo, analisando a eficiência de amplificação de amostras não diluídas e diluídas 1:5 em comparação com 3 calibradores (p.ex. 100%, 10% e 1% de plasmídeo mutante G1849T JAK em fundo plasmídeo selvagem), é possível determinar se a quantidade de
 35 alelos mutantes nas amostras de teste é maior ou menor que 50%, que é indicativo de homozigose ou heterozigose.

O método do presente invento também é adequado para

detectar outras mutações genéticas responsáveis por patologias diferentes, tais como KRAS, EGFR, bem como para detectar SNPs.

Um outro aspecto do presente invento é um conjunto de iniciadores para detectar a presença de uma mutação pontual numa molécula alvo de ácido nucleico num fundo de moléculas de ácido nucleico selvagem por amplificação isotérmica mediada por laço, o conjunto de iniciadores compreendendo um primeiro iniciador externo F3, um segundo iniciador externo B3, um primeiro iniciador interno FIP, um segundo iniciador interno BIP e um iniciador extensível mutante haste-laço, todos como definido acima com referência ao método do presente invento.

De acordo com uma forma preferida de realização, o conjunto de iniciadores compreende um primeiro iniciador externo F3 consistindo de SEQ ID NO: 3, um segundo iniciador externo B3 consistindo de SEQ ID NO: 4, um primeiro iniciador interno FIP consistindo de SEQ ID NO: 5, um segundo iniciador interno BIP consistindo de SEQ ID NO: 6, e um iniciador extensível mutante haste-laço consistindo de SEQ ID NO: 8.

Uma forma adicional preferida de realização do presente invento é um conjunto de iniciadores como definido acima adicionalmente compreendendo uma porção não extensível que é capaz de hibridizar com as moléculas de ácido nucleico selvagens. A porção não extensível é por exemplo um ácido nucleico peptídico (PNA) ou um iniciador não extensível haste-laço, como definido nas reivindicações anexas. Um PNA que tenha pelo menos 10 bases de comprimento é mais preferido. O PNA ilustrado na lista de sequências como SEQ ID NO: 9 é a forma de realização mais preferida da porção não extensível.

Um aspecto adicional do presente invento é um kit para detectar a presença de uma mutação pontual numa molécula alvo de ácido nucleico num fundo de moléculas de ácido nucleico selvagens por amplificação isotérmica mediada por laço, o kit compreendendo um conjunto de iniciadores como definido acima bem como uma ou mais DNA polimerases tendo atividade de deslocamento de fita. A DNA polimerase é preferencialmente escolhida dentre o grupo que consiste de polimerase de grande fragmento Bst, fragmentos Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago π 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, Klenow, e quaisquer combinações deles. A DNA polimerase mais preferida é a polimerase de grande fragmento Bst.

O kit de acordo com o presente invento pode conter componentes convencionais adicionais tais como por exemplo um ou mais calibradores, meios para detectar e/ou quantificar a amplificação das moléculas alvo de ácido nucleico, bem como instruções para executar o ensaio. A escolha e uso de tais componentes adicionais é parte das habilidades dos técnicos da área.

O escopo do presente invento adicionalmente compreende um iniciador oligonucleotídeo isolado escolhido dentre o grupo que consiste de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8, bem como um ácido nucleico peptídico (PNA) de 6 a 24 bases de comprimento, compreendendo uma sequência de bases que é capaz de hibridizar a uma região do DNA genômico JAK 2 (SEQ ID NO: 2) incluindo a posição 93526 de SEQ ID NO: 2, ou a uma região do cDNA de JAK2 (SEQ ID NO: 1) incluindo a posição 2343 de SEQ ID NO: 1. Uma forma preferida de realização do PNA do presente invento compreende a seguinte sequência de bases:

NH₂- GAGTATGTGTCTGTGGA-COOH (SEQ ID NO:9), em que G é guanina, A é adenina, T é timina e C é citosina.

O presente invento é adicionalmente descrito abaixo por meio de exemplos específicos não limitativos, com referência aos seguintes desenhos:

Figura 1. Princípio LAMP (estado da técnica)

A reação de amplificação é realizada empregando-se 4 iniciadores oligonucleotídeos específicos por 6 regiões diferentes da sequência genômica alvo. Os iniciadores internos hibridizam-se às sequências complementares da molécula alvo de ácido nucleico e são estendidos pela DNA polimerase; o produto de amplificação é deslocado em duas etapas pelos iniciadores externos (F3, B3) e formatado como uma estrutura dupla de haste-laço (estrutura de partida) (painel A). A estrutura de partida é simultaneamente amplificada a partir das extremidades 3' livres e por um outro iniciador interno (painel B). Os concatâmeros DNA construídos pelas repetições invertidas do módulo inicial são progressivamente sintetizados de forma exponencial (painel C).

Figura 2. Estratégia LAMP "HALTERE"

Na configuração do presente ensaio ilustrado na Fig. 2, os oligonucleotídeos F1c e B1c contidos nos iniciadores internos FIP e BIP são complementares a regiões não sobrepostas do gene JAK2 que termina e começa respectivamente uma base a montante e uma base a jusante do nucleotídeo de interesse na posição 1849 do códon de início na sequência de codificação JAK2. Além disso, a base da extremidade 5' dos iniciadores FIP e BIP é específica para o nucleotídeo mutado na sequência JAK2 e ambos iniciadores internos têm uma base incompatível na terceira base a partir da extremidade 3'. Quando a reação contém o alelo alvo selvagem e é formada uma estrutura do tipo haltere, as sequências F1c e B1c específicas a mutantes não são pareadas na extremidade 3' bloqueando qualquer amplificação alvo adicional. Diferentemente, se o alelo alvo mutante estiver presente na solução, as sequências F1c e B1c específicas a mutantes hibridizam-se perfeitamente à região alvo complementar do ácido nucleico e são estendidas pela DNA polimerase.

Figura 3. Estratégia LAMP “iniciador de laço alelo específico”

O nucleotídeo na extremidade 3' do iniciador de laço específico a mutante é complementar ao nucleotídeo T mutado na posição 1849 na sequência de codificação JAK2. Em adição, este iniciador de laço contém uma base incompatível na terceira base a partir da extremidade 3'. Se a reação contém a sequência JAK2 selvagem, a extremidade 3' do iniciador de laço específico a mutante não se pareia com a sequência alvo resultando em nenhuma amplificação. Diferentemente, se as sequências JAK2 mutantes estiverem presentes em solução, o iniciador de laço específico a mutante hibridiza perfeitamente à sequência alvo complementar e é estendido pela DNA polimerase.

Figura 4. Estratégia LAMP “iniciadores haste-laço”

Um conjunto universal (insensível a mutantes) de iniciadores compreendendo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP para obter um haltere apresentando o nucleotídeo T putativo mutado na região do laço. Um primeiro iniciador haste-laço é incluído, projetado para reconhecer a base mutada na estrutura haltere de fita única, juntamente com um segundo iniciador haste-laço modificado complementar à sequência JAK2 selvagem e contendo uma extremidade 3' não extensível. Quando a sequência JAK2 mutada está presente na amostra de ácido nucleico (painel A), o iniciador haste-laço específico a mutante quebra sua estrutura interna para parear com a sequência alvo e é estendido pela DNA polimerase. Reciprocamente, se a sequência alvo selvagem estiver presente na amostra, o iniciador haste-laço não extensível modificado hibridiza com a sequência alvo selvagem bloqueando a amplificação desta sequência (efeito de silenciamento).

Figura 5. Estratégia LAMP “iniciador haste-laço específico a mutante com PNA”

Um conjunto universal (insensível a mutantes) de iniciadores compreendendo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP para obter um haltere apresentando o nucleotídeo T putativo mutado na região do laço. Um primeiro iniciador haste-laço é incluído, projetado para reconhecer a base mutada na estrutura haltere de fita única, juntamente com uma molécula PNA. O PNA é projetado para ser complementar à região de laço compreendida entre B2 e B1c e abrangendo a posição do ácido nucleico da mutação pontual a ser detectada. Ela forma um duplex estável com a sequência JAK2 selvagem, evitando assim a hibridização e extensão do iniciador haste-laço específico a mutante e suprimindo a amplificação não específica da sequência selvagem (painel B). O PNA não hibridiza à sequência JAK2 mutada por causa da afinidade mais baixa (painel A).

Figura 6. Sensibilidade do ensaio LAMP “Haltere”

A reação de amplificação foi realizada numa amostra

contendo 7×10^3 cps/ μ L de plasmídeo selvagem JAK2 (quadrados), em um controle sem alvo e em diluições seriadas em água de plasmídeo mutante JAK2 (de 7×10^3 cps/ μ L a 7×10 cps/ μ L, pontos romboides, e 7 cps/ μ L, ponto circular). Cada amostra foi testada três vezes. As barras de erro representam um desvio padrão. Em comparação com o plasmídeo selvagem, a sequência alvo mutante é amplificada com eficiência maior até uma concentração de amostra de 7×10 cps/ μ L. O presente ensaio mostra a linearidade entre as amostras de plasmídeo mutantes 7×10^3 cps/ μ L e 7×10 cps/ μ L.

Figura 7. Sensibilidade do ensaio LAMP “iniciador de laço mutante alelo específico”

A reação de amplificação foi realizada numa amostra contendo 7×10^3 cps/ μ L de plasmídeo selvagem JAK2 (pontos quadrados), em um controle sem alvo e em diluições seriadas em água de plasmídeo mutante JAK2 (de 7×10^3 cps/ μ L a 7×10 cps/ μ L, pontos romboides). Cada amostra foi testada três vezes. As barras de erro representam um desvio padrão. Em comparação com o plasmídeo selvagem, a sequência alvo mutante é amplificada com eficiência maior até uma concentração de amostra de 7×10^2 cps/ μ L. O presente ensaio mostra a linearidade entre as amostras de plasmídeo mutantes 7×10^3 cps/ μ L e 7×10 cps/ μ L.

Figura 8. Sensibilidade do ensaio LAMP “iniciador haste-laço”

A reação de amplificação foi realizada numa amostra contendo 7×10^3 cps/ μ L de plasmídeo selvagem JAK2 (pontos quadrados), em um controle sem alvo e em diluições seriadas plasmídeo mutante JAK2 em plasmídeo selvagem variando de 75% a 1%, quantidade total de 35000 cps de DNA por reação. Cada amostra foi testada três vezes. As barras de erro representam um desvio padrão. Em comparação com o plasmídeo selvagem, a sequência alvo mutante é amplificada com eficiência maior até uma amostra de dose de 1% (350 cópias de plasmídeo mutante em 34650 cópias do plasmídeo pai original). O ensaio mostra linearidade entre as amostras de plasmídeo mutantes 100% e 1% em fundo selvagem.

Figura 9. LAMP “iniciador haste-laço com PNA”

Desempenho do ensaio em amostras de plasmídeo mutante e selvagem (35000 cps cada) com e sem PNA. Na ausência de PNA, o plasmídeo JAK2 selvagem é amplificado de forma não específica pelo iniciador haste-laço específico a mutante, com um atraso de 5 minutos com relação à sequência alvo mutada. Em contraste, quando o PNA é adicionado à mistura de reação, o plasmídeo selvagem é amplificado pelo iniciador haste-laço específico a mutante com um atraso de uma hora e somente 5 minutos de atraso são medidos para a amplificação específica do plasmídeo JAK2 mutante. O PNA forma um duplex estável somente com a sequência complementar selvagem evitando a hibridização e extensão do iniciador haste-laço específico a mutante

causando com isso uma mudança de uma hora no tempo de amplificação da sequência selvagem.

Figura 10. Seletividade do ensaio LAMP “iniciador haste-laço com PNA”

Desempenho do ensaio em amostras de plasmídeo JAK2 mutadas (350000 cps), amostras de plasmídeo JAK2 selvagem (350000 cps) e em plasmídeos mutados em diluições seriadas em fundo selvagem nas seguintes proporções: 1, 0,5, 0,1 0,05 e 0,01%. As barras de erro correspondem a 1 desvio padrão. Nenhuma amplificação foi detectada para a amostra selvagem (plasmídeo selvagem 350000 cps) dentro de uma hora de reação. A amplificação específica da sequência alvo mutante foi detectada até as sequências mutantes 0,01% em fundo selvagem (35 cópias de plasmídeo mutante total em 349650 cópias de plasmídeo selvagem). O ensaio é linear até uma concentração de 0,1% de plasmídeos mutantes (350 cópias de plasmídeo mutante total em 349650 cópias de plasmídeo selvagem).

Figura 11. Reação de controle LAMP

Conjunto universal (insensível a mutantes) de iniciadores incluindo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP. Este método é projetado para amplificar a sequência alvo de DNA genômico independente da presença da mutação específica. Tal ensaio de controle permite avaliar a eficiência de amplificação dos iniciadores na presença de inibidores no tubo de reação.

Figura 12. Reação de controle LAMP em amostras de ácido nucleico JAK2 selvagem e mutante

A eficiência de amplificação do conjunto universal (insensível a mutante) de iniciadores incluindo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP é comparável para todas as amostras analisadas: 100% de plasmídeo JAK2 selvagem, 100%, 10% e 1% de plasmídeo JAK2 mutante. Um atraso ou ausência de amplificação da sequência alvo é indicativo da presença de inibidores de reação ou de problemas nas condições de reação.

Figura 13. Princípio de estimativa de cópias alélicas JAK2 mutantes numa amostra de ácidos nucleicos

Para estimar se a quantidade de cópias alélicas de JAK2 numa amostra de ácido nucleico é maior ou menor que 50%, a LAMP modificada com iniciador haste-laço específico a mutante e PNA é realizada em amostras não diluídas e diluídas 1:5. Se uma amostra contém mais de 50% de cópias alélicas JAK2 mutantes, o minuto de amplificação limiar da sequência alvo está compreendido entre o (min)_t do calibrador 100% e o calibrador 10% para ambas amostras não diluída (painel A) e diluída (painel B). Se uma amostra contém menos de 50% de cópias alélicas JAK2 mutantes, o minuto de amplificação limiar da sequência alvo está compreendido entre o t(min) do

calibrador 100% e o calibrador 10% para as amostras não diluídas (painel A), e entre o min(t) do calibrador 10% e o calibrador 1% para as amostras diluídas (painel B).

Figura 14. Estimativa de cópias alélicas JAK2 mutantes em amostras de ácido nucleico contendo mais de 50% de sequências alvo mutadas

Quatro amostras de ácido contendo mais de 50% de plasmídeo JAK2 mutante em fundo selvagem (respectivamente 60%, 70%, 80% e 90%) foram diluídos 1:5 e analisados usando o ensaio LAMP iniciador haste-laço com PNA, juntamente com três calibradores consistindo de 100%, 10% e 1% de plasmídeos JAK2 mutantes em fundo selvagem. Para todas as quatro amostras, o minuto de amplificação limiar estava compreendido entre o min(t) do calibrador 100% e o min(t) do calibrador 10%.

Figura 15. Estimativa de cópias alélicas JAK2 mutantes em amostras de ácido nucleico contendo menos de 50% de sequências alvo mutadas

Quatro amostras de ácido contendo 50% ou menos de plasmídeo JAK2 mutante em fundo selvagem (respectivamente 40%, 30% e 20%) foram diluídos 1:5 e analisados usando o ensaio LAMP iniciador haste-laço com PNA, juntamente com três calibradores consistindo de 100%, 10% e 1% de plasmídeos JAK2 mutantes em fundo selvagem. A amplificação da amostra de 50% diluída 1:5 ocorreu no mesmo minuto limiar da amostra do calibrador 10%. Para as três amostras restantes, o minuto de amplificação limiar estava compreendido entre o min(t) do calibrador 10% e o min(t) do calibrador 1%.

Os seguintes exemplos são providos somente a título de ilustração e não se destinam a limitar o escopo do presente invento como definido nas reivindicações anexas.

Exemplo 1 – Materiais, métodos e resultados da estratégia halteres LAMP modificada JAK2

Reagentes

Os plasmídeos JAK2 foram providos pelo fornecedor GeneArt (Regensburg, Alemanha) e continham a sequência JAK2 selvagem ou mutante. Em detalhes:

- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base G no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo selv";
- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base T no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo mut".

Iniciadores: sintetizados pelo fornecedor Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha), chamados de "iniciadores":

- GA211 (F3) 5' GTCAAACAACAATTCTTTGTACT 3' (SEQ ID NO: 10);

- GA212 (B3) 5' AGCTGTGATCCTGAAACTG 3' (SEQ ID NO: 11);
- GA216 (FIP) 5' - AATATACTCCATAATTTAAAACCAAATGCTTTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGT 3' (SEQ ID NO: 12);
- GA220 (BIP) 5' TTTTGTGGAGACGAGAGTAAGTAAAACTACATAAAACAAAAACAGATGCTCTGA 3' (SEQ ID NO: 13);
- GA221 (LF) 5' GTGAGAAAGCTTGCTCATCAT 3' (SEQ ID NO: 14);
- GA222 (LB) 5' AGGCTTTCTAATGCCTTTC 3' (SEQ ID NO: 15).

Tampão de reação: 100 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 40 mM MgSO₄, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% Tween, 5% DMSO ("buffer 5x")

mistura 25 mM dNTPs (Fermentas) ("dNTPs")

polimerase Bst de fragmentos grandes 8 U/μL (New England Biolabs) ("polimerase")

água apirogênica estéril (SALF Spa) ("ddw")

Procedimento

Preparação da amostra

O preparo da mistura de reação foi como segue: 0,2 μM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 μM de iniciadores internos (FIP e BIP), 0,8 μM de iniciadores de laço (LF e LB), solução tampão 1x, 1,4 mM de mistura dNTPs, 8 U de polimerase Bst. O volume final da mistura de reação deve ser de 4/5 do volume de reação total (i.e. 20 μL de mistura de reação + 5 μL de amostra). Manter sempre os reagentes no gelo. Preparar a mistura para pelo menos 17 amostras, compreendendo 3 controles negativos (7 x 10³ cps/μL de plasmídeo selvagem), 12 controles positivos (3 amostras 7 x 10³ cps/μL de plasmídeo mutante, 3 amostras 7 x 10² cps/μL de plasmídeo mutante, 3 amostras 7 x 10 cps/μL de plasmídeo mutante, 3 amostras 7 cps/μL de plasmídeo mutante), 1 controle sem alvo.

Tabela 1 – composição da mistura de amostras

Tubo de amostra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Alvo a ser adicionado (5μL)	plasmídeo selv 7x10 ³ cps/μL	plasmídeo mut 7x10 ³ cps/μL	plasmídeo mut 7x10 ² cps/μL	plasmídeo mut 7x10 cps/μL	plasmídeo mut 7 cps/μL	
GA 211 100 μM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
GA 212 100 μM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
GA 221 100 μM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
GA 221 100 μM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
GA 216 100 μM	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GA 220 100 μM	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
LAMP Buffer 5x	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Bst polimerase 8 U/ μ L	1	1	1	1	1	1
dNTPs 25 mM	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
ddw para 20 μ L	13.18	13.18	13.18	13.18	13.18	13.18

Dispensar 20 μ L da mistura de reação na tira. Manter a tira no gelo. Sempre manter a mistura de reação no gelo de agora em diante.

Preparar diluições em série do alvo ("diluições alvo") a partir da solução enviada (plasmídeo selv e plasmídeo mut). A solução enviada é uma solução 7×10^{10} cópias/ μ L. Diluir inicialmente o plasmídeo mutante a 7×10^4 cópias/ μ L em Tris 10 mM, então diluir em série para 7×10^3 cps/ μ L, 7×10^2 cps/ μ L, 7×10 cps/ μ L e 7 cps/ μ L em Tris 10 mM. Diluir o plasmídeo selv a 7×10^3 cps/ μ L em Tris 10 mM.

Adicionar 5 μ L de diluições alvo às tiras, em triplicata. Adicionar 5 μ L das diluições alvo partindo da amostra menos concentrada para a mais concentrada. Fechar todos os tubos.

Reação

A reação segue o esquema de método das figuras 1 e 2.

Programar o turbidímetro (Teramecs) para incubação a temperatura constante e monitoração em tempo real para turbidez, a fim de obter uma temperatura de reação constante de 66°C por 1 hora.

Colocar as tiras no instrumento imediatamente antes de iniciar os programas. Iniciar o programa.

Análise de dados

Analisar a variação de absorbância em termos de a.u. (unidades arbitrárias de absorbância) para encontrar o tempo limiar para cada amostra analisada. O tempo limiar é o minuto em que a absorbância da amostra, após subtração da linha base, atinge o valor de unidade arbitrária que representa o limiar (neste caso 0,1 a.u.). O tempo limiar atingido por cada amostra é correlacionado com seu log de cópias de DNA/ μ L.

Resultados

A estratégia "LAMP JAK2 haltere" é baseada no método LAMP Eiken para detecção de SNP (descrito em EP 1231281, 20, 21, 22, bem como em http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/snps_anim.html).

No presente arranjo de ensaio ilustrado na Fig. 2, os oligonucleotídeos F1c e B1c contidos nos iniciadores FIP e BIP são complementares às sequências não sobrepostas do gene JAK2 que termina e começa respectivamente uma base a montante e uma base a jusante do nucleotídeo de interesse na posição 1849 a partir do códon de partida na sequência de codificação de JAK2. Além disso, a base de extremidade 5' dos iniciadores FIP e BIP é específica para o nucleotídeo T mutado na

sequência JAK2 e ambos iniciadores internos têm uma base não correspondente na terceira base a partir da extremidade 3'. Quando a reação contém o alelo alvo selvagem e uma estrutura haltere é formada, as sequências F1c e B1c não se pareiam na extremidade 3' bloqueando qualquer amplificação adicional. Diferentemente, se o alelo alvo mutante estiver presente na solução, as sequências F1c e B1c específicas a mutante hibridizam perfeitamente à região alvo do ácido nucleico complementar e são estendidas pela DNA polimerase.

Como mostrado na Fig. 6, concentrações decrescentes de plasmídeo mutante foram detectadas pelo ensaio LAMP variando de 7×10^3 cps/ μ L a 7 cps/ μ L (35 cópias de plasmídeo mutante total). Em baixas concentrações da sequência alvo de ácido nucleico, este arranjo de ensaio LAMP não poderia discriminar entre plasmídeos mutante e selvagem que são de fato amplificados numa concentração de 7×10^3 cps/ μ L. Uma vez que um valor de seletividade menor que 1% é exigido a fim de superar as limitações dos métodos de ensaio previamente descritos na literatura, nenhuma vantagem clara foi obtida com a presente abordagem.

Exemplo 2 – Materiais, métodos e resultados da estratégia LAMP modificada por JAK2 “extensão de iniciador de laço alelo específico”

Reagentes

Os plasmídeos JAK2 foram providos pelo fornecedor GeneArt (Regensburg, Alemanha) e continham a sequência JAK2 selvagem ou mutante. Em detalhes:

- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base G no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo selv";
- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base T no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo mut".

Iniciadores: sintetizados pelo fornecedor Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha), chamados de "iniciadores":

JAKR5 (F3) 5' TCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAG 3' (SEQ ID NO: 16)

JAKR2 (B3) 5' AAGGCATTAGAAAGCCTGTAGT 3' (SEQ ID NO: 17)

JAKR7 (FIP) 5' ACAAAGAATTGTTGTTTGAAGTGTGCTCCATTGCATCTTTATTATGGCAGAGAGAA 3' (SEQ ID NO: 18)

JAKR8 (BIP) 5' AGTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGATGTTACTTACTCTCGTCTCCACAGA 3' (SEQ ID NO: 19)

JAKR9 (LB) 5' AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTAGGTT 3' (SEQ ID NO: 20).

A base sublinhada corresponde a um nucleotídeo incompatível; a base em negrito corresponde ao nucleotídeo mutado na posição 1849 a partir do códon inicial ATG da sequência de codificação JAK2.

Tampão de reação: 100 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 40 mM MgSO₄, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% Tween, 5% DMSO ("buffer 5x")

mistura 25 mM dNTPs (Fermentas) ("dNTPs")

polimerase Bst de fragmentos grandes 8 U/μL (New England Biolabs) ("polimerase")

5 água apirogênica estéril (SALF Spa) ("ddw")

Procedimento

Preparação da amostra

Estocar os iniciadores em alíquotas. É melhor estocar soluções a -20°C, enquanto diluições de trabalho devem ser armazenadas a 4°C.

- 10 Preparar a mistura de reação como segue: 0,2 μM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 μM de iniciadores internos (FIP e BIP), 0,8 μM de iniciador de laço (LB), solução tampão 1x, 1,4 mM de mistura dNTPs, 8 U de polimerase Bst. O volume final da mistura de reação deve ser de 4/5 do volume de reação total (i.e. 20 μL de mistura de reação + 5 μL de amostra). Manter sempre os reagentes no gelo.
- 15 Preparar a mistura para pelo menos 14 amostras, compreendendo 3 controles negativos (7 x 10³ cps/μL de plasmídeo selvagem), 9 controles positivos (3 amostras 7 x 10³ cps/μL de plasmídeo mutante, 3 amostras 7 x 10² cps/μL de plasmídeo mutante, 3 amostras 7 x 10 cps/μL de plasmídeo mutante), 1 controle sem alvo.

Tabela 2 – composição da mistura de amostras

Tubo de amostra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Alvo a ser adicionado (5μL)	plasmídeo selv 7x10 ³ cps/μL	plasmídeo mut 7x10 ³ cps/μL	plasmídeo mut 7x10 ² cps/μL	plasmídeo mut 7x10 cps/μL	plasmídeo mut 7 cps/μL	
JAKR5 100 μM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
JAKR2 100 μM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
JAKR7 100 μM	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
JAKR8 100 μM	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
JAKR9 100 μM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
LAMP Buffer 10x	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Bst polimerase 8 U/μL	1	1	1	1	1	1
dNTPs 25 mM	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
ddw para 20 μL	14	14	14	14	14	14

- 20 Dispensar 20 μL da mistura de reação na tira. Manter a tira no gelo. Sempre manter a mistura de reação no gelo de agora em diante.

Preparar diluições em série do alvo ("diluições alvo") a partir da solução enviada (plasmídeo selv e plasmídeo mut). A solução enviada é uma solução

7×10^{10} cópias/ μL . Diluir inicialmente o plasmídeo mutante a 7×10^4 cópias/ μL em Tris 10 mM, então diluir em série para 7×10^3 cps/ μL , 7×10^2 cps/ μL , 7×10 cps/ μL em Tris 10 mM. Diluir o plasmídeo selv a 7×10^3 cps/ μL em Tris 10 mM.

Adicionar 5 μL de diluições alvo às tiras, em triplicata.

- 5 Adicionar 5 μL das diluições alvo partindo da amostra menos concentrada para a mais concentrada. Fechar todos os tubos.

Reação

A reação segue o esquema de método da figura 3.

- 10 Programar o turbidímetro (Teramecs) para incubação a temperatura constante e monitoração em tempo real para turbidez, a fim de obter uma temperatura de reação constante de 65°C por 1 hora.

Colocar as tiras no instrumento imediatamente antes de iniciar os programas. Iniciar o programa.

Análise de dados

- 15 Analisar a variação de absorbância em termos de a.u. (unidades arbitrárias de absorbância) para encontrar o tempo limiar para cada amostra analisada. O tempo limiar é o minuto em que a absorbância da amostra, após subtração da linha base, atinge o valor de unidade arbitrária que representa o limiar (neste caso 0,1 a.u.). O tempo limiar atingido por cada amostra é correlacionado com seu log de cópias de DNA/ μL .
- 20

Resultados

- A presente abordagem consiste na amplificação seletiva de uma sequência mutante usando um iniciador de laço específico a mutante (Fig. 3). Foi projetado um conjunto universal (insensível a mutante) de iniciadores incluindo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP para obter uma estrutura halteres apresentando a mutação putativa na região de laço compreendida entre B2 e B1c. Em adição, foi projetado um iniciador de laço apresentando a última base na extremidade 3' complementar ao nucleotídeo T mutado na posição 1849 da sequência de codificação JAK2 e uma base não correspondente na terceira base a partir da extremidade 3'.
- 25

- 30 Se a reação contém a sequência alvo selvagem a extremidade 3' do iniciador de laço específico a mutante não parecia ao nucleotídeo complementar, resultando assim em nenhuma amplificação. Diferentemente, se as sequências mutantes JAK2 estiverem presente em solução, o iniciador de laço específico a mutante hibridiza perfeitamente à sequência complementar e é estendido pela DNA polimerase.
- 35

A avaliação do ensaio foi feita em amostras de plasmídeos mutantes em concentrações variando de 7×10^3 cps/ μL a 7×10 cps/ μL (35000 e 350

cópias de plasmídeo mutante total) e numa amostra selvagem contendo 7×10^3 cps/ μ L, todas amostras testadas em triplicata. Com o presente método, a amplificação não específica foi detectada para a amostra de plasmídeo selvagem em 7×10^3 cps/ μ L e em amostras mutante e selvagem em concentrações de 7×10 cps/ μ L não poderiam ser discriminadas. Uma vez que um valor de seletividade menor que 1% é exigido a fim de superar as limitações dos métodos de ensaio previamente descritos na literatura, nenhuma vantagem clara foi obtida com a presente abordagem (Fig. 7).

Exemplo 3 – Materiais, métodos e resultados da estratégia LAMP modificada por JAK2 “iniciador haste-laço”

Reagentes

Os plasmídeos JAK2 foram providos pelo fornecedor GeneArt (Regensburg, Alemanha) e continham a sequência JAK2 selvagem ou mutante. Em detalhes:

- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base G no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo selv";
- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base T no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo mut".

Iniciadores: sintetizados pelo fornecedor Eurofins MWG Operon, chamados de "iniciadores":

GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

GA235 (LF) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTGTCTGTGGAGAddC 3' (SEQ ID NO: 7)

a base sublinhada corresponde ao nucleotídeo selvagem na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972).

ddC significa didesoxi-citosina não extensível.

GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

a base sublinhada corresponde ao nucleotídeo mutado na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972).

Tampão de reação: 100 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 40 mM MgSO₄, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% Tween, 5% DMSO ("buffer 5x")

mistura 25 mM dNTPs (Fermentas) ("dNTPs")

polimerase Bst de fragmentos grandes 8 U/ μ L (New England Biolabs) ("polimerase")

água apirogênica estéril (SALF Spa) ("ddw")

Procedimento

Preparação da amostra

Estocar os iniciadores em alíquotas. É melhor estocar soluções a -20°C, enquanto diluições de trabalho devem ser armazenadas a 4°C.

- 5 Preparar a mistura de reação como segue: 0,2 µM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 µM de iniciadores internos (FIP e BIP), 0,8 µM de iniciador de laço (LF não extensível e LB), solução tampão 1x, 1,4 mM de mistura dNTPs, 8 U de polimerase Bst. O volume final da mistura de reação deve ser de 4/5 do volume de reação total (i.e. 20 µL de mistura de reação + 5 µL de amostra). Manter sempre os reagentes no gelo. Preparar a mistura para pelo menos 26 amostras, compreendendo 3
- 10 controles negativos (100% de plasmídeo selvagem, 7×10^3 cps/µL), 21 controles positivos (3 amostras 100% de plasmídeo mutante 7×10^3 cps/µL, 3 amostras 75% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 50% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 25% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 10% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 5% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 1% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem), um controle sem
- 15 alvo.

Tabela 3 – composição da mistura de amostras

Tubo de amostra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15
Alvo a ser adicionado (5µL)	plasmídeo selv 7×10^3 cps/µL	plasmídeo mut 7×10^3 cps/µL	plasmídeo mut $5,25 \times 10^3$ cps/µL, plasmídeo selv $1,75 \times 10^3$ cps/µL	plasmídeo mut $3,5 \times 10^3$ cps/µL, plasmídeo selv $3,5 \times 10^3$ cps/µL	plasmídeo mut $1,75 \times 10^3$ cps/µL, plasmídeo selv $5,25 \times 10^3$ cps/µL
GA231 100 µM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
GA232 100 µM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
GA233 100 µM	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GA234 100 µM	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GA235 100 µM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
GA236 100 µM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
LAMP Buffer 10x	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Bst polimerase 8 U/µL	1	1	1	1	1
dNTPs 25 mM	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4

ddw para 20 µL	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8
----------------	------	------	------	------	------

Dispensar 20 µL da mistura de reação na tira. Manter a tira no gelo. Sempre manter a mistura de reação no gelo de agora em diante.

Preparar diluições em série do alvo ("diluições alvo") a partir da solução enviada (plasmídeo selv e plasmídeo mut). A solução enviada é uma solução 7×10^{10} cópias/µL. Diluir inicialmente o plasmídeo mutante a 7×10^4 cópias/µL em Tris 10 mM, então diluir em série o plasmídeo mutante em plasmídeo selvagem para obter as seguintes concentrações de sequências mutantes em fundo selvagem: 75%, 50%, 25%, 10%, 5%, 1% (quantidade total por tubo, 7×10^3 cps/µL).

Adicionar 5 µL de diluições alvo às tiras, em triplicata. Adicionar 5 µL das diluições alvo partindo da amostra menos concentrada para a mais concentrada. Fechar todos os tubos.

Reação

A reação segue o esquema de método da figura 4.

Programar o turbidímetro (Teramecs) para incubação a temperatura constante e monitoração em tempo real para turbidez, a fim de obter uma temperatura de reação constante de 65°C por 1 hora.

Colocar as tiras no instrumento imediatamente antes de iniciar os programas. Iniciar o programa.

Análise de dados

Analisar a variação de absorbância em termos de a.u. (unidades arbitrárias de absorbância) para encontrar o tempo limiar para cada amostra analisada. O tempo limiar é o minuto em que a absorbância da amostra, após subtração da linha base, atinge o valor de unidade arbitrária que representa o limiar (neste caso 0,1 a.u.). O tempo limiar atingido por cada amostra é correlacionado com seu log de cópias de DNA/µL.

Resultados

A presente abordagem consiste na amplificação seletiva de uma sequência mutante baseada num projeto particular de iniciador de laço resultando na hibridização seletiva de tal iniciador de laço no haltere formado a partir da sequência mutante (Fig. 4). Foi desenvolvido um conjunto universal (insensível a mutantes) de iniciadores incluindo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP para obter uma estrutura haltere apresentando a mutação putativa na região do laço compreendida entre B1 e B2. Não foram detectadas diferenças principais ao realizar tais experimentos em sequências alternativas contendo o nucleotídeo putativo mutado na região do laço em B2 ou entre B2 e B1c. Foi incluído no conjunto de iniciadores um iniciador de laço particular apresentando uma região de sequência de 8 bases na sua extremidade 5' complementar

a sua própria sequência na extremidade 3'. Consequentemente, este iniciador de laço especial forma uma estrutura intramolecular de grampo de cabelo que está em equilíbrio com sua forma aberta na temperatura de reação (65°C).

Quando a sequência JAK2 mutada está presente na amostra, tal iniciador de laço modificado quebra sua estrutura interna para se hibridizar à sequência alvo complementar de acordo com o equilíbrio termodinâmico (T_m entre o iniciador e o alvo específico = 65°C). O iniciador de laço hibridizado ao alvo mutado específico é então estendido pela polimerase e a amplificação pode proceder adicionalmente. Como característica adicional, o iniciador de laço específico para a mutação JAK2 G→T apresenta uma T_m com a sequência alvo selvagem (59°C) menor que com a estrutura intramolecular de grampo de cabelo (65°C). Assim, numa amostra contendo a sequência JAK2 selvagem, tal diferença em valores T_m resulta num auto-sequestro do iniciador de laço modificado que prefere se dobrar na estrutura de grampo de cabelo que formar um duplex com o alvo não específico, uma vez que as forças intramoleculares são maiores que as intermoleculares.

Para limitar a competição deste iniciador de laço pelas sequências selvagens que provavelmente estariam presentes em grande excesso na amostra clínica, foi incluído no arranjo da reação um segundo iniciador de laço com estrutura análoga e contendo uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência JAK2 selvagem, i.e., com a base G na posição 1849 a partir do códon inicial (GeneBank no. NM_004972).

A extremidade 3' deste iniciador de laço "competidor" é tornada não extensível por uma modificação (3' didesoxi). A tarefa deste competidor é "silenciar" a sequência selvagem, permitindo assim que o iniciador específico a mutante encontre seu alvo.

Quando o iniciador "competidor" reconhece a sequência selvagem complementar, ele quebra sua estrutura intramolecular para hibridizar ao alvo selvagem, de acordo com a maior afinidade (T_m da duplex formada pelo alvo selvagem e iniciador de laço modificado selvagem = 67°C). O iniciador de laço hibridizado ao alvo selvagem não é extensível, resultando em nenhuma amplificação de sequências selvagens. Uma vez que a reação é conduzida a temperatura constante, o iniciador haste-laço específico a selvagem fica anexado às sequências selvagens evitando assim a hibridização não específica do iniciador de laço mutante.

Em contraste ao iniciador de laço específico a mutante, o iniciador "competidor" apresenta uma T_m com a sequência alvo mutante (62°C) menor que a estrutura intramolecular de grampo de cabelo formada com ele mesmo (65°C). Assim, as forças intramoleculares maiores comparadas com as intermoleculares causam

o auto-sequestro do iniciador haste-laço modificado que prefere se dobrar na estrutura grampo de cabelo em vez de formar um duplex com a sequência alvo mutante.

A seletividade do presente ensaio foi avaliada pela realização da amplificação da sequência alvo em diluições seriadas de plasmídeo mutante em fundo selvagem (Fig. 8). A seletividade alcançada é significativamente menor que 1% (350 cópias de plasmídeo mutante total em 34650 cópias de plasmídeo selvagem) indicando um desempenho melhor que os ensaios previamente descritos na literatura.

A linearidade do ensaio é detectada entre 100% de plasmídeo mutante (35000 cps) e 1% de mutante em 99% de plasmídeos selvagens (350 cópias de plasmídeo mutante em 34650 cópias de plasmídeo selvagem), permitindo assim a detecção e quantificação da baixa percentagem de sequências mutantes em grandes quantidades de plasmídeos selvagens. Portanto, foi alcançado um aperfeiçoamento significativo com tal abordagem LAMP implementada.

Exemplo 4 – Materiais, métodos e resultados da estratégia LAMP modificada por JAK2 “iniciador haste-laço com PNA”

Reagentes

Os plasmídeos JAK2 foram providos pelo fornecedor GeneArt (Regensburg, Alemanha) e continham a sequência JAK2 selvagem ou mutante. Em detalhes:

- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base G no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo selv";
- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base T no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo mut".

Iniciadores: sintetizados pelo fornecedor Eurofins MWG Operon, chamados de "iniciadores":

GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTTTCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

a base sublinhada corresponde ao nucleotídeo mutado na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972).

PNA: sintetizado por Eurogentec, chamado de PNA GM43

^{NH₂}GAGTATGTGTCTGTGGA^{COOH} (SEQ ID NO: 9).

A base sublinhada corresponde ao nucleotídeo selvagem na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972).

Tampão de reação: 100 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 40 mM MgSO₄, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% Tween, 5% DMSO ("buffer 5x")

5 mistura 25 mM dNTPs (Fermentas) ("dNTPs")

polimerase Bst de fragmentos grandes 8 U/μL (New England Biolabs) ("polimerase")

água apirogênica estéril (SALF Spa) ("ddw")

Procedimento

Preparação da amostra

10 Estocar os iniciadores em aliquotas. É melhor estocar soluções a -20°C, enquanto diluições de trabalho devem ser armazenadas a 4°C.

Preparar a mistura de reação como segue: 0,2 μM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 μM de iniciadores internos (FIP e BIP), 0,8 μM de iniciador de laço auto pareado específico a JAK2 mutante (LB), 0,8 μM de PNA, solução
15 tampão 1x, 1,4 mM de mistura dNTPs, 8 U de polimerase Bst. O volume final da mistura de reação deve ser de 4/5 do volume de reação total (i.e. 20 μL de mistura de reação + 5 μL de amostra). Manter sempre os reagentes no gelo. Preparar a mistura para pelo menos 23 amostras, compreendendo 3 controles negativos (100% de plasmídeo selvagem, 7 x 10⁴ cps/μL), 18 controles positivos (3 amostras 100% de plasmídeo mutante, 3 amostras 1% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,5% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,1% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,05% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,01% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem – quantidade total de DNA 7 x 10⁴ cps/μL), um controle sem
20 alvo.
25

Tabela 4 – composição da mistura de amostras

Tubo de amostra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Alvo a ser adicionado (5μL)	plasmídeo selv 7x10 ⁴ cps/μL	plasmídeo mut 7x10 ⁴ cps/μL	plasmídeo mut 7x10 ² cps/μL, plasmídeo selv 6,93x10 ⁴ cps/μL	plasmídeo mut 3,5x10 ² cps/μL, plasmídeo selv 6,65x10 ⁴ cps/μL	plasmídeo mut 7x10 ² cps/μL, plasmídeo selv 6,993x10 ⁴ cps/μL	plasmídeo mut 3,5x10 ² cps/μL, plasmídeo selv 6,9965x10 ⁴ cps/μL
GA231 100 μM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
GA232 100 μM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

GA233 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GA234 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
PNA 100 μ M	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
GA236 100 μ M	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
LAMP Buffer 5x	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Bst polimerase 8 U/ μ L	1	1	1	1	1	1
dNTPs 25 mM	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
ddw para 20 μ L	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8

Dispensar 20 μ L da mistura de reação na tira. Manter a tira no gelo. Sempre manter a mistura de reação no gelo de agora em diante.

Preparar diluições em série do alvo ("diluições alvo") a partir da solução enviada (plasmídeo selv e plasmídeo mut). A solução enviada é uma solução 7×10^{10} cópias/ μ L. Diluir inicialmente o plasmídeo mutante a 7×10^4 cópias/ μ L em Tris 10 mM, então diluir em série o plasmídeo mutante em plasmídeo selvagem para obter as seguintes concentrações de sequências mutantes em fundo selvagem: 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% (quantidade total por tubo, 7×10^4 cps/ μ L).

Adicionar 5 μ L de diluições alvo às tiras, em triplicata. Adicionar 5 μ L das diluições alvo partindo da amostra menos concentrada para a mais concentrada. Fechar todos os tubos.

Reação

A reação segue o esquema de método da figura 5.

Programar o turbidímetro (Teramecs) para incubação a temperatura constante e monitoração em tempo real para turbidez, a fim de obter uma temperatura de reação constante de 65°C por 1 hora.

Colocar as tiras no instrumento imediatamente antes de iniciar os programas. Iniciar o programa.

Análise de dados

Analisar a variação de absorbância em termos de a.u. (unidades arbitrárias de absorbância) para encontrar o tempo limiar para cada amostra analisada. O tempo limiar é o minuto em que a absorbância da amostra, após subtração da linha base, atinge o valor de unidade arbitrária que representa o limiar (neste caso 0,1 a.u.). O tempo limiar atingido por cada amostra é correlacionado com seu log de cópias de DNA/ μ L.

Resultados

Esta abordagem consiste na amplificação seletiva de uma sequência mutante baseada num projeto particular de iniciador de laço, resultando na hibridização de tal iniciador de laço ao haltere formado a partir da sequência mutante

(Fig. 5). Foi desenvolvido um conjunto universal (insensível a mutantes) de iniciadores incluindo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP para obter uma estrutura haltere apresentando a mutação putativa na região do laço compreendida entre B1 e B2. Não foram detectadas diferenças principais ao realizar tais experimentos em sequências alternativas contendo o nucleotídeo putativo mutado na região do laço em B2 ou entre B2 e B1c. Foi incluído no conjunto de iniciadores um iniciador de laço particular apresentando uma região de sequência de 8 bases na sua extremidade 5' complementar a sua própria sequência na extremidade 3'. Consequentemente, este iniciador de laço especial forma uma estrutura intramolecular de grampo de cabelo que está em equilíbrio com sua forma aberta na temperatura de reação (65°C).

Quando a sequência JAK2 mutada está presente na amostra, tal iniciador de laço modificado quebra sua estrutura interna para se hibridizar à sequência alvo complementar de acordo com o equilíbrio termodinâmico (T_m entre o iniciador e o alvo específico = 65°C). O iniciador de laço hibridizado ao alvo mutado específico é então estendido pela polimerase e a amplificação pode proceder adicionalmente. Como característica adicional, o iniciador de laço específico para a mutação JAK2 G→T apresenta uma T_m com a sequência alvo selvagem (59°C) menor que com a estrutura intramolecular de grampo de cabelo (65°C). Assim, numa amostra contendo a sequência JAK2 selvagem, tal diferença em valores T_m resulta num auto-sequestro do iniciador de laço modificado que prefere se dobrar na estrutura de grampo de cabelo que formar um duplex com o alvo não específico, uma vez que as forças intramoleculares são maiores que as intermoleculares.

Para aumentar ainda mais a capacidade de discriminação do sistema LAMP baseado no iniciador haste-laço seletivo, foi adicionado à mistura de reação um ácido nucleico peptídico (PNA).

Os PNAs são oligonucleotídeos não extensíveis e não deslocáveis em que a cadeia principal de ribose-fosfato é substituída por unidades (2-aminoetil)-glicina ligadas por ligações amida. Cada base emparelhada DNA/PNA contribui mais com a estabilidade da estrutura duplex que o pareamento de bases DNA/DNA regular. Portanto, uma única incompatibilidade num duplex PNA/DNA resulta numa diferença significativa em T_m . Uma sonda PNA completamente complementar à sequência do gene JAK2 selvagem evita a hibridização e extensão do iniciador haste-laço específico a mutante, suprimindo a amplificação não específica da sequência selvagem. Na presença de uma única incompatibilidade, o PNA não inibe a hibridização do iniciador de laço, que leva à amplificação. Portanto, o PNA pode ser usado para bloquear seletivamente a sequência selvagem presente na amostra.

O PNA é projetado para ser complementar à região do laço

compreendida entre B2 e B1c apresentando o nucleotídeo G selvagem. Ele forma um duplex estável somente com a sequência complementar selvagem ($T_m = 65,7^\circ\text{C}$), evitando a hibridização e extensão do iniciador haste-laço específico a mutante e portanto suprimindo a amplificação da sequência selvagem. O PNA não hibridiza à sequência JAK2 mutada por causa da afinidade menor ($T_m = 56^\circ\text{C}$).

A eficiência do PNA como grampo de amplificação selvagem foi avaliada comparando-se o desempenho de reações de amplificação executadas com e sem o PNA em amostras 7×10^3 cps/ μL de plasmídeo selvagem e mutante (Fig. 9). A análise da curva de amplificação revelou que a presença do PNA levou a um atraso de uma hora na amplificação não específica do plasmídeo selvagem pelo iniciador haste-laço específico a mutante e a um atraso de 5 minutos na amplificação específica do plasmídeo mutante. Reciprocamente, na ausência do PNA a amplificação não específica do plasmídeo selvagem pelo iniciador haste-laço específico a mutante ocorreu com somente 5 minutos de atraso em comparação com a sequência alvo específica mutada. O atraso observado na amplificação selvagem é explicado pela formação de um duplex estável entre o PNA e a sequência selvagem complementar, evitando assim a hibridização não específica e extensão do iniciador haste-laço específico a mutante.

Para determinar a seletividade deste formato de ensaio LAMP, as reações de amplificação foram realizadas em diluições seriadas de plasmídeo mutante em fundo selvagem (Fig. 10). Uma vez que a seletividade alcançada é de menos que 0,01% (35 cópias de plasmídeo mutante total em 34965 cópias de plasmídeo selvagem), a presente abordagem exibe uma seletividade maior que a dos ensaios descritos no estado da técnica, cerca de 3 logs maior com relação ao sequenciamento direto, RFLP e pirosequenciamento, e cerca de 2 logs maior com relação a ARMS, técnicas em tempo real e análise de curva de fusão de DNA.

Em resumo, o presente formato de ensaio LAMP representa um aperfeiçoamento significativo com relação às estratégias previamente descritas neste documento e aos métodos de detecção ilustrados na literatura: i) a amplificação não específica da amostra selvagem (350000 cps plasmídeo selvagem) é retardada em cerca de uma hora, ii) a amplificação específica do alvo mutante é detectada até 0,01% de sequências mutantes em fundo selvagem (35 cópias de plasmídeo mutante total em 349965 cópias de plasmídeo selvagem), iii) a seletividade do ensaio é cerca de 2 logs maior que a seletividade de outras abordagens descritas na literatura, iv) a linearidade do ensaio é até 0,1% de sequências mutantes (350 cópias de plasmídeo mutante em 349650 cópias de plasmídeo selvagem), permitindo assim a detecção e quantificação de uma baixa percentagem de alelos mutantes num grande excesso de DNA selvagem.

Exemplo 5 – LAMP “iniciador haste-laço com PNA” em amostras clínicas:

comparação com ARMs

Um total de 29 amostras de DNA extraídas de pacientes na Ospedali Riuniti di Bergamo foram analisadas usando a estratégia JAK2 LAMP “iniciador haste-laço com PNA”, como descrito no Exemplo 4. Os resultados obtidos foram comparados com os dados obtidos no Hospital usando a tecnologia ARMs. A ARMs explora o fato que os iniciadores oligonucleotídeos devem estar perfeitamente pareados nas suas extremidades 3' para que uma DNA polimerase estenda estes iniciadores durante PCR. Projetando-se os iniciadores oligonucleotídeos que correspondam à extremidade 3' da mutação pontual JAK2 específica, ARMs pode distinguir entre os alelos selvagem e mutante.

Como mostrado na Tabela 5, a amostra LAMP detectou como positiva todas as amostras previamente diagnosticadas como tal por ARMs. Dentre as 15 amostras que resultaram negativas por ARMs, 11 foram diagnosticadas como negativa por LAMP e 4 como baixo positivo. Para excluir que estas 4 amostras discordantes fossem falsos positivos no ensaio LAMP e para confirmar que o diagnóstico de mutação era devido a maior seletividade do método LAMP implementado, as amostras discordantes foram testadas usando um terceiro ensaio. Tal ensaio foi baseado na amplificação da região JAK2 de interesse por PCR na presença da molécula PNA complementar ao alvo selvagem com a finalidade de enriquecer a base mutada, se presente, pela supressão da amplificação da sequência selvagem via grameamento PNA. Se um enriquecimento de amostra de 20% do alelo mutante fosse obtido, a sequência alterada poderia ser detectada por uma abordagem de sequenciamento direto. Os iniciadores (GA231 *forward* e GA232 *reverse*) e o PNA eram como descrito previamente (Exemplo 4). A amplificação foi realizada em tampão de reação 1x contendo 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM dNTPs, 500 nM de iniciadores *forward* e *reverse*, 1,5 M de PNA e 0,025 U de Taq Gold num volume final de 45 µL. Um volume de 5 µL de sequência alvo (20 ng/µL) foi adicionado à mistura de reação e a solução foi incubada num termociclo, seguindo um programa térmico consistindo de 10 min. A 95°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 40 s a 62°C, 30 s a 58°C e 30 s a 72°C e terminando com 10 min a 72°C para a extensão final. As quatro amostras clínicas discordantes, uma amostra controle sem alvo e um controle positivo e um negativo contendo respectivamente o alvo plasmídeo mutante e selvagem foram testados em duplicata. Após a reação, os produtos de amplificação foram separados num gel de agarose e visualizados usando EtBr. Nenhuma amplificação foi detectada para o controle sem alvo; uma banda fraca estava visível no gel de agarose para o controle negativo e uma forte banda para o controle positivo. Os produtos PCR das quatro amostras clínicas foram subsequentemente analisados via sequenciamento automático, todos mostrando um pico duplo na posição

1849 a partir do códon inicial ATG (GeneBank no. NM_004972), correspondendo respectivamente à base Guanina (selvagem) e à base Timina (mutada). Estes resultados confirmaram que as quatro amostras discordantes foram corretamente diagnosticadas como portando a substituição de bases G→T por LAMP, enquanto ARMs detectou-as como falsos negativos.

5

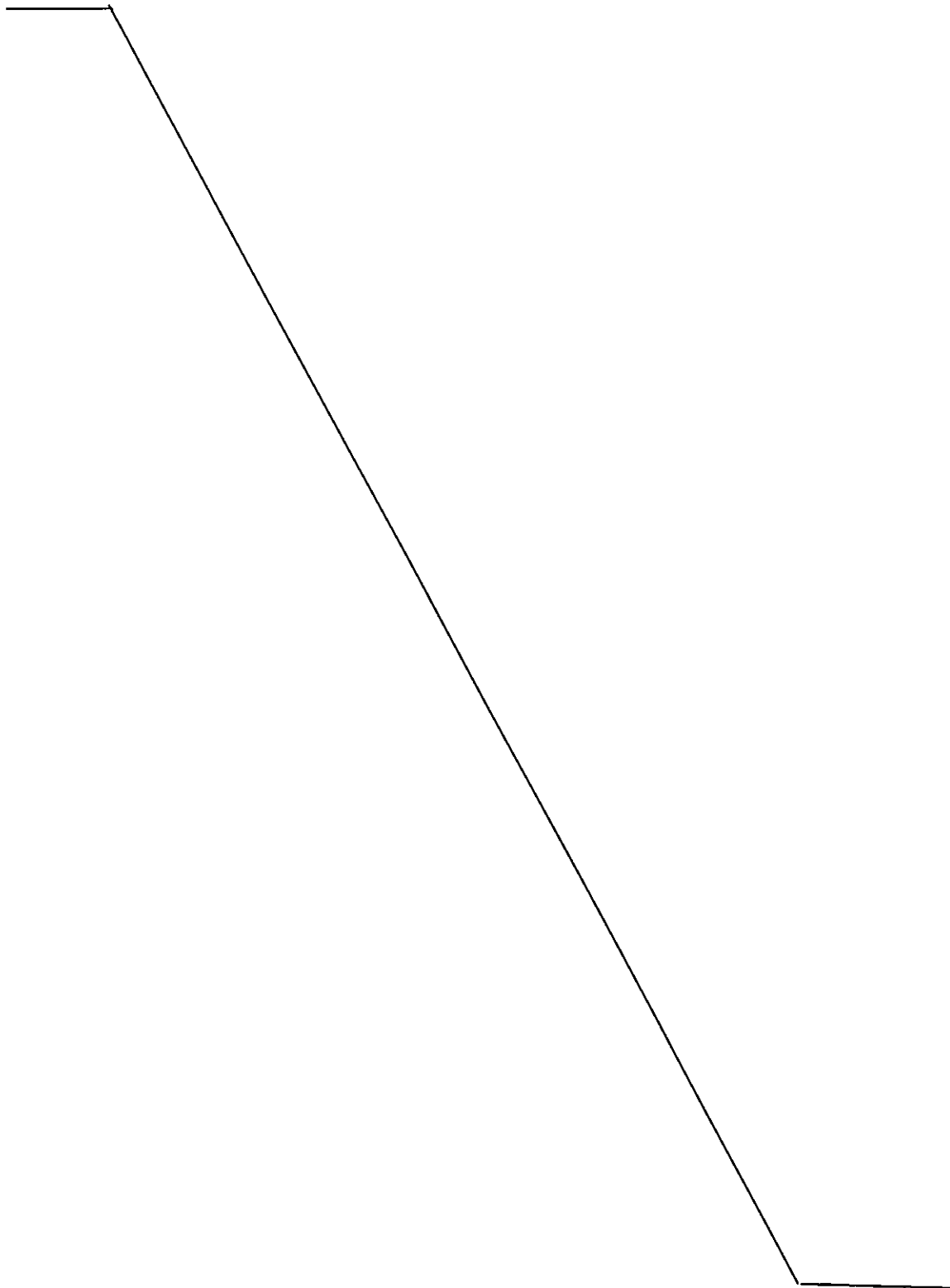


Tabela 5

amostra	ARMs	LAMP iniciador de laço auto-pareado com PNA
PIGI	-	+(baixo)
PEVI	-	-
ACGI	+	+
BEMA	+	+
BILU	+	+
PAAN	-	+(baixo)
BOMA	-	-
OLIN	-	-
PALO	+	+
BOED	+	+
SAGE	+	+
BAGI	+	+
FEGI	+	+
BEAL	+	+
TALU	+	+
CAPI	+	+
SAGI	+	+
SAVGI	+	+
PECA	+	+
SCLU	-	-
BILU2	-	+(baixo)
NAGI	-	-
MAST	-	-
COSA	-	-
GUAL	-	-
COCL	-	-
PEMG	-	-
SABA	-	+(baixo)
ANPI	-	-

Exemplo 6 – Estratégia LAMP modificado por JAK2 fluorescente “iniciador haste-laço”

Reagentes

- 5 Os plasmídeos JAK2 foram providos pelo fornecedor GeneArt (Regensburg, Alemanha) e continham a sequência JAK2 selvagem ou mutante. Em detalhes:
- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base G no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo selv";
 - 10 - Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base T no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo mut".
- Iniciadores: sintetizados pelo fornecedor Eurofins MWG Operon, chamados de "iniciadores":

GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

5 GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

GA236 (LB) 5' TAMRA-TGTCTCCACTGGAGTATGTTCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

a base sublinhada corresponde ao nucleotídeo mutado na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972). A base Timina em negrito na extremidade 5' não tem uma base complementar na sequência alvo. Ela foi adicionada para separar o fluoróforo da base Guanina a jusante, o que tem um efeito extintor.

GA235 (LF) 5'-5'GTCTCCACTGGAGTATGTGTCTGTGGAGAddC 3' (SEQ ID NO: 7)

a base sublinhada corresponde ao nucleotídeo mutado na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972); ddC significa didesoxi-citosina não extensível.

Tampão de reação: 100 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 40 mM MgSO₄, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% Tween ("buffer 5x")

mistura 25 mM dNTPs (Fermentas) ("dNTPs")

20 polimerase Bst de fragmentos grandes 8 U/μL (New England Biolabs) ("polimerase")

água apirogênica estéril (SALF Spa) ("ddw")

Procedimento

Preparação da amostra

25 Estocar os iniciadores em alíquotas. É melhor estocar soluções a -20°C, enquanto diluições de trabalho devem ser armazenadas a 4°C.

Preparar a mistura de reação como segue: 0,2 μM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 μM de iniciadores internos (FIP e BIP), 0,8 μM de iniciador de laço auto pareado fluorescente específico para JAK2 mutante (LB), 0,8 μM de iniciador de laço auto pareado não extensível para JAK2 selvagem (LF), solução tampão 1x, 1,4 mM de mistura dNTPs, 8 U de polimerase Bst. O volume final da mistura de reação deve ser de 4/5 do volume de reação total (i.e. 20 μL de mistura de reação + 5 μL de amostra). Manter sempre os reagentes no gelo. Preparar a mistura para pelo menos 23 amostras, compreendendo 3 controles negativos (100% de plasmídeo selvagem, 7 x 10³ cps/μL), 18 controles positivos (3 amostras 100% de plasmídeo mutante, 3 amostras 1% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,5% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,1% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,05% de plasmídeo mutante diluído

em plasmídeo selvagem, 3 amostras 0,01% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem – quantidade total de DNA 7×10^3 cps/ μ L), um controle sem alvo.

Tabela 6 – composição da mistura de amostras

Tubo de amostra	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-19
Alvo a ser adicionado (5 μ L)	plasmídeo selv 7×10^3 cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10^3 cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10^3 cps/ μ L, plasmídeo selv $6,93 \times 10^3$ cps/ μ L	plasmídeo mut $3,5 \times 10^3$ cps/ μ L, plasmídeo selv $6,965 \times 10^3$ cps/ μ L	plasmídeo mut 7 cps/ μ L, plasmídeo selv $6,993 \times 10^3$ cps/ μ L	plasmídeo mut 3,5 cps/ μ L, plasmídeo selv $6,996 \times 10^3$ cps/ μ L
GA231 100 μ M	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
GA232 100 μ M	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
GA233 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GA234 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
GA235 100 μ M	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
GA236 100 μ M	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
LAMP Buffer 5x	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Bst polimerase 8 U/ μ L	1	1	1	1	1	1
dNTPs 25 mM	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
ddw para 20 μ L	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8

5 Dispensar 20 μ L da mistura de reação na tira. Manter a tira no gelo. Sempre manter a mistura de reação no gelo de agora em diante.

Preparar diluições em série do alvo ("diluições alvo") a partir da solução enviada (plasmídeo selv e plasmídeo mut). A solução enviada é uma solução 7×10^{10} cópias/ μ L. Diluir inicialmente o plasmídeo mutante a 7×10^4 cópias/ μ L em Tris 10 mM, então diluir em série o plasmídeo mutante em plasmídeo selvagem para obter as seguintes concentrações de sequências mutantes em fundo selvagem: 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% (quantidade total por tubo, 7×10^3 cps/ μ L).

Adicionar 5 μ L de diluições alvo às tiras, em triplicata. Adicionar 5 μ L das diluições alvo partindo da amostra menos concentrada para a mais concentrada. Fechar todos os tubos.

15 Reação

A reação segue o esquema de método da figura 4.

Programar o turbidímetro (Teramecs) para incubação a temperatura constante e monitoração em tempo real para turbidez, a fim de obter uma

temperatura de reação constante de 65°C por 1 hora.

Colocar as tiras no instrumento imediatamente antes de iniciar os programas. Iniciar o programa.

Análise de dados

5 O iniciador de laço auto pareado fluorescente na reação produz um sinal fluorescente uma vez que seja excitado por uma emissão de luz de comprimento de onda apropriado. Quando a reação LAMP ocorre, o iniciador de laço auto pareado fluorescente hibridiza com a sequência alvo complementar sendo consequentemente incorporado nos produtos de amplificação. O iniciador de laço auto
10 pareado fluorescente é projetado para ser complementar a uma sequência contendo pelo menos um nucleotídeo Guanina próximo da extremidade 5'. A base Guanina pode absorver o comprimento de onda emitido pelo fluoróforo (TAMRA, no nosso caso), causando a extinção do sinal fluorescente. Neste caso a detecção da amplificação da sequência alvo durante a reação LAMP é baseada na medida da diminuição do sinal
15 fluorescente a fim de encontrar um tempo limiar para cada amostra sob análise. O tempo limiar é o minuto no qual o sinal de fluorescência da reação atinge 50% de extinção. Para cada amostra, o tempo limiar é correlacionado com o log de cópias de DNA/μL.

Resultados

A presente abordagem consiste na amplificação seletiva de
20 uma sequência mutante baseada num projeto particular de iniciador de laço resultando na hibridização seletiva de tal iniciador de laço ao haleter formado a partir da sequência mutante (Fig. 4). Foi desenvolvido um conjunto universal (insensível a mutantes) de iniciadores incluindo os oligonucleotídeos F3, B3, FIP e BIP para obter uma estrutura haltere apresentando a mutação putativa na região do laço compreendida entre B1 e B2.
25 Não foram detectadas diferenças principais ao realizar tais experimentos em sequências alternativas contendo o nucleotídeo putativo mutado na região do laço em B2 ou entre B2 e B1c. Foi incluído no conjunto de iniciadores um iniciador de laço particular apresentando uma região de sequência de 8 bases na sua extremidade 5' complementar a sua própria sequência na extremidade 3'. Consequentemente, este iniciador de laço
30 especial forma uma estrutura intramolecular de grampo de cabelo que está em equilíbrio com sua forma aberta na temperatura de reação (65°C).

Quando a sequência JAK2 mutada está presente na amostra, tal iniciador de laço modificado quebra sua estrutura interna para se hibridizar à sequência alvo complementar de acordo com o equilíbrio termodinâmico (T_m entre o
35 iniciador e o alvo específico = 65°C). O iniciador de laço hibridizado ao alvo mutado específico é então estendido pela polimerase e a amplificação pode proceder adicionalmente. Como característica adicional, o iniciador de laço específico para a

mutação JAK2 G→T apresenta uma T_m com a sequência alvo selvagem (59°C) menor que com a estrutura intramolecular de grampo de cabelo (65°C). Assim, numa amostra contendo a sequência JAK2 selvagem, tal diferença em valores T_m resulta num auto-sequestro do iniciador de laço modificado que prefere se dobrar na estrutura de grampo de cabelo que formar um duplex com o alvo não específico, uma vez que as forças intramoleculares são maiores que as intermoleculares.

Para limitar a competição deste iniciador de laço por sequências selvagens provavelmente presentes em grande excesso na amostra clínica, foi incluído no arranjo de reação um segundo iniciador de laço com estrutura análoga e contendo uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência JAK2 selvagem, i.e. Com uma base G na posição 1849 a partir do códon de início (GeneBank no. NM_004972).

A extremidade 3' deste iniciador de laço "competidor" é tornada não extensível por uma modificação (3' dideoxi). A tarefa deste competidor é "silenciar" a sequência selvagem, permitindo assim que o iniciador específico a mutante encontre seu alvo.

Quando o iniciador "competidor" reconhece a sequência selvagem complementar, ele quebra sua estrutura intramolecular para hibridizar ao alvo selvagem, de acordo com a maior afinidade (T_m da duplex formada pelo alvo selvagem e iniciador de laço modificado selvagem = 67°C). O iniciador de laço hibridizado ao alvo selvagem não é extensível, resultando em nenhuma amplificação de sequências selvagens. Uma vez que a reação é conduzida a temperatura constante, o iniciador haste-laço específico a selvagem fica anexado às sequências selvagens evitando assim a hibridização não específica do iniciador de laço mutante.

Em contraste ao iniciador de laço específico a mutante, o iniciador "competidor" apresenta uma T_m com a sequência alvo mutante (62°C) menor que a estrutura intramolecular de grampo de cabelo formada com ele mesmo (65°C). Assim, as forças intramoleculares maiores comparadas com as intermoleculares causam o auto-sequestro do iniciador haste-laço modificado que prefere se dobrar na estrutura grampo de cabelo em vez de formar um duplex com a sequência alvo mutante.

Para seguir a reação num instrumento em tempo real, a extremidade 5' do iniciador haste-laço específico a mutante foi marcada com um corante FAM. Para evitar a ligação do fluoróforo à base Guanina presente na extremidade 5' do iniciador de laço modificado, que tem um efeito extintor, foi adicionada uma base Timina à extremidade do oligonucleotídeo. O iniciador modificado-marcado, quando presente em solução, emite um sinal fluorescente se excitado com luz de comprimento de onda apropriado. Quando a reação LAMP inicia e continua, o iniciador haste-laço fluorescente

é incorporado nos produtos da amplificação. As bases Guanina presentes na sequência de nucleotídeos complementares podem absorver o comprimento de onda emitido pelo fluoróforo, causando uma extinção detectável do sinal fluorescente em tempo real. Portanto, a acumulação de produtos de amplificação pode ser monitorada por toda a reação LAMP medindo-se a diminuição no sinal fluorescente causada por este "efeito de extinção".

Exemplo 7 – Reação LAMP de controle

Reagentes

Os plasmídeos JAK2 foram providos pelo fornecedor GeneArt (Regensburg, Alemanha) e continham a sequência JAK2 selvagem ou mutante. Em detalhes:

- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base G no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo selv";

- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base T no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo mut".

Iniciadores: sintetizados pelo fornecedor Eurofins MWG Operon, chamados de "iniciadores":

GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

Tampão de reação: 100 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 40 mM MgSO₄, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% Tween ("buffer 5x")

mistura 25 mM dNTPs (Fermentas) ("dNTPs")

polimerase Bst de fragmentos grandes 8 U/μL (New England Biolabs) ("polimerase")

água apirrogênica estéril (SALF Spa) ("ddw")

Procedimento

Preparação da amostra

Estocar os iniciadores em alíquotas. É melhor estocar soluções a -20°C, enquanto diluições de trabalho devem ser armazenadas a 4°C.

Preparar a mistura de reação como segue: 0,2 μM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 μM de iniciadores internos (FIP e BIP), solução tampão 1x, 1,4 mM de mistura dNTPs, 8 U de polimerase Bst. O volume final da mistura de reação deve ser de 4/5 do volume de reação total (i.e. 20 μL de mistura de reação + 5 μL de amostra). Manter sempre os reagentes no gelo. Preparar a mistura para pelo

menos 23 amostras, compreendendo 3 controles negativos (100% de plasmídeo selvagem, 7×10^3 cps/ μ L), 9 controles positivos (3 amostras 100% de plasmídeo mutante, 3 amostras 10% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 1% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem), um controle sem alvo.

5

Tabela 7 – composição da mistura de amostras

Tubo de amostra	1-3	4-6	7-9	10-12
Alvo a ser adicionado (5 μ L)	plasmídeo selv 7×10^3 cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10^3 cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10^2 cps/ μ L, plasmídeo selv $6,3 \times 10^2$ cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10^1 cps/ μ L, plasmídeo selv $6,93 \times 10^2$ cps/ μ L
GA231 100 μ M	0.05	0.05	0.05	0.05
GA232 100 μ M	0.05	0.05	0.05	0.05
GA233 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4
GA234 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4
LAMP Buffer 5x	2.5	2.5	2.5	2.5
Bst polimerase 8 U/ μ L	1	1	1	1
dNTPs 25 mM	1.4	1.4	1.4	1.4
ddw para 20 μ L	13.8	13.8	13.8	13.8

Dispensar 20 μ L da mistura de reação na tira. Manter a tira no gelo. Sempre manter a mistura de reação no gelo de agora em diante.

Preparar diluições em série do alvo ("diluições alvo") a partir da solução enviada (plasmídeo selv e plasmídeo mut). A solução enviada é uma solução 7×10^{10} cópias/ μ L. Diluir inicialmente o plasmídeo mutante a 7×10^4 cópias/ μ L em Tris 10 mM, então diluir em série o plasmídeo mutante em plasmídeo selvagem para obter as seguintes concentrações de sequências mutantes em fundo selvagem: 10%, 1%(quantidade total por tubo, 7×10^3 cps/ μ L) .

Adicionar 5 μ L de diluições alvo às tiras, em triplicata. Adicionar 5 μ L das diluições alvo partindo da amostra menos concentrada para a mais concentrada. Fechar todos os tubos.

Reação

A reação segue o esquema de método da figura 11.

Programar o turbidímetro (Teramecs) para incubação a temperatura constante e monitoração em tempo real para turbidez, a fim de obter uma temperatura de reação constante de 65°C por 1 hora.

Colocar as tiras no instrumento imediatamente antes de iniciar os programas. Iniciar o programa.

Análise de dados

Analisar a variação de absorbância em termos de a.u. (unidades arbitrárias de absorbância) para encontrar o tempo limiar para cada amostra analisada. O tempo limiar é o minuto em que a absorbância da amostra, após subtração da linha base, atinge o valor de unidade arbitrária que representa o limiar (neste caso 0,1 a.u.). O tempo limiar atingido por cada amostra é correlacionado com seu log de cópias de DNA/ μ L.

Resultados

A presente abordagem consiste numa amplificação insensível a mutante da sequência do gene JAK2 usando os iniciadores F3, B3, FIP e BIP (Fig. 11). Foi empregado o mesmo conjunto de iniciadores descrito no Exemplo 4, excluindo o PNA e o iniciador haste-laço específico a mutante da mistura de reação. A detecção de amplificação de sequência alvo no "ensaio LAMP de controle" é indicativa de parâmetros de qualidade diferente tais como a correta correspondência de bases de iniciadores ao gabarito, as condições de extensão eficiente e a ausência de inibidores na solução de reação. Reciprocamente, a ausência ou atraso da amplificação da amostra de ácido nucleico no "ensaio LAMP de controle" destaca problemas no arranjo da reação (i.e., composição do tampão, temperatura, qualidade dos iniciadores, etc.) ou a presença de um inibidor na mistura de reação.

Para avaliar tal método de ensaio de controle, um painel de amostra clínica foi analisado em duplicata usando ambos ensaio LAMP específico para detectar a mutação G→T (Exemplo 4) e o "ensaio LAMP de controle". Quando a sequência de ácido nucleico é amplificada em ambos ensaios, é obtido um resultado validado e a amostra é considerada contendo a mutação V617F. Quando a sequência de ácido nucleico é amplificada pelo "ensaio LAMP de controle" e não pela "estratégia LAMP modificada por JAK2 iniciador haste-laço com PNA", novamente é obtido um resultado validado e a amostra é diagnosticada como uma amostra JAK2 selvagem. No caso de nenhuma amplificação de sequência alvo no "ensaio LAMP de controle", a análise deve ser considerada inválida.

A avaliação do "ensaio LAMP de controle" foi realizada em amostras de DNA de plasmídeo contendo respectivamente 7×10^3 cps/ μ L de plasmídeo selvagem e mutante e em amostras contendo 10% e 1% de plasmídeo mutante em fundo selvagem, 35000 cópias no total (Fig. 12). Todas as amostras de ácido nucleico testadas exibiram eficiência de amplificação comparável indicando assim a ausência de inibidores de reação.

Exemplo 8 – Estimativa da quantidade de sequências JAK2 mutantes numa amostra usando o ensaio LAMP "iniciador haste-laço com PNA"

Reagentes

Os plasmídeos JAK2 foram providos pelo fornecedor GeneArt (Regensburg, Alemanha) e continham a sequência JAK2 selvagem ou mutante. Em detalhes:

- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base G no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo selv";
- Plasmídeos JAK2 cuja inserção corresponde à sequência 93249-93731 de SEQ ID NO:2, incluindo uma base T no nucleotídeo 93526, chamado de "plasmídeo mut".

Iniciadores: sintetizados pelo fornecedor Eurofins MWG Operon, chamados de "iniciadores":

GA231 (F3) 5' GCATCTTTATTATGGCAGAGAG 3' (SEQ ID NO: 3)

GA232 (B3) 5' TGCTCTGAGAAAGGCATTA 3' (SEQ ID NO: 4)

GA233 (FIP) 5' GCTGCTTCAAAGAAAGACTAAGGAAATGGACAACAGTCAAACAAC 3' (SEQ ID NO: 5)

GA234 (BIP) 5' GCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTAAATTAGCCTGTAGTTTTACTTACTCTC 3' (SEQ ID NO: 6)

GA236 (LB) 5' GTCTCCACTGGAGTATGTITCTGTGGAGAC 3' (SEQ ID NO: 8)

a base sublinhada corresponde ao nucleotídeo mutado na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972).

PNA: sintetizado por Eurogentec, chamado de PNA GM43

$\text{NH}_2\text{GAGTATGTG}\underline{\text{TCTGTGGA}}^{\text{COOH}}$ (SEQ ID NO: 9).

A base sublinhada corresponde ao nucleotídeo selvagem na posição 1849 a partir do códon de início ATG na sequência de codificação JAK2 (GeneBank no. NM_004972).

Tampão de reação: 100 mM de Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 40 mM MgSO_4 , 50 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5% Tween ("buffer 5x")

mistura 25 mM dNTPs (Fermentas) ("dNTPs")

polimerase Bst de fragmentos grandes 8 U/ μL (New England Biolabs) ("polimerase")

água apirogênica estéril (SALF Spa) ("ddw")

Procedimento

Preparação da amostra

Estocar os iniciadores em aliquotas. É melhor estocar soluções a -20°C , enquanto diluições de trabalho devem ser armazenadas a 4°C .

Preparar a mistura de reação como segue: 0,2 μM de iniciadores externos (F3 e B3), 1,6 μM de iniciadores internos (FIP e BIP), 0,8 μM de iniciador de laço auto pareado específico a JAK2 mutante (LB), 0,8 μM de PNA, solução tampão 1x, 1,4 mM de mistura dNTPs, 8 U de polimerase Bst. O volume final da mistura de reação deve ser de 4/5 do volume de reação total (i.e. 20 μL de mistura de reação + 5 μL de amostra). Manter sempre os reagentes no gelo. Preparar a mistura para pelo

menos 23 amostras, compreendendo 3 controles negativos (100% de plasmídeo selvagem, 7×10^3 cps/ μ L), 9 controles calibradores positivos (3 amostras 100% de plasmídeo mutante, 3 amostras 10% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem, 3 amostras 1% de plasmídeo mutante diluído em plasmídeo selvagem), um controle sem alvo.

Tabela 8 – composição da mistura de amostras

Tubo de amostra	1-3	4-6	7-9	10-12
Alvo a ser adicionado (5 μ L)	plasmídeo selv 7×10^3 cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10^3 cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10^2 cps/ μ L, plasmídeo selv $6,3 \times 10^3$ cps/ μ L	plasmídeo mut 7×10 cps/ μ L, plasmídeo selv $6,93 \times 10^3$ cps/ μ L
GA231 100 μ M	0.05	0.05	0.05	0.05
GA232 100 μ M	0.05	0.05	0.05	0.05
GA233 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4
GA234 100 μ M	0.4	0.4	0.4	0.4
PNA 100 μ M	0.2	0.2	0.2	0.2
GA236 100 μ M	0.2	0.2	0.2	0.2
LAMP Buffer 10x	2.5	2.5	2.5	2.5
Bst polimerase 8 U/ μ L	1	1	1	1
dNTPs 25 mM	1.4	1.4	1.4	1.4
ddw para 20 μ L	13.8	13.8	13.8	13.8

Dispensar 20 μ L da mistura de reação na tira. Manter a tira no gelo. Sempre manter a mistura de reação no gelo de agora em diante.

Preparar diluições em série do alvo ("diluições alvo") a partir da solução enviada (plasmídeo selv e plasmídeo mut). A solução enviada é uma solução 7×10^{10} cópias/ μ L. Diluir inicialmente o plasmídeo mutante a 7×10^4 cópias/ μ L em Tris 10 mM, então diluir em série o plasmídeo mutante em plasmídeo selvagem para obter as seguintes concentrações de sequências mutantes em fundo selvagem: 10%, 1% (quantidade total por tubo, 7×10^3 cps/ μ L).

Adicionar 5 μ L de diluições alvo às tiras, em triplicata. Adicionar 5 μ L das diluições alvo partindo da amostra menos concentrada para a mais concentrada. Fechar todos os tubos.

Reação

A reação segue o esquema de método da figura 5.

Programar o turbidímetro (Teramecs) para incubação a temperatura constante e monitoração em tempo real para turbidez, a fim de obter uma temperatura de reação constante de 65°C por 1 hora.

Colocar as tiras no instrumento imediatamente antes de iniciar os programas. Iniciar o programa.

Análise de dados

Analisar a variação de absorbância em termos de a.u. (unidades arbitrárias de absorbância) para encontrar o tempo limiar para cada amostra analisada. O tempo limiar é o minuto em que a absorbância da amostra, após subtração da linha base, atinge o valor de unidade arbitrária que representa o limiar (neste caso 0,1 a.u.). O tempo limiar atingido por cada amostra é correlacionado com seu log de cópias de DNA/ μ L.

Resultados

Um subconjunto de pacientes são homozigotos para o alelo¹ JAK2 V617F. O mecanismo de homozigose resulta da recombinação mitótica e duplicação do alelo mutante, conhecida como dissomia uniparental adquirida¹. A heterozigose ou homozigose do alelo mutante JAK2 está correlacionada com a prognose, resultando assim na importância de determinar se a quantidade de cópias alélicas mutantes JAK2 na amostra é maior ou menor que 50%.

De acordo com a presente abordagem, as amostras desconhecidas são analisadas como não diluídas e diluídas 1:5 usando o ensaio LAMP "iniciador haste-laço com PNA" previamente descrito no Exemplo 4. Em adição, o arranjo do ensaio inclui três amostras calibradoras contendo respectivamente 100%, 10% e 1% de cópias de plasmídeo JAK2 mutante em fundo selvagem. Se a quantidade de sequências alvo JAK2 mutantes na amostra de ácido nucléico for maior que 50%, a amplificação em tempo real de dita sequência alvo é detectada num tempo entre os minutos limiares de amplificação do calibrador 100% e do calibrador 10% tanto no caso de amostras não diluídas (Fig. 13, painel A) e de amostras diluídas 1:5 (Fig. 13, painel B). Um desempenho de amplificação diferente é detectado para amostras de ácido nucléico contendo menos que 50% de quantidade de sequência JAK2 mutante uma vez que os fragmentos amplificados alvo nas amostras não diluídas são detectados mais cedo que no calibrador 10% (Figura 13, painel A) enquanto que o minuto limiar de amplificação nas amostras correspondentes diluídas 1:5 é medido num tempo entre o min(t) do calibrador 10% e o min(t) do calibrador 1% (Figura 13, painel B).

A presente abordagem foi testada realizando-se a reação LAMP "iniciador haste-laço com PNA" em amostras de controle (7×10^3 cps/ μ L de plasmídeo selvagem, 7×10^2 cps/ μ L de plasmídeo mutante em $6,3 \times 10^3$ cps/ μ L plasmídeo selvagem, 7×10 cps/ μ L de plasmídeo mutante em $6,93 \times 10^3$ cps/ μ L plasmídeo selvagem), em quatro amostras consistindo de misturas de plasmídeo JAK2 mutante em fundo selvagem em proporções maiores que 50% (respectivamente 60%,

70%, 80%, 90%) e em quatro amostras consistindo de misturas de plasmídeo JAK2 mutante em fundo selvagem na proporção de 50% ou menos (respectivamente 40%, 30%, 20%). Exceto pelos controles, todas as amostras foram analisadas como não diluídas (5 µL dos 7×10^3 cps/µL para cada reação) e diluída 1:5 em Tris-HCl 10 mM.

5 Para as amostras de teste contendo mais de 50% de cópias alélicas JAK2 mutantes e diluídas 1:5, a amplificação da sequência alvo foi detectada após a amplificação da sequência correspondente no calibrador 100% e antes do calibrador 10% (Figura 14). Para as amostras apresentando quantidade de 50% de cópias alélicas JAK2 mutantes e diluídas 1:5, a amplificação da sequência alvo foi
10 registrada no mesmo minuto limiar da amostra do calibrador 10% (Figura 15).

Para as amostras de teste contendo menos de 50% de cópias alélicas JAK2 mutantes e diluídas 1:5, a amplificação da sequência alvo foi detectada num minuto limiar intermediário entre o tempo de amplificação dos calibradores 10% e 1% (Figura 15).

15 Portanto, usando a presente abordagem é possível estimar se a quantidade de cópias alélicas mutantes JAK2 numa amostra de ácido nucléico é maior ou menor que 50%. Tal informação é clinicamente muito relevante uma vez que ela provê indicação sobre a heterozigose ou homozigose numa amostra o que por sua vez está correlacionado com a prognose da doença.

20 Referências

1. Levine, R. L. *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387–397 (2005).
2. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144–1148 (2005).
- 25 3. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054–1061 (2005).
4. Kralovics, R. *et al.* A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779–1790 (2005).
- 30 5. Nelson ME, Steensma DP: JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 2006, 47:177–194
6. James C, Ugo V, Le Couedic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes
35 polycythaemia vera. *Nature* 2005, 434:1144–1148
7. De Keersmaecker K, Cools J: Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. *Leukemia* 2005, 20:200–205

8. Kaushansky K: On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005, 105:4187–4190
9. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005, 365:1054–1061
10. Smith TA, Whelan J, Parry PJ: Detection of single-base mutations in a mixed population of cells: a comparison of SSCP and direct sequencing. *Genet Anal Tech Appl* 1992, 9:143–145
11. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N: Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006, 20:350–353
12. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA: the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989, 17:2503–2516
13. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106:2162–2168
14. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S, Tulliez M, Vainchenker W, Ugo V, Casadevall N: Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006, 20:350–353
15. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005, 365:1054–1061
16. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM: Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005, 19:1847–1849
17. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S, Beran M, Estey E, Kantarjian HM, Issa JP: JAK2 mutation 1849G_T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 2005, 106:3370–3373

18. Jones AV: Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005, 106: 2162-2168.
19. Steensma D: JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *Journal of Molecular Diagnostics* 2006, 8:397-411.
- 5 20. Iwasaki M. et al. *Genome Letters* 2003, 2:119-126.
21. Fukuta S. et al. *J Appl Genet* 2006, 47:303-308.
22. Ikeda S. et al. *Pathol. Intern.* 2007, 57: 594-599.

Reivindicações

1. "Método para identificar a presença de uma mutação pontual numa molécula ácido nucléico alvo em um fundo de moléculas de ácido nucléico selvagem", o método sendo **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

- 5 1) prover uma amostra de ácido nucléico
- 2) 10 contatar dita amostra de ácido nucléico, sob condições de reação apropriadas, com uma solução compreendendo uma mistura de oligonucleotídeos e uma DNA polimerase tendo atividade de deslocamento de fita sob condições de hibridização, em que dita mistura de oligonucleotídeos consiste de iniciadores adequados para amplificação isotérmica mediada por laço da região da molécula alvo de ácido nucléico incluindo a posição no ácido nucleico da mutação pontual a ser detectada, ditos iniciadores compreendendo:
 - i. um primeiro iniciador externo F3 e um segundo iniciador externo B3;
 - 15 ii. um primeiro iniciador interno FIP e um segundo iniciador interno BIP, em que FIP consiste de uma sequência F2 de ácido nucléico 3' e uma sequência F1c de ácido nucléico 5', e BIP consiste de uma sequência B2 de ácido nucléico 3' e uma sequência B1c de ácido nucléico 5', em que F2 é capaz de reconhecer e hibridizar-se a uma região da molécula alvo de ácido nucléico designada como F2c e B2 é capaz de reconhecer e hibridizar-se a uma região da molécula alvo de ácido nucléico designada como B2c, em que F2c e B2c são regiões diferentes situadas em fitas opostas da molécula alvo de ácido nucléico, em que B2c está a jusante da mutação pontual ou F2c está a montante da mutação pontual, e em que
 - 25 se B2c está a jusante da mutação pontual, então dita mutação pontual está situada na sequência F2c ou a jusante da sequência F2c e a montante da sequência F1c, ou
 - se F2c está a montante da mutação pontual, então dita mutação pontual está situada na sequência B2c ou a montante da sequência B2c e a jusante da sequência B1c.
 - 30 iii. um iniciador extensível mutante haste-laço compreendendo:
 - uma sequência de laço central capaz de reconhecer seletivamente e hibridizar-se a uma região da molécula alvo de ácido nucléico compreendendo a mutação pontual, de modo que a sequência de laço central seja capaz de reconhecer e hibridizar-se à molécula alvo de ácido nucléico somente se a mutação pontual estiver presente, e
 - 35 - uma sequência terminal 5' e uma sequência terminal 3' que são

complementares uma à outra para formar uma haste com a hibridização intramolecular,

a afinidade de hibridização da sequência do laço central à região da molécula alvo de ácido nucléico compreendendo a mutação pontual sendo maior que a afinidade de hibridização intramolecular da sequência 5' à sequência 3' de modo que, se o ponto de hibridização estiver presente, a sequência de laço central pareia e amplifica a região da molécula alvo de ácido nucléico compreendendo o ponto de mutação;

iv. uma porção não extensível que é capaz de seletivamente reconhecer e hibridizar-se às moléculas de ácido nucléico selvagem;

3) incubar a mistura resultante a temperatura constante;

4) detectar um sinal indicativo de amplificação da região da molécula alvo de ácido nucléico compreendendo a mutação pontual.

2. "Método", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato que a mutação pontual está situada na região entre a sequência F2c e a sequência F1c ou entre a sequência B2c e a sequência B1c.

3. "Método", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato que a mutação pontual está situada na sequência F2c ou na sequência B2c.

4. "Método", de acordo com as reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato que cada uma da sequência de extremidade 5' e sequência de extremidade 3' do iniciador extensível mutante haste-laço tem pelo menos 3 nucleotídeos de comprimento.

5. "Método", de acordo com as reivindicações de 1 a 4, **caracterizado** pelo fato que a porção não extensível é um ácido nucléico peptídico (PNA).

6. "Método", de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato que o PNA tem pelo menos 10 bases de comprimento.

7. "Método", de acordo com as reivindicações 5 ou 6, **caracterizado** pelo fato que a sequência de bases do PNA é tal que a temperatura de fusão da estrutura de dupla fita resultante da hibridização do PNA com a molécula alvo de ácido nucléico na ausência da mutação pontual ($T_m = X$) é maior que a temperatura de incubação e a temperatura de fusão da estrutura de dupla fita resultante da hibridização do PNA com a molécula alvo de ácido nucléico na presença da mutação pontual ($T_m = Y$) é menor que a temperatura de incubação, e adicionalmente pelo fato que X é pelo menos 5°C maior que Y .

8. "Método", de acordo com as reivindicações de 1 a 4,

caracterizado pelo fato que a porção não extensível é um iniciador não extensível haste-laço selvagem, compreendendo:

- uma sequência central de laço capaz de seletivamente reconhecer e hibridizar a uma região da molécula de ácido nucléico selvagem compreendendo a posição do ácido nucléico da mutação pontual a ser detectada;
 - uma sequência terminal 5' e uma sequência terminal 3' que são complementares uma à outra para formar uma haste com a hibridização intramolecular,
- a afinidade de hibridização da sequência do laço central à região da molécula de ácido nucléico selvagem compreendendo a posição do ácido nucléico da mutação pontual a ser detectada sendo maior que a afinidade de hibridização intramolecular da sequência 5' à sequência 3' de modo que a sequência de laço central pareie a região da molécula de ácido nucléico selvagem compreendendo a posição de ácido nucléico do ponto de mutação a ser detectado, bloqueando com isso a amplificação.

9. "Método", de acordo com as reivindicações de 1 a 8, **caracterizado** pelo fato que a DNA polimerase é escolhida dentre o grupo que consiste de grande fragmento de polimerase Bst, fragmentos Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago ϕ 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, Klenow, e quaisquer combinações deles.

10. "Método", de acordo com as reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato que a mutação pontual a ser detectada é a mutação g $\rightarrow$ t na posição 2343 de SEQ ID NO: 1.

11. "Método", de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato que o primeiro iniciador externo F3 consiste de SEQ ID NO: 3, o segundo iniciador externo B3 consiste de SEQ ID NO: 4, o primeiro iniciador interno FIP consiste de SEQ ID NO: 5, o segundo iniciador interno BIP consiste de SEQ ID NO: 6 e o iniciador extensível mutante haste-laço consiste de SEQ ID NO: 8.

12. "Método", de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de adicionalmente compreender uma porção não extensível que é um PNA tendo a seguinte sequência de bases:

NH₂- GAGTATGTGTCTGTGGA -COOH (SEQ ID NO:9), em que G é guanina, A é adenina, T é timina e C é citosina.

13. "Método", de acordo com as reivindicações de 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de adicionalmente compreender a etapa de avaliar se a mutação pontual está na forma homozigótica ou heterozigótica, pela comparação quantitativa do sinal indicativo de amplificação da região da molécula alvo de ácido nucléico compreendendo a mutação pontual obtida a partir da amostra com o dito sinal obtido a partir de pelo menos um calibrador.

14. "Método", de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato que o pelo menos um calibrador consiste de uma percentagem predeterminada (%) de moléculas alvo mutantes de ácido nucléico num fundo de moléculas de ácido nucléico selvagem, em que a dita percentagem predeterminada (%) é preferencialmente em torno de 10%.

15. "Conjunto de iniciadores", para detectar por amplificação isotérmica mediada por laço, a presença de uma mutação pontual numa molécula alvo de ácido nucléico num fundo de moléculas de ácido nucléico selvagem, o conjunto de iniciadores sendo **caracterizado** pelo fato de compreender:

- i. um primeiro iniciador externo F3 e um segundo iniciador externo B3;
- ii. um primeiro iniciador interno FIP e um segundo iniciador interno BIP, em que FIP consiste de uma sequência F2 de ácido nucléico 3' e uma sequência F1c de ácido nucléico 5', e BIP consiste de uma sequência B2 de ácido nucléico 3' e uma sequência B1c de ácido nucléico 5', em que F2 é complementar a uma região da molécula alvo de ácido nucléico designada como F2c e B2 é complementar a uma região da molécula alvo de ácido nucléico designada como B2c, em que F2c e B2c são regiões não sobrepostas situadas em fitas opostas da molécula alvo de ácido nucléico, em que B2c está a jusante da mutação pontual ou F2c está a montante da mutação pontual, e em que se B2c está a jusante da mutação pontual, então dita mutação pontual está situada na sequência F2c ou a jusante da sequência F2c e a montante da sequência F1c, ou se F2c está a montante da mutação pontual, então dita mutação pontual está situada na sequência B2c ou a montante da sequência B2c e a jusante da sequência B1c.
- iii. um iniciador extensível mutante haste-laço compreendendo:
 - uma sequência de laço central complementar a uma região da molécula alvo de ácido nucléico compreendendo a mutação pontual, e
 - uma sequência terminal 5' e uma sequência terminal 3' que são complementares uma à outra para formar uma haste com a hibridização intramolecular,
 a afinidade de hibridização da sequência do laço central à região da molécula alvo de ácido nucléico compreendendo a mutação pontual sendo maior que a afinidade de hibridização intramolecular da sequência 5' à sequência 3'.

16. "Conjunto", de acordo com a reivindicação 15,

caracterizado pelo fato que cada uma da sequência de extremidade 5' e sequência de extremidade 3' do iniciador extensível mutante haste-laço tem pelo menos 3 nucleotídeos de comprimento.

17. "Conjunto", de acordo com as reivindicações 15 ou 16, **caracterizado** pelo fato de adicionalmente compreender uma porção não extensível capaz de hibridizar com as moléculas de ácido nucléico selvagem.

18. "Conjunto", de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato que a porção não extensível é um ácido nucléico peptídico (PNA).

19. "Conjunto", de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato que o PNA tem pelo menos 10 bases de comprimento.

20. "Conjunto", de acordo com as reivindicações 15 ou 16, **caracterizado** pelo fato que a porção não extensível é um iniciador não extensível haste-laço, compreendendo:

- uma sequência central de laço complementar a uma região da molécula de ácido nucléico selvagem compreendendo a posição do ácido nucléico da mutação pontual a ser detectada;
 - uma sequência terminal 5' e uma sequência terminal 3' que são complementares uma à outra para formar uma haste com a hibridização intramolecular,
- a afinidade de hibridização da sequência do laço central à região da molécula de ácido nucléico selvagem compreendendo a posição do ácido nucléico da mutação pontual a ser detectada sendo maior que a afinidade de hibridização intramolecular da sequência 5' à sequência 3'.

21. "Conjunto", de acordo com as reivindicações de 15 a 20, **caracterizado** pelo fato que o primeiro iniciador externo F3 consiste de SEQ ID NO: 3, o segundo iniciador externo B3 consiste de SEQ ID NO: 4, o primeiro iniciador interno FIP consiste de SEQ ID NO: 5, o segundo iniciador interno BIP consiste de SEQ ID NO: 6 e o iniciador extensível mutante haste-laço consiste de SEQ ID NO: 8.

22. "Conjunto", de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de adicionalmente compreender uma porção não extensível que é um PNA tendo a seguinte sequência de bases:

NH₂- GAGTATGTGTCTGTGGA-COOH (SEQ ID NO:9), em que G é guanina, A é adenina, T é timina e C é citosina.

23. "Kit para detectar, por amplificação isotérmica mediada por laço, a presença de uma mutação pontual numa molécula alvo de ácido nucléico num fundo de moléculas de ácido nucléico selvagem", o kit sendo **caracterizado** pelo fato de compreender o conjunto de iniciadores de acordo com as reivindicações de 15 a 22 e

uma DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita.

24. "Kit", de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato que a DNA polimerase é escolhida dentre o grupo que consiste de grande fragmento de polimerase Bst, fragmentos Bca (exo-), Vent, Vent (exo-), Deep Vent, Deep Vent (exo-), fago ϕ 29, fago MS-2, Z-Taq, KOD, Klenow, e quaisquer combinações deles.

25. "Kit", de acordo com as reivindicações 23 ou 24, **caracterizado** pelo fato de adicionalmente compreender um ou mais calibradores.

26. "Oligonucleotídeo isolado", **caracterizado** pelo fato de ser escolhido dentre o grupo que consiste de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 8.

27. "Ácido nucléico peptídico (PNA)", de 6 a 24 bases de comprimento, **caracterizado** pelo fato de compreender uma sequência de bases que é capaz de hibridizar a uma região do DNA genômico JAK2 (SEQ ID NO: 2) incluindo a posição 93526 de SEQ ID NO: 2 ou a uma região do cDNA JAK2 (SEQ ID NO: 1) incluindo a posição 2342 de SEQ ID NO: 1.

28. "Ácido nucléico peptídico (PNA)", de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de compreender a seguinte sequência de bases:

NH₂- GAGTATGTGTCTGTGGA-COOH (SEQ ID NO:9), em que G é guanina, A é adenina, T é timina e C é citosina.

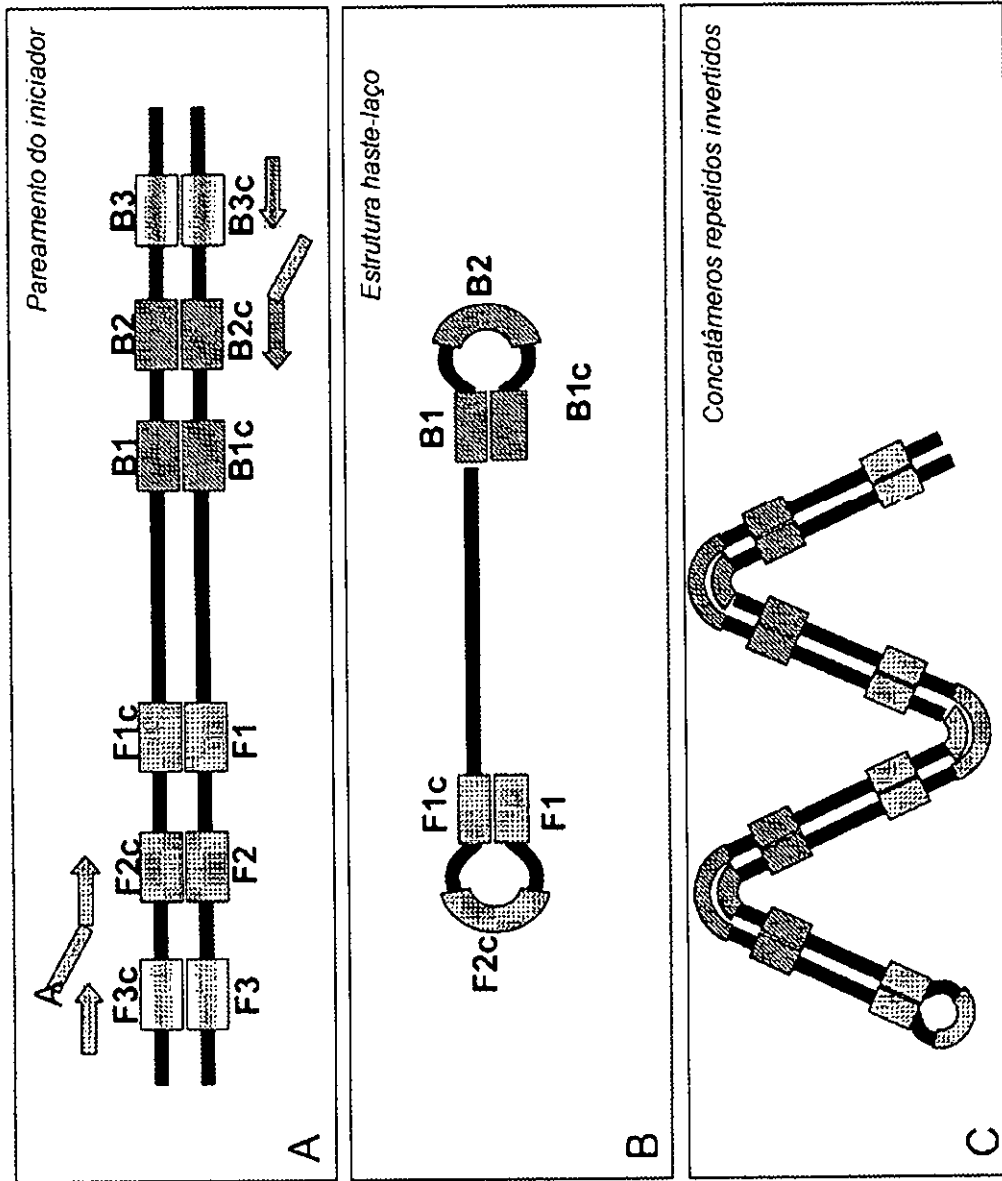


Fig.1

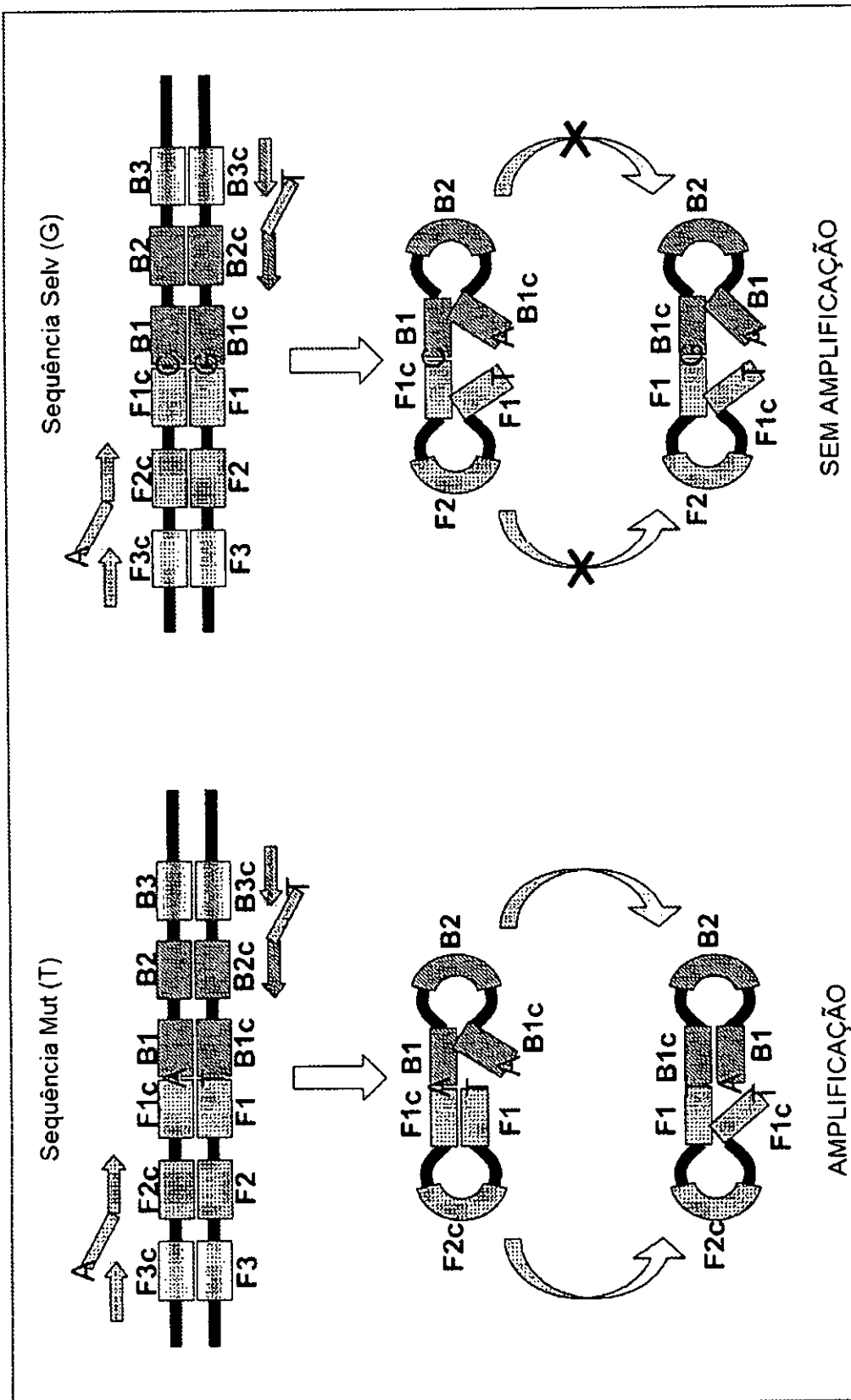


Fig.2

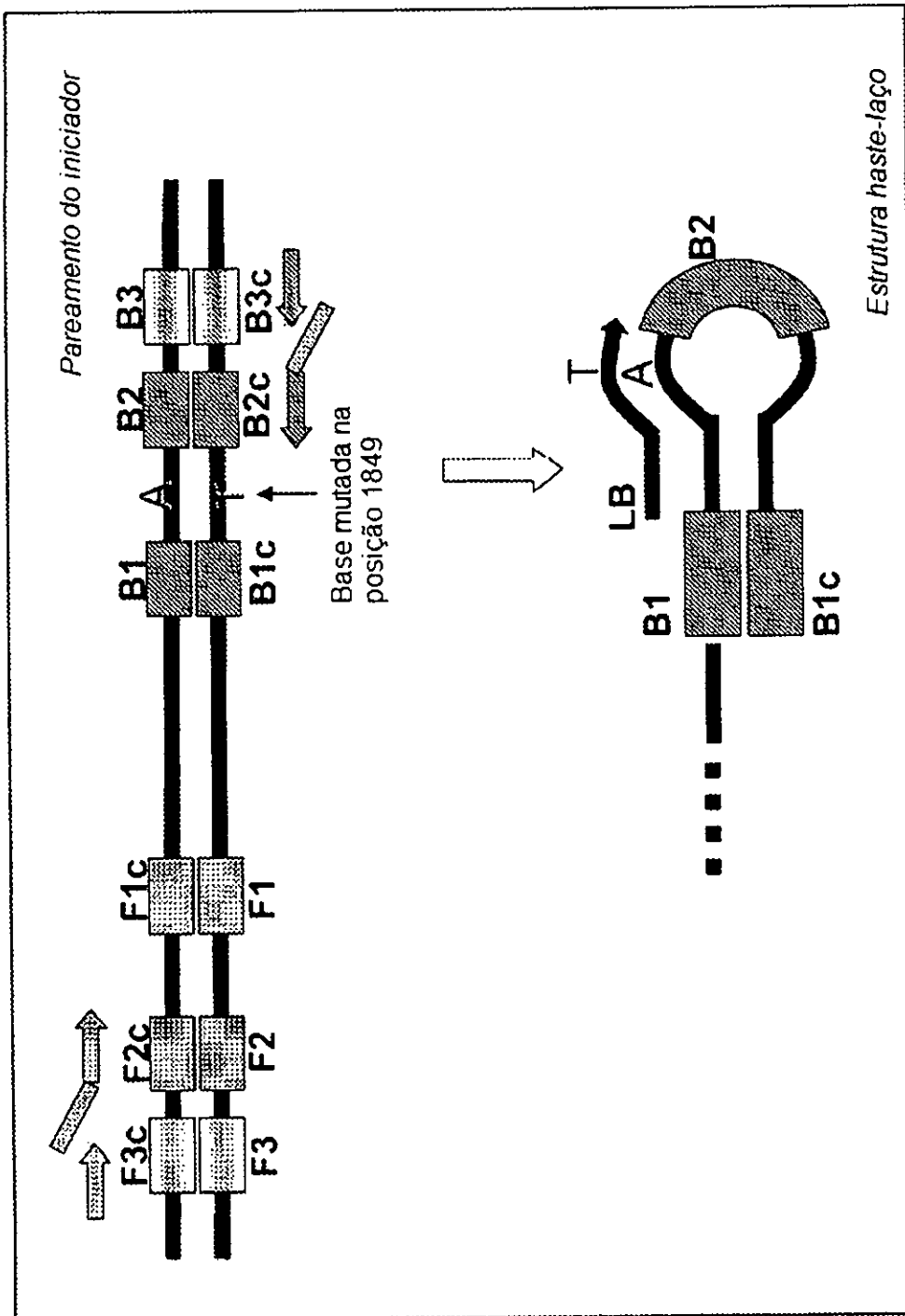


Fig.3

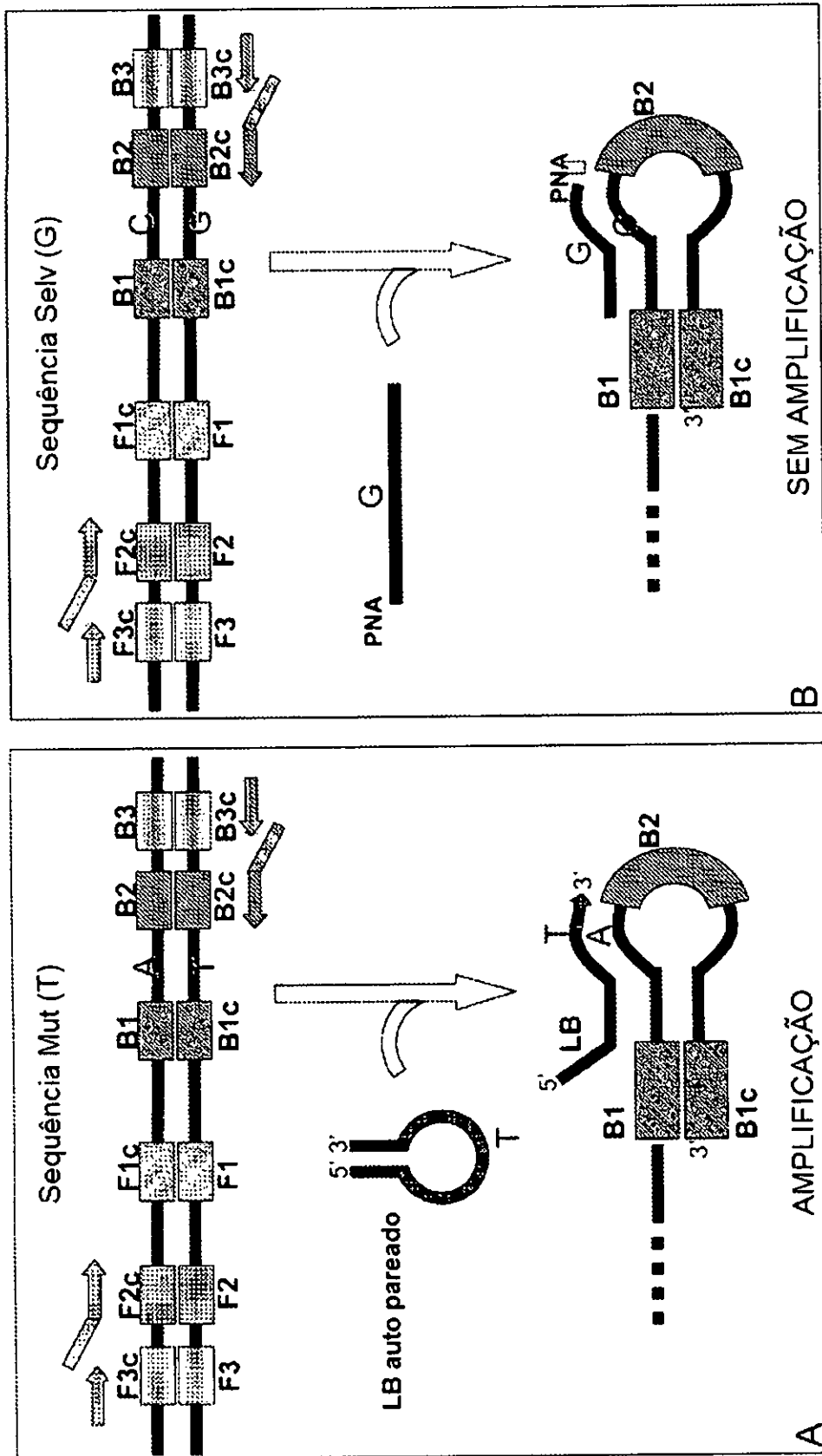


Fig.5

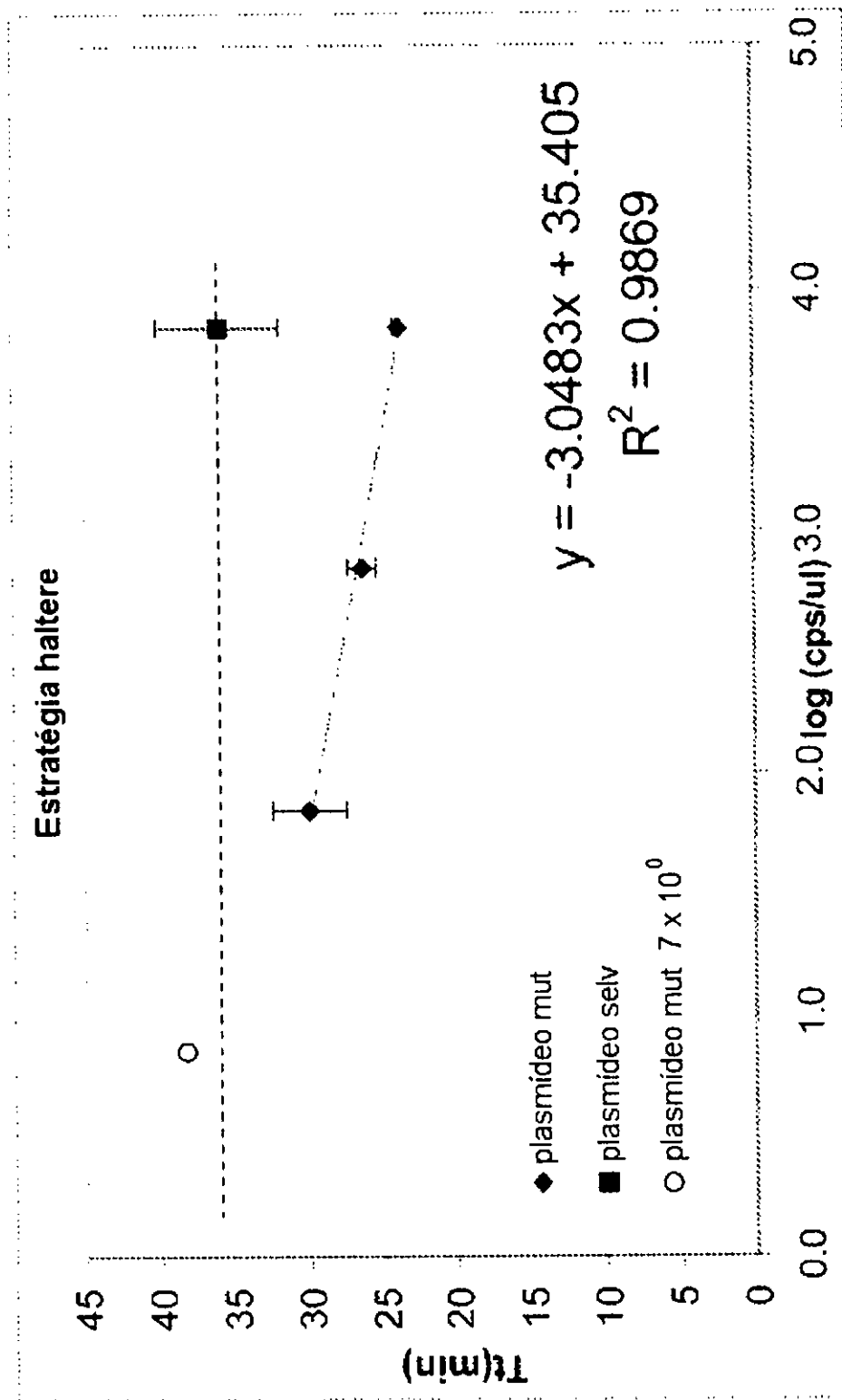


Fig.6

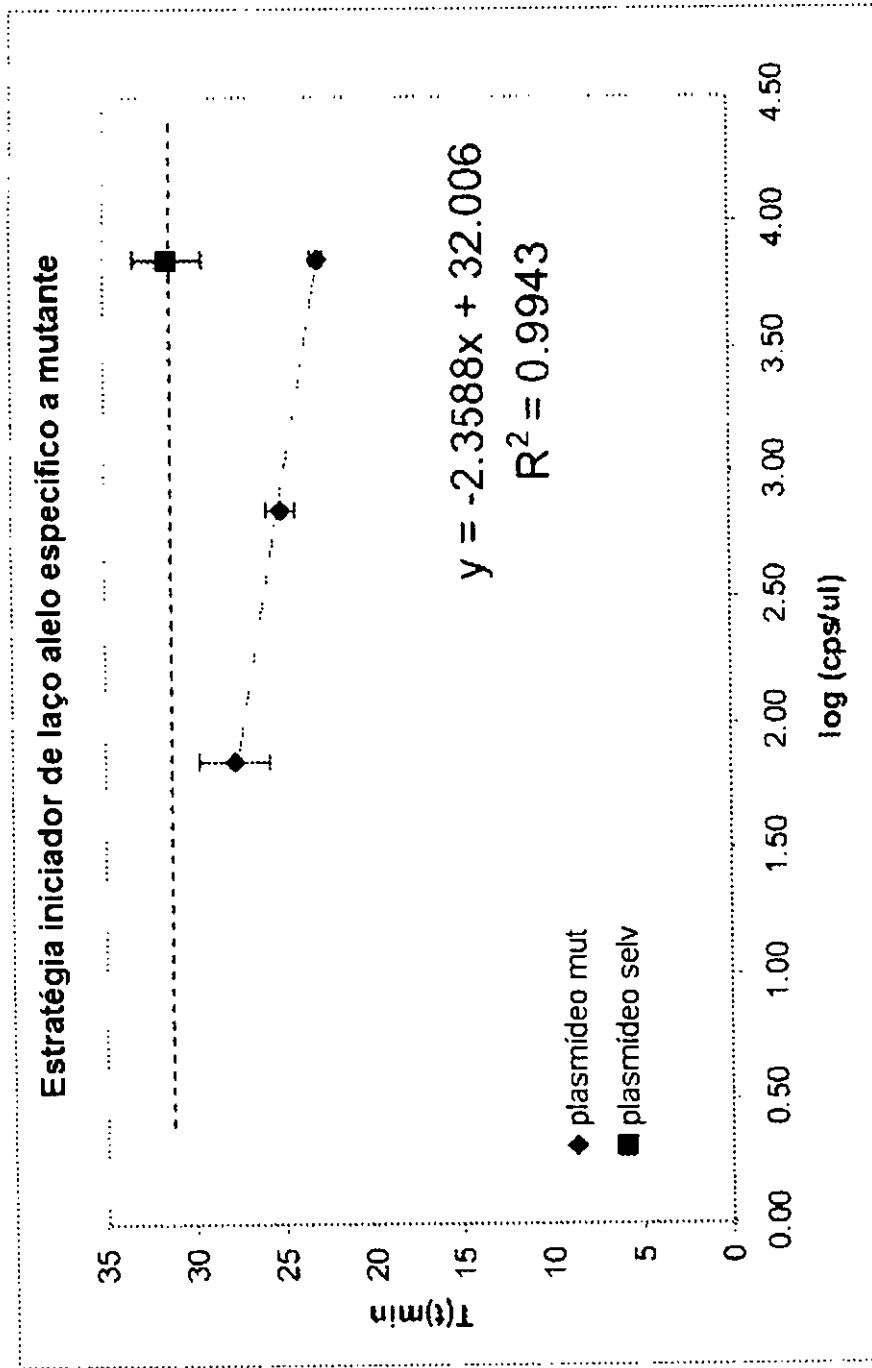


Fig.7

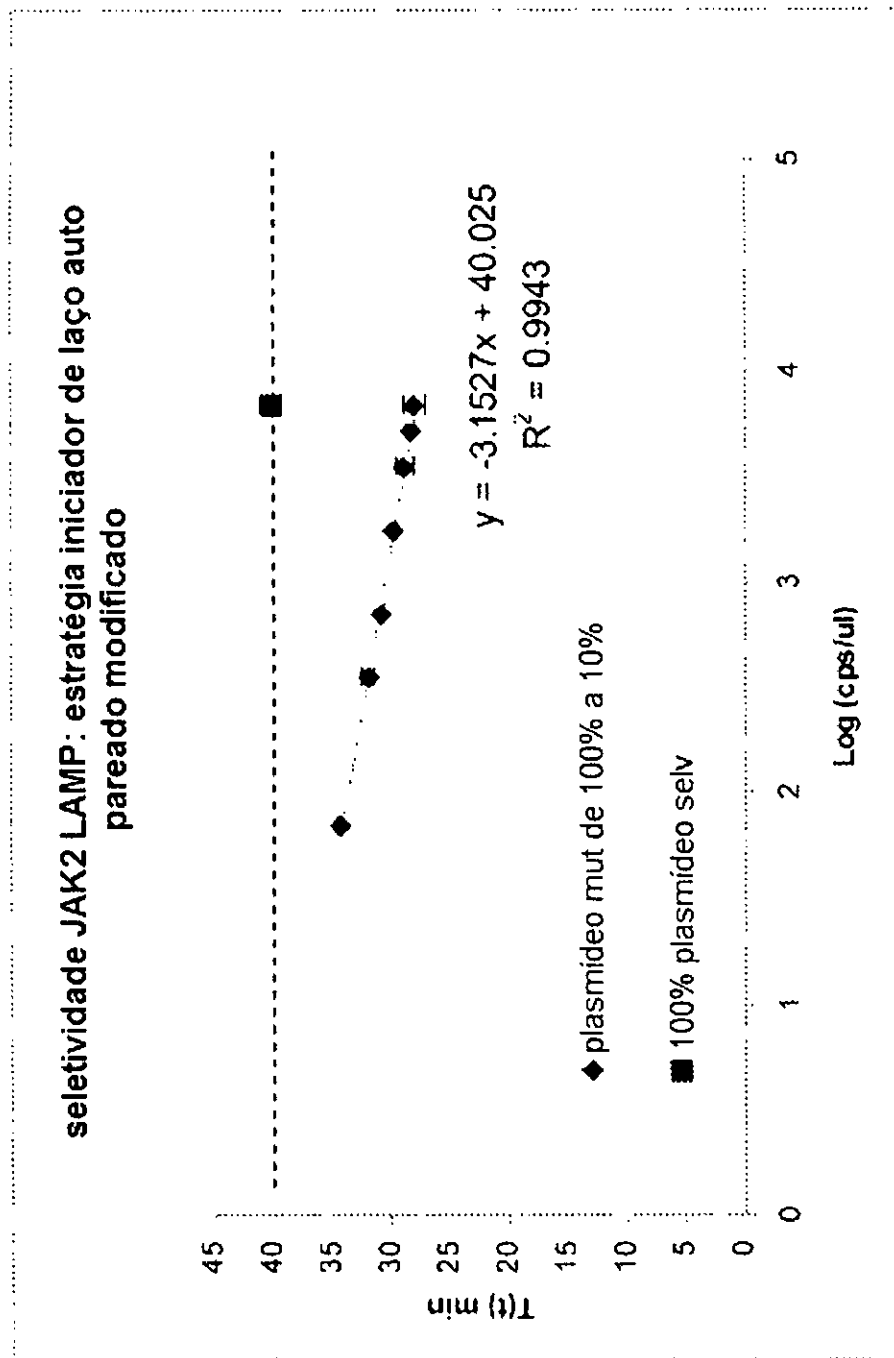


Fig.8

LAMP para discriminação de mutação JAK2 com LB auto-pareado, com e sem PNA

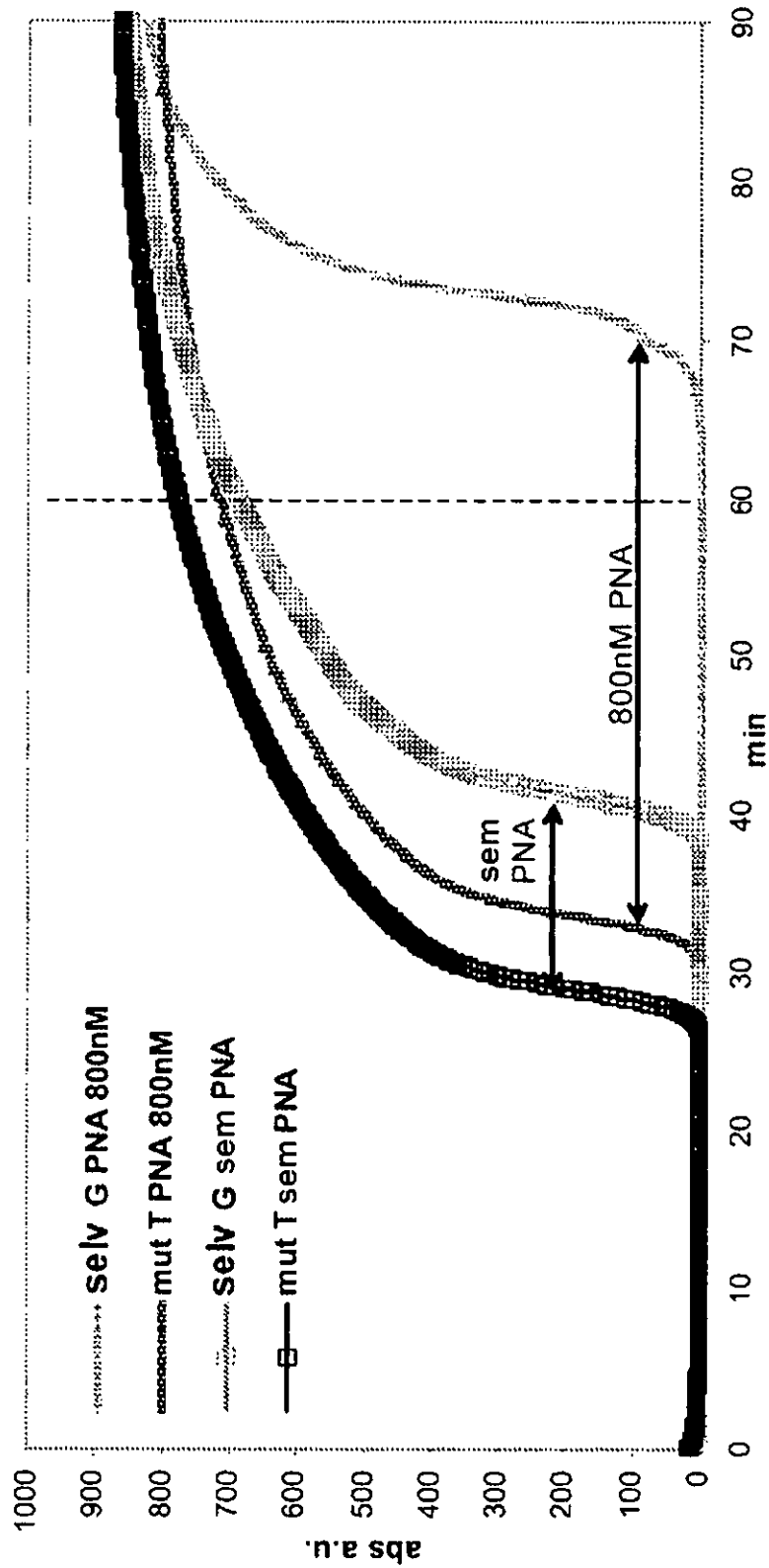


Fig.9

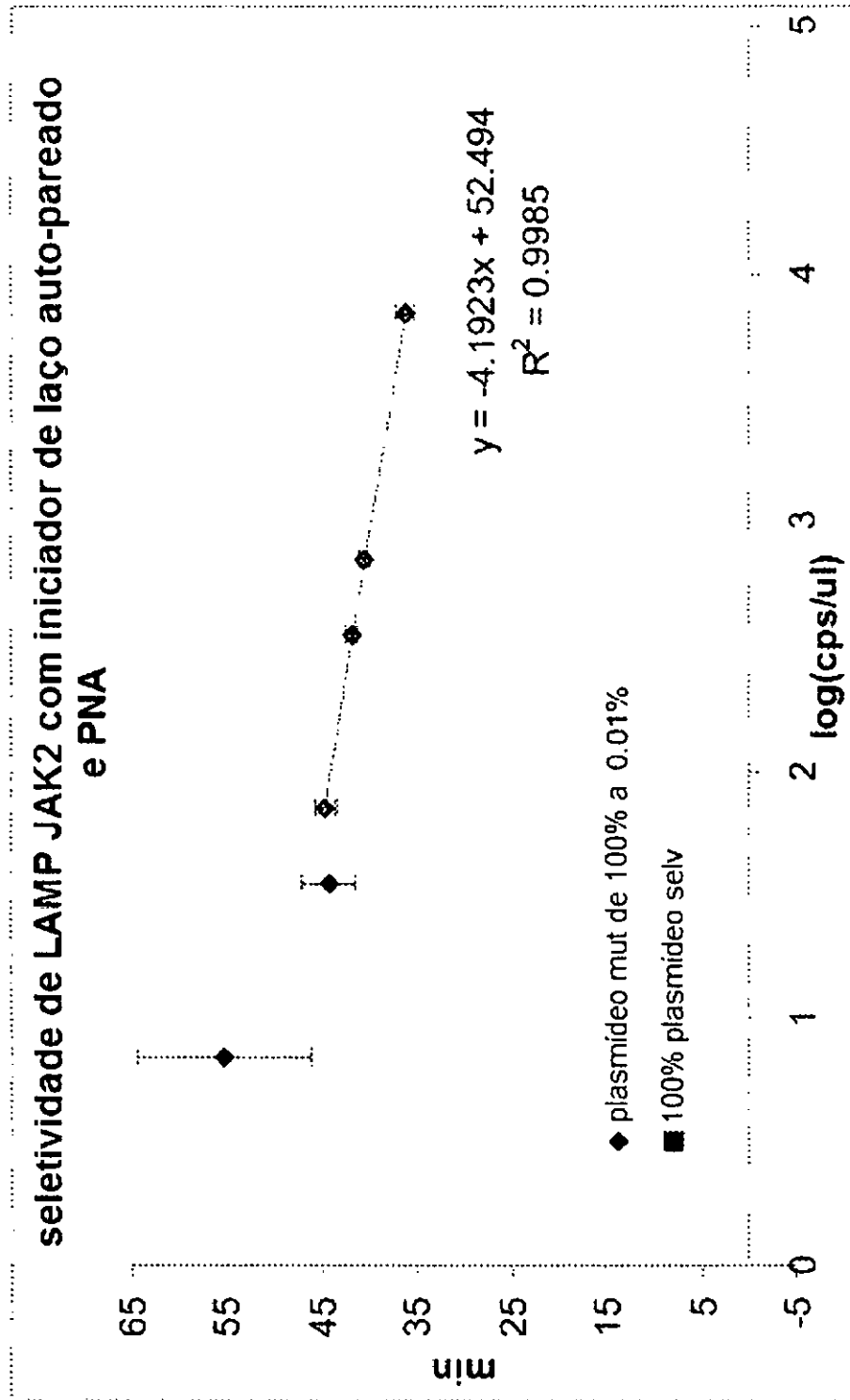


Fig.10

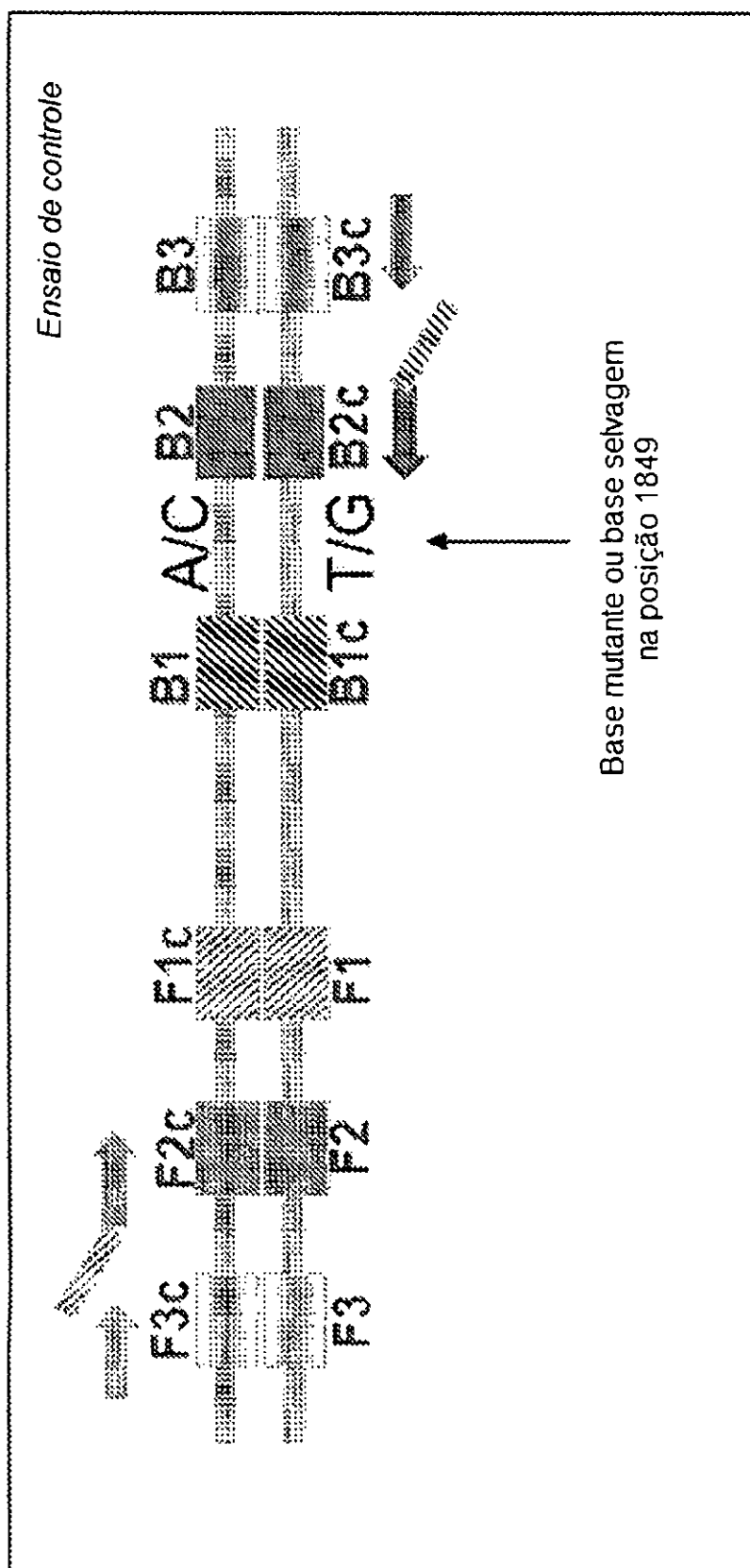


Fig.11

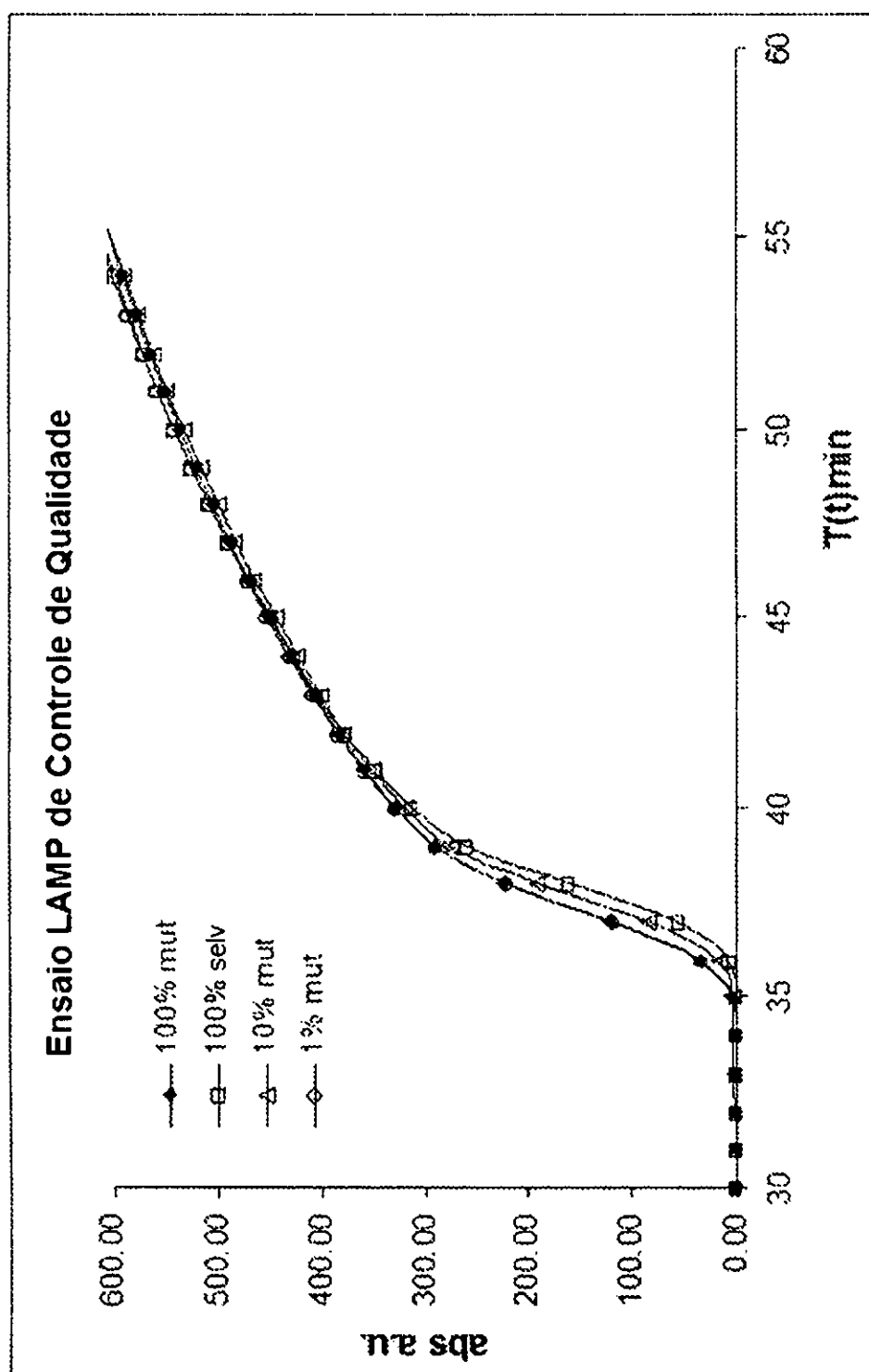


Fig.12

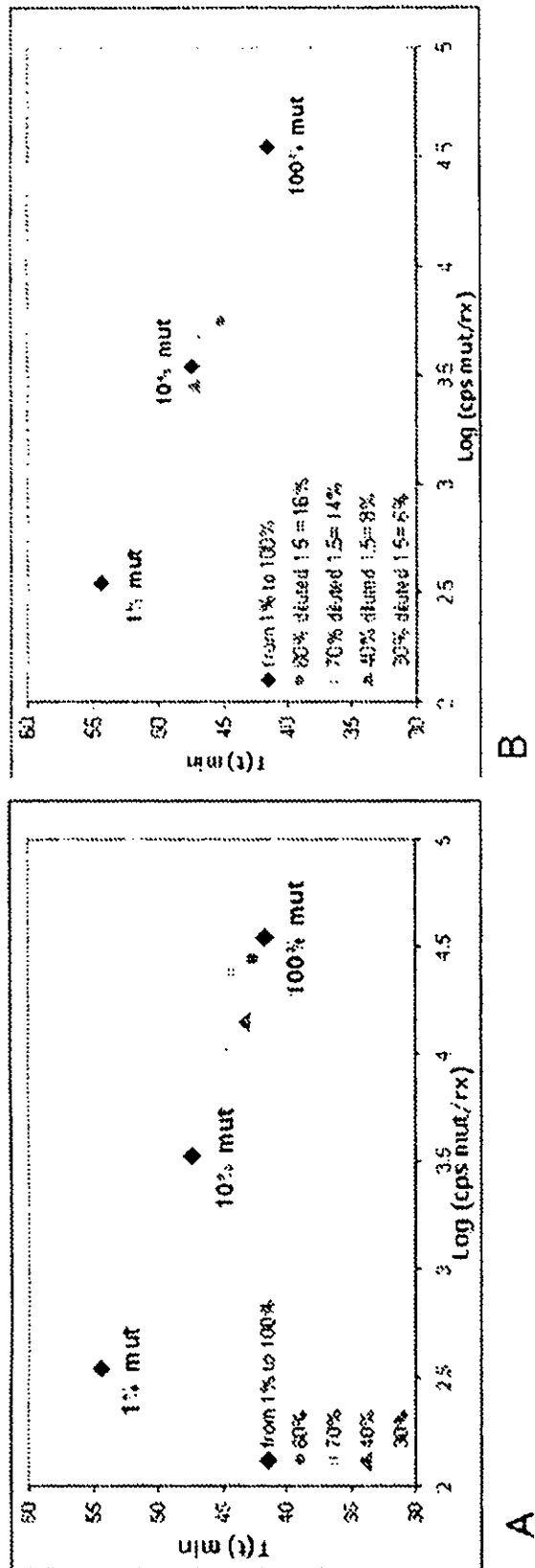


Fig.13

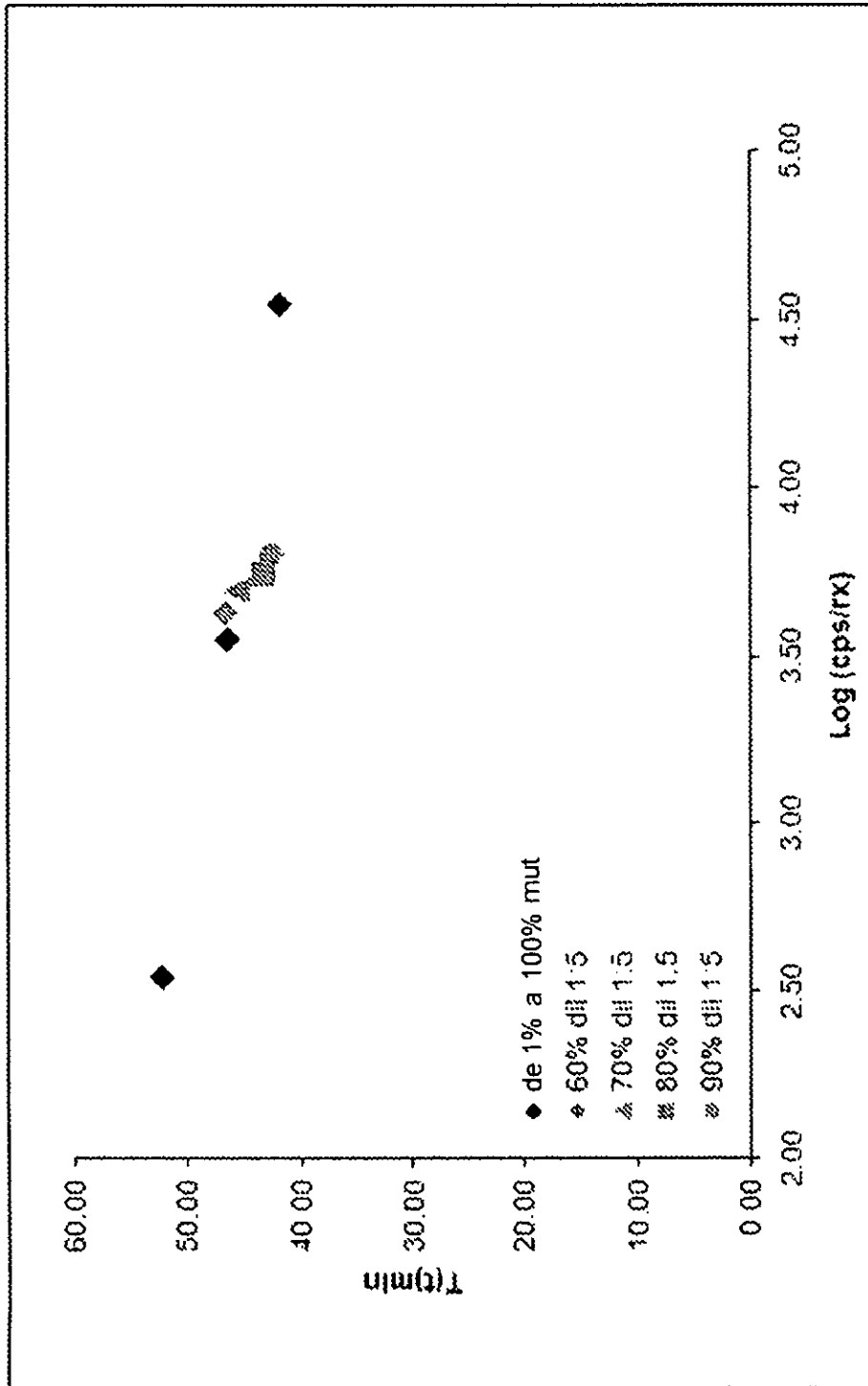


Fig.14

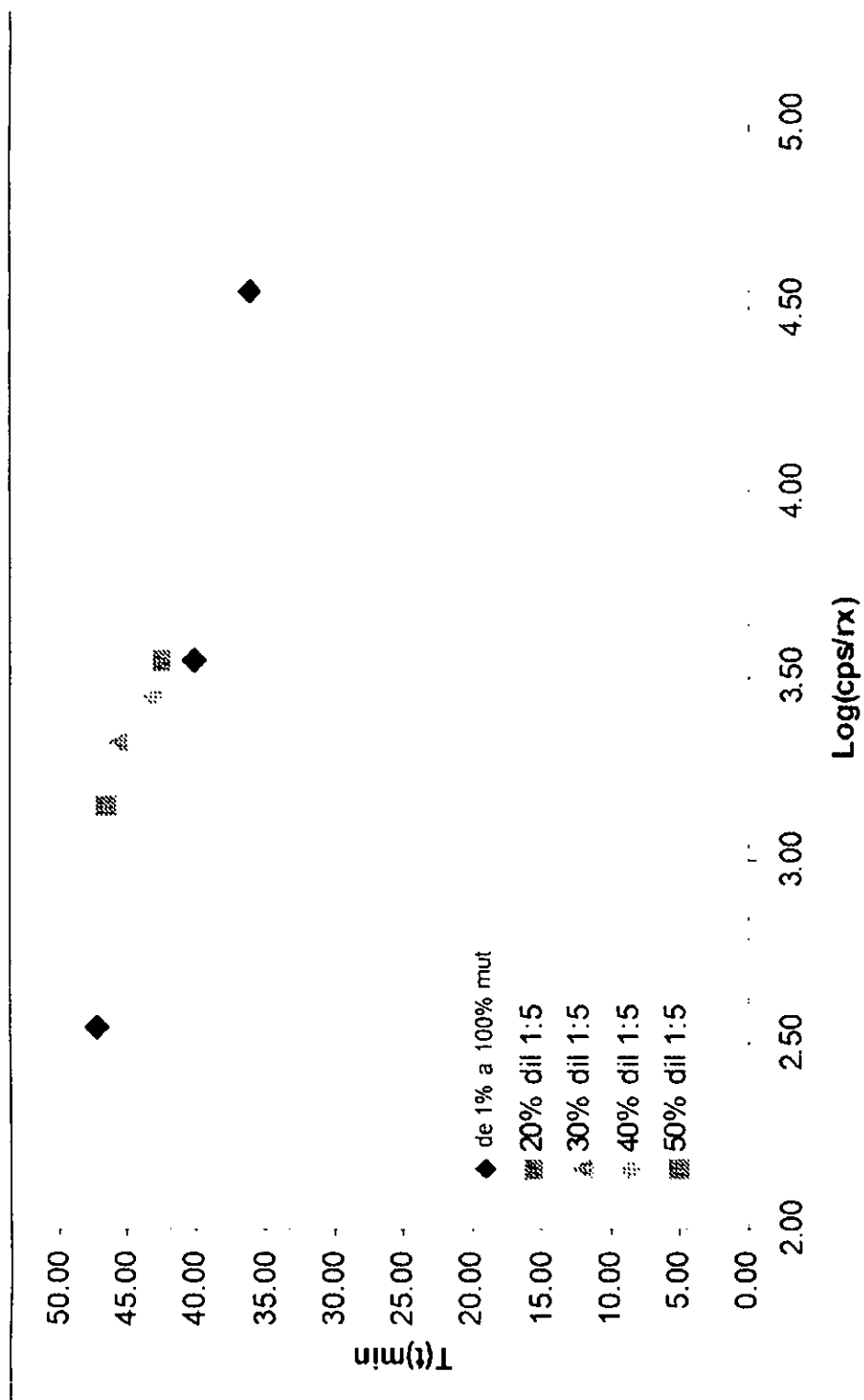


Fig.15

Resumo

Método isotérmico rápido altamente sensível para a detecção de mutações pontuais e SNPs, conjunto de iniciadores e kit deles.

- 5 O presente invento se refere a um método para detectar uma mutação pontual de uma sequência de nucleotídeos por um aperfeiçoamento do método de amplificação LAMP (amplificação isotérmica mediada por laço), bem como a um conjunto de iniciadores e a um kit para eles. Como uma forma não limitativa de realização do presente invento, o invento se refere à mutação G1849T do gene JAK2.