

PI 05171059
PI 05171059



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0517105-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0517105-9

(22) Data do Depósito: 17/10/2005

(43) Data da Publicação do Pedido: 27/04/2006

(51) Classificação Internacional: C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: 18/10/2004 US 60/619,654

(54) Título: MÉTODO PARA ANÁLISE DE PELO MENOS UM PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO FITA SIMPLES DE UM PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO NÃO-SIMÉTRICO

(73) Titular: BRANDEIS UNIVERSITY. Endereço: 415 South Street MS115, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América (US), CEP: 02454-9110.

(72) Inventor: LAWRENCE J. WANGH; JOHN RICE; AQUILES J. SANCHEZ; KENNETH PIERCE; JESSE SALK; ARTHUR REIS

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 17/10/2005, observadas as condições legais.

Expedida em: 23 de Junho de 2015.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira

Diretor de Patentes

**MÉTODO PARA ANÁLISE DE PELO MENOS UM PRODUTO DE
AMPLIFICAÇÃO FITA SIMPLES DE UM PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE
ÁCIDO NUCLÉICO NÃO-SIMÉTRICO**

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção se refere à reações de amplificação de ácido nucléico, incluindo amplificação utilizando a reação em cadeia de polimerase, e ensaios utilizando tais reações em combinação com seqüenciamento e métodos de detecção de sonda de hibridização.

ANTECEDENTES

10 Técnicas e ensaios de amplificação de ácido nucléico são bem conhecidos. Algumas reações de amplificação são isotérmicas, tal como amplificação baseada em seqüência de ácido nucléico (NASBA). Outras empregam ciclização térmica, tal como a reação em cadeia de polimerase (PCR). Ensaios de 15 amplificação preferidos empregando detecção por fluorescência do produto amplificado são homogêneos, isto é, eles não requerem a separação física de reagentes para permitir detecção (por exemplo, separação de sondas ligadas de sondas não ligadas) e podem ser realizados em um único 20 vaso fechado. Tais ensaios podem ser *end-point* em que o produto é detectado após amplificação ou eles podem ser em tempo real, em que o produto é detectado à medida que a amplificação prossegue.

Amplificação de ácido nucléico e ensaios empregando 25 PCR são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 4.683.202, 4.683.195 e 4.965.188 e, de modo geral, PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis e colaboradores eds., Academic Press (San Diego, CA (EUA) 1990). Ensaios de PCR homogêneos, incluindo ensaios em 30 tempo real, nos quais o produto amplificado é detectado

durante alguns ou todos os ciclos de PCR à medida que a reação se processa são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 5.994.056, 5.487.972, 5.925.517 e 6.150.097.

Reações de amplificação por PCR geralmente são projetadas para serem simétricas, isto é, fazer amplicons fita dupla exponencialmente utilizando um primer dianteiro e um primer reverso em concentrações equimolares e temperaturas de fusão (T_m 's) iguais. Uma técnica que tem encontrado uso limitado para fazer DNA fita simples diretamente em uma reação de PCR é "PCR assimétrica". Gyllensten e Erlich, "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652-7656 (1988); e Patente U.S. 5.066.584. A PCR assimétrica difere a PCR simétrica pelo fato de que um dos primers é adicionado em quantidade limitada, tipicamente 1-20 por cento da concentração do outro primer. Como uma consequentemente, a amplificação consiste de uma fase exponencial na qual ambos os primers são estendidos, gerando o produto fita dupla, ou amplicon, seguido por uma amplificação linear na qual apenas um primer permanece, gerando o amplicon fita simples.

Mais recentemente, nós desenvolvemos um método de amplificação por PCR não-simétrica conhecido como PCR "Linear-Após-O-Exponencial" ou, para abreviar, "LATE-PCR". A LATE-PCR é uma amplificação por PCR não-simétrica consistindo de uma fase exponencial na qual ambos os primers são anelados e estendidos, seguido por uma fase linear após exaustão do Primer Limitado, quando apenas o Primer em Excesso é anelado e estendido. Veja Sanchez e

colaboradores (2004) PNAS 101: 1933-1938, Pierce e
colaboradores (2005) PNAS 102: 8609-8614 e pedido de
patente internacional publicado WO 03/054233 (3 de Julho de
2003) e Pierce e colaboradores (2005) Proc. Natl. Acad. Sci
5 (USA) 102: 8609-8614, todos os quais são incorporados aqui
por referência em sua totalidade.

Um método conveniente e barato para monitoramento da produção de amplicon fita dupla em uma amplificação por PCR é usar um corante que fluoresce quando de intercalação em
10 ou, de outro modo, interação com DNA fita dupla, tal como SYBR Green I ou SYBR Gold. Veja, por exemplo, Patente U.S. 5.994.056. A análise da temperatura de fusão de amplicons realizada em tempo real durante amplificação por PCR ou realizada após amplificação é usada para identificação de
15 produto. Um problema com a utilização de tal análise de temperatura de fusão é que a fluorescência do corante é uma função do tamanho do amplicon. Outro problema é que os corantes se redistribuem dos produtos da amplificação, ou amplicons, tendo baixas temperaturas de fusão para
20 amplicons tendo maiores temperaturas de fusão durante análise, desse modo, distorcendo os resultados. Duas abordagens para resolver esses problemas foram sugeridas.
Uma abordagem, *G quenching*, impõe graves restrições sobre o design do primer e causa grande fluorescência de fundo
25 (Crockett AO, Wittwer CT. "Fluorescein-Labeled Oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the Inherent Quenching of Deoxyguanosine Nucleotides" Anal. Biochem. 290: 89-97 (2001)). A outra, substituição de corantes SYBR por corante LC Green, proporciona um percentual muito
30 pequeno de sinal para seqüências não presentes em

abundância e requer software e hardware altamente especializados (Wittwer e colaboradores, "High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LC Green", Clin. Chem. 49: 853-860(2003)).

5 Sondas fluorescentes-rotuladas são usadas em ensaios de amplificação de ácido nucléico homogêneos, incluindo ensaios de PCR, para medir o acúmulo de amplicon desejado, quer em análise em tempo real ou end-point. Vários tipos disponíveis de sondas são significativamente alelo-
10 discriminatórios quando comparado com sondas fita simples lineares. Sondas de tempo real incluem sondas lineares duplamente rotuladas que são clivadas pela atividade de 5'-3' exonuclease da DNA polimerase durante a etapa de extensão de um ciclo de PCR (veja patentes U.S. 5.210.015, 15 5.487.972 e 5.538.848); sondas sinalizadoras moleculares (veja patentes U.S. 5.925.517, 6.103.476 e 6.365.729); sondas de ligação com ranhura mínima (veja Afonina e colaboradores "Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered 20 Fluorescence", Biotechniques 32: 946-949 (2002)); pares de sondas lineares FRET quando hibridizadas adjacentes sobre uma fita alvo; sondas lineares dupla fita silenciadas para as quais um alvo compete para hibridizar á fita da sonda rotulada (veja Li, Q. e colaboradores (2002), Nucl. Acid. 25 Res. 30: e5); e as assim denominadas sondas "leves", as quais são oligômeros de ácido nucléico peptídico (PNA) ligados a um corante de cianina assimétrico que fluoresce quando a sonda se liga a seu alvo para formar uma região fita dupla. para LATE-PCR, nós utilizamos sondas de alelo-
30 discriminação de baixa temperatura, tais como sondas

sinalizadoras moleculares de baixa temperatura (veja WO 03/045233). Sondas de oligonucleotídeo rotuladas podem ser presas a primers por ligantes de modo que, durante amplificação, as sondas não são copiadas, mas estão livres para se hibridizar a uma seqüência alvo resultante de extensão do primer. Exemplos são primers Scorpions®, aos quais estão sondas sinalizadoras moleculares presos e Anglers®, os quais são primers aos quais estão presas sondas lineares fluoroforo-rotuladas. Lee, M.A. e colaboradores (2002), *Analytica Clinica Acta* 457: 61:70; Whitcombe, D. e colaboradores (1999), *Nature Biotechnology* 17: 804-807. A porção de sonda de tais estruturas compostas, as quais trazem o rótulo fluorescente, se hibridiza separadamente da porção de primer. Assim, elas são sondas rotuladas e não primers rotulados, conforme esses termos são usados aqui. Sondas alvo-específicas carecem da capacidade de monitorar a produção total de produtos fita simples, contudo.

Determinadas sondas são tolerantes à combinação errônea. Sondas tolerantes à combinação errônea se hibridizam com e geram sinal detectável para mais de uma seqüência alvo em uma temperatura de detecção em um ensaio e vários híbridos assim formados terão diferentes pontos de fusão. Sondas fita simples lineares ou com espiral aleatória são, geralmente, tolerantes à combinação errônea. Exemplos de tais sondas são sondas lineares com uma porção fluorescente interna cujo nível de fluorescência aumenta quando de hibridização a uma ou outra fita alvo; sondas lineares fluorescentemente rotuladas usadas em combinação com corantes SYBR Gold e SYBR Green I, de modo que a

fluorescência do rótulo ocorre através de FRET do corante quando a sonda se hibridiza a um ou outro alvo (veja publicação de patente U.S. 2002/0119450, 28 de Agosto de 2002), os assim denominados "sloppy beacons" e variações de 5 pares de sondas lineares FRET (veja patente U.S. 6.472.156).

Utilização de múltiplas sondas que se ligam, cada uma, apenas a um possível amplicons alvo gerado em uma reação de amplificação cria um problema para análise de misturas de 10 reação complicadas ou para detecção de um ou alguns alvos entre numerosos possíveis alvos. A detecção de fluorescência disponível permite decomposição de um número limitado de fluoroforos, geralmente não mais do que oito. Formação de multiplex limitada é possível, por exemplo, 15 através de design de uma sonda sinalizadora moléculas de alelo-discriminação diferente para cada alvo e rotulação de cada sonda diferencialmente (veja, for exemplo, Tyagi e colaboradores (2000) Nature Biotechnology 18: 1191-1196). Misturas de sondas de alelo-discriminação, cada uma 20 compreendendo alíquotas de múltiplas cores, aumenta o número de assinaturas da sonda e funciona bem apenas se um de muitos (pelo menos até 56) alvos está realmente presente, mas encontra resultados ambíguos se mais de um alvo está presente.

Existem muitas situações que envolvem alvos complexos ou um entre muitos possíveis alvos. Vários esquemas foram desenvolvidos ou propostos para tais situações, mas todos têm graves deficiências ou limitações. Tyagi e 25 colaboradores, pedido de patente internacional publicado WO 01/31062, descreveram uma técnica algumas vezes referida

como "Sloppy beacons", os quais são sondas sinalizadoras moleculares que têm seqüências de loop longas, tornando-as tolerantes à combinação errônea e capazes de se ligar, até algum grau, a múltiplos alvos na temperatura de anelamento 5 de uma reação de amplificação por PCR. Tais sondas sofrem de pobre cinética de reação contra alvos erroneamente combinados e, provavelmente, permanecem hibridizadas a alvos perfeitamente equivalentes na temperatura de extensão 10 de uma amplificação por PCR e são clivadas por uma Taq DNA polimerase. Ainda, apenas uma indicação indireta de temperaturas de fusão de híbridos de sonda-alvo sob as condições de ensaio é obtida e essa admite que um equilíbrio tenha sido obtido. Formação de multiplex em tempo real em amplificações por PCR simétricas com sondas 15 FRET foi descrita. De forma a não interferir com a amplificação, as temperaturas de fusão de todos os híbridos de sonda-alvo são limitadas a estarem na faixa limitada de temperatura entre a temperatura de anelamento de primer e a temperatura de extensão de primer. Também, esse esquema não 20 é quantitativo. Ensaios com sondas múltiplas pós-amplificação empregando sondas FRET de diferentes cores foram divulgados por Wittwer e colaboradores, "Real-Time Multiplex PCR Assays Methods" 25: 430-442 (2001). A mistura de reação após uma amplificação por PCR simétrica é 25 rapidamente resfriada, então, lentamente aquecida para determinar curvas de fusão para os vários fluoroforos presentes. Essa abordagem não é quantitativa. Além disso, em virtude da grande dispersão entre amplificações por PCR simétricas repetidas, ensaios de end-point em geral tendem 30 a ser apenas qualitativos.

Produtos de reação de seqüenciamento proporcionam uma alternativa à hibridização. Seqüenciamento tradicional de dideoxi pode utilizar produtos de reações de amplificação, tal como PCR simétrica ou LATE-PCR, como materiais de iniciação para seqüenciamento de ciclo. O produto amplificado é purificado utilizando precipitação com etanol ou uma coluna de afinidade para remover os dNTPs e primers restantes, submetido a uma reação de seqüenciamento de ciclo utilizando um primer de seqüenciamento e dideoxi nucleotídeos fluorescentemente rotulados e submetidos à eletroforese em gel capilar. "Piro-seqüenciamento" é um método de seqüência-por-síntese isotérmico, em tempo real, conhecido na técnica. Se métodos de amplificação exponencial, por exemplo, PCR, são usados no preparo de material de iniciação para Piro-seqüenciamento, o produto amplificado deve ser limpo através de isolamento de produtos fita simples, bem como remoção de dNTPs, pirofosfato e primers não incorporados, porque esses geram primariamente produtos fita simples, mas isso não elimina em si a necessidade de limpar o produto.

Um aspecto da presente invenção é métodos para detecção homogênea de produtos da reação de amplificação, ciclização de temperatura ou isotérmica, utilizando a detecção de fluorescência dos primers de oligonucleotídeo lineares fluoroforo-rotulados excitados indiretamente através de excitação de um corante fluorescente de DNA, tal como SYBR Green I ou, de preferência, SYBR Gold. Tais corantes se tornam fluorescentes quando eles se associam com DNA fita dupla, nos quais é reportado que eles se intercalam. Os métodos precedentes podem ser realizados em

tempo real ou após a reação de amplificação, quer através de leitura de fluorescência em uma temperatura de detecção (detecção de end-point) ou determinando-se as alterações na fluorescência como uma função da temperatura através de 5 análise de fusão pós-amplificação. Conforme a mistura de reação é aquecida através das temperaturas de fusão de vários produtos de reação, a fluorescência diminui progressivamente à medida que vários amplicons contendo um primer contendo um fluoroforo em particular atingem suas 10 temperaturas de fusão e se tornam fita simples. Métodos preferidos incluem cálculo de uma proporção de sinal de primer para sinal de corante.

Outro aspecto da presente invenção é kits de reagente que incluem corantes fluorescentes de DNA e pelo menos um 15 de tais primers rotulados, de preferência como parte de um par de primer e opcionalmente reagentes de amplificação.

Ainda outros aspectos da presente invenção são métodos homogêneos para detecção de produtos da reação de LATE-PCR empregando uma etapa de detecção em baixa temperatura. 20 Determinadas modalidades compreendem inclusão, na mistura de reação, de pelo menos uma sonda de alelo-discriminação de acordo com a presente invenção, isto é, uma sonda fita dupla silenciada geralmente do tipo descrito por Li, Q. e colaboradores (2002) Nucl. Acids Res. 30: e5, exceto que 25 ela é uma sonda alvo-específica de baixa temperatura (baixa T_m ou T_m super-baixa) e é excitada indiretamente através de excitação de um corante fluorescente de DNA intercalado no híbrido de sonda-alvo tal como, de preferência SYBR Gold. Outras modalidades incluem, na mistura de reação, pelo 30 menos uma sonda tolerante à combinação errônea

indiretamente excitável de acordo com a presente invenção, isto é, uma sonda fita simples silenciada geralmente do tipo descrito por Lee e Furst, pedido de patente publicado dos Estados Unidos Pub. No. US 2002/0119450, exceto que ela 5 é uma sonda de baixa temperatura silenciada. Esses vários métodos incluem excitação do corante durante as etapas de detecção em baixa temperatura de uma amplificação por LATE-PCR e detecção de fluorescência das sondas sob essas condições para proporcionar uma medida da seqüência fita 10 simples do alvo. Modalidades em particular ainda podem incluir medição da quantidade total de produto(s) fita dupla na mistura de reação através de detecção de fluorescência do corante, de preferência durante ou ao final da etapa de extensão dos ciclos de PCR, enquanto a 15 temperatura da mistura de reação está acima da(s) temperatura(s) de fusão das sondas. Determinados métodos preferidos incluem cálculo da proporção de sinal da sonda para sinal de corante. No caso de amostras repetidas, tal proporção corrige as diferenças entre amostras repetidas em 20 amplificação conhecidas por ocorrer em amplificações por PCR.

Outros aspectos da presente invenção são tais sondas tolerantes à combinação errônea silenciadas e de baixa temperatura de alelo-discriminação, kits de LATE-PCR que 25 incluem pelo menos uma de tais sondas alvo-específicas de baixa temperatura junto com reagentes de amplificação e, de preferência, o corante de DNA fluorescente; e conjuntos de oligonucleotídeos compreendendo primers de LATE-PCR e pelo menos uma de tais sondas.

30 Outros aspectos da presente invenção são métodos de

detecção homogêneos para uso quando amplicons múltiplos estão presentes ou podem estar presentes, tal método compreendendo, em uma mistura de reação para amplificação por LATE-PCR, uma ou mais sondas de detecção tolerantes à combinação errônea de baixa temperatura que, em virtude de sua baixa T_m , não interferem com a amplificação e não são hidrolisadas (cortadas) por uma DNA polimerase tendo atividade de 5'-3' exonuclease e que emitem um sinal fluorescente quando hibridizadas e excitadas, quer diretamente por uma fonte de excitação adequada ou indiretamente por um corante de DNA fluorescente que é excitado por uma fonte de excitação adequada. Tais métodos incluem ensaios com uma única sonda e ensaios com sondas múltiplas para aplicações tal como genotipificação. Mais de uma sonda pode ser rotulada com o mesmo fluoroforo, caso no qual a discriminação conta com alteração na fluorescência com a temperatura, apenas quando uma única sonda é usada. Sondas podem ser rotuladas com diferentes fluoroforos, caso no qual a diferença de cor também é usada para discriminação. A discriminação entre alvos para fins de identificação e quantificação pode incluir as proporções de fluorescência entre fluoroforos nas mesmas ou em temperaturas diferentes, bem como proporções de fluoroforo-para-corante. A detecção é, de preferência, realizada durante amplificação (tempo real) e, mais preferivelmente, durante uma etapa de detecção em baixa temperatura incluída em um protocolo de amplificação por LATE-PCR e a etapa de detecção pode incluir detecção em múltiplas temperaturas.

Ainda outro aspecto da presente invenção é uma sonda linear fita simples útil em tais métodos de detecção, tal

como uma sonda sendo do tipo descrito na publicação de pedido de patente U.S. 2002/0119450 (29 de Agosto de 2002), isto é, uma sonda excitada pela emissão de fluorescência de um corante de DNA fluorescente, exceto que ela é uma sonda 5 de baixa temperatura (baixa T_m ou T_m super-baixa), é tolerante à combinação errônea e inclui uma porção de silenciamento que silencia a fluorescência a qual, de outro modo, resultaria da estrutura secundária em baixa temperatura.

10 Outro aspecto da presente invenção é um método de amplificação através de seqüenciamento que permite que o produto de uma amplificação por LATE-PCR seja preparado para Piro-seqüenciamento na câmara, vaso, cavidade, lâmina ou recipiente de reação de amplificação, uma operação em um 15 "único tubo", a qual pode ser utilizada com amplificações por LATE-PCR realizadas em pequenos volumes, de preferência 17 ul ou menos.

Outro aspecto da presente invenção é um método para preparo de produtos de LATE-PCR para seqüenciamento de 20 dideóxi utilizando apenas diluição aquosa pós-amplificação de misturas de reação para amplificação, o qual pode ser realizado como uma operação em um "único tubo".

SUMÁRIO

No presente pedido, referências são feitas às 25 temperaturas de fusão, T_m , dos primers de ácido nucléico, sondas e amplicons. A T_m significa a temperatura na qual metade do material em questão sai da forma fita dupla e o restante é fita simples. Geralmente, exceto quando de LATE-PCR, a T_m de um primer é um valor calculado usando o método 30 de "% de GC" (Wetmar, J.G. (1991) "DNA Probes: Applications

of the Principles of Nucleic Acid Hybridization", Crit. Rev. Biochem. Mol Biol. 26: 227-259) ou o método de "2(A+T) mais 4(G+C)", ambos os quais são bem conhecidos, em uma condição padrão de concentração de primer e sal. LATE-PCR, 5 contudo, leva em conta as temperaturas de fusão reais do primer em uma reação em particular, levando em conta as concentrações de primer no início de amplificação. Veja Sanchez e colaboradores (2004) PNAS (USA) 101: 1933-1938 e Pierce e colaboradores (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 10 102: 8609- 8614.

No presente pedido, nós nos referimos a tal temperatura de fusão concentração-ajustada no início de amplificação como $T_m[0]$, a qual pode ser determinada empiricamente, conforme necessário, quando nucleotídeos não naturais são usados ou calculada de acordo com o método do "vizinho mais próximo" (Santa Lucia, J. (1998), PNAS (USA) 15 95: 1460-1465; e Allawi, H.T. e Santa Lucia, J. (1997), Biochem. 36: 10581-10594) usando um ajuste da concentração de sal a qual, nos exemplos abaixo, foi uma concentração de 20 cátions monovalentes de 0,07M. LATE-PCR também pode levar em conta a temperatura de fusão do amplicon, a qual é calculada utilizando a fórmula: $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G + \%C) - 500/L + 16,6 \log [M]/(1 + 0,7 [M])$, onde L é o comprimento em nucleotídeos e [M] é a concentração molar de 25 cátions monovalentes. Temperaturas de fusão de sondas lineares ou espiral aleatória são calculadas conforme para primers. As temperaturas de fusão de sondas estruturadas, por exemplo, sondas sinalizadoras moleculares, podem ser determinadas empiricamente.

30 Conforme usado no presente pedido, "LATE-PCR"

significa uma amplificação de DNA não-simétrica empregando o processo de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando um primer de oligonucleotídeo (o "Primer em Excesso") em um excesso de pelo menos cinco vezes com 5 relação ao outro primer (o "Primer Limitado") o qual é, em si, utilizado em baixa concentração, de até 200 nM, de modo a ser esgotado em ciclos de PCR aproximadamente suficientes para produzir amplicon fita dupla fluorescentemente detectável, em que a temperatura de fusão concentração-10 ajustada do Primer Limitado no início de amplificação, $T_{m[0]}$, é de não mais do que 5 °C abaixo da temperatura de fusão concentração-ajustada do Primer em Excesso no início de amplificação, $T_{m[0]}^X$, de preferência pelo menos tão alta e, mais preferivelmente, 3-10 °C mais alta; e em que a 15 ciclização térmica é continuada durante múltiplos ciclos após exaustão do Primer Limitado para produzir produtos fita simples, isto é, o produto da extensão de Primer em Excesso, algumas vezes referido como a "Fita de Primer em Excesso".

20 Os primers e sondas da presente invenção ou úteis em métodos e kits da presente invenção são oligonucleotídeos no sentido amplo, pelo qual entenda-se que eles podem ser DNA, RNA, misturas de DNA e RNA e podem incluir nucleotídeos não naturais (por exemplo, 2'0-m etil 25 ribonucleotídeos) e ligações inter-nucleotídicas não naturais (por exemplo, ligações de fosforotioato). Primers e sondas funcionam, em parte, através de hibridização a uma seqüência de interesse em uma mistura de reação. Um primer é um oligonucleotídeo fita simples que pode se hibridizar à 30 sua seqüência complementar na temperatura de anelamento de

primer de uma reação de amplificação e se estender em sua extremidade 3' por uma DNA polimerase. Um primer da presente invenção é um primer que sinaliza hibridização se sua seqüência de priming por meio de um fluoroforo que é indiretamente excitável. Uma sonda da presente invenção ou útil em métodos de kits da presente invenção é ou inclui um oligonucleotídeo fita simples que pode se hibridizar à sua seqüência alvo pretendida (ou seqüências) na temperatura de detecção (ou temperaturas) em ou após uma reação de amplificação e excitável. Conforme usado aqui, uma "sonda" não é estendida na reação de amplificação por uma DNA polimerase. Sondas que são muito específicas para uma seqüência alvo perfeitamente complementar e rejeitam fortemente seqüências intimamente relacionadas tendo uma ou umas poucas bases erroneamente combinadas são de "alelo-discriminação". Sondas que se hibridizam sob pelo menos uma condição de detecção aplicável não apenas à seqüências perfeitamente complementares, mas também à seqüências parcialmente complementares tendo uma ou mais bases erroneamente combinadas que são sondas "tolerantes à combinação errônea".

"Corante de DNA fluorescente", conforme usado aqui, significa uma composição, por exemplo, SYBR Green I ou SYBR Gold, que se torna fluorescentemente excitável quando se associa com um DNA fita dupla. Foi reportado que os corantes de DNA fluorescentes se intercalam no DNA fita dupla, mas nós não queremos estar presos a qualquer teoria de operação.

Os primers da presente invenção são usados em conjunto com um corante de DNA fluorescente e são oligonucleotídeos

fita simples lineares rotulados com um fluoroforo que é indiretamente excitável, isto é, quando o primer se hibridiza a uma fita modelo na mistura de reação para formar uma região de DNA fita dupla e luz (usualmente, mas não necessariamente, luz visível) de um comprimento de onda que excita ou é absorvido pelo corante fluorescente de DNA, mas não pelo fluoroforo que brilha sobre a amostra, o fluoroforo emite. Foi reportado que a transferência a energia se transfere de um corante de DNA fluorescente para 5 um fluoroforo próximo através de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET), mas nós não queremos estar preso a qualquer teoria de operação. Nós nos referimos a um fluoroforo que emite, nessa circunstância como um fluoroforo que é "indiretamente excitado". As 10 sondas da presente invenção são, da mesma forma, usadas em conjunto com um corante fluorescente que se liga ao DNA fita dupla (um "corante de DNA fluorescente") e rotuladas com tal fluoroforo indiretamente excitável de modo que, quando a sonda de hibridiza a uma fita alvo na mistura de 15 reação e o corante é excitado, o fluoroforo emite.

20

Conforme usado aqui, "kit" significa uma coleção de reagentes para realização de uma amplificação ou um ensaio. Um kit pode ser "completo", isto é, incluir todos os reagentes necessários para todas as etapas de uma 25 amplificação ou amplificação-detecção. Alternativamente, um kit pode ser "parcial", omitindo determinados reagentes necessários para essas operações. Kits completos e parciais da presente invenção podem, adicionalmente, incluir reagentes para preparo de amostra, tal como isolamento de 30 ácido nucléico e transcrição reversa. Seqüenciamento pode

envolver dois kits, por exemplo, um kit completo para amplificação por LATE-PCR e um kit completo para seqüenciamento de ciclo ou os dois podem ser combinados em um único kit.

5 Conforme usado aqui, um "conjunto de oligonucleotídeo" significa uma coleção de primer ou primers e sondas para realizar uma amplificação ou ensaio. Para seqüenciamento, um conjunto de oligonucleotídeo pode incluir, por exemplo, Primer em Excesso e Primer Limitado para amplificação por
10 LATE-PCR e um ou mais primers de seqüenciamento adicionais para seqüenciamento de ciclo. Para um ensaio de sonda de hibridização, um conjunto de oligonucleotídeo pode incluir, por exemplo, Primer em Excesso e Primer Limitado para uma amplificação por LATE-PCR e pelo menos uma sonda de
15 hibridização fluoroforo-rotulada.

Conforme usado aqui, um método em um "único tubo" significa uma série de pelo menos duas operações, por exemplo, preparo de amostra, amplificação ou seqüenciamento, que podem ser realizadas sem transferência
20 da amostra para outro recipiente, seja ele um tubo de ensaio, uma cavidade de reação, uma câmara em um dispositivo microfluídico, uma lâmina de vidro ou qualquer outro aparelho capaz de manter uma mistura de reação, para outro recipiente.

25 Sondas que têm baixas temperaturas de fusão (isto é, sondas que formam híbridos de sonda-alvo tendo baixas temperaturas de fusão) podem ser adicionadas às misturas de reação para amplificação antes de início de amplificação e utilizadas apenas quando desejado. Mantendo as temperaturas
30 acima da temperatura de fusão de uma sonda durante toda ou

partes de uma reação de amplificação, a sonda é impedida de hibridizar a seu alvo e, possivelmente, reduz a eficácia de reação. Determinadas modalidades de ensaios de LATE-PCR utilizam sondas de baixa temperatura. Conforme usado aqui,

5 "sonda de baixa T_m " significa uma sonda de hibridização que tem uma temperatura de fusão concentração-ajustada no início de amplificação, $T_{m[0]}$, para pelo menos 5 °C abaixo da $T_{m[0]}$ do Primer Limitado em um ensaio de LATE-PCR; e uma "sonda de T_m super-baixa" significa uma sonda de

10 hibridização que tem uma $T_{m[0]}$ que está pelo menos 5 °C abaixo da temperatura média de anelamento de primer da fase exponencial de uma reação de LATE-PCR. Nós freqüentemente adicionamos sondas às reações de LATE-PCR em uma concentração de 1 micromolar (μM). Portanto, quando do

15 design de sondas, nós algumas vezes utilizamos uma $T_{m[0]}$ nominal calculada conforme anteriormente descrito, mas utilizando uma concentração nominal de 1 μM . A maioria das sondas de baixa T_m e T_m super-baixa tem uma $T_{m[0]}$ calculada em uma concentração de 1 μM na faixa de 30-55 °C.

20 Detecção utilizando sondas de baixa temperatura requer detecção em baixa temperatura, em que a temperatura da mistura de sonda-alvo é diminuída suficientemente para que sondas fluorescentemente rotuladas se hibridizem e sinalizem. Isso pode ser feito ao término da amplificação

25 (end-point) ou em uma análise de fusão pós-amplificação. alternativamente, uma etapa de detecção em baixa temperatura pode ser incluída em alguns ou todos os ciclos da fase linear de uma amplificação por LATE-PCR para um ensaio em tempo real. De preferência, tal etapa ocorre após

30 extensão de primer e antes de fusão de fita em alta

temperatura (ou "desnaturação), embora possa ser incluída na etapa de anelamento de primer. Uma etapa de detecção em baixa temperatura em um ensaio de LATE-PCR significa uma redução na temperatura para pelo menos 5 °C abaixo da 5 temperatura de anelamento de primer.

Determinados métodos de acordo com a presente invenção utilizam primers fluoroforo-rotulados ou sondas de hibridização em combinação com corantes fluorescentes que se ligam ao DNA fita dupla e incluem estimulação de um 10 corante em um comprimento de onda que excita o corante, mas não o(s) fluoroforo(s) e detecção da fluorescência emitida por um fluoroforo estimulado indiretamente através desse procedimento. Algumas modalidades dos métodos de acordo com 15 a presente invenção incluem detecção da emissão de fluorescência do corante também. Determinados métodos preferidos ainda incluem cálculo da proporção de emissão de fluoroforo para emissão de corante.

Uma modalidade da presente invenção inclui a adição, a 20 uma mistura de amplificação de ácido nucléico, de um corante de DNA fluorescente, tal como SYBR Green I ou, de preferência, SYBR Gold, e pelo menos um primer de amplificação de acordo com a presente invenção, isto é, um oligonucleotídeo fita simples linear que é extensível por uma DNA polimerase e que é rotulado com um fluoroforo que é 25 indiretamente excitável para produção de sinal conforme descrito acima; realização de uma reação de amplificação, de preferência uma reação de PCR (incluindo LATE-PCR), que inclui anelamento e extensão desse primer rotulado; e durante a amplificação (detecção em tempo real) ou após 30 término da amplificação (uma detecção de end-point ao

término da reação de amplificação ou durante uma subsequente análise térmica (curva de fusão)), excitação do corante e detecção da emissão de fluorescência do fluoroforo, quer sozinho ou em combinação com detecção de emissão de fluorescência do corante. Através de design apropriado do protocolo de amplificação, análise de fusão dos produtos fita dupla pode ser incluída em pontos desejados em uma reação de amplificação. Nessa modalidade, apenas primers que são incorporados em DNA fita dupla fluorescem. Primers não incorporados não fluorescerão, de modo que não há necessidade de separar os primers não ligados fisicamente. O método é homogêneo. Também, a emissão de fluoroforo se origina apenas de regiões fita dupla de produtos que incluem um primer rotulado, não de todos os produtos fita dupla. O Exemplo 1 abaixo demonstra esses aperfeiçoamentos. Ele mostra que, em um único ciclo de extensão projetado para produzir produtos de extensão misturados de vários comprimentos, a curva de fusão baseada em detecção de emissões do fluoroforo do primer mostrou todos os produtos, enquanto que a curva de fusão baseada em detecção de emissões do corante não. O Exemplo 1 demonstra também o uso do método dessa modalidade em reações isotérmicas.

Conforme será apreciado por aqueles habilitados na técnica, geralmente é importante corrigir a sobreposição de fluorescência quando um corante de DNA fluorescente, por exemplo, SYBR Green I, é usado em conjunto com um primer ou sonda fluorescentemente rotulada que é excitada, através de FRET, a partir do corante intercalado. Esse é o caso porque os corantes de DNA fluorescentes emitem, tipicamente, luz

sobre uma ampla faixa espectral a qual pode incluir o comprimento de onda da luz usada para medir a fluorescência emitida pelo primer ou sonda. A correção desejada pode ser obtida através de: 1) estabelecimento do espectro de emissão do corante apenas; 2) medição da intensidade de emissão do corante em cada amostra em um comprimento de onda que é mais curto do que o comprimento de onda de emissão do primer ou sonda; 3) cálculo da intensidade de emissão do corante no comprimento de onda de emissão do primer ou sonda levando-se em conta as etapas 1 e 2; 4) subtração dessa intensidade de corante calculada da intensidade total medida no comprimento de onda de emissão do primer ou sonda. Muitas máquinas comerciais, tais como o ABI 7700 e o Cepheid Smart Cycler, fornecem software para realizar essa correção. Alternativamente, as medições de espectro do corante, emissão de corante apenas e emissão total de corante/sonda podem ser feitas e uma fórmula satisfatória para correção pode ser manualmente aplicada. Por exemplo, Lee e Fuerst, Pub. de Pedido de Patente Publicada dos Estados Unidos No. US 2002/0119450, descrevem tal formula para medição e correção manual de fluorescência do SYBR Green I que se sobrepõe sobre o Light Cycler.

Todos os Exemplos descritos no presente pedido foram realizados sobre o ABI 7700 e o software da máquina foi usado para corrigir a sobreposição de fluorescência em todos os casos nos quais o corante de DNA fluorescente foi usado em conjunto com um primer ou sonda fluorescente indiretamente excitado, a despeito do fato de a fluorescência do corante apenas ter sido registrada.

30 Para amplificações por PCR utilizando um único par de

primer, em que pelo menos um primer é fluoroforo-rotulado para excitação indireta conforme descrito acima, uma análise de curva de fusão de acordo com essa modalidade pode distinguir entre o(s) produto(s) pretendido(s) e 5 produtos não específicos. Para amplificações por PCR multiplex utilizando múltiplos pares de primer, em que pelo menos um elemento de cada par é fluoroforo-rotulado e um fluoroforo diferente é utilizado para cada par, diferentes produtos pretendidos podem ser distinguidos pela cor e 10 pelas temperaturas de fusão associadas aos diferentes fluoroforos. Para amplificações por PCR de modo geral, a(s) emissão(ões) de fluoroforo e emissões de corante podem ser monitoradas durante a reação para rastrear o desenvolvimento de produto(s) específico(s) e rastrear o 15 desenvolvimento de todos os produtos fita dupla, respectivamente.

Análises de reações de amplificação podem utilizar a proporção de emissões de fluoroforo, um sinal específico para primers ou sondas hibridizados, para o sinal de 20 emissão de corante, o qual não é tão específico. Tal proporção, por exemplo, corrige variações entre reações repetidas. Também, as análises podem utilizar o pico de fusão de primer-modelo, o qual diminui quanto à magnitude à medida que o primer rotulado é incorporado no produto ou 25 produtos da extensão.

A presente invenção inclui kits e kits parciais de amplificação que incluem um corante de DNA fluorescente, pelo menos um par de primer que inclui um primer rotulado com um fluoroforo que é excitado indiretamente quando o 30 corante é excitado e reagentes para amplificar a região

definida pelos primers, de preferência através de LATE-PCR.

Outra modalidade de um método de acordo com a presente invenção inclui adição, a uma mistura de amplificação de ácido nucléico, de um corante de DNA fluorescente, tal como 5 SYBR Green I ou, de preferência, SYBR Gold, e pelo menos uma sonda de hibridização de baixa T_m ou T_m super-baixa de alelo-discriminação, indiretamente excitável, silenciada, a qual pode ser uma sonda da presente invenção. As sondas de alelo-discriminação da presente invenção são sondas do tipo 10 fita dupla descrito por Li, Q. e colaboradores (2002), "A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based in Specific Displacement Hybridization", Nucl. Acid Res. 30: (2)e5 (uma fita de sonda de oligonucleotídeo linear fluoroforo-rotulada complementar ao alvo e uma fita 15 complementar corante silenciador-rotulada que é mais curta do que a fita da sonda, geralmente de 2-10 nucleotídeos), exceto que elas são rotuladas com um fluoroforo que é excitado indiretamente pela excitação do corante e que elas têm uma baixa temperatura de fusão, adequado para uso em 20 amplificações por LATE-PCR como sondas de baixa T_m ou T_m super-baixa. A capacidade de alelo-discriminação das sondas fita dupla pode ser ajustada conforme descrito por Li e 25 colaboradores, assim como o nível de fluorescência de fundo. Além disso, a fluorescência de fundo pode ser reduzida incluindo resíduos de guanidina adjacentes à porção fluorescente, o assim denominado "G-silenciamento".

Os métodos dessa modalidade incluem amplificação utilizando tal mistura e detecção em uma temperatura na qual a sonda se hibridiza de um modo alelo-discriminação. 30 Modalidades preferidas incluem uso de uma etapa de detecção

em baixa temperatura durante a fase de amplificação linear de uma reação de LATE-PCR em que as sondas precedentes se hibridizam ao amplicon fita simples que está sendo sintetizado, excitando o corante de DNA fluorescente em um comprimento de onda que não excita o fluoroforo ou fluoroforos diretamente e leitura de fluorescência do fluoroforo da sonda ou fluoroforos da sonda, o(s) qual(is) é ou são excitado(s) indiretamente desse modo. Outras modalidades incluem amplificação seguido por uma detecção em baixa temperatura como uma determinação de *end-point*. Algumas modalidades ainda incluem detecção de emissão do corante e determinadas modalidades preferidas incluem cálculo de uma proporção de emissão da(s) sonda(s) para emissão de corante. Detecção da emissão de corante é, mais preferivelmente, realizada logo no início da etapa de detecção, enquanto a temperatura da mistura de reação está acima das temperaturas de fusão de todas as sondas que estão presentes. Dados de moléculas fita dupla que se acumulam ou acumuladas (o sinal de corante) e de moléculas fita simples que se acumulam ou acumuladas (o sinal de cada sonda) podem ser usados para construir proporções da maneira descrita. Os métodos dessa modalidade também incluem o uso de sondas sinalizadores moleculares de baixa temperatura, conforme descrito no pedido publicado WO 03/054233, se o rótulo de fluoroforo é estimulado pela emissão do corante, mas não pelo comprimento de onda usado para excitar o corante.

A presente invenção também inclui kits e kits parciais para ensaios de LATE-PCR que incluem reagents para realização de uma amplificação não simétrica, de

preferência uma amplificação por LATE-PCR, com uma etapa de detecção em baixa temperatura (end-point ou tempo real) e que incluem um corante de DNA fluorescente, pelo menos um par de primer, de preferência um par de primer para LATE-
5 PCR incluindo um Primer em Excesso e um Primer Limitado e pelo menos uma sonda de hibridização de baixa T_m ou T_m super-baixa fluoroforo-rotulada para um produto fita simples da reação de amplificação (produto da extensão de primer presente em excesso), em que a sonda não é tolerante
10 à combinação errônea, mas é, antes, de alelo-discriminação na temperatura de detecção pretendida e em que o fluoroforo da sonda é indiretamente excitado pela excitação do corante. Em kits e kits parciais preferidos, pelo menos uma sonda é uma sonda de alelo-discriminação da presente
15 invenção. A presente invenção também inclui conjuntos de oligonucleotídeo que incluem pelo menos um par de primer para amplificação não-simétrica, de preferência amplificação por LATE-PCR e pelo menos uma sonda dupla fita de alelo-discriminação silenciada de baixa T_m ou T_m super-
20 baixa rotulada com um fluoroforo de modo a ser indiretamente excitável conforme descrito acima, de preferência por um corante SYBR, bem como tais sondas fita dupla em si.

Ainda outra modalidade de um método de acordo com a
25 presente invenção inclui adição de uma mistura de reação de amplificação não simétrica, de preferência uma mistura de reação para LATE-PCR, reagentes de detecção compreendendo um corante de DNA fluorescente tal como SYBR Gold e pelo menos uma sonda de hibridização linear fita simples
30 tolerante à combinação errônea que é perfeitamente

complementar a uma possível seqüência alvo de amplicon fita simples que pode ou não estar presente para amplificação na reação e é menos do que perfeitamente complementar a pelo menos uma outra possível seqüência alvo de amplicon fita simples que pode estar presente. Sondas úteis nessa modalidade são fita simples rotuladas com fluoroforo que é indiretamente excitável pela emissão de fluorescência do corante. Elas são sondas de baixa T_m ou, de preferência, T_m super-baixa, com relação a seus possíveis alvos mais complementares que podem estar presentes, geralmente significando alvo perfeitamente equivalente. É preferido que elas tenham uma $T_{m[0]}$ contra o alvo perfeitamente equivalente que não é mais do que uns poucos graus maior e, de preferência, abaixo, mais preferivelmente pelo menos 5 °C abaixo, da temperatura de anelamento de primer durante a fase exponencial de amplificação da reação de amplificação. As sondas podem ser lineares (ou com espiral aleatória) ou sondas com espiral aleatória de acordo com a presente invenção, isto é, silenciadas para eliminar o sinal em virtude de formação de estrutura secundária em baixas temperaturas. Sondas lineares silenciadas de acordo com a presente invenção têm, de preferência, um fluoroforo sobre uma extremidade e uma porção de silenciamento não fluorescente sobre a outra extremidade, aquela sobre a extremidade 3' da sonda substituindo a extremidade de fosfato de outro modo adicionada para impedir que a sonda seja estendida, isto é, funcione como um primer.

Essa modalidade compreende sujeição da mistura precedente à amplificação não simétrica, de preferência por LATE-PCR, para gerar moléculas de amplicon fita simples e

sujeição da mistura de reação de amplificação a uma análise térmica utilizando pelo menos uma sonda tolerante à combinação errônea que sinaliza quando de hibridização.

Análise térmica pode ser realizada não apenas após a reação de amplificação estar completa, mas também durante a etapa de detecção em baixa temperatura da LATE-PCR, durante ciclos térmicos nos quais o produto fita simples está sendo produzido, isto é, após exaustão do Primer Limitado.

Análise térmica revela alvos de cada sonda de acordo com as temperaturas de fusão dos híbridos de sonda-alvo que se formam ou desestabilizam à medida que a temperatura é diminuída ou elevada, respectivamente. À medida que a temperatura é diminuída, uma sonda primeiro se hibridizará a seu alvo perfeitamente equivalente (se presente) e emitirá um sinal fluorescente. À medida que a temperatura é adicionalmente diminuída, a sonda se hibridizará sucessivamente a alvos progressivamente "mais não-equivalentes" e emitirá sinal fluorescente aumentando em cada ocasião. Conforme explicado com relação às modalidades anteriores, emissão do corante de DNA fluorescente também pode ser detectada, de preferência quando as sondas não estão hibridizadas, isto é, em uma temperatura acima da T_m da(s) sonda(s), para permitir monitoramento do acúmulo de moléculas fita dupla na reação e permitir o uso de proporções para reduzir a dispersão entre amostras repetidas.

A presente invenção inclui kits contendo reagents para amplificação não-simétrica, de preferência uma amplificação por LATE-PCR, que incluem um corante de DNA fluorescente, pelo menos um par de primer, de preferência um par de

primer para LATE-PCR incluindo um Primer em Excesso e um Primer Limitado e pelo menos uma sonda com espiral aleatória tolerante à combinação errônea com baixa T_m ou T_m super-baixa, silenciada se necessário, para um produto da amplificação fita simples, bem como kits parciais e conjuntos de oligonucleotídeo contendo tais primers e sondas e tais sondas em si.

Os métodos de acordo com a presente invenção que utilizam uma etapa de detecção em baixa temperatura em ensaios de LATE-PCR, de preferência uma etapa de detecção em baixa temperatura após extensão de primer e antes de fusão de fita, incluem múltiplas sondas de ensaio as quais contêm mais de um par de primers e geram um ou mais amplicons fita simples (uma sonda para cada alvo), bem como ensaios com sondas múltiplas que contêm pelo menos uma sonda para múltiplos alvos. Determinados métodos preferidos com uma etapa de detecção em baixa temperatura incluem uma etapa de detecção em baixa temperatura após extensão de primer e antes de fusão de fita. Durante a etapa de detecção em tais ensaios, a temperatura pode ser diminuída para tanto quanto 30 °C ou mesmo 40 °C abaixo da temperatura de anelamento de primer, proporcionando uma grande janela de temperatura para detecção. Sondas de alelo-discriminação, além de serem diferenciáveis pela cor (comprimento de onda de emissão de fluoroforo), podem ser diferenciadas pelas diferenças na temperatura de fusão. Por exemplo, quatro diferentes sondas de alelo-discriminação FAM-rotuladas com T_m 's de 30, 35, 40 e 45 °C, respectivamente, contra seus alvos podem ser distinguidas em tempo real ou após amplificação como uma determinação de

end-point, à medida que a temperatura da reação é diminuída ou elevada, não apenas através de análise de fusão pós-amplificação. Esse grau de liberdade adicionado multiplica significativamente o número de diferentes sondas que podem ser usadas na mesma reação. Sondas tolerantes à combinação errônea terão menores T_m 's contra alvos não equivalentes do que contra alvos perfeitamente equivalentes. Combinações de sondas tolerantes à combinação errônea de baixa temperatura diferentemente coloridas que sinalizam quando de hibridização produz padrões de curvas de emissão de fluorescência temperatura-dependentes durante detecção em baixa temperatura. Os método de acordo com a presente invenção incluem o uso de tais curvas de emissão, curvas derivadas e proporções das mesmas em uma temperatura ou em diferentes temperaturas para identificar os constituintes de alvos misturados com análise de fusão pós-amplificação e também em tempo real através de monitoramento da fluorescência em várias temperaturas dentro da janela da etapa de detecção em baixa temperatura de LATE-PCR. As proporções podem incluir proporções da mesma sonda/sonda, uma sonda diferente/sonda, proporções de sonda/corante e combinações dos mesmos.

Kits para LATE-PCR, kits parciais e conjuntos de oligonucleotídeo podem incluir pelo menos duas sondas de alelo-discriminação da mesma cor que podem ser distinguidas pela T_m ou pelo menos duas sondas tolerantes à combinação errônea cuja hibridização a diferentes alvos pode ser distinguida pela T_m , de preferência sondas com espiral aleatória silenciadas que são indiretamente excitadas através de excitação de um corante de DNA fluorescente.

A presente invenção inclui métodos aperfeiçoados para preparo dos produtos da amplificação por LATE-PCR para reações de seqüenciamento, quer seqüenciamento de dideoxi ou métodos de seqüenciamento-por-síntese, tal como Piro-
5 seqüenciamento. Em particular, nós demonstramos a geração e preparo de tais materiais de iniciação em um único recipiente de reação, por exemplo, um tubo para microcentrífuga. Modalidades preferidas incluem, na mistura de reação para LATE-PCR, um reagente para inibição de
10 iniciação errônea, mais preferivelmente um reagente divulgado em nosso pedido de patente Provisório dos Estados Unidos no. 60/619.620, intitulado "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification", o qual é incorporado por referência aqui em
15 sua totalidade. Para seqüenciamento de dideoxi, nós demonstramos o preparo de produto de amplificação por LATE-PCR para seqüenciamento através de uma única etapa de diluição de amostra, um método que nós referimos como "diluir e ir". Para Piro-seqüenciamento, nós demonstramos
20 métodos que requerem apenas a adição de reagentes de enzima/substrato para Piro-seqüenciamento à mistura de produto de LATE-PCR antes de anelamento de primer.

Os métodos de acordo com a presente invenção também incluem amplificação por LATE-PCR e preparo de amostra para
25 Piro-seqüenciamento no mesmo recipiente, tal como o mesmo tubo de reação ou a mesma câmara de um dispositivo microfluídico, todos os quais nós referimos, para abreviar, como métodos em um "único tubo". Em Piro-seqüenciamento tradicional, o DNA é amplificado através de PCR simétrica,
30 onde um primer é rotulado 5' com uma molécula de biotina.

Após amplificação, glóbulos revestidos com estreptavidina são usados em conjunto com vácuo ou equipamento magnético para isolar DNA fita simples (ssDNA) e lavar os componentes residuais da reação de PCR que interferem com o Piro-
5 seqüenciamento, incluindo pirofosfato (PPi), dNTPs e primers de PCR. Em virtude de sua capacidade de gerar ssDNA, a LATE-PCR elimina a necessidade de separação de fita e simplifica o preparo de amostra quando combinada com o método no mesmo recipiente para eliminação dos quatro
10 componentes de interferência restantes da PCR. Em um de tais métodos, a necessidade de remover dNTPs restantes ao final da amplificação é minimizada usando quantidades limitadas de dNTPs na amplificação para a mistura de reação para LATE-PCR, tomando cuidado para utilizar uma quantidade
15 suficiente para produzir ssDNA o bastante para Piro- seqüenciamento. Uma enzima com atividade de pirofosfatase, por exemplo, uma pirofosfatase , tal como pirofosfatase de levedo, é adicionada ao produto da amplificação para remover PPi e a mistura é aquecida para desnaturar essa
20 enzima antes de prosseguir no Piro-seqüenciamento. Em virtude do fato de o Primer Limitado não permanecer após amplificação por LATE-PCR e o Primer em Excesso residual não poder produzir a fita estendida a partir do Primer em Excesso durante amplificação (fita de Primer em Excesso),
25 os primers restantes não precisam ser removidos em muitos casos. Contudo, iniciação errônea em potencial pode ser evitada incluindo, na mistura de reação para LATE-PCR, um oligonucleotídeo que se hibridiza ao Primer em Excesso em temperaturas abaixo da T_m do Primer em Excesso, incluindo a
30 temperatura usada para Piro-seqüenciamento.

Alternativamente, um oligonucleotídeo bloqueado para extensão na extremidade 3' e totalmente complementar ao Primer em Excesso pode ser adicionado após amplificação por LATE-PCR, mas antes de Piro-sequenciamento, para evitar 5 iniciação errônea em potencial pelo Primer em Excesso nas temperaturas usadas para Piro-sequenciamento. Uma terceira estratégia para evitar iniciação errônea pelo Primer em Excesso na extremidade 3' da fita estendida a partir do Primer Limitado durante amplificação (fita de Primer 10 Limitado) envolve o uso de uma concentração suficiente de um oligonucleotídeo 3' bloqueado contendo a mesma seqüência como o Primer em Excesso para competir com o Primer em Excesso pelos locais de ligação.

Nosso método mais preferido de preparo de amostra em 15 um "único tubo" evita a necessidade de determinar concentrações limitadas apropriadas de dNTP para amplificações em particular. Nesse método, nós primeiro adicionamos reagentes de enzima/substrato para Piro-sequenciamento ao produto de LATE-PCR, os quais removem 20 dNTPs e PPi. Em seguida, anelamos esse primer usando um primer de seqüenciamento adicionado e, então, adicionamos dNTPs individuais para Piro-sequenciamento. Alternativamente, pode-se eliminar os dNTPs através da adição de uma enzima purificada com uma atividade de 25 dNTPase, tal como apirase de batata, seguido por aquecimento para inativar a enzima e pode-se eliminar o pirofosfato através da adição de uma enzima purificada com atividade de pirofosfatase, tal como pirofosfatase de levedo, seguido por aquecimento para inativar a enzima. Se 30 ambas as enzimas são empregadas, elas podem ser adicionadas

ao mesmo tempo.

Os ensaios de acordo com a presente invenção, particularmente ensaios de LATE-PCR, incluem, de preferência, meios para evitar a iniciação errônea, a qual 5 pode causar uma diminuição no sinal da sonda nos últimos estágios da reação. Nós evitamos esse "efeito de gancho" com sucesso incluindo, na mistura de reação, um reagente de supressão de iniciação errônea divulgado em nosso pedido de patente Provisória dos Estados Unidos descrito acima. Nós 10 também evitamos esse efeito ajustando a concentração de polimerase adicionada à reação. Diminuição da iniciação errônea através de ajuste da polimerase pode ser observada em termos da cinética de reação de LATE-PCR usando uma sonda do ssDNA, bem como pela composição do produto final 15 revelada através de vários meios conhecidos na técnica.

Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são apresentados nos desenhos em anexo e na descrição abaixo. Outras características, objetivos e vantagens da invenção serão evidentes a partir da descrição e desenhos e das 20 reivindicações.

DESCRÍÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 mostra o uso de primers fluorescentemente rotulados de acordo com os métodos da invenção para análise de curva de fusão.

25 A FIG. 2 mostra redução da dispersão de sinal através do uso de proporções de produto fita simples para produto dupla de acordo com os métodos da invenção .

A FIG. 3 mostra uma comparação da identificação de cinco espécies de Micobactérias via análise de curva de 30 fusão obtida com sondas tolerantes à combinação errônea

contra o gene de RNA ribossômico 16S ou duas versões diferentes de sondas tolerantes à combinação errônea silenciadas contra o mesmo alvo projetadas de acordo com os métodos da invenção.

5 A FIG. 4 mostra a identificação de cinco espécies de Micobactérias usando apenas duas sondas tolerantes à combinação errônea contra o gene de RNA ribossômico 16S de acordo com os métodos da invenção.

A FIG. 5 mostra a identificação de cinco espécies de
10 Micobactérias via análise de curvas de fusão de primeiro-derivado mostrada na FIG. 3 usando duas sondas tolerantes à combinação errônea contra o gene de RNA ribossômico 16S de acordo com os métodos da invenção.

A FIG. 6 mostra a identificação de cinco espécies de
15 Micobactérias usando proporções de sinais fluorescentes coletados em diferentes temperaturas a partir de duas sondas tolerantes à combinação errônea contra o gene de RNA ribossômico 16S de acordo com os métodos da invenção.

A FIG. 7 mostra genotipificação de end-point de
20 amostras homozigóticas e heterozigóticas para a mutação G269 no gene de Hex A humana usando LATE-PCR e uma única sonda tolerante à combinação errônea de baixa T_m contra o alelo do tipo silvestre de acordo com os métodos da invenção.

25 A FIG. 8 mostra a identificação distinta de três diferentes alelos do gene regulador de transmembrana da fibrose cística humana (CFTR) usando LATE-PCR, sondas de baixa T_m de alelo-discriminação rotuladas com a mesma cor e análise de curvas de fusão de primeiro-derivado.

30 A FIG. 9 mostra a identificação simultânea de

diferentes combinações de vários alelos do gene regulador de transmembrana da fibrose cística humana (CFTR) usando as sondas de baixa T_m de alelo-discriminação rotuladas com a mesma cor e análise de curvas de fusão de primeiro-
5 derivado.

A FIG. 10 mostra a identificação de diferentes combinações de alelo do gene regulador de transmembrana da fibrose cística humana (CFTR) através de plotagem das alterações de fluorescência em duas temperaturas coletadas
10 de acordo com os métodos da invenção.

A FIG. 11 mostra ensaios de Normalização de Duas Temperaturas (com correção para a linha de base).

A FIG. 12 mostra ensaios de Normalização de Duas Temperaturas (sem correção para a linha de base).

15 A FIG. 13 mostra ensaios de Normalização de Três Temperaturas.

A FIG. 14 mostra uma comparação do método de preparo de amostras para LATE-PCR "diluir-e-ir" para Piro-sequenciamento de acordo com os métodos da invenção com
20 relação ao método convencional de preparo de amostras para LATE-PCR para o mesmo ensaio.

A FIG. 15 é Pirogramas obtidos de células simples preparadas através do método de LATE-PCR em um único tubo. As setas indicam o sítio IVS10 de β -globina de: a) células
25 homozigóticas do tipo silvestre, b) heterozigóticas e c) mutantes homozigóticas.

A FIG. 16 é o Pirograma de uma reação de Piro-sequenciamento realizada para mais de cinqüenta pares de base. A ordem de distribuição de nucleotídeo é listada
30 abaixo de cada pico e a sequência esperada é anotada acima.

A FIG. 17 é cromatografias de seqüenciamento de dideóxi resultante do método de preparo de amostras para LATE-PCR de "diluir-e-ir" para seqüenciamento de dideóxi de acordo com os métodos da invenção e do método convencional 5 de preparo de amostras para LATE-PCR para o mesmo ensaio.

A FIG. 18 é um gel de eletroforese de uma amplificação por LATE-PCR de mais de um produto do mesmo modelo de DNA na mesma reação.

A FIG. 19 é cromatografias de seqüenciamento de 10 dideóxi por "diluir-e-ir" do produto da amplificação por LATE-PCR da FIG. 18.

A FIG. 20 mostra que a quantidade de ssDNA e dsDNA geradas através de amplificação por LATE-PCR pode ser medida independentemente e pode ser usada para calcular a 15 proporção de ssDNA/dsDNA a qual, por sua vez, pode ser usada para determinar se a quantidade de ssDNA assim acumulada até o momento é suficiente para subsequente seqüenciamento via o método de "diluir-e-ir".

A FIG. 21 é a cromatografia de seqüenciamento de 20 dideóxi resultante do método de "diluir-e-ir" empregado em uma mistura a 50:50 de amplicons de LATE-PCR tendo duas seqüências intimamente relacionadas, mas diferentes.

A FIG. 22 mostra a faixa de sensibilidade de amplicons de LATE-PCR misturados tendo seqüências intimamente 25 relacionadas, mas diferentes, que podem ser distinguidos via o método de "diluir-e-ir".

A FIG. 23 mostra que a LATE-PCR, junto com pelo menos uma sonda tolerante à combinação errônea, pode ser usada para gerar curvas de fusão de end-point as quais, por sua 30 vez, podem ser usadas para quantificar as quantidades

relativas de dois ou mais amplicons de LATE-PCR misturados tendo seqüências intimamente relacionadas, mas diferentes.

A FIG. 24 mostra a cinética de vários ensaios de LATE-PCR realizados usando duas diferentes concentrações de Taq polimerase com cada uma de três diferentes quantidades de DNA genômico.

Símbolos de referência semelhantes nos vários desenhos indicam elementos semelhantes.

DESCRÍÇÃO DETALHADA

10 A presente invenção inclui ensaios de amplificação de ácido nucléico, por exemplo, ensaios de PCR, que incluem detecção de emissão de fluorescência de pelo menos um primer fluoroforo-rotulado que é excitado, não diretamente através de aplicação de luz (visível ou não) de um comprimento de onda fortemente absorvido pelo fluoroforo, mas indiretamente através de aplicação de luz de um comprimento de onda que excita um corante de DNA fluorescente próximo, tal como SYBR Green ou, de preferência, SYBR Gold, bem como kits completos e parciais 15 contendo todos ou alguns reagentes de amplificação e conjuntos de oligonucleotídeo contendo tais primers rotulados e também os primers em si.

20 Primers de amplificação são bem conhecidos. Os primers de acordo com a presente invenção são oligonucleotídeos curtos, geralmente de cinqüenta bases de comprimento, que se hibridizam a uma fita alvo e são estendidos por uma polimerase apropriada. Um primer pode ser composto de nucleotídeos que ocorrem naturalmente ou pode incluir nucleotídeos não naturais e ligações inter-nucleotídicas 25 não naturais. Embora primers geralmente sejam

oligonucleotídeos lineares, eles podem incluir estrutura secundária (veja, por exemplo, Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ (1997), "A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based in Energy Transfer", Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521). Amplificações freqüentemente incluem o uso de um ou mais pares de primer, cada um consistindo de um primer dianteiro e um primer reverso. Em métodos, kits e conjuntos de oligonucleotídeo de acordo com a presente invenção, um primer de um par ou ambos os primers do par podem ser rotulados com um fluoroforo covalentemente ligado que fluoresce quando corante de DNA fluorescente próximo é estimulado. Quando o primer rotulado se hibridiza (ou anela) à sua seqüência complementar em uma fita modelo, uma região fita dupla é formada. O corante de DNA fluorescente se associa com essa região, através de intercalação na mesma ou de outro modo e se torna fluorescente nessa região, a qual está próxima do fluoroforo do primer de modo que, quando o corante é estimulado em um comprimento de onda que não excita diretamente o fluoroforo, o fluoroforo emite em seu comprimento de onda característico. Esses primers podem ser usados para monitorar a síntese de produtos resultantes da extensão de uma DNA polimerase, tal como aqueles resultantes de PCR e ensaios de extensão de primer em tempo real ou através de detecção de end-point e/ou para avaliar a especificidade de produto através de análise da curva de fusão.

Os primers de acordo com a presente invenção, usados como um substrato para extensão por uma DNA polimerase, incluindo primers para amplificação por PCR (simétrica ou

não simétrica incluindo, particularmente, LATE-PCR) são rotulados em qualquer posição de nucleotídeo com um fluoroforo covalentemente ligado, de modo que a extremidade 3' do primer de oligonucleotídeo permaneça disponível para 5 extensão. Os primers podem ter o design de sondas fita dupla, conforme descrito por Li, Q. e colaboradores (2002) ("A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based in Specific Displacement Hybridization", Nucl. Acid Res. 30: (2)e5). A única restrição com relação à seqüência sobre o 10 oligonucleotídeo do primer é que o oligonucleotídeo não deve ter qualquer estrutura secundária que, em si, leve à excitação indireta do fluoroforo, significando que geralmente não existe estrutura secundária maior do que 2 pares de base. A porção de fluoroforo não deverá ser 15 apreciavelmente excitada diretamente, mas o corante deve ser diretamente excitado pelo comprimento de onda da fonte de excitação usada; o fluoroforo deve emitir quando o corante de DNA fluorescente é excitado em sua presença imediata, geralmente não maior do que uma distância na qual 20 o fluoroforo sofre transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET); e o espectro de emissão do fluoroforo escolhido deve ser distinguível do espectro de emissão do corante de DNA fluorescente através do uso de filtros ou deconvolução espectral. Sob essas condições, o 25 fluoroforo fluoresce quando de incorporação no produto fita dupla após anelamento de primer, incluindo extensão por uma DNA polimerase. Perda de fluorescência ocorre durante aquecimento, quando a temperatura de fusão (T_m) do trecho de DNA fita dupla em particular contendo o fluoroforo é 30 atingido.

Condições para uso dos primers de acordo com a presente invenção em conjunto com corantes de DNA fluorescentes (concentração de primer e corante de DNA, comprimento de onda de excitação de corante de DNA) são as 5 mesmas conforme aquelas conhecidas na técnica para monitoramento da síntese de produtos de reações de extensão de primer (incluindo PCR) no curso da reação e para avaliação de especificidade do produto da reação através de análise de curva de fusão usando apenas corantes de DNA 10 fluorescentes, exceto que a fluorescência é coletada no comprimento de onda de emissão correspondendo ao fluoroforo de primer ao invés de ou além do comprimento de onda do corante. Sob essas condições, os sinais de fluorescência se originam de seqüências fita dupla contendo os primers, ao 15 invés de todas as seqüências fita dupla na reação.

Comparação do desempenho do corante de DNA com métodos e sistemas de acordo com a presente invenção foi realizada por meio do experimento reportado abaixo no Exemplo 1 e na FIG. 1. Um primer fluoroforo-rotulado foi estendido através 20 de DNA polimerase na presença de corante SYBR Green e na presença de um oligonucleotídeo não extensível relativamente longo hibridizado à fita modelo próximo da região de extensão de primer. Isso resultou em uma mistura de produtos tendo híbridos de fita modelo-primer não 25 estendido, primer curto-produtos da extensão e o oligonucleotídeo não extensível, de modo que os híbridos com o modelo tinham T_m 's oscilando de 60 °C (o primer fluoroforo (Cy5)-rotulado) a 79 °C (o oligonucleotídeo não extensível), com os produtos da extensão de primer caindo 30 entre essas duas T_m 's.

Análise padrão de curva de fusão foi realizada sobre a mistura de reação final (amostras duplicadas) usando leituras de fluorescência do corante e leituras de fluorescência do fluoroforo. As curvas de fusão são 5 apresentadas na FIG. 1. O Painel A é as curvas de fusão 1 obtidas utilizando emissões de corante. O único pico é de 79 °C, a temperatura de fusão do oligonucleotídeo não extensível. Nenhum outro pico é observado, nem mesmo aquele do primer não extensível. O Painel A demonstra a migração 10 do corante SYBR Green para o híbrido com maior T_m durante geração da curva de fusão, o que disfarça a presença de híbridos com menor T_m . O Painel B é as curvas de fusão 2 obtidas utilizando emissões de fluoroforo. Ele mostra um pico a 60 °C, a T_m do híbrido primer não estendido-modelo e 15 um pico adicional em uma temperatura entre 69 °C e 79 °C, isto é, um pico indicativo de produto da extensão de primer. As menores T_m 's são observadas a despeito da tendência do corante de migrar, conforme mostrado pelas curvas de fusão 1. Monitoramento da emissão de fluoroforo 20 de acordo com a presente invenção revela cada espécie híbrida rotulada com o fluoroforo na mistura em sua concentração correta. No caso de amplificações por PCR utilizando um único par de primers, em que pelo menos um membro do par é um primer de acordo com a presente 25 invenção, análise da curva de fusão pode distinguir entre produtos específicos e não específicos usando um único fluoroforo porque o produto específico tem uma temperatura de fusão esperada e o produto não específico tem uma temperatura de fusão inesperada.

30 No caso de amplificações por PCR multiplex utilizando

mais de um par de primers, em que pelo menos um membro de cada par de primers é um primer de acordo com a presente invenção, dois produtos específicos diferentes podem ser distinguidos um do outro porque eles têm valores de T_m 5 diferentes, mas esperados e/ou porque os dois primers diferentes empregados são rotulados com diferentes fluoroforos. Além disso, análise de curva de fusão usando os primers de acordo com a presente invenção pode ser realizada durante uma reação de amplificação em andamento 10 ou ao final de uma reação.

Incorporação de um ou mais primers de acordo com a presente invenção durante o curso de uma reação pode também ser usada para medir quantitativamente a extensão de amplificação de um ou mais alvos durante o curso de uma PCR 15 ou a síntese de um ou mais trechos de DNA fita dupla durante o curso de uma reação de extensão isotérmica. Em qualquer caso, a quantidade de molécula ou moléculas de produto fita dupla de comprimento total pode ser acompanhada com o tempo através de detecção repetida de 20 aumento de fluorescência ou pode ser medida ao final de uma reação. Além disso, a incorporação de um ou mais primers de acordo com a presente invenção durante o curso de reações isotérmicas ou reações com ciclo térmico pode ser usada para medir a existência e/ou acúmulo de produtos parciais, 25 isto é, aqueles que começaram a extensão junto com uma fita modelo, mas ainda não atingiram seu possível comprimento máximo. Em tais casos, as temperaturas de fusão dos produtos parciais são menores do que a temperatura de fusão do produto de comprimento total, mas são maiores do que a 30 temperatura de fusão do primer rotulado a partir do qual

5 eles são derivados. Além disso, concomitante com a incorporação do primer rotulado em uma fita de produto parcial ou de comprimento total, a magnitude dos picos de temperatura de fusão gerados a partir do híbrido de primer/DNA-DNA modelo diminui e pode ser usada como uma medida adicional de síntese de DNA.

Conforme estabelecido acima, cada trecho de um DNA fita dupla ou amplicon sintetizado através de incorporação de um primer de acordo com a presente invenção gera um sinal fluorescente no comprimento de onda de emissão do fluoroforo covalentemente ligado ao primer, quando indiretamente estimulado através de FRET ou outro mecanismo a partir do corante SYBR ligado, um "sinal primer-específico". O mesmo DNA fita dupla também gera um sinal fluorescente no comprimento de onda de emissão do corante SYBR, o "sinal de SYBR total", a soma de todas as seqüências fita dupla presentes na reação, uma vez que todas as seqüências fita dupla fluorescem, a despeito de terem um primer rotulado incorporado. Assim, os primers de acordo com a presente invenção podem ser usados para analisar os sinais fluorescentes em termos da seguinte proporção: (sinal primer-específico/sinal de SYBR total), aqui depois o valor de (PSS/TSS). Análise de dados em termos do valor de (PSS/TSS) corrige variações no sinal de 10 DNA fluorescente do corante (TSS) entre reações repetidas. Isso é particularmente útil no caso de amplificações por LATE-PCR, porque a taxa de síntese de amplicon fita simples é proporcional à quantidade de amplicon fita dupla acumulado ao final da fase exponencial de reação. Assim, 15 pequenas diferenças no nível de DNA fita dupla entre 20 25 30

reações repetidas alteram a taxa de acúmulo de amplicon fita simples.

Também é possível utilizar mais de um primer rotulado com o mesmo fluoroforo, na medida em que os amplicons sejam 5 diferenciáveis por uma análise de curva de fusão pós-amplificação. Veja FIG. 1, Painel B, para exemplificação desse princípio. Sinal do fluoroforo em comum ao final de uma etapa de extensão, a qual pode ser a etapa de extensão final (end-point) ou etapas de extensão intermediárias, 10 proporciona uma indicação dos amplicons totais incorporando o fluoroforo. Análise de curva de fusão distingue entre produtos e proporciona uma medida quantitativa de suas concentrações.

LATE-PCR é uma amplificação por PCR não simétrica que, 15 dentre outras vantagens, proporciona um grande "espaço de temperatura" no qual ações podem ser tomadas. Veja WO 03/054233 e Sanchez e colaboradores (2004), citados acima. LATE-PCR permite o uso de sondas de hibridização de "baixa T_m " e " T_m super-baixa" para detectar os produtos da 20 amplificação ("amplicons") que são fita simples. Vários tipos de sondas que são específicas a um único alvo em um ensaio em particular, incluindo sondas de alelo-discriminação capazes de discriminar contra uma combinação errônea de um único par de base, tais como sondas 25 sinalizadores moleculares de alelo-discriminação, podem ser utilizadas com LATE-PCR como sondas de baixa T_m e T_m super-baixa, assim como sondas tolerantes à combinação errônea, tais como sondas sinalizadoras moleculares tolerantes à 30 combinação errônea ou sondas lineares (espiral aleatória) tendo um fluoroforo indiretamente excitável por emissão de

um corante SYBR. Nós projetamos uma nova classe de sondas de alelo-discriminação útil como sondas de baixa T_m e T_m super-baixa em ensaios de LATE-PCR que permitem a determinação de proporções de fita simples/fita dupla dentro de uma reação, assim como sondas sinalizadoras moleculares de alelo-discriminação rotuladas com tal fluoroforo.

As sondas de alelo-discriminação de acordo com a presente invenção são sondas silenciadas, de alelo-discriminação, fita dupla modificadas de acordo com Li, Q. e colaboradores (2002), Nucl. Acid Res. 30: (2)e5). Elas têm as seguintes modificações: elas são rotuladas com um fluoroforo que é indiretamente excitável através de excitação de um corante fluorescente de DNA fita dupla, tal como SYBR Green ou SBYR Gold, mas não diretamente excitáveis pelo comprimento de onda utilizado para estimular o corante (nesse caso, similar aos primers discutidos acima) e elas são construídas para serem sondas de baixa T_m ou T_m super-baixa. Quando não ligada à sua seqüência alvo, tal sonda se liga a um oligonucleotídeo complementar mais curto. Nós preferimos que o oligonucleotídeo complementar inclua um corante silenciador, tal como corante silenciador Dabcila ou a Black Hole™, para reduzir a fluorescência de fundo da sonda. Alternativamente ou além disso, a fluorescência de fundo pode ser reduzida incluindo resíduos de guanidina adjacentes ao fluoroforo (G-silenciamento). Na presença da fita alvo totalmente complementar, a fita complementar mais curta é deslocada, a fita fluoroforo-rotulada mais longa se hibridiza ao alvo e a o fluoroforo é não silenciado e

tornado capaz de receber energia do corante de modo a fluorescer em seu comprimento de onda característico. Várias dessas sondas para diferentes alvos, rotuladas com diferentes fluoroforos, podem ser usadas para ensaios 5 multiplex.

Tais sondas de alelo-discriminação são projetadas para ter uma temperatura de fusão concentração-ajustada, $T_m[0]$, no ensaio, o que as tornam com baixa T_m ou T_m super-baixa. A $T_m[0]$ do híbrido de sonda-alvo é, convenientemente, 10 determinada e ajustada empiricamente, embora um valor calculado possa ser empregado, pelo menos como um bom ponto de partida para minimizar ajuste. O comprimento e concentração da fita complementar da sonda com relação à fita fluoroforo-rotulada são ajustados empiricamente para 15 discriminação máxima de alelo. Nós começamos com um comprimento de 1-3 nucleotídeos mais curto do que a fita fluoroforo-rotulada e uma concentração de 1-1,2 vezes a concentração da fita fluoroforo-rotulada.

Em um ensaio de LATE-PCR, essas sondas de alelo- 20 discriminação são utilizadas em uma etapa de detecção em baixa temperatura, de preferência após a etapa de extensão de primer em ciclos após exaustão do Primer Limitado. Para leituras em tempo real sobre múltiplos ciclos, o corante SYBR é excitado e a fluorescência é lida do corante e do 25 fluoroforo (ou fluoroforos). Nós preferimos ler o sinal de corante durante ou ao término da etapa de extensão de PCR, quando a temperatura está acima da T_m da sonda (ou sondas) e ler a emissão de fluoroforo durante a etapa de detecção em baixa temperatura, quando as sondas (uma sonda de alelo- 30 discriminação de acordo com a presente invenção ou uma

sonda sinalizadora molecular apropriadamente rotulada) são hibridizadas. Então, nós determinamos a proporção de fluorescência de cada sonda para o sinal total de SYBR. Essa proporção minimiza diferenças entre ensaios repetidos 5 em virtude de diferenças no acúmulo de produto. Pelo fato das diferenças serem minimizadas, tais proporções podem ser usadas para análise de *end-point* também.

O uso de proporções de produto fita simples para produto fita dupla permitido por primers e sondas de acordo 10 com a presente invenção é uma técnica para reduzir a dispersão entre ensaios repetidos, conforme foi estabelecido. Isso é particularmente importante para ensaios de *end-point*, os quais não revelam a cinética de reação. Um exemplo é um ensaio de LATE-PCR para distinguir 15 amostras homozigóticas e amostras heterozigóticas utilizando um par de primer para ambos os alelos e uma sonda de alelo-discriminação de acordo com a presente invenção. A FIG. 2 ilustra a redução na dispersão obtida quando aplicada a uma amplificação por LATE-PCR com uma 20 etapa de detecção em baixa temperatura realizada com um corante SYBR (nesse caso, SYBR Gold), uma sonda de alelo-discriminação para um alelo rotulado com Cy5, excitação do corante e leituras de sinais do corante (a 72 °C, a temperatura de extensão) e o fluoroforo (a 55 °C, uma 25 detecção em baixa temperatura após extensão de primer). O Painel A apresenta as leituras em tempo real do fluoroforo para amostras homozigóticas repetidas (círculo 21) e amostras heterozigóticas repetidas (círculo 22). Conforme é evidente, a dispersão entre as réplicas borra a diferença. 30 O Painel B, contudo, plota a proporção de sinais de Cy4

para sinais de SYBR para as amostras homozigóticas (círculo 23) e amostras heterozigóticas (círculo 24). A redução de dispersão é suficiente para permitir um ensaio de *end-point*.

5 A presente invenção também inclui sondas fita simples com baixa T_m ou T_m super-baixa tolerantes à combinação errônea que são rotuladas, de preferência terminalmente rotuladas, com um fluoroforo excitável pela emissão de um corante de DNA fluorescente (por exemplo, SYBR Green I ou 10 SYBR Gold) e que são silenciadas para reduzir a fluorescência de fundo. Essas sondas trazem uma porção de silenciamento que suprime a fluorescência na ausência do alvo. Sondas lineares tolerantes à combinação errônea têm uma tendência a duplicar e formar regiões fita dupla curtas 15 à medida que a temperatura é diminuída. O uso de uma etapa de detecção por LATE-PCR em baixa temperatura exacerba essa tendência. Isso não ocorre quando a seqüência de sonda é hibridizada à seqüência alvo. Se a sonda inclui um fluoroforo que é excitado pela emissão de um corante SYBR 20 que está presente na mistura de reação, o corante se intercala em ou, de outro modo, se associa com a região fita dupla não desejada das moléculas de sonda não ligadas e, assim, excita o fluoroforo da sonda através de FRET. O resultado é um aumento na fluorescência de fundo em baixa 25 temperatura.

Silenciamento de sondas tolerantes à iniciação errônea de acordo com a presente invenção é obtido através da adição de uma porção de silenciamento, por exemplo, um corante silenciador (BHQ) DABCILA ou Black Hole™, à sonda 30 em um local no qual ele silencia a fluorescência de

fluoroforo resultante da estrutura secundária não desejada dentro da sonda não ligada. Nós preferimos adicionar o corante silenciador ao extremidade oposta do fluoroforo sempre que possível. O Exemplo 2 abaixo exemplifica duas possíveis técnicas, simplesmente adicionando um corante silenciador ou construindo um "hairpin" silenciado, isto é, uma estrutura secundária especificamente projetada que mantém o corante silenciador em proximidade íntima com o fluoroforo, à estrutura secundária, ou ambos. De preferência, a T_m da estrutura secundária construída é pelo menos 5 °C maior do que a T_m de qualquer estrutura secundária alternativa de modo que, na ausência de alvo, a maioria das moléculas da sonda estão na configuração de "hairpin" e a fluorescência de fundo é baixa. A T_m do tronco construído está abaixo da T_m da sonda hibridizada ao alvo perfeitamente equivalentes e similar à T_m da sonda hibridizada a seus alvos não equivalentes, de modo que a hibridização aos alvos da seqüência dentro do tronco não é impedida pela formação do tronco.

Detecção e identificação de alvos de ácido nucléico podem ser realizadas utilizando uma ou múltiplas sondas tolerantes à combinação errônea de baixa temperatura que sinalizam quando hibridizadas, incluindo sondas sinalizadoras moleculares tolerantes à combinação errônea, sondas fita simples lineares que são indiretamente excitadas através de excitação de um corante de DNA fluorescente e sondas lineares silenciadas de acordo com a presente invenção. Uma mistura de sonda pode, para determinadas modalidades, incluir também pelo menos uma sonda alelo-específica de acordo com a presente invenção.

Uma técnica útil é utilizar uma proporção de fluorescência de duas sondas como uma função da temperatura para distinguir entre alvos tendo uma T_m similar com relação a pelo menos uma das sondas. Algumas vezes, nós referimos as 5 curvas de tal proporção como uma "assinatura de fluorescência" de um alvo.

Com LATE-PCR que inclui uma etapa de detecção em baixa temperatura, é possível combinar o efeito de temperatura de detecção com o efeito de assinatura de fluorescência. um 10 ensaio que nós usamos com múltiplas sondas tolerantes à combinação errônea incluindo, mas não limitado a, sondas silenciadas, fita simples, indiretamente excitáveis de acordo com a presente invenção, é uma amplificação por LATE-PCR consistindo de uma etapa de temperatura elevada 15 para desnaturar o DNA fita simples (95 °C durante 2 min), seguido por amplificação em fase exponencial utilizando Primer Limitado e Primer em Excesso (30 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 60 °C durante 15 seg e 78 °C for 40 seg), seguido pelo término da fase exponencial e a subsequente 20 fase linear durante as quais as etapas de detecção de sonda estão incluídas (40 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 60 °C durante 15 seg, 78 °C durante 40 seg, 55 °C durante 20 seg, 50 °C durante 20 seg, 45 °C durante 20 seg e 40 °C durante 20 seg). Isso proporciona quatro temperaturas de detecção 25 abaixo da temperatura de anelamento de primer, 60 °C. A produção de fita dupla pode ser monitorada através de emissão de corante SYBR na temperatura de extensão de primer, 78 °C, a qual está acima da T_m de qualquer sonda. Emissão de fluoroforo pode ser monitorada em cada 30 temperatura baixa de 55 °C a 40 °C. Após o último ciclo, a

temperatura pode ser diminuída para um valor baixo, por exemplo, 30 °C, e lentamente aumentada para análise de fusão. Além dos níveis de fluorescência detectados, proporções de fluorescência de fluoroforo para 5 fluorescência de corante e proporções de fluorescência de fluoroforo podem ser usadas para gerar informação de diferenciação de amplicons.

Algumas das Figures são ilustrativas de técnicas que tomam vantagem das seguintes possibilidades. A FIG. 4 10 mostra o comportamento de fusão de suas sondas tolerantes à combinação errônea contra o gene de RNA ribossômico 16s de várias espécies de Micobactérias. Duas sondas foram usadas: a sonda silenciada de formação de "hairpin" descrita no Exemplo 2, tendo a seqüência 5'-Cy5 - CTG GAT AGG ACC ACG 15 AGG CCA G - BHQ II -3' (SEQ. ID No. 2) e uma sonda TAMRA-rotulada tendo a seqüência 5'-G CAT GTC TTG TGG TGG-T AMRA- 3' (SEQ. ID No. 3). Descobriu-se que a última sonda, a qual não foi silenciada, proporciona sinais discerníveis acima da base para várias espécies. O Painel A da FIG. 4 20 apresenta curvas de fusão para a sonda de "hairpin" sem alvo (linha 41), *M. asiaticum* (linha 42), *M. gordonaee* (linha 43), *M. heidelbergense* (linha 44), *M. malmoense* (linha 45) e *M. marinum* (linha 46). O Painel B apresenta 25 curvas de fusão para a sonda TAMRA-rotulada sem alvo (linha 47), *M. asiaticum* (linha 48), *M. gordonaee* (linha 49), *M. heidelbergense* (linha 50) *M. malmoense* (linha 51) e *M. marinum* (linha 52). O Painel C da FIG. 4 plota a proporção 30 de fluorescência de TAMRA para fluorescência de Cy5, *M. asiaticum* (linha 53), *M. gordonaee* (linha 54), *M. heidelbergense* (linha 55), *M. malmoense* (linha 56) e *M.*

marinum (linha 57).

Outra técnica analítica é plotar a taxa de alteração de fluorescência dos fluoroforos como uma função da temperatura. A FIG. 5 apresenta tais plotagens para a sonda 5 de "hairpin" silenciada Cy5-rotulada de acordo com a presente invenção e a sonda não silenciada TAMRA-rotulada, ambas descritas acima. O Painel A é a sonda de "hairpin" silenciada e o Painel B é a sonda TAMRA-rotulada. As plotagens mostram picos de fusão para *M. asiaticum* (linhas 10 61, 71), *M. gordonae* (linhas 62, 72), *M. heidelbergense* (linhas 63, 73), *M. malmoense* (linhas 64, 74) e *M. marinum* (linhas 65, 75). Usando ambas as sondas, é possível distinguir os cinco alvos pelos picos de fusão. A sonda Cy5-rotulada em si foi capaz de distinguir *M. gordonae* 15 (linha 62) dos outros. A sonda TAMRA-rotulada em si pôde distinguir cada um de *M. asiaticum* (linha 71), *M. gordonae* (linha 72) e *M. marinum* (linha 75) dos outros. Tomadas juntas, essas sondas poderiam distinguir *M. heidelbergense* de *M. asiaticum*, porque *M. heidelbergense* proporcionou um 20 pico elevado com a sonda Cy5 e um baixo pico com a sonda TAMRA, enquanto que *M. asiaticum* proporcionou o oposto. Com uma única sonda por amplicon, alturas relativas de pico podem refletir diferenças na concentração de produto. Aqui, contudo, ambas as sondas detectam o mesmo amplicon, assim, 25 alturas relativas de pico refletem diferenças nas características de fusão de sonda-alvo.

Outra ferramenta analítica, descrita acima, é usar uma ou mais proporções de fluorescência, tal como, na modalidade discutida aqui em particular, a proporção de 30 fluorescência de TAMRA para a fluorescência de Cy5 na mesma

temperatura ou em temperaturas diferentes durante a PCR. Uma estratégia útil para design de sonda inclui projetar uma sonda para se ligar a uma região conservada em comum a múltiplas espécies para servir como uma referência ou 5 incluindo, onde necessário, utilizando uma parte da seqüência do Primer Limitado como uma região conservada. Essa é uma opção para LATE-PCR, porque as T_m 's da sonda estão bem abaixo da T_m do Primer Limitado e da temperatura de anelamento, de modo que a sonda com uma seqüência em 10 comum não interfere com a amplificação. A FIG. 6 mostra os resultados usando uma combinação de proporções de fluorescência. Nessa modalidade, nós utilizamos, como uma proporção de valores de fluorescência de TAMRA/Cy5, cada um coletados na temperatura de detecção de 40 °C e, como a 15 outra proporção, a proporção de sinais fluorescentes de TAMRA/Cy5 coletados nas temperaturas de detecção de 45 °C e 55 °C, respectivamente. A FIG. 6 plota ambas as proporções em um ciclo em particular, nesse caso, ciclo 50. Seis réplicas proporcionaram dados não sobrepostos para as 20 várias espécies de *M. asiaticum* (círculo 81), *M. gordonae* (círculo 82), *M. heidelbergense* (círculo 83), *M. malmoense* (círculo 84) e *M. marinum* (círculo 85).

Medição de fluorescência da sonda em diferentes temperaturas durante PCR tem vantagens com relação à 25 análise limitada à fusões pós-PCR. Uma vantagem é a capacidade de comparar valores de fluorescência em um número específico de ciclos após o ciclo de limiar, valor de CT, ter sido atingido. Isso permite o uso de proporções com corantes SYBR (ou outros corantes de intercalação), 30 conforme descrito acima. Outra vantagem é que cada amostra

tem uma fluorescência de fundo medida em cada temperatura durante ciclos antes de detecção de amplicon. Assim, ajustes precisos podem ser feitos para variações amostra-para-amostra na fluorescência de fundo. É possível medir a 5 fluorescência em muitas temperaturas durante a PCR, proporcionando análise de fusão quase que completa sobre a faixa de temperatura na qual a sonda mostra diferenças na hibridização a diferentes alvos. O número e duração dessas etapas dependem, em parte, das capacidades do equipamento 10 de detecção. Detecção contínua de fluorescência durante aumentos ou diminuições a temperatura é possível com alguns ciclizadores térmicos. Detecção em múltiplas temperaturas não precisa começar até algum ponto exatamente antes que uma elevação inicial na fluorescência é esperada. Detecção 15 em múltiplas temperaturas pode ser feita a cada ciclo ou em algum outro intervalo, por exemplo, a cada cinqüenta ciclos. Eliminação de múltiplas etapas de detecção durante os ciclos iniciais e redução da freqüência dessas etapas reduz o tempo global requerido para completar a reação de 20 amplificação. Quando de utilização de uma proporção de fluorescência de sonda para fluorescência de corante, de preferência, a fluorescência de sonda é medida sobre as temperaturas nas quais a sonda se hibridiza a seus alvos e a fluorescência do SYBR é medida em temperaturas nas quais 25 as sondas não são ligadas. Mais preferivelmente, a fluorescência do SYBR é medida na temperatura de extensão. Uma vez que a fluorescência da sonda aumenta em ciclos bem além do valor do ciclo de limiar (CT) enquanto a fluorescência do SYBR atinge um platô, essas proporções 30 mudarão durante a reação de amplificação. Portanto, é

importante comparar proporções de amostras individuais em um número específico de ciclos além do valor de CT de cada amostra.

Análise de produtos de DNA fita simples também pode ser realizada usando uma única sonda tolerante à combinação errônea cujo sinal é medido em mais de uma, por exemplo, duas ou três, temperaturas diferentes. Os dados resultantes podem, então, ser processados como proporções usando os valores de fluorescência em duas ou mais temperaturas. A proporção reduz significativamente as diferenças de sinal entre amostras repetidas e proporciona medição quantitativa do alelo em questão. A FIG. 11 mostra níveis de fluorescência de sonda em duas temperaturas. Conforme ilustrado na FIG. 11, sinais de sonda provenientes de hibridização da sonda à fita de Primer em Excesso são coletados em uma temperatura elevada onde a sonda é de discriminação de alelo e se liga apenas ao alelo totalmente complementar, bem como em temperaturas menores onde a sonda é totalmente tolerante à combinação errônea e se liga a todas as possíveis variantes alélicas da seqüência alvo. Medição da fluorescência na temperatura elevada e baixa e cálculo das proporções resultantes também podem ser realizados como um ensaio de end-point. Nós nos referimos a esses ensaios como "Ensaios de Normalização de Duas Temperaturas (sem correção para a base)". Eles distinguem prontamente genotipos homozigóticos e heterozigóticos, conforme ilustrado na FIG. 11. Esse tipo de ensaio pode ser realizado com um ensaio de LATE-PCR homogêneo de end-point, ensaios de QE LATE-PCR.

A FIG. 11 reporta sinais de fluorescência corrigidos

para a linha de base. Conforme discutido no Exemplo 5, nós preferimos usar sinais de fluorescência brutos ao invés de corrigidos para a linha de base do ABI 7700, conforme mostrado na FIG. 12. A correção para a linha de base 5 introduz potencialmente defeitos nas proporções fluorescentes normalizadas de amostras individuais, porque o fator de correção é sensível à flutuações espúrias nos sinais de fluorescência de fundo usados para definir a linha de base. Leituras da fluorescência bruta não estão 10 sujeitas a esse defeito. Contar com os sinais fluorescentes brutos torna o ensaio aplicável a qualquer termociclizador de PCR com capacidades de fluorímetro ou regular os termociclizadores usados em combinação com um fluorímetro temperatura-regulado para leituras de fluorescência de end- 15 point.

Genotipificação por QE-LATE-PCR pode ser ainda refinada construindo proporções de sinais detectados em mais de duas temperaturas. Um método com três temperaturas para normalização de dados de end-point é fornecido na 20 seguinte fórmula:

Valor de fluorescência normalizado = $(Fs-Ft)/(Fb-Ft)$,
 onde (Ft = fluorescência na temperatura superior), (Fb = fluorescência na temperatura inferior), (Fs = fluorescência em qualquer dada terceira temperatura). O método com três 25 temperaturas aplicado a genotipos homozigóticos e heterozigóticos de um sítio SNP dentro do gene p53 humano é descrito no Exemplo 6 e ilustrado na FIG. 13.

Piro-sequenciamento é um método de seqüenciamento por síntese isotérmico, em tempo real conhecido na técnica. Ele 30 é catalisado por quatro enzimas cineticamente equilibradas:

DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase. O método inclui um primer de seqüenciamento anelado a DNA fita simples. Cada nucleotídeo é distribuído e testado individualmente com relação à sua incorporação na extremidade 3' do primer de seqüenciamento de acordo com a seqüência do DNA modelo. Um evento de incorporação com sucesso é acompanhado por liberação de pirofosfato (PPi) em uma quantidade equimolar à quantidade de nucleotídeo incorporado. ATP sulfurilase converte, quantitativamente, o PPi liberado em ATP na presença de ATP 5' fosfo-sulfato de adenosina. ATP, então, aciona a conversão luciferase-mediada de luciferina em oxiluciferina, que gera luz visível em quantidades que são proporcionais à quantidade de ATP. A luz é detectada por uma câmera com dispositivo carga-acoplada (CCD) e visualizada como um pico em um pirograma. dNTP não incorporado e ATP em excesso são continuamente degradados pela apirase. A seqüência de nucleotídeo é determinada a partir da ordem de distribuição de nucleotídeo e alturas de pico no pirograma, os quais são proporcionais às quantidades de nucleotídeos incorporados.

LATE-PCR gera eficazmente DNA fita simples e, assim, elimina a necessidade de métodos convencionais de preparo de amostra para Piro-seqüenciamento requeridos para gerar modelos fita simples a partir de produtos de PCR fita dupla tradicionais. O uso de produtos de LATE-PCR para Piro-seqüenciamento, contudo, requer remoção eficaz de reagentes deixados pela reação de amplificação (dNTP, pirofosfato e Primers em Excesso que interferirão com a química de Piro-seqüenciamento). Remoção dos reagentes deixados pode ser realizada através de purificação em coluna, precipitação

com etanol ou qualquer abordagem conhecida de purificação de produto de PCR para remoção de dNTP, pirofosfato e Primers em Excesso da reação de amplificação. Após limpeza, o DNA fita simples da LATE-PCR é diretamente anelado ao 5 primer de seqüenciamento e processado para Piro-seqüenciamento de acordo com as instruções do fabricante. É importante que as amostras de LATE-PCR não sejam aquecidas para uma temperatura que desnatura os produtos fita dupla gerados na reação para assegurar que os únicos modelos 10 disponíveis ao primer de seqüenciamento são os produtos de DNA fita simples. Na verdade, pode não ser necessário aquecer as amostras de LATE-PCR para anelamento de primer, uma vez que o DNA modelo já é fita simples.

Nós combinamos amplificação por LATE-PCR com métodos 15 de limpeza simplificados para preparar amostras para operações de seqüenciamento. Veja Exemplo 7 e FIG. 14. Nós projetamos dois métodos de preparo de amostra para LATE-PCR para Piro-seqüenciamento que não envolvem purificação do produto de PCR físico e podem ser realizados em um único 20 tubo. No primeiro método, o problema de dNTPs restantes de uma amplificação por LATE-PCR é dirigido usando quantidades limitadas de todos os dNTPs durante a amplificação, de modo que os dNTPs são eliminados no curso da reação (mas não prematuramente de modo a causar produção insuficiente de 25 DNA fita simples, isto é, a fita de Primer em Excesso), o que pode ser determinado através de experimento de rotina. O problema do pirofosfato restante de LATE-PCR é dirigido através de tratamento da amostra de LATE-PCR com uma enzima trazendo uma atividade de pirofosfatase, por exemplo, uma 30 pirofosfatase tal como pirofosfatase de levedo, seguido por

inativação térmica. O Primer em Excesso que resta de uma amplificação por LATE-PCR não interferirá com o Piro-sequenciamento, uma vez que a seqüência alvo equivalente para esses primers sobre a extremidade 3' do produto da extensão de Primer Limitado (a fita de Primer Limitado) é:
5 A) ligado em uma forma fita dupla e, portanto, não facilmente disponível e B) 5-20 vezes menos abundante do que a fita do Primer em Excesso, dependendo das proporções de primer em LATE-PCR. Contudo, para eliminar qualquer possibilidade de iniciação errônea pelos Primers em Excesso sobre produtos de PCR na temperatura usada para Piro-sequenciamento, pode-se opcionalmente adicionar um oligonucleotídeo complementar ao Primer em Excesso no início da amplificação por LATE-PCR. Esse oligonucleotídeo
10 complementar deve ter uma T_m pelo menos 5-10 °C abaixo da T_m do Primer em Excesso, por exemplo, sendo uns poucos nucleotídeos mais curto do que o Primer em Excesso em sua extremidade 3' e deve ser bloqueado na extremidade 3' através de qualquer método conhecido por aqueles
15 habilitados na técnica para impedir extensão do oligonucleotídeo por DNA polimerases (por exemplo, através de inclusão de um grupo fosfato). Quando projetado desse modo, o oligonucleotídeo complementar não interfere com a amplificação por LATE-PCR, mas forma um híbrido fita dupla
20 estável com o Primer em Excesso na temperatura usada para Piro-sequenciamento, desse modo, impedindo o Primer em Excesso de iniciação errônea em outros locais complementares sobre o material amplificado.
25 Alternativamente, o oligonucleotídeo complementar pode ter
30 o mesmo comprimento ou uma T_m que é menos do que 5-10 °C

abaixo daquela do Primer em Excesso, ou ambos, se adicionado após a reação de LATE-PCR. Adicionalmente, um oligonucleotídeo 3' bloqueado contendo a mesma seqüênci⁵a que o Primer em Excesso, com ou sem outras modificações para aumentar sua T_m (por exemplo, bases extras na extremidade 3' ou uso de análogos de LNA, etc.), pode ser adicionado após a reação de LATE-PCR em uma concentração suficiente para competir com os Primers em Excesso pelo local complementar sobre a extremidade 3' da fita do Primer 10 Limitado.

O segundo método inclui pré-tratamento de amostras de LATE-PCR com as mesmas misturas de enzima e substrato usadas para Piro-sequenciamento, seguido por anelamento de primer e adição de dNTPs individuais para Piro-sequenciamento. Nesse método, a ordem do protocolo recomendado pelo fabricante é invertida (isto é, o protocolo normal requer anelamento de primer, seguido pela adição de mistura para reação de Piro-sequenciamento). Nesse método, a apirase presente na mistura de Piro-sequenciamento degrada os dNTPs, enquanto que ATP sulfurylase e luciferase convertem pirofosfato em ATP e luz. A luciferase e luciferina contidas nessas soluções proporcionam um sistema útil para monitoramento da decomposição de PPi, bem como dNTPs. ATP e dATP servem como substratos para a luciferase, assim, de modo que a interrupção da produção de luz da amostra, conforme detectado pela câmera de CCD na máquina de Piro-sequenciamento, serve como uma boa aproximação para limpeza. Se necessário para um preparado em particular, 20 particularmente se amplicons são mais longos do que cerca 25 30

de 100 pares de base ou mais do que cerca de vinte pares de base têm de ser seqüenciados, os substratos eliminados por essas reações (5' fosfo-sulfato de adenosina e luciferina) são, então, repostos antes do início de seqüenciamento de 5 DNA. Em alguns casos, tratamento inicial requererá mais mistura de substrato do que o protocolo do fabricante. Em casos onde aquecimento e resfriamento são requeridos para subsequente anelamento de primer, esses reagentes serão destruídos e precisam ser repostos antes de Piro- 10 seqüenciamento.

Uma variação do segundo método é adicionar uma enzima pura com uma atividade de dNTPase, por exemplo, uma apirase, tal como apirase de batata, e uma enzima purificada com atividade de pirofosfatase, por exemplo, uma pirofosfatase tal como pirofosfatase de levedo, seguido por inativação térmica dessas enzimas, anelamento de primer e, então, Piro-seqüenciamento convencional. Mais uma vez, os Primers em Excesso restantes da LATE-PCR geralmente não interferirão com o Piro-seqüenciamento mas, no caso em que 15 ocorre, esses primers podem ser eliminados usando a estratégia de oligonucleotídeo complementar descrita acima. Esse segundo método não requer ajustes da concentração de 20 dNTP para diferentes amplificações por LATE-PCR e, assim, economiza um tempo apreciável.

25 Piro-seqüenciamento direto de produtos de LATE-PCR requer 0,5-4 pmoles, algumas vezes 2-4 pmoles, de produtos fita simples preparados anelados a 3-15 pmoles, algumas vezes 10-15 pmoles, de primer de seqüenciamento, dependendo do instrumento de Piro-seqüenciamento usado. Nos segundo e 30 terceiro métodos de preparo de amostra, é importante que o

volume de amostra de LATE-PCR adicionado seja menor do que um meio, algumas vezes menor do que um terço, da reação de Piro-sequenciamento total para preservar o pH ótimo da mistura de Piro-sequenciamento (pH de 7,5 comparado com pH 5 de 8,0 ou acima, por exemplo, 8,3, para PCR). Alternativamente, produtos de LATE-PCR podem compreender mais de metade do volume de reação se a concentração de tampão e pH são consequentemente ajustados. Reagentes usados para monitoramento dos vários pHs de uma 10 amplificação por LATE-PCR, tais como corantes de DNA fluorescentes e sondas de hibridização, são compatíveis com Piro-sequenciamento e não precisam ser removidos, exceto quando a sonda de hibridização é projetada para se ligar a uma região a ser sequenciada ou onde o primer de Piro-sequenciamento se liga. Nesse caso, uma das estratégias descritas acima para bloqueio do Primer em Excesso pode ser 15 empregada para bloquear a sonda de hibridização. Nós determinados que reagentes para inibir a iniciação errônea durante amplificação, divulgados em nosso pedido de patente 20 Provisório dos Estados Unidos concorrentemente depositado, intitulado "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification", são compatíveis com Piro-sequenciamento quando a concentração final desses compostos na reação de 25 Piro-sequenciamento é de 300 nM ou abaixo, de preferência 200 nM ou abaixo e a DNA polimerase padrão para Piro-sequenciamento é usada (fragmento de DNA polimerase Klenow exonuclease-deficiente). Utilizando uma técnica de preparo de amostra para PCR que permite preparo e amplificação na 30 mesma câmara ou recipiente (veja, por exemplo, publicação

de patente dos Estados Unidos US-2003-022231-A1), em combinação com uma amplificação por LATE-PCR realizada em pequenos volumes, de preferência menor do que ou igual a 10 μ l, por exemplo, 2-10 μ l, é possível obter informação de 5 Piro-seqüenciamento de pequenos grupos de células (de um a 10.000 células) em um formato em um único tubo. De acordo com esse ensaio de "célula-para-seqüência", pequenos grupos de células (de uma a 10.000 células) são preparados para amplificação de acordo com a técnica de preparo de amostra 10 para PCR, tal como aquela descrita em Pierce e colaboradores (2002) Biotechniques 32(5): 1106-1111 (veja publicação de patente dos Estados Unidos US-2003-022231-A1), submetidos à amplificação por LATE-PCR e processados diretamente para Piro-seqüenciamento em um único 15 recipiente, cavidade, tubo ou câmara de reação, conforme descrito acima. Conforme demonstrado no Exemplo 8 abaixo e mostrado na FIG. 15, o método em um único tubo permite genotipificação precisa e exata, mesmo a nível de uma única célula, uma única molécula.

20 Uma preocupação geral de abordagens de limpeza por PCR enzima-baseada para Piro-seqüenciamento é a superprodução de subprodutos da decomposição que podem levar à inibição de feedback de enzimas durante o seqüenciamento posterior e comprimentos de leitura reduzidos. Esses incluem SO_4^{2-} , 25 oxiluciferina, fosfato inorgânico (Pi), dNMPs e AMP. Uma forma de limitar o reservatório de Pi e dNMPs é reduzir a concentração de dNTPs usada durante PCR (embora, não necessariamente, até o ponto onde eles são mais totalmente consumidos durante a reação, conforme discutido acima em um 30 método). Através de PCR quantitativa, observações sobre

amplicons de LATE-PCR de até seiscentos pares de base de comprimento, nós descobrimos que as concentrações de dNTP podem ser rotineiramente diminuídas para 100 nM sem afetar a eficácia de amplificação. Sob tais condições, Piro-
5 seqüenciamento ou reações de LATE-PCR enzimaticamente preparadas podem ser obtidas para mais de cinqüenta bases consecutivas, conforme demonstrado no Exemplo 9, FIG. 16.

No caso de seqüenciamento de dideóxi, nós desenvolvemos um protocolo que inclui diluição como o único
10 tratamento necessário do produto amplificado por LATE-PCR. Seqüenciamento convencional de dideóxi de amplicon fita simples a partir de uma amplificação por LATE-PCR através de seqüenciamento de ciclo requer 5 fmoles desse produto e uma quantidade conhecida de produto, uma vez que a
15 eletroforese capilar é sensível à quantidade de produto. utilizando corante de ligação a DNA fluorescente SYBR Green I para monitorar a síntese de DNA fita dupla e uma sonda linear rotulada com Cy5 para monitorar a síntese de amplicon fita simples, pode-se monitorar a amplificação por
20 LATE-PCR a qual, de preferência, inclui um reagente de inibição de iniciação errônea divulgado em nossa Patente Provisória dos Estados Unidos, intitulada "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification." Nenhum desses três
25 aditivos interfere com subsequentes reações de seqüenciamento. Em uma reação de LATE-PCR, a extensão de amplificação exponencial e síntese de produto fita simples são definidas pela quantidade de Primer Limitado e é independente da quantidade de modelo de iniciação. A
30 extensão de produto fita simples pode ser limitada

restringindo a quantidade de pelo menos um dNTP ou restringindo o número de ciclos de amplificação, se desejado.

Nós determinados que, para seqüenciamento da fita do Primer em Excesso (isto é, a fita feita do Primer em Excesso em LATE-PCR), diluição da amplificação por LATE-PCR com água para um total de pelo menos 20 vezes ou mais torna o produto da fita do Primer em Excesso adequado como material de iniciação para seqüenciamento de dideóxi. Para assegurar que a quantidade utilizada com nosso seqüenciador capilar contém a quantidade mínima requerida de 50 fmoles de material a ser seqüenciado após diluição, a fase linear da reação de LATE-PCR deve proporcionar pelo menos 200 femtomoles (fmoles) de DNA fita simples/microlitro (μ l) quando a concentração de Primer Limitado é de 25 nanomolar (nM) (25 fmoles/ μ l) e, assim, um excesso de cerca de 8 vezes de DNA fita simples é necessário. Para estimar a concentração de DNA fita simples gerado por uma amplificação por LATE-PCR, nós adicionamos até a concentração de fitas presentes no DNA fita dupla ao final da reação (o qual participa no seqüenciamento de ciclo e cuja concentração é definida pela concentração de Primer Limitado), mas a concentração de DNA fita simples feito por ciclo (nós estimamos que, em geral, cada ciclo de síntese linear proporciona aproximadamente 50% do produto teórico, o produto teórico sendo igual a uma quantidade de DNA fita dupla na reação, vezes os números de ciclo enquanto a reação permanece linear). Se o acúmulo de produto deixa de ser linear no curso da reação, conforme mostrado por nivelamento da curva de fluorescência em tempo

real para o fluoroforo, a quantidade de DNA fita simples feito durante a fase não linear é inferida do aumento de vezes nos sinais fluorescentes entre o último ciclo quando a reação era linear para o ciclo final de reação de 5 amplificação. Tipicamente, se a concentração de produto fita simples produzido em uma amplificação por LATE-PCR é de 20 fmoles/ul, nós diluímos a fita do Primer em Excesso a 1:8 para 25 fmoles/ul e usamos 2 ul de produto diluído (50 fmoles) diretamente em uma reação de seqüenciamento de 10 dideoxi de 20 ul. Sob essas condições, o fator total de diluição dos produtos de LATE-PCR na reação de seqüenciamento é de 80 vezes. Pode-se usar tanto quanto 8 μ l de produtos de LATE-PCR diluídos (200 fmoles) na reação de seqüenciamento para uma diluição total de 20 vezes e 15 ainda obter chromatogramas de seqüência interpretáveis.

Purificação da amostra é necessária porque os reagentes restantes da amplificação por PCR, tais como dNTP e primers, interferirão com o seqüenciamento de dideoxi. LATE-PCR substitui o preparo de amostra através de 20 precipitação com etanol ou colunas de afinidade por uma etapa de diluição simples em água. O preparo de LATE-PCR para seqüenciamento de dideoxi requer apenas diluição de produtos de DNA fita simples em excesso em água pelo menos 8-10 vezes para uma concentração de 25 fmoles/ μ l, seguido 25 pela adição de 50-200 fmoles de produto de DNA fita simples para uma reação de seqüenciamento de ciclo de dideoxi contendo 10 fmoles de primer de seqüenciamento. O fator de diluição total da mistura final de seqüenciamento de dideoxi é de pelo menos 20 vezes. Sob essas condições, 30 dNTPs restantes da LATE-PCR estão muito diluídos para

interferir com o seqüenciamento de dideoxi. Primer em Excesso transportado da LATE-PCR também não é um problema, porque o modelo ao qual esses primers se ligam, a fita do Primer Limitado, está presente em uma concentração muito baixa após a etapa de diluição e é totalmente hibridizado à fita do Primer em Excesso. Por essas duas razões, o primer em Excesso não serve como um primer de seqüenciamento. O Exemplo 10 e FIG. 17 demonstram a eficácia de nosso método "diluir e ir". A FIG. 17 apresenta cromatografias de seqüência obtidas usando PCR simétrica e o método tradicional de preparo de amostra (purificação de produtos de DNA usando colunas Qiagen, seguido por quantificação através de eletroforese em gel; tempo total de preparo: 1 hora) e cromatografias de seqüência obtidas usando LATE-PCR e diluição em água (tempo total de preparo: 30 segundos). As cromatografias de seqüência são aproximadamente idênticas.

O Exemplo 11 e FIGS. 18-19 ilustram estratégias para amplificação por LATE-PCR de mais de um produto a partir do mesmo modelo de DNA na mesma reação. Assim, essas reações contêm dois pares de primers (cada um compreendido de um Primer em Excesso e um primer Limitado) que amplificam duas seqüências distintas dentro de um modelo contínuo. Os dois pares de primers podem estar dispostos de modo que o Primer em Excesso e o Primer Limitado se hibridizam à mesma fita do modelo ou à fitas opostas do modelo. Conforme aqueles habilitados na técnica apreciarão, quando primers semelhantes se hibridizam à fitas opostas do modelo, os dois Primers em Excesso podem se estender "para dentro" ou "para fora" sobre suas respectivas fitas modelos. A FIG. 19

também mostra que seqüências das fitas do Primer em Excesso podem ser obtidas a partir da mesma mistura de reação via o método "diluir-e-ir".

O Exemplo 12 e FIG. 20 mostram que a quantidade de ssDNA e dsDNA gerada através de amplificação por LATE-PCR podem ser medidas independentemente e podem ser usadas para calcular a proporção de ssDNA/dsDNA a qual, por sua vez, pode ser usada para determinar se a quantidade de ssDNA acumulada até o momento é suficiente para subsequente seqüenciamento via o método "diluir-e-ir".

O Exemplo 13 e FIG. 21 mostram o método de "diluir-e-ir" empregado em uma mistura a 50:50 de amplicons de LATE-PCR tendo duas seqüências intimamente relacionadas, mas diferentes. A FIG. 22 mostra que misturas compreendidas de proporções a 90:10 e 10:90 de dois amplicons de LATE-PCR tendo seqüências intimamente relacionadas, mas diferentes, podem ser distinguidas de misturas a 100:0 e 0:100 puras, bem como misturas a 30:70 e 70:30 via o método de "diluir-e-ir". De forma a realizar esse tipo de análise, é necessário corrigir as amplitudes observadas de cada pico de nucleotídeo em cada posição heteroplasmica em termos da amplitude esperada do nucleotídeo "puro" equivalente nessa posição. Uma vez que isso é feito, quantidades relativas de cada seqüência podem ser calculadas como a proporção de amplitudes (nucleotídeo 1 corrigido)/(nucleotídeo 1 corrigido + nucleotídeo 2 corrigido). Assim, conforme no caso de seqüências de DNA mitocondrial que diferem, os métodos de LATE-PCR e dideoxi "diluir-e-ir" descritos aqui podem ser usados para detectar heteroplasmia. O método de dideoxi para medição de heteroplasmia é particularmente

vantajoso porque ele pode ser usado para examinar muitas centenas de nucleotídeos em uma única análise. Embora não se deseje estar preso a qualquer teoria, nós acreditamos que os métodos descritos aqui funcionam, em contraste às tentativas anteriores baseadas em PCR simétrica e seqüenciamento de dideoxi, porque a LATE-PCR gera populações altamente homogêneas de amplicons fita simples. A PCR simétrica, em contraste, tende a gerar populações de moléculas de comprimento total junto com alguns amplicons parciais e alguns amplicons com iniciação errônea.

O Exemplo 14 e FIG. 23 mostram que a LATE-PCR, junto com pelo menos uma única sonda tolerante à combinação errônea, pode ser usada para gerar curvas de fusão de end-point as quais, por sua vez, podem ser usadas para quantificar as quantidades relativas de dois ou mais amplicons de LATE-PCR misturados tendo uma seqüência intimamente relacionada, mas diferente. LATE-PCR para análise de fusão de end-point quantitativa (QE) de misturas de amplicons relacionados se torna possível em virtude do fato de que a LATE-PCR gera produtos fita simples. Assim, quando uma ou mais sondas tolerantes à combinação errônea rotuladas estão presentes na reação, a(s) sonda(s) se hibridiza(m) primeiro à seqüência alvo mais complementar e, então, se a temperatura é suficientemente diminuída, a todas as seqüências relacionadas. Assim, cada híbrido de sonda/alvo no conjunto tem sua própria temperatura de fusão e a magnitude do pico de fusão derivado de cada híbrido de sonda/alvo reflete precisamente a quantidade de cada seqüência alvo acumulada. Medidas quantitativas da amplitude ou duas áreas dimensionais de cada curva de fusão

podem, então, ser usadas para calcular a abundância relativa de cada seqüência alvo. Os dados mostrados na FIG. 23 demonstram que esse método pode ser usado com 99,7% de confiança para distinguir entre misturas a 0:100 - 10:90 - 5 50:50 - 90:10 - 100:0 de duas seqüências que diferem por um único nucleotídeo.

Os ensaios de acordo com a presente invenção, quer realizados na presença ou ausência dos reagentes descritos em nosso pedido de patente Provisório dos Estados Unidos 10 60/619.620, podem ser independentemente otimizados para evitar iniciação errônea através de ajuste da concentração de DNA polimerase, por exemplo, Taq polimerase, adicionada à reação. Diminuição da iniciação errônea através de ajuste da polimerase pode ser observada em termos da cinética da 15 reação de LATE-PCR usando uma sonda do ssDNA, bem como pela composição do produto final revelado através de vários meios conhecidos na técnica. Nós descobrimos que é experimentalmente conveniente começar com uma concentração típica em excesso de Taq polimerase e, então, diminuir essa 20 concentração em etapas. Embora muito pouca polimerase possa fazer com que a reação se torne ineficaz (manifestado como uma diminuição significativa na taxa ou extensão de amplificação de produto), níveis ótimos de polimerase resultam em um ensaio de amplificação por LATE-PCR com 25 amplificação eficaz de dsDNA e síntese sustentada de ssDNA durante muitos ciclos. O Exemplo 15 demonstra que o nível ótimo de polimerase pode ser julgado pelo sinal de dsDNA observado usando um corante fita dupla, tal como SYBR Green, mais a curva de fusão do produto de dsDNA, também 30 observada usando SYBR Green. O Exemplo 16 e FIG. 24 mostram

que, quando tais ensaios são usados para um produto de ssDNA específico gerado a partir de diferentes quantidades de material de iniciação, as plotagens resultantes são lineares e paralelas sobre muitos ciclos de produção de 5 ssDNA.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Corante de Ligação Versus Corante de Ligação mais Primers Rotulados

Para comparar o desempenho de um corante de 10 intercalação com o desempenho de um corante usado em combinação com um primer que inclui um fluoroforo de intercalação, um ensaio de extensão foi realizado. O corante utilizado foi SYBR Green I em uma diluição de 1:40.000.

15 Três fitas de nucleotídeo foram incluídas. Um modelo de DNA, um primer de DNA extensível (5' rotulado com Cy5, complementar ao modelo e tendo uma T_m de 60 °C) e um oligonucleotídeo de DNA não-extensível (extremidade 3' bloqueada com um grupo fosfato) também complementar ao 20 alvo, em uma localização 3' ao primer, também rotulado com fluoroforo Cy5 e tendo uma T_m maior de 79 °C. O espaçamento entre o primer e o nucleotídeo não-extensível foi escolhido de modo que o produto de primer das extensões até o oligonucleotídeo não extensível tivessem todos T_m 's abaixo 25 de 79 °C. A mistura de reação para o ensaio de extensão de primer incluía DNA modelo a 0,5 micromolar (μM), primer a 1,5 μM e oligonucleotídeo não-extensível a 1,5 μM . A mistura também incluía 1X tampão de PCR, MgCl_2 a 3 milimolar (mM), cada dNTP a 250 nanomolar (nM), 1:40.000X 30 SYBR Green I e Taq DNA polimerase. A mistura de reação foi

aquecida para 50 °C durante 2 minutos, de modo a ligar o primer e o oligonucleotídeo não-extensível e gerar os produtos da extensão de primer curtos a partir do oligonucleotídeo não-extensível. Amostras em duplicata 5 foram realizadas.

Após a reação de extensão de primer, o produto foi submetido à análise por fusão na qual o corante SYBR Green foi excitado à medida que a temperatura era alterada. Leituras de fluorescência foram tomadas no comprimento de 10 onda de emissão do corante e no comprimento de onda de emissão do fluoroforo à medida que a temperatura era aumentada através da faixa de temperaturas de fusão, abrangendo o primer não estendido e o oligonucleotídeo não-extensível. Curvas de fusão, o primeiro derivado de 15 fluorescência com relação à temperatura plotada contra a temperatura, são apresentadas na FIG. 1, em que o Painel A apresenta as curvas 1 para as duas amostras, dados das emissões de corante e o Painel B apresenta as curvas 2 para as duas amostras, dados das emissões de Cy5.

20 Exemplo 2. Sondas Silenciadas Tolerantes à Combinação Errônea

Uma sonda rotulada foi projetada para ter uma seqüência de consenso complementar ao gene de RNA ribossômico 16S da *Mycobacterium*. A estrutura secundária 25 foi prevista de acordo com os programas Mfold (Zucker, M (2003), "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction", Nucleic Acids Res 31: 3406-3415) com uma concentração de sódio ajustada a 70 milimolar (mM) e uma concentração de magnésio ajustada a 3 mM. A seqüência 30 da sonda era Cy5-AATACTGGATAGGACC ACG AGG (SEQ. ID No. 1),

com a estrutura secundária prevista formada através de hibridização das regiões sublinhadas. A T_m prevista da estrutura secundária da sonda era de 37 °C. Essa sonda foi testada em amostras não contendo alvo, *M. gordonae* ou *M. asiaticum* em misturas contendo corante SYBR Green I, em que o corante foi excitado diretamente e o fluoroforo foi, por sua vez, excitado indiretamente. Os resultados da fluorescência de Cy5 versus a temperatura são apresentados na FIG. 3, Painel A. A linha 31 (sem alvo) mostra uma elevada fluorescência de fundo, mas a linha 32 (*M. gordonae*) e linha 33 (*M. asiaticum*) mostram sinais discerníveis acima da base. Para silenciar a fluorescência de fundo, um silenciador não-fluorescente (um silenciador Black Hole™ II) foi adicionado ao nucleotídeo 3' terminal da sonda. A sonda modificada foi similarmente testada e os resultados são mostrados no Painel B da FIG. 3. Conforme pode ser observado, a fluorescência de fundo (linha 34, sem alvo) caiu acentuadamente e os sinais de *M. gordonae* (linha 35) e *M. asiaticum* (linha 36) eram muito maiores, acima da base.

Outra técnica para silenciamento da sonda é construir a sonda para ter uma estrutura de "hairpin" terminalmente rotulada com um fluoroforo apropriado sobre uma extremidade e um silenciador sobre a outra. Nós construímos uma sonda tendo a seqüência Cy5- CTGGATAGGACCACGAGGCCAG-BHOII (SEQ. ID. NO. 2), em que as seqüências sublinhadas são complementares e formam um tronco de "hairpin". Nós adicionados os três nucleotídeos 3'-terminais para fins de obtenção do tronco. A temperatura de fusão prevista dessa sonda com um alvo perfeitamente combinado é de 60 °C. A T_m

prevista do tronco está em torno de 48 °C (baseado na T_m prevista do tronco de nucleotídeo não modificado de 40 °C, não levando em conta a afinidade aumentada da interação fluoroforo-silenciador). Essa sonda foi também testada 5 conforme descrito acima e os resultados são apresentados no Painel C da FIG. 3. Fluorescência de fundo (linha 37, sem alvo) era muito baixa e os sinais de *M. gordonae* (linha 38) e *M. asiaticum* (linha 39) estavam elevados acima da base.

Exemplo 3. Genotipificação em Tempo Real e End-Point
10 **Usando Sondas Tolerantes à Combinação Errônea**

Esse exemplo ilustra a identificação de amostras homozigóticas e amostras heterozigóticas para o alelo G269 do gene de Hexosaminidase A humana (Hex A) responsável pela doença de Tay-Sachs usando amplificação por LATE-PCR em 15 tempo real e uma sonda linear tolerante à combinação errônea a Cy5-rotulada de baixa T_m excitada indiretamente pela emissão de um corante SYBR. Hibridização da sonda foi monitorada duas vezes durante cada ciclo de amplificação dentro do espaço de temperatura de detecção de LATE-PCR, 20 primeiro a 55 °C, uma temperatura na qual a sonda é de alelo-discriminação nesse ensaio e se liga exclusivamente a seu alvo perfeitamente combinado e, então, a 40 °C, uma temperatura na qual a sonda é tolerante à combinação errônea e se liga à totalidade dos alelos de sua seqüência 25 alvo na reação de amplificação. Detecção de alelos específicos e alelos totais com a sonda tolerante à combinação errônea permite correção das variações estocásticas tubo-para-tubo no rendimento de amplicon entre amostras repetidas. A proporção de alelos específicos-para- 30 totais na reação (Cy5 a 55 °C/Cy5 a 40 °C) permite

normalização da amostra repetida para genotipificação de end-point. Informação genotípica é derivada dos valores de proporção. No caso de amostras homozigóticas, os sinais da sonda detectados sob condições de alelo-discriminação são 5 os mesmos conforme os sinais da sonda detectados sob condições tolerantes à combinação errônea, uma vez que, em ambos os casos, a sonda está se ligando a 100% dos alelos na seqüência alvo. Em contraste, no caso de amostras heterozigóticas, os sinais da sonda detectados sob 10 condições de alelo-discriminação são metade tão intensos quanto os sinais da sonda detectados sob condições de combinação errônea, uma vez que a sonda está se ligando a apenas 50% dos alelos na seqüência alvo sob condições de alelo-discriminação, mas a 100% dos alelos sob condições 15 tolerantes à combinação errônea. Conseqüentemente, amostras homozigóticas têm maiores proporções de Cy5 a 55 °C/Cy5 a 40 °C do que amostras heterozigóticas. Esse método de genotipificação conta apenas com detecção de um único alelo.

20 As seqüências e a para a temperatura de fusão concentração-ajustada, $T_m[0]$ dos primers de LATE-PCR e da sonda são como segue. O primer Limitado tem a seqüência 5' CGAGGTC ATTGAATACGC ACGGCTCC 3' (SEQ. ID No. 3). Ele tem uma $T_m[0]$ concentração-ajustada de 63,2 °C a 25 nM. O primer 25 em Excesso tem a seqüência 5' TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (SEQ. ID No. 4). Ele tem uma $T_m[0]$ concentração-ajustada de 61,8 °C a 1 μM. A sonda tem a seqüência 5' Cy5-GGGACCAGGTAAGAA 3' (SEQ. ID No. 5). Ela tem uma T_m de 56,3 °C. Ela é uma sonda de baixa T_m e, quando usada com uma 30 temperatura de anelamento de 65 °C, também uma sonda de T_m

super-baixa.

Ensaios de LATE-PCR repetidos ($n = 15$) foram ajustados para cada diferente genotípico (G269 homozigótico e G269 heterozigótico) em 1X tampão de PCR, $MgCl_2$ a 3 mM, dNTP a 5 250 micromolar (μM), Primer Limitado a 25 nM, Primer em Excesso a 1000 nM, 1,25 unidades Taq DNA polimerase, sonda Cy5-rotulada a 0,6 μM e uma diluição a 1:40.000 de SYBR Gold I. Os parâmetros de ciclo de PCR foram 95 °C durante 3 minutos, então, 25 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 65 °C 10 durante 20 seg e 72 °C durante 20 seg, seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 seg e 40 °C durante 20 seg, com aquisição de fluorescência a 55 °C e 40 °C no canal Cy5.

15 A FIG. 7 mostra análise das proporções de sinais de Cy5 a 55 °C para os sinais de Cy5 a 40 °C e demonstra que essas proporções são adequadas para genotipificação de end-point para qualquer ciclo de amplificação que passa o limiar de detecção da sonda. Nessa figura, amostras 20 homozigóticas (círculo 91) têm proporções de aproximadamente duas vezes a proporção de amostras heterozigóticas (círculo 92).

Exemplo 4. Análise de Múltiplos Alvos Usando Sondas Alvo-Específicas com Diferentes Temperaturas de Fusão

25 Múltiplas sondas, cada rotulada com o mesmo fluoroforo, podem ser usadas em combinação para detectar e quantificar seqüências ao longo de um único oligonucleotídeo mais longo (por exemplo, um produto de PCR assimétrica, LATE-PCR ou amplificação Rolling Circle) ou 30 sobre diferentes oligonucleotídeos. O uso de sondas de

baixa T_m aumenta a especificidade por tais alvos, reduzindo grandemente ou eliminando os sinais gerados a partir de alvos erroneamente combinados. Uma possível aplicação dessa tecnologia é a genotipificação de DNA humano para identificar alelos conhecidos que causam uma doença genética. Esse exemplo descreve análises de temperatura para design de sonda e para detecção de produtos. Como um ponto de partida, nós escolhemos os seguintes alvos que poderiam estar potencialmente presentes em um produto da amplificação: a seqüência normal do gene regulador da transmembrana da fibrose cística (CFTR) na região que codifica o aminoácido 542 da proteína; a seqüência da mutação Delta F508, a mutação mais comum em CFTR; e a seqüência normal correspondendo à mutação Delta F508. Nós projetamos sondas de discriminação de alelo de baixa T_m para cada uma das três seqüências alvo.

As sondas eram sondas sinalizadoras moleculares de baixa temperatura, cada uma rotulada com o fluoroforo FAM e um corante silenciador. As sondas foram projetadas para ter diferentes T_m 's versus seus alvos em misturas contendo Tris-HCl a 70 mM e MgCl₂ a 3 mM. A "sonda 542" tinha uma T_m de 40 °C (valor previsto de 41 °C pelo cálculo do vizinho mais próximo); a "sonda 508 normal" tinha uma T_m de 47 °C (valor previsto de 46 °C pelo cálculo do vizinho mais próximo); e a "sonda Delta F508" tinha uma T_m de 54 °C (valor previsto de 53 °C pelo cálculo do vizinho mais próximo).

A FIG. 8 apresenta as curvas de fusão a partir das quais os valores de T_m foram obtidos. A FIG. 8 mostra o primeiro derivado negativo de leituras de fluorescência

como uma função da temperatura para a sonda 542 (linha 96), a sonda DF508 (linha 97) e a sonda normal 508 (linhas 98) para amostras duplicadas. Alturas de pico aproximadamente iguais foram obtidas usando concentrações de alvo de 1 μM e 5 uma concentração da sonda 542 de 2 μM . Nós testamos cada sonda contra o alvo erroneamente combinado para verificar a discriminação de alelo e descobrimos que a fluorescência contra o perfeito era 5-10 vezes a fluorescência contra o alvo erroneamente combinado.

10 Pode ser observado a partir da FIG. 8 que mesmo pequenas diferenças na T_m seriam facilmente solucionáveis. A partir de uma plotagem tal como a FIG. 8, diferenças de 4-5 °C seriam solucionáveis. Deconvolução utilizando o software fornecido com aparelhos de ciclização térmica para 15 PCR em tempo real poderia permitir decomposição das T_m 's que diferem em metade dessa quantidade.

Exame do primeiro derivado negativo da fluorescência é um método para determinar quais alvos de oligonucleotídeo estão presentes em uma determinada amostra. A FIG. 9 mostra 20 tal análise, utilizando a fluorescência acima da base. Amostras contendo o alvo 508 normal, mas nenhum alvo Delta F508 (círculo 101) têm um pico de fusão a 54 °C, indicativo de um híbrido alvo-sinalizador molecular. Amostras contendo o alvo Delta F508, mas nenhum alvo normal (círculo 102) têm 25 um pico de fusão em torno de 47 °C, indicativo de hibridização ao sinalizador com a seqüência mutante. Amostras contendo ambos esses alvos (círculo 103) têm um pico amplo sobre essa faixa de temperaturas, indicando fluorescência dos híbridos alvo-sinalizador molecular. A 30 presença e concentração relativa da seqüência normal no

aminoácido 542 são indicados pela presença e altura relativa do pico de fusão em torno de 40 °C. Amostras com alvo normal 542 (linha sólida para cada grupo numerado) têm um pico grande nessa temperatura, amostras com alvo 542 mutante contendo uma única alteração de nucleotídeo nessa região, idêntico à segunda mutação CFTR mais comum (linha pontilhada para cada grupo numerado) não têm pico nessa temperatura e amostras com ambos os alvos 542 (linha tracejada para cada grupo numerado) têm picos de altura intermediária. A altura do pico em amostras com ambos os alvos 542 é afetada pela presença do pico de fusão Delta F508 vizinho.

Nem sempre pode ser possível ou desejável obter um perfil de fusão completo durante o curso de uma reação de amplificação. Análise adicional da amostra, conforme acima, mostra que um número limitado de etapas de detecção poderia proporcionar a informação requerida para identificar os oligonucleotídeos específicos em uma mistura.

Diminuição, ao invés de aumento de temperatura, pode ser usada. As amostras foram aquecidas para 70 °C e, então, diminuídas em reduções de °C para 30 °C com uma detecção de 30 segundos em cada etapa. Amostras contendo o alvo 508 normal mas nenhum alvo Delta F508 ou contendo o alvo Delta F508 mas nenhum alvo normal puderam ser distinguidas baseado em alterações na fluorescência entre 60 °C e 50 °C. Cada combinação dos oligonucleotídeos alvo produziu um único padrão de alteração de fluorescência. Uma plotagem de dispersão da alteração percentual no aumento da fluorescência a 55 °C vs. a alteração percentual no aumento de fluorescência a 45 °C é mostrada na FIG. 10. Essa

análise distingue a combinação de alvos que está presente em cada amostra. Usando as alterações na fluorescência ao invés da intensidade de fluorescência em si, uma avaliação precisa pode ser feita, mesmo quando as amostras diferem 5 consideravelmente quanto à concentração total de alvos, conforme poderia ocorrer em amostras repetidas de amplificação.

A FIG. 10 inclui amostras duplicadas para cada combinação de alvos 508 normal mais 542 normal (marcados 10 com círculo 111), alvos 508 normal mais 542 (112), alvos 508 normal mais 542 mutante (113), alvos 508 mais 542 normal (114), alvos 508 mais 542 (115), alvos 508 mais 542 mutante (116), alvos Delta 508 mais 542 normal (117), alvos Delta 508 mais 542 (118) e alvos Delta 508 mais 542 mutante 15 (119). Uma análise similar poderia ser feita usando esse perfil de temperatura durante cada ciclo ou ciclos selecionados de uma reação de amplificação. Várias amostras com DNA de genotipos conhecidos poderiam ser amplificadas e os dados de detecção usados para estabelecer uma faixa esperada de valores. Isso proporcionaria um método para determinação rápida de genotipos de amostras desconhecidas.

Embora apenas 3 sondas tenham sido usadas nesse exemplo, o uso combinado de um número muito maior de sondas é possível. As principais limitações sobre o número total 25 de sondas são a faixa de temperatura para detecção e a diferença mínima de T_m entre o híbrido sonda-alvo. Essas são, por sua vez, dependentes da natureza da reação de amplificação e das capacidades do equipamento e software de e deconvolução. Por exemplo, 10 diferentes combinações de 30 sonda-alvo poderiam ser distinguidas sobre uma faixa de

temperatura de 30 graus se a diferença mínima da T_m para deconvolução é de graus. Esse número pode ser aumentado várias vezes usando múltiplos fluoroforos.

Exemplo 5. Normalização de Duas Temperaturas com e Sem
5 Correção para a Linha de Base

Genotipificação por QE LATE-PCR do SNP rs858521 foi realizada com amostras de DNA desconhecidas e controle homozigótico rs858521 (alelos CC) e controle heterozigótico (alelos CGs) usando uma única sonda tolerante à combinação errônea Cy5-rotulada. Amplificação e detecção foram realizadas usando um ABI Prism Sequence Detector 7700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, U.S.A.), o qual normalmente gera sinais fluorescentes corrigidos para a linha de base. Para nossa análise utilizando proporções, contudo, as proporções de sinal fluorescente foram obtidas a partir dos sinais de fluorescência corrigidos para a linha de base (FIG. 11) e de sinais fluorescentes brutos (FIG. 12).

A FIG. 11 apresenta a proporção de fluorescência da sonda a 50 °C para sua fluorescência a 25 °C como uma função do número de ciclos da reação de amplificação utilizando os sinais fluorescentes corrigidos para a linha de base pelo instrumento. Na FIG. 11, o círculo 113 é uma réplica do controle homozigótico, o círculo 114 é uma réplica do controle heterozigótico, enquanto que os círculos 111 e 112 são os desconhecidos.

A FIG. 12 apresenta os mesmos resultados utilizando sinais brutos de fluorescência. Na FIG. 12, o círculo 116 é uma réplica do controle homozigótico, o círculo 117 é uma réplica do controle heterozigótico e o círculo 115 é os

desconhecidos. O uso de sinais de fluorescência corrigidos para a linha de base para normalização resultou em genotipificação ambígua para uma amostra, FIG. 11, círculo 112. Em contraste, o uso de sinais brutos de fluorescência 5 para normalização proporcionou a genotipificação correta para todas as amostras. Esse resultado demonstra que a correção para a linha de base no software ABI Prism 7700 Sequence Detector pode introduzir defeitos que afetam a normalização de sinal e, de preferência, não deverá ser 10 usada.

Exemplo 6. Normalização de Três Temperaturas

Reações repetidas de amplificação por LATE-PCR contendo os primers de SNP rs858521 e uma única sonda anti-senso tolerante à combinação errônea foram realizadas com 15 DNA genômico purificado para cada genótipo do gene SNP rs858521 (equivalente a 1800 genomas, 18 reações repetidas de cada um dos genótipos CC homozigóticos, CG heterozigóticos e GG homozigóticos). Os produtos amplificados foram analisados pelas curvas de fusão, 20 mostradas na FIG. 13, painel A e através de normalização dos dados, conforme mostrado no Painel B e Painel C.

A FIG. 13A mostra uma plotagem dos sinais brutos da fluorescência coletada durante análise da curva de fusão após amplificação por LATE-PCR. A sonda que foi utilizada 25 era de alelo-discriminação em temperaturas maiores, mas se tornava progressivamente mais tolerante à combinação errônea à medida que a temperatura era reduzida. A variabilidade intrínseca no rendimento de produto entre amostras repetidas exclui discriminação desses genótipos 30 pelos sinais brutos de fluorescência (círculo 131) dentro

da janela de temperatura de discriminação de alelo para essa sonda (40°C - 60°C , previamente determinada com alvos de oligonucleotídeo sintéticos, dados não mostrados).

A FIG. 13B mostra os sinais de cada amostra normalizados em cada temperatura contra o signal coletado em uma temperatura totalmente tolerante à combinação errônea (25°C) para essa amostra. Na FIG. 13B, os sinais normalizados para os alelos CC homozigóticos são o círculo 132, os sinais normalizados para os alelos CG heterozigóticos são o círculo 133 e os sinais normalizados para os alelos GC homozigóticos são o círculo 134. Conforme mostra a figura, normalização reduz a dispersão de sinal e permite identificação de cada genótipo dentro da janela de discriminação de alelo. Separação máxima foi observada a 52°C , o que corresponde à T_m da sonda anti-senso que foi usada. Embora a dispersão de sinal fosse significativamente reduzida na FIG. 13B comparado com a FIG. 13A, ainda havia alguma variabilidade na intensidade de sinal entre amostras repetidas, julgando a partir da dispersão nas plotagens cinéticas.

A FIG. 13C mostra que o melhor método para eliminar essa dispersão de sinal residual foi através de normalização dos sinais fluorescentes em cada temperatura para os sinais fluorescentes coletados nas temperaturas superior e inferior da janela de discriminação de alelo observada na FIG. 13B, onde curvas de fusão começam a divergir (isto é, 40°C e 60°C , respectivamente). Na FIG. 13C, os sinais normalizados para os alelos CC homozigóticos são o círculo 135, os sinais normalizados para os alelos CG heterozigóticos são o círculo 136 e os sinais normalizados

para os alelos GG homozigóticos são o círculo 137. If Fb e Ft são as leituras de fluorescência com relação à janela de temperatura inferior e superior de discriminação de alelo, respectivamente e Fs é a leitura fluorescente em qualquer dada temperatura durante análise por fusão, então, as proporções de fluorescência normalizadas são calculadas como:

Proporção de Fluorescência Normalizada para Três

$$\text{Temperaturas} = (Fs-Ft)/(Fb-Ft)$$

10 Normalização simultânea dos sinais fluorescentes em cada temperatura para os sinais fluorescentes a 40 °C e 60 °C dentro de qualquer dada amostra reduziu adicionalmente a dispersão de sinal fluorescente e fez com que curvas de fusão repetidas de cada genótipo se tornassem muito próximas (veja FIG. 13C). As proporções de fluorescência calculadas em uma única temperatura, isto é, a T_m da sonda (52 °C) normalizada usando os sinais fluorescentes com relação às temperaturas superior e inferior da janela de discriminação de alelo (isto é, a 60 °C, 40 °C) definem 15 unicamente cada genótipo com mais de 99,7% de certeza (isto é, caixas de erro consistindo de três desvios padrões abrangendo 99,7% de todas as possíveis proporções de fluorescência para cada genótipo são bem separadas umas das outras, dados não mostrados). Resultados similarmente 20 aperfeiçoados foram obtidos para o sítio SNP rs2270517 quando os sinais fluorescentes foram calculados na T_m da sonda (57 °C) normalizada para as temperaturas superior e inferior correspondentes da janela de discriminação de alelo (isto é, a 71 °C, 45 °C).

30 Exemplo 7. Piro-sequenciamento Direto do Produto de

LATE-PCR

Amplificações por LATE-PCR repetidas foram realizadas em um volume de 25 µl consistindo de 1X tampão de PCR, MgCl₂ a 3 mM, dNTP a 20 nanomolar (nM), Primer Limitado a 5 nM, Primer em Excesso a 1000 nM, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase Platinum e 100 genomas de DNA humano. A seqüência do Primer Limitado era 5' CCGCCCTTCTCTGCCCCCTGGT 3' (SEQ. E) No. 6) e a seqüência do Primer em Excesso era 5' GCCAGGGTTCCACTACGTAGA 3' (SEQ. 10 ID No. 7). Essas seqüências amplificam um segmento de 94 pares de base do éxon 11 do gene de Hexosaminidase A humana. Para amplificação por LATE-PCR, o perfil de ciclo térmico era 95 °C durante 3 min, seguido por 10 ciclos de 95 °C durante 10 seg e 72 °C durante 20 seg, seguido por 55 15 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 67 °C durante 20 seg e 72 °C durante 20 seg. Após a reação, 16,6 µl (o equivalente a 3 pmoles de DNA fita simples (ssDNA), conforme estimado empiricamente a partir de experimentos anteriores de Piro-seqüenciamento) foram misturados com 20 microlitros (µl) de 20 Tris-Cl a 10 mM, pH de 8,5 e colocados em uma cavidade de uma lâmina de microtitulação usada para Piro-seqüenciamento.

Para remoção do dNTP e pirofosfato transportados do produto amplificado por LATE-PCR, mistura de enzima padrão 25 para Piro-seqüenciamento consistindo de DNA polimerase Klenow exonuclease-deficiente, apirase, luciferase, ATP sulfatase e mistura padrão de substrato para Piro-seqüenciamento consistindo de luciferina e adenosina 5' fosfato, conforme fornecido no PSQ 96 SNP Reagent Kit 30 (Pyrosequencing, Inc, Westboro, MA) foram distribuídas

seqüencialmente na cavidade contendo a amostra de LATE-PCR usando um instrumento PSQ 96 (Pyrosequencing, Inc., Westboro, MA) de acordo com as instruções do fabricante e incubadas durante 60 seg a 37 °C. As adições subsequentes 5 de dNTP normalmente realizadas automaticamente pelo instrumento PSQ 96 foram substituídas por uma única adição de Tris-Cl a 10 mM, pH de 7,5, usando o volume de default programado no instrumento. Após essa etapa, a cavidade contendo a amostra de LATE-PCR recebeu 2,5 µl de primer de 10 seqüenciamento a 10 µM (5' CTGGTACCTGAACCGTAT 3') (SEQ. TD No. 8).

Levando-se em conta o volume de misturas de enzima e substrato para Piro-seqüenciamento adicionado à amostra de LATE-PCR, a concentração final de primer de seqüenciamento 15 foi estimada como sendo de 0,5 µM e o volume final de 50 µl. A amostra com o primer de seqüenciamento foi retornada para o instrumento PSQ 96 novamente e processada de acordo com as instruções do fabricante, exceto que as adições de enzima e substratos para Piro-seqüenciamento normalmente 20 realizadas pelo instrumento foram substituídas pela adição de volumes similares de Tris-Cl a 10 mM, pH de 7,5, seguido pela adição de dNTP. O pirogramma resultante é mostrado na FIG. 14, Painel A, a qual mostra o sinal de luz resultante de incorporação de nucleotídeos em particular. A altura dos 25 picos corresponde ao número de nucleotídeos incorporados durante cada adição.

Fazendo referência ao Painel C da FIG. 14, pode ser observado que um de cada dos dois primeiros nucleotídeos (A, T) foi incorporado no modelo, seguido por dois dos 30 próximos nucleotídeos (C, C) e assim por diante. Baseado na

altura dos picos e na ordem de adições de nucleotídeo, a seqüência foi derivada: 5' ATCCTATGGCCC3' (SEQ. ED No. 9) e subseqüentemente confirmada usando a seqüência do GenBank para o gene de Hexosaminidase A humana (Número de Acesso ao GenBank: S62068). Esses resultados demonstram que pré-tratamento de amostras de LATE-PCR com as misturas de enzima e substratos usadas para Piro-seqüenciamento permite Piro-seqüenciamento direto do produto amplificado por LATE-PCR após anelamento de primer e adição iterativa de dNTP.

10 Alteração do protocolo acima para seguir as instruções do fabricante (isto é, realização de anelamento de primer, seguido pela adição das misturas de enzima e substrato para Piro-seqüenciamento) resultou em 80% de picos falso positivos quando de adição de dNTP que se supõe não ter sido incorporado sobre o modelo. Esses picos falso positivos eram em virtude de extensão parcial do primer de seqüenciamento do dNTP restante da amplificação por LATE-PCR antes de Piro-seqüenciamento.

Em um experimento distinto, a mesma amostra de LATE-PCR descrita acima foi submetida à purificação usando um QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante e recuperada a 0,375 pmoles/ μ l em Tris-Cl a 10 mM, pH de 7,5. Oito microlitros (μ l) dessa solução (total de 3 pmoles) foram misturados com o primer de seqüenciamento descrito acima até uma concentração final de primer de seqüenciamento de 0,5 μ M em um volume final de 50 μ l em Tris-Cl a 10 mM, pH de 7,5. A amostra foi submetida a Piro-seqüenciamento usando o instrumento PSQ 96 de acordo com as instruções do fabricante. O pirograma resultante é mostrado na FIG. 14,

painel B. Preparo tradicional, embora consuma mais tempo e seja mais caro, não proporcionada dados superiores quando comparado com nosso método, que produziu o Painel A.

Exemplo 8. Piro-sequenciamento Direto de Produtos de

5 LATE-PCR

Para genotipificar células únicas, amplificações por LATE-PCR repetidas foram realizadas em um volume de 25 µL consistindo de 1X tampão de PCR, MgCl₂ a 3 mM, dNTP a 100 µM, Primer Limitado a 100 nM, Primer em Excesso a 1000 nM, 10 1,25 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, USA). Cada reação foi iniciada com um único linfoblasto humano preparado conforme descrito em Pierce e colaboradores (2002) Biotechniques 32(5): 1106-1111 (veja publicação de patente dos Estados Unidos US-2003-022231-A1) 15 com um de três possíveis genotipos para a mutação IVS-110.

A seqüência do Primer Limitado era 5'
GGCCATCACTAAAGGCACCGAGCACT 3' (SEQ. ID NO. 10) e a
seqüência do Primer em Excesso era 5'
GGGTTTCTGATAACGCACTGACTCTCTC 3' (SEQ. ID NO. 11). Essas 20 seqüências amplificam um segmento de 191 pares de base do gene de β-globina sobre o cromossoma humano 17p.

Para amplificação por LATE-PCR, o perfil de ciclo térmico foi de 95 °C durante 10 min, seguido por 65 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 66 °C durante 15 seg e 72 °C 25 durante 20 seg. Após amplificação, 5 µl foram misturados com 6,64 µl de Tris-Aacetato a 20 mM, pH de 7,6 e colocados em uma cavidade de uma lâmina óptica usada para Piro-sequenciamento. Para remoção dos dNTPs e PPi transportados do produto de amplificação por LATE-PCR, um volume padrão 30 de mistura de enzima para Piro-sequenciamento (consistindo

de DNA polimerase Klenow exonuclease-deficiente, apirase, luciferase, ATP sulfurlase) e aproximadamente duas vezes o volume padrão de mistura de substrato (consistindo de luciferina e adenosina 5' fosfo-sulfato), conforme fornecido no Pyro Gold Reagent Kit (Biotage AB, Uppsala, Suécia) foram distribuídos seqüencialmente nas cavidades contendo as amostras de LATE-PCR usando um instrumento PSQ HS 96A (Biotage AB, Uppsala, Suécia) usando os seguintes ajustes do instrumento: tempo de pulso de mistura de enzima: 23,5 ms; tempo de pulso de mistura de substrato: 44,0 ms; pressão de distribuição de reagente: 400 mbar.

As amostras foram incubadas durante 60 seg a 28 °C ate que a produção de luz caísse para abaixo da base. Após isso, 0,36 µL de um primer de seqüenciamento a 10 mM: 5' GACCACCAGCAGCCTAAG 3' (SEQ. ID NO. 12) foram adicionados a cada amostra para um volume total de reação de 12 µl e, então, anelados a 80 °C durante 2 min, seguido por resfriamento para a temperatura ambiente durante 10 min. Além disso, uma concentração de 900 µM de uma versão 3' fosforilada do Primer Limitado de LATE-PCR (SEQ. ID NO. 7) foi também adicionada aqui para impedir a extremidade 3' da fita modelo de duplicar em si e se estender. Amostras com o primer de seqüenciamento foram, então, retornadas para o instrumento PSQ HS 96A novamente e processadas de acordo com as instruções do fabricante, incluindo adições normais de mistura de enzima e substrato. Os Pirogramas resultantes de células com um tipo silvestre homozigótico, genotipos mutantes heterozigóticos e homozigóticos são mostrados na FIG. 15, Painéis A-C, respectivamente. As unidades de luz e alturas de picos são conforme explicado no Exemplo 7. A

altura relativa dos picos corresponde ao número de nucleotídeos incorporados em cada posição.

Fazendo referência ao painel A da FIG. 15, pode ser observado que o segundo pico (T) é um meio tão alto quanto o primeiro pico (G), um terço tão alto quanto o terceiro pico (G), um quarto tão alto quanto o quarto pico (A) e tem a mesma altura que os picos 5-8 (TAGA). A seqüência para os primeiros oito picos é, assim, lida como: GGTGGGAAATAGA (SEQ. ID NO. 13). Baseado na altura dos picos e na ordem de adição de nucleotídeos, a seqüência de β -globina do tipo silvestre na FIG. 15, painel A, foi derivada e subseqüentemente confirmada usando a seqüência do GenBank para o gene de β -globina humana. Uma mutação heterozigótica (Painel B) ou homozigótica (Painel C) foi confirmada no sítio IVS-110, indicado pelas setas. Deve ser observado no Painel B que o pico "C" de 1,5 unidades seguido por um pico "T" de 0,5 unidades indica uma base "C" em ambos os alelos, seguido por uma "C" em um alelo e uma "T" no outro alelo. Esses resultados demonstram que o pré-tratamento de amostras de LATE-PCR com as misturas de enzima e substratos usadas para Piro-seqüenciamento permite Piro-seqüenciamento direto da LATE-PCR após anelamento de primer e adições iterativas de dNTP. Alteração do protocolo acima para seguir as instruções do fabricante (isto é, realizando anelamento de primer seguido pela adição das misturas de enzima e substrato para Piro-seqüenciamento) resultou em 80% de picos falso positivos quando de adição de dNTP que se supõe que não foram incorporados sobre o modelo. Esses picos falso positivos eram em virtude de extensão parcial do primer de seqüenciamento com dNTPs remanescentes.

Exemplo 9. Piro-sequenciamento de Produtos de LATE-PCR para Seqüências Longas

A amplificação por LATE-PCR foi realizada em um volume de 25 µl consistindo de 1X tampão de PCR, MgCl₂ a 3 mM, 5 dNTP a 100 µM, Primer Limitado a 100 nM, Primer em Excesso a 1000 nM, 1,25 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, USA) e de reagente de redução de iniciação errônea 9-22DD a 50 nM, conforme divulgado em nosso pedido de patente Provisório dos Estados Unidos 10 depositado, intitulado "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification". Reagente 9-22DD é um oligonucleotídeo de "hairpin" tendo um tronco de nove nucleotídeos de comprimento e um loop fita simples de 22 nucleotídeos de 15 comprimento. O oligonucleotídeo é modificado através da adição de porções Dabcila 5' terminais e 3' terminais. Sua seqüência de nucleotídeo é 5'
GCGGCCGTCAGGCATATAGGATACCGGGACAGACGCCGCG 3' (SEQ. ID. No 14). A reação foi iniciada com 20 equivalentes de genoma de 20 DNA humano. A seqüência do Primer Limitado era 5'
GGTCAGCGCCGGCTGCAAGTGTAGA 3' (SEQ. ID. NO. 15) e a seqüência do Primer em Excesso era 5'
GATGGGTGGAGCTTGTCTTGAGG 3' (SEQ. ID. NO. 16). Essas 25 seqüências amplificam um segmento de 78 pares de base próximo do gene p53 sobre o cromossoma humano 17p.

Para amplificação por LATE-PCR, o perfil de ciclo térmico era 95 °C durante 10 min, seguido por 60 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 66 °C durante 10 seg e 72 °C durante 20 seg. Após amplificação, 7,5 µl de produto foram 30 misturados com 9,96 µl de Tris-Aacetato a 20 mM, pH de 7,6 e

colocados em uma cavidade de uma lâmina óptica usada para Piro-seqüenciamento. Para remoção dos dNTPs e PPi transportados da LATE-PCR, um volume padrão de mistura de enzimas para Piro-seqüenciamento (consistindo de DNA polimerase Klenow exonuclease-deficiente, apirase, luciferase, ATP sulfurilase) e aproximadamente duas vezes o volume padrão de mistura de substrato (consistindo de luciferina e adenosina 5' fosfo-sulfato) conforme fornecido no Pyro Gold Reagent Kit (Biotage AB, Uppsala, Suécia) foram distribuídos seqüencialmente na cavidade contendo as amostras de LATE-PCR usando um instrumento PSQ HS 96A (Biotage AB, Uppsala, Suécia) usando os seguintes ajustes do instrumento: tempo de pulso de mistura de enzima: 23,5 ms; tempo de pulso de mistura de substrato: 44,0 ms; pressão de distribuição de reagente: 400 mbar.

A amostra foi, então, incubada durante 60 seg a 28 °C até que a produção de luz caísse para abaixo da base. Nesse amplicon, o primer Limitado de LATE- PCR (SEQ. ID NO. 10) foi usado como o Piroprimer de seqüenciamento e 0,54 µl de solução a 10 µM desse foram adicionados a cada amostra para um volume total de reação de 18 µl e, então, anelado a 80 °C durante 2 min, seguido por resfriamento para a temperatura ambiente durante 10 min. Amostras com o primer de seqüenciamento foram, então, retornadas para o instrumento PSQ HS 96A novamente e processadas de acordo com as instruções do fabricante, incluindo adições normais de mistura de enzima e substrato. O Programa resultante é mostrado na FIG. 16. A altura relativa dos picos corresponde ao número de nucleotídeos incorporados em cada posição, conforme descrito no Exemplo 8. A seqüência

esperada equivalendo corretamente, conforme determinado a partir do banco de dados GenBank, é anotada acima dos picos, com subscritos indicando o número de uma determinada base em uma coluna (Le-G1C1A1G2 = GCAGG). Esses resultados 5 demonstram que o pré-tratamento de amostras de LATE-PCR amostras as misturas de enzima e substrato usadas para Piro-sequenciamento permite leituras de mais de cinqüenta pares de base de comprimento.

Exemplo 10. Seqüenciamento Direto de Dideóxi do
10 Produto de LATE-PCR

Amplificações por PCR foram realizadas utilizando um ABI Prism Sequence Detector 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) para amplificar um segmento do éxon 7 do gene de Hexosaminidase A humana contendo a 15 mutação G269, a qual é responsável pela doença de Tay-Sachs. A seqüência corresponde ao Número de Acesso ao GenBank M16417. Uma amplificação foi a amplificação por LATE-PCR e o produto foi submetido diretamente a seqüenciamento de dideóxi. Como um controle, as 20 concentrações de primer foram alteradas para equimolar, uma amplificação por PCR simétrica convencional foi realizada e o produto amplificado foi submetido à purificação convencional antes de seqüenciamento de dideóxi.

Misturas de Reação Para Amplificação (Concentrações Finais)

25 Volume: 25 µl
 1x tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)
 MgCl₂ a 3 mM
 dNTPs a 10 µM
 Sonda a 0,6 µM (LATE-PCR apenas)
 30 Diluição a 1:41.666 de Corante SYBR Gold (Molecular

Sondas, Eugene, OR, U.S.A)

1,25 Unidades de Taq DNA polimerase Platinum
(Invitrogen)

6 ng de DNA genômico humano (equivalente a 1000
5 genomas)

Primers: para LATE-PCR, Primer Limitado a 25 nM e
Primer em Excesso a 1000 nM; (para o controle, 300 nM de
cada um dos mesmos primers).

Seqüências de Oligonucleotídeo

10 Primer Limitado: 5' CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3'
(SEQ. ID. No. 17)

Primer em Excesso: 5' TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (SEQ.
ID. No. 18)

Sonda: 5' Cy5 GGGACCAGGTAAGAA- Fosfato 3' (SEQ. ID No.
15 19)

Mistura de Reação Para Seqüenciamento de Ciclo

Volume: 20 µl

100 femtomoles (fmoles) de produto que está sendo
seqüenciado

20 5 picomoles (pmoles) de Primer de seqüenciamento
(primer Limitado ou primer em Excesso)

1x DTC5 Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Inc.,
Fullerton, CA, U.S.A.) [inclui dNTPs, ddNTP, tampão,
 $MgCl_2$].

Seqüenciamento de Dideoxi

Misturas de reação de seqüenciamento foram submetidas
a seqüenciamento de ciclo e eletroforese capilar em um CEQ
2000XL DNA Sequencer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA,
U.S.A.) usando o CEQ 2000 Dye Termination Cycle Sequencing
30 Kit (Beckman Coulter) de acordo com as instruções do

fabricante.

Amplificação por LATE-PCR e Preparo de Seqüenciamento

A mistura de reação para amplificação por LATE-PCR foi submetida à ciclização térmica como segue: 95 °C durante 3 min; 20 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg e 72 °C durante 20 seg e 70 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 seg e 40 °C durante 20 seg. Síntese de amplicon fita dupla foi monitorada através de excitação do corante SYBR e leitura de sua fluorescência durante a etapa de extensão de primer de 72 °C. Síntese de produto fita simples após exaustão do Primer Limitado foi monitorada através de excitação do corante SYBR e leitura de fluorescência do fluoroforo Cy5 da sonda de baixa T_m durante a etapa de detecção em baixa temperatura de 40 °C.

Para obter 100 fmoles do produto da extensão do Primer em Excesso, diluição do produto da amplificação foi necessária. Nós estimamos a quantidade de produto nos 25 µl de produto de reação da seguinte maneira. Primeiro, a quantidade desse produto no produto fita dupla feito durante os ciclos iniciais de amplificação é orientada pela quantidade de Primer Limitado. Nesse exemplo, essa era de 25 nM, o qual se traduz em 25 fmoles/µl. A concentração de produto da extensão fita simples feito durante a fase linear de amplificação por LATE-PCR, isto é, após exaustão do Primer Limitado, foi estimada dividindo-se essa fase em duas partes determinadas através de inspeção da curva de fluorescência de Cy5: uma primeira parte na qual a amplificação se processa aritmeticamente e uma segunda parte na qual acúmulo de produto diminui. Para a primeira

parte a qual, nesse exemplo, era seis ciclos, nós admitimos uma eficácia de amplificação de 50%, baseado em Gyllensten, U.B.H. e Erlich, A. (1988), "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Application to 5 Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. A produção de fitas simples durante os seis ciclos foi calculada como a concentração inicial (25 fmoles/μl) vezes o número de ciclos (6) vezes a eficácia (0,5). Produção adicional foi estimada como o 10 aumento percentual no sinal de Cy5 durante o restante da reação a qual, nesse caso, era de 233,3%. A produção total durante a fase linear foi, assim, de 175 fmoles/μl ($25 \times 6 \times 0,5 \times 2,333$) e a concentração total desse produto, incluindo 25 fmoles/μl no amplicon fita dupla, foi estimada 15 como sendo de 200 fmoles/μl. Para obter 100 fmoles na mistura de reação de seqüenciamento de ciclo, nós diluímos o produto da amplificação para 1:8 com água e usamos 4 μl do produto diluído em 20 μl de mistura de reação. Conforme será apreciado, isso significa que o produto da 20 amplificação foi, por fim, diluído a 1:40.

Para obter 100 fmoles do produto da extensão do Primer Limitado, nosso ponto de partida foi que o produto da reação de amplificação continha 25 nM desse produto ou 25 fmoles/μl. Nós simplesmente usamos 4 μl do produto da 25 amplificação nos 20 μl de mistura de reação de seqüenciamento de ciclo para obter a quantidade inicial desejada de 100 fmoles.

Amplificação de controle e Preparo de Seqüenciamento

A mistura de reação de amplificação foi submetida ao 30 mesmo perfil de ciclização térmica, exceto que apenas 18

(ao invés de 70) dos cinco ciclos de temperatura foram realizados, porque uma plotagem em tempo real do sinal de corante intercalado indicou que a amplificação atinge um platô nesse ponto e apenas o produto da amplificação 5 desejado era feito nesse ponto. Os produtos da amplificação na mistura de amplificação ao final de amplificação foram purificados da maneira convencional usando o QIAGEN Quick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.) de acordo com as instruções do fabricante. Amplicons purificados 10 foram quantificados através de eletroforese em gel em um gel a agarose a 3% em 0,5x TBE contra diferentes quantidades conhecidas de marcadores de DNA Φ X174 Hind III após visualização através de coloração com brometo de etídio (0,5 μ g/ml). Um volume contendo 100 fmoles foi usado 15 na mistura de reação de seqüenciamento de ciclo com cada primer de seqüenciamento.

Resultados

A LATE-PCR e métodos de controle produziram seqüências correspondendo à informação de seqüência do Genbank (número 20 de acesso M 16417). A FIG. 17 inclui quarto cromatografias obtidas a partir de seqüenciamento de dideoxi. O Painel A é do método de LATE-PCR com seqüenciamento de ciclo utilizando o Primer Limitado como o primer de seqüenciamento. O Painel B é do método de LATE-PCR com 25 seqüenciamento de ciclo utilizando o primer em Excesso como o primer de seqüenciamento. O Painel C é o método de controle utilizando o primer em Excesso como o primer de seqüenciamento. O Painel D é o método de controle utilizando o primer Limitado como o primer de seqüenciamento. O Painel E é o método de controle 30 utilizando o primer em Excesso como o primer de seqüenciamento. Cada cromatografia inclui as curvas de

fluorescência obtidas a partir dos nucleotídeo de dideoxi rotulados e a seqüênciade nucleotídeo determinada.

Exemplo 11. Estratégias para Amplificação por LATE-PCR de Mais de Um Produto a partir do Mesmo Modelo de DNA na

5 Mesma Reação

Amplificações por PCR foram realizadas utilizando um ABI Prism Sequence Detector 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) para amplificar dois amplicons de 549 e 464 bases designados como fitas HV1 e HV2 H e L na mesma reação duplex dentro da região de d-loop de DNA mitocondrial humano baseado em quais seqüências eram amplificadas usando um Primer em Excesso.

Misturas de reação para amplificação (concentrações finais)

Volume: 25 µl

15 1x tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)

MgCl₂ a 3 mM (Invitrogen)

dNTPs a 250 µM (Promega)

Sonda a 1,0 µM (LATE-PCR apenas)

10x diluição de Corante SYBR Green (FMC Bioproducts, Rockland ME, U.S.A)

1,25 Unidades de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen)

DNA genômico de linfócitos de sangue humano (equivalente a 100 genomas de mtDNA)

25 Primers: para LATE-PCR, Primer Limitado a 50 nM e Primer em Excesso a 1000 nM.

Seqüências de Oligonucleotídeo

Sonda: 5' Cy5 - TGCTAATGGTGGAG -Fosfato 3' (SEQ. ID No. 20)

30 HV1-H

Primer Limitado: 5' GCCCGGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTG
3' (SEQ. ID. No. 21)

Primer em Excesso: 5' CACCA GTCTTG TAA ACCGGAGATGAA 3'
(SEQ. ID. No. 22)

5 HV2-H

Primer Limitado: 5' GTATGGGAGTGGGAGGGAAAATAATGTGTTAG
3' (SEQ. ID. No. 23)

Primer em Excesso: 5' AGGTCT ATCAC CCTATT AACC ACTCA 3'
(SEQ. ID. No. 24)

10 HV1-L

Primer Limitado: 5' CACCAGTCTTG TAA ACCGGAGATGAAAACC 3'
(SEQ. ID. No. 25)

Primer em Excesso: 5' CGAGGAGAGTAGCACTCTT 3' (SEQ. ID.
No. 26)

15 HV2-L

Primer Limitado: 5' AGGTCTATCAC CCTATT AACCA CT CACGG
3' (SEQ. ID. No. 27)

Primer em Excesso: 5' GGAGGGAAAATAATGTGTTAGT 3' (SEQ.
ID. No. 28)

20 Mistura de reação para seqüenciamento de ciclo

Volume: 25 µl

100 fmoles de produto sendo seqüenciados

5 pmoles de Primer de Seqüenciamento (Primer Limitado
ou Primer em Excesso)

25 1x DTC5 Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Lie,
Fullerton, CA, U.S.A. [inclui dNTPs, ddNTP, tampão, MgCl₂].

Seqüenciamento de Dideoxi

Misturas de reação de seqüenciamento foram submetidas
a seqüenciamento de ciclo e eletroforese capilar em um CEQ

30 2000XL DNA Sequencer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA,

U.S.A.) usando o CEQ 2000 Dye Termination Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter) de acordo com as instruções do fabricante.

Amplificação por LATE-PCR e Preparo de Seqüenciamento

5 A mistura de reação de amplificação por LATE-PCR foi submetida à ciclização térmica como segue: 95 °C durante 3 min; 15 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 64 °C durante 10 seg e 72 °C durante 45 seg e 50 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 64 °C durante 10 seg, 72 °C durante 45 seg e, para
10 HV1-H, apenas 50 °C durante 20 seg. Síntese de amplicon fita dupla foi monitorada através de excitação do Corante SYBR Green e leitura de sua fluorescência durante a etapa de extensão de primer de 72 °C. Síntese de produto fita simples após exaustão do Primer Limitado foi monitorada
15 através de excitação do corante SYBR e leitura de fluorescência do fluoroforo Cy5 da sonda de baixa T_m durante a etapa de detecção em baixa temperatura de 50 °C para a região HV1-H.

Para obter 100 fmoles do produto da extensão do Primer
20 em Excesso, diluição do produto da amplificação foi necessária. Nós estimamos a quantidade de produto no produto da reação de 25 µl da seguinte maneira. Primeiro, a quantidade desse produto no produto fita dupla feito durante os ciclos iniciais de amplificação é orientada pela
25 quantidade de Primer Limitado. Nesse exemplo, essa era de 50 nM, o qual se traduz em 50 fmoles/µl. A concentração de produto fita simples da extensão feita durante a fase linear de amplificação por LATE-PCR, isto é, após exaustão do Primer Limitado, foi estimada dividindo essa fase em
30 duas partes determinadas através de inspeção da curva de

fluorescência de Cy5: uma primeira parte na qual a amplificação se processa aritmeticamente e uma segunda parte na qual o acúmulo de produto diminui. Para a primeira parte a qual, nesse exemplo, era de onze ciclos, nós 5 admitimos uma eficácia de amplificação de 50%, baseado em Gyllensten, U.B.H. e Erlich, A. (1988), "Generation of single-stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. A produção de 10 fitas simples durante os onze ciclos foi calculada como a concentração inicial (50 fmoles/ μ l) vezes o número de ciclos 11) vezes a eficácia (0,5). Produção adicional foi estimada como o aumento percentual no sinal de Cy5 durante o restante da reação a qual, nesse caso, era de 100%. A 15 produção total durante a fase linear era, assim, de 275 fmoles/ μ l ($50 \times 11 \times 0,5 \times 1,0$) e a concentração total desse produto, incluindo 50 fmoles/ μ l no amplicon fita dupla, foi estimada como sendo de 325 fmoles/ μ l. Para obter 20 100 fmoles na mistura de reação de seqüenciamento de ciclo, nós diluímos o produto da amplificação a 1:13 com água e usamos 4 μ l do produto diluído na mistura de reação de 25 μ l.

Resultados

Existem quatro possíveis combinações: 1) HV1-H com 25 HV2-H, 2) HV1-L com HV2-L, 3) HV1-H com HV2-L, 4) HV1-L com HV2-H. A FIG. 18 mostra um gel de agarose a 4% de eletroforese de controles sem modelo (NTC), três fileiras à esquerda; amplicons das reações começam com 100 cópias de DNA genômico, próximas três fileiras; e, mais à direita, 30 uma fileira de ladder com 100 pares de base. A FIG. 18

mostra a formação dos amplicons de dsDNA de HV1-H e HV2-H de 549 e 464 pares de base usando 100 cópias de DNA genômico no início da reação. Controles sem modelo, NTC, não amplificam.

5 Conforme aqueles habilitados na técnica compreenderão, na amplificação de dois amplicons fita simples na mesma reação a partir de um único modelo, as duas fitas do Primer em Excesso podem ser geradas a partir da mesma fita de DNA ou de fitas complementares de DNA. Nós empregamos com 10 sucesso ambas as abordagens. Nas combinações de HV1-H com HV2-H e HV1-L com HV2-L, ambos os amplicons são gerados a partir da mesma fita modelo de DNA. Nas combinações de HV1-H com HV2-L e HV1-L com HV2-H, os dois amplicons são gerados a partir de fitas complementares de DNA. A FIG. 19A 15 mostra informação de seqüência para o amplicon HV1-H na dupla HV1-H com HV2-H na região das bases 16209-16169. A FIG 19B mostra informação de seqüência para o amplicon HV2-H na dupla HV1-H com HV2-H na região das bases 289- 326. A FIG. 19C mostra informação de seqüência para o amplicon 20 HV1-H na dupla HV1-H com HV2-L na região das bases 16209-16169. A FIG. 19D mostra informação de seqüência para o amplicon HV2-L na dupla HV1-H com HV2-L na região das bases 289-326. A LATE-PCR produziu seqüências correspondendo à informação de seqüência do GenBank.

25 **Exemplo 12. Determinação da Necessidade de ssDNA**

A quantidade de DNA fita simples e DNA fita dupla gerados por uma amplificação por LATE-PCR pode ser usada para determinar a quantidade de ssDNA necessária para seqüenciamento por "diluir-e-ir" de dideoxi. Amplificações 30 por PCR foram realizadas utilizando um ABI Prism Sequence

Detector 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) para amplificar o amplicon de 549 bases designado como HV1 H dentro da região de d-loop de DNA mitocondrial humano. MtDNA foi extraído sob condições de lise (conforme descrito em Peirce e colaboradores (2002) Biotechniques 32(5); 1106-1111 com a inclusão de 4 µl de DTT em 100 µl da mistura de reação de lise) de um fio de cabelo humano. Todas as amplificações eram amplificações por LATE-PCR e o produto foi submetido diretamente a seqüenciamento de dideoxi.

10 Misturas de Reação para Amplificação (concentrações finais)

Volume: 25 µl
1x tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)
 $MgCl_2$ a 3 mM (Invitrogen)
dNTPs a 250 µM (Promega)
15 Sonda a 1,0 µM (LATE-PCR apenas)
10x diluição de Corante SYBR Green (FMC Byproducts, Rockland ME, U.S.A.)
1,25 Unidades de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen)
20 1 µl de solução de lise de DNA (equivalente a ~ 10 genomas de mtDNA)

Primers: para LATE-PCR, Primer Limitado a 50 nM e Primer em Excesso a 1000 nM.

Seqüências de Oligonucleotídeo

25 HV1H: Primer Limitado, Primer em Excesso e Sonda conforme no Exemplo 11.

Mistura de Reação para Seqüenciamento de Ciclo

Conforme no Exemplo 11.

Seqüenciamento de Dideoxi

30 Conforme no Exemplo 11.

Amplificação por LATE-PCR e Preparo de Seqüenciamento

Conforme no Exemplo 11. Os dados brutos de fluorescência do CY5 e SYBR Green foram usados para determinar a quantidade de produto disponível para uma reação de seqüenciamento. A proporção de CY5/SYBR Green foi usada para normalizar todas as flutuações nos dados brutos.

Resultados

Dados de fluorescência das amplificações por LATE-PCR são apresentados na FIG. 20, painéis A e B. A FIG. 20A, por exemplo, linha 201, mostra todos os dados para o fio de cabelo plotados contra o número de ciclos de amplificação como a proporção de ss-DNA/ds-DNA (sinal da sonda para sinal de corante). Esse método de análise minimiza a variação quando amplificação exponencial começa ou que se nivelia em seu platô e demonstra que a eficácia de amplificação de ss-DNA é virtualmente a mesma em todas as amostras, exceto aquela que começou muito tarde.

A FIG. 20B mostra um método para monitoramento de um conjunto de ensaios de LATE-PCR de forma a estabelecer sua prontidão para seqüenciamento por diluir-e-ir. A plotagem mostra as proporções calculadas de ssDNA/dsDNA (sinal da sonda para sinal de corante versus sinal de corante) para todas as amostras amplificadas no ciclo 45 (quadrados) e ciclo 65 (diamantes). Apenas as amostras que têm proporções de entre 0,06 e 0,10 e valores de SYBR entre 300 e 600 (aqueelas na caixa) estão prontas para seqüenciamento. A FIG. 20B estende o uso de análise de end-point quantitativa (QE LATE-PCR) para demonstrar que, após 65 ciclos, todas menos uma amostra tinham acumulado ss-DNA suficiente para uso em seqüenciamento por "diluir-e-ir".

Exemplo 13. Amplicons Tendo Múltiplos SNPs

A sensibilidade da LATE-PCR e o método de seqüenciamento "diluir-e-ir" podem distinguir uma mistura de amplicons tendo múltiplos SNPs até o nível de resolução 5 de 10%. Amplificações por PCR eram de um fio de cabelo humano de 2 mm ou uma única impressão digital humana aderida a uma lâmina de vidro. Todas as amplificações eram amplificações por LATE-PCR e o produto foi submetido diretamente a seqüenciamento de dideoxi. Misturas de reação 10 de amplificação finais, seqüências de oligonucleotídeo (HV1-H), mistura de reação de seqüenciamento de ciclo e Seqüenciamento de dideoxi e Amplificação por LATE-PCR e Preparo de Seqüenciamento eram todos conforme no Exemplo 11.

15 Misturas de 10:90 a 90:10 dos produtos fita simples de LATE-PCR de cada uma das três reações foram seqüenciadas usando o protocolo de dideoxi 'diluir-e-ir' descrito previamente. Os resultados são mostrados nas FIG. 21 e FIG. 22.

20 A FIG. 21 mostra um segmento de 10 bases circundando as bases 16320 e 16311 da mistura a 50:50 de linfócitos de sangue humano e impressão digital humana. As alturas de pico refletem as Alturas a 100% reais na seqüência de dideoxi e não as alturas iguais esperadas de uma mistura a 25 50:50. A linha 211 mostra o pico para a base G nessa seqüência e a linha 202 mostra o pico para a base A na mesma posição na seqüência. O pico 212 é maior do que o pico 211 em uma mistura a 50:50 de linfócitos de sangue humano e fio de cabelo humano tendo diferentes seqüências 30 genéticas em virtude das características fluorométricas de

seqüenciamento de dideóxi, conforme é demonstrável por meio de análise de seqüências puras para a mesma região.

A FIG. 22 mostra os percentuais recíprocos (90:10, 70:30, 50:50, 30:70 e 10:90) de duas amostras em cada um dos cinco locais de SNPs. A Amostra 1 é proveniente de um Fio de Cabelo Humano e a Amostra 2 é proveniente de uma Impressão Digital Humana de outro indivíduo. As alturas de cada pico em cada posição foram medidas a partir de impressões das seqüências de dideóxi e foram, então, escalonadas baseado na mesma base de um controle de Amostra 1 a 100% ou Amostra 2 a 100%. Na FIG. 22, a linha 222 é o percentual pretendido de Amostra 1 na mistura plotado contra o percentual pretendido de Amostra 2 na mistura. A linha 221 é uma linha adaptada aos resultados reais, isto é, o percentual observado de Amostra 1 na mistura plotado contra o percentual pretendido de Amostra 2. O percentual observado para cada percentual pretendido de Amostra 2 é de cinco pontos, um para cada base. Os dados demonstram que existe muito pouca dispersão entre as diferentes bases em cada percentual, mas os dados também mostram que linha 221 dos valores observados não cai para cima da linha dos valores previstos (linha 222), provavelmente porque a quantidade de Amostra 1 e Amostra 2 na mistura não eram exatamente iguais.

25 Exemplo 14. Distinção de Misturas

Para distinguir amostras consistindo de 100% de DNA genômico heterozigótico de amostras consistindo de 90% de DNA heterozigótico e 10% de DNA genômico homozigótico para uma única alteração de nucleotídeo, nós primeiro criamos uma mistura de DNA consistindo de 90% de DNA heterozigótico

para o sítio SNP rs858521 localizado no cromossoma humano
17 (alelos C/G) mais 10% de DNA homozigótico para o mesmo
sítio do SNP (alelos C/C). O sítio SNP é listado no banco
de dados NCBI dbSNP acessível através de
5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=SNP>). Essa
mistura de DNA foi preparada através de mistura de
concentrações equivalentes dos DNAs heterozigóticos e DNAs
homozigóticos correspondentes fornecidos pelo Reid
Laboratory na University of Washington em Seattle. As
10 concentrações de DNA para cada DNA genômico para fins de
mistura foram estimadas baseado nos valores de Ct da
fluorescência do SYBR derivada de análise em tempo real de
amostras de LATE-PCR similar àquela descrita abaixo. Uma
vez que a mistura de DNA foi preparada, nós ajustamos as
15 reações de LATE-PCR repetidas contendo 100% de DNA
heterozigótico ou 90% de DNA heterozigótico + 10% de
homozigótico. Cada amostra de LATE-PCR consistia de 1X
Tampão de Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl₂ a
3 mM, mistura de dNTP a 250 μM, 0,24X SyberGold I
20 (Invitrogen, Carlsbad, CA), reagente de prevenção de
iniciação errônea a 200 nM que nós denominados Elixir
composto 9-3iDD, 1,25 unidades de Taq polimerase Platinum
(Invitrogen, Carlsbad, CA), Primer em Excesso rs858521 a 1
μM, Primer Limitado rs858521 a 50 nM e sonda anti-senso a
25 2,4 μM contra o alelo G de SNP rs858521 e 1800 equivalentes
de genoma do DNA genômico apropriado em um volume final de
25 μl.

A seqüência do Primer em Excesso rs858521 é 5'
CAATCCCTTGACCTGTTGTGGAGAGAA 3' (SEQ. ID. No. 29).

30 A seqüência do Primer Limitado rs858521 é 5'

TCCCCAGAGCCCAGCCGGTGTCACTTC 3' (SEQ. ID. NO. 30).

A seqüência da sonda anti-senso contra o alelo G de SNP rs858521 é 5' [Cy5] CTTCAGCTCAAACAATA [Phos] (SEQ. ID. No. 31).

5 A seqüência do reagente de prevenção de iniciação errônea é 5' Dabcila- CGCTATAATGAAATTATAGCG-Dabcila (SEQ. ID. No. 32).

Essas amostras foram submetidas à amplificação em um ABI 7700 usando um perfil de ciclo térmico consistindo de 10 um ciclo de 95 °C durante 3 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C durante 10 seg, 66 °C durante 10 seg. e 72 °C durante 20 seg. Ao final da reação, a reação foi fundida de 95 °C para 25 °C em intervalos de 1 °C durante 1 min. em cada temperatura, com aquisição de fluorescência no canal Cy5. 15 Os sinais de fluorescência de Cy5 captados sem nenhuma correção para a linha de base foram exportados para o programa de computador Excel. Cálculo da primeira derivada dos sinais de fluorescência foi realizado através de subtração dos sinais de fluorescência de uma temperatura 20 dos sinais de fluorescência da próxima temperatura durante a fusão. Os resultados são mostrados na FIG. 23, painéis A e B. A FIG. 23A mostra a plotagem da primeira derivada de 25 sinais de fluorescência versus temperatura, isto é, curvas de fusão. As curvas de fusão na FIG. 23 A foram niveladas usando a função de movimento médio do Excel para eliminar a interferência em virtude de flutuações térmicas no ABI 7700. A FIG. 23A revelou os picos de fusão correspondendo à ligação da sonda a seu alvo alelo G equivalente em 30 temperaturas maiores e ao alvo alelo C não equivalente em temperaturas menores. A FIG. 23A mostra que as amostras 90%

heterozigóticas + 10% homozigóticas, círculo 231, exibem um menor pico de alelo G e um maior pico de fusão de alelo C com relação às alturas dos picos de fusão de alelo C e alelo G nas amostras 100% heterozigóticas, círculo 232.

5 Essas diferenças estão de acordo com a maior proporção esperada do alelo C nas amostras 90% heterozigóticas + 10% homozigóticas (55% de alelo C: 45% de alelo G) comparado com as amostras 100% heterozigóticas (50% de alelo G: 50% de alelo C). A proporção da altura do pico de alelo C para 10 a altura do pico de alelo G é mostrada como um gráfico de barras na FIG. 23B. O conjunto de barras à direita é para as amostras 90% heterozigóticas + 10% homozigóticas, correspondendo ao círculo 231. As barras mais escuras à esquerda são para as amostras 100% heterozigóticas. Caixas 15 de erro convencionais 233 e 234 são mostradas para os conjuntos de barras. Essa proporção distingue amostras 100% heterozigóticas de amostras 90% heterozigóticas + 10% homozigóticas com certeza de 99,7%, baseado na falta de sobreposição das caixas de erro que refletem três desvios 20 padrões do erro da média.

Exemplo 15. Sensibilidade das Reações de LATE-PCR à Concentração Inicial de Polimerase

Amplificações por PCR foram realizadas utilizando um ABI 7700 para amplificar o amplicon de 549 bases designado 25 como HV1-H dentro da região de d-loop do DNA mitocondrial humano. Misturas de reação para DNA genômico humano, Seqüências de oligonucleotídeo (HV1-H) e amplificações por LATE-PCR eram conforme descrito no Exemplo 11, exceto que 30 as Unidades de Taq DNA polimerase Platinum variavam entre as amostras, como segue: 0,125, 0,250, 0,375, 0,50, 0,625 e

1,25 Unidades.

Análise da curva de fusão (fluorescência do SYBR Green versus temperatura) foi realizada. Curvas de fusão mostram como a concentração de Taq influencia a especificidade do produto de dsDNA para essa reação de LATE-PCR. À medida que a concentração de Taq Platinum diminui de 1,25 unidades para 0,375 unidades, a especificidade da reação aumenta, conforme refletido nos picos de fusão das réplicas. Diminuição da concentração adicionalmente, para 0,250 unidades, diminuiu a especificidade. A 0,125 unidades, a reação não ocorre. A maior especificidade ocorreu com uma concentração de Taq de 0,375 unidades.

Exemplo 16. Variação de Declínio como uma Função da Concentração de Taq em uma LATE-PCR em Tempo Real e em uma LATE-PCR Duplex em Tempo Real

Nós projetamos um ensaio de LATE-PCR em tempo real duplex para amplificação simultânea de seqüências dentro dos exons dos genes Oct4 e Xist de murino (Número de Acesso ao GenBank NM 013633 e L04961, respectivamente). Cada reação foi realizada em um volume final de 50 µl e continha os seguintes reagentes: 1 X tampão de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) compreendido por Tris-HCl a 20 mM, pH de 8,4 e KCl a 50 mM, MgCl₂ a 3 mM, 0,4 mM de cada dNTP, Primer Limitado Oct4 a 50 nM tendo a seqüência 5' TGGCTGGACACCTGGCTTCAGACT 3' (SEQ ID NO: 33), Primer em Excesso Oct4 a 2 µM tendo a seqüência 5' CAACTTGGGGACTAGGC 3' (SEQ ID NO: 34), Primer Limitado Xist a 100 nM tendo a seqüência 5' GGTCGTACAGGAAAAGATGGCGGCTCAA 3' (SEQ ID NO: 35), Primer em Excesso Xist a 2 µM tendo a seqüência 5' TGAAAGAAACCAGTAGAGGGCA 3' (SEQ ID NO: 36), 1 µM de uma sonda

sinalizadora molecular Oct4 com baixo ponto de fusão tendo a seqüência 5' TET-CCG CCT GGG ATG GCA TAC TGT GGA AGG CGG-Dabcila 3' (SEQ ID NO: 37) e 300 nM de um reagente que impede iniciação errônea (que nós referimos como composto 5' 9-3bDD) tendo a sequência 5'Dabcila-CGTTATAATGAAATTATAACG-Dabcila 3' (SEQ. ID. No. 38). Taq DNA polimerase Platinum® em complexo com anticorpo (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi também incluída na mistura de PCR em concentrações de 1, 2, ou 3 Unidades por ensaio). Uma sonda sinalizadora molecular 10 para a detecção de amplicons Xist não foi adicionada nesse exemplo.

Em paralelo com essas LATE-PCRs duplex, nós também realizamos uma série de ensaios para amplificação por LATE-PCR do amplicon Oct4 apenas. Esses ensaios tinham 15 composição idêntica conforme as duplas antes mencionadas, exceto quanto à omissão do Primer Limitado Xist e o Primer em Excesso Xist.

DNA genômico de camundongo (Sigma, St Louis, MO) foi adicionado a todos os ensaios e proporcionou os modelos 20 para amplificação por PCR. O número de genomas adicionados a cada tubo foi calculado como 1000, baseado em um tamanho de genoma de 6 pg (veja Vendrely e Vendrely (1949) Experientia 5: 327-329).

Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. 25 Amplificação foi realizada em um ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, CA) com um perfil de ciclização térmica compreendido de 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos; 6 ciclos a 95 °C durante 10 seg, 63 °C durante 20 seg e 72 °C durante 30 seg; e 54 ciclos a 95 °C durante 30 15 seg, 55 °C durante 25 seg, 72 °C durante 35 seg e 45 °C

durante 30 seg, com aquisição de fluorescência a 45 °C no canal TET.

Os resultados desse experimento são mostrados na FIG. 24, a qual plota os sinais fluorescentes gerados pelo acúmulo de amplicons Oct4 através de hibridização com a sonda sinalizadora molecular TET-Oct4. Quando apenas um par de primers estava presente, aumento da concentração de Taq polimerase de 1 Unidade/ensaio (círculo 241) para 2 Unidades/ensaio (círculos 242) ou 3 Unidades/ensaio (círculos 243) tinha o efeito de tornar o declínio dos sinais mais gradual, em virtude da eficácia aumentada de amplificação. Os sinais identificados pelos círculos 242 e 243 (2 e 3 Unidades/ensaio, respectivamente) eram interespacados, sugerindo que a eficácia máxima tinha sido atingida aproximadamente nesses níveis. Conforme esperado, os declínios das linhas geradas pelas reações duplex (círculos 244, 245 e 246) eram, em todos os casos, menores do que aqueles gerados através de amplificação de um único amplicon, porque a Taq polimerase foi usada em duas vezes essa taxa. Conforme no caso da LATE-PCR de um único amplicon, aumento da concentração de Taq na reação duplex de 1 Unidade/ensaio (círculo 244) para 2 Unidades/ensaio (círculo 245) ou 3 Unidades/ensaio (círculo 246) resultou em um aumento no declínio de sinal. Não houve aumento adicional no declínio inicial das 3 Unidades/ensaio (círculo 246) quando comparado com o declínio inicial das 2 Unidades/ensaio (círculo 245), novamente sugerindo que a eficácia máxima tinha sido atingida. Contudo, as amostras com 3 Unidades/ensaio (círculo 246) atingiram rapidamente um platô e o declínio começou a diminuir, diferente daquele

com as amostras com 2 Unidades/ensaio (círculo 245), indicando a provável ocorrência de iniciação errônea na presença da maior concentração de Taq testada, o que não foi o caso para as amostras 243, também contendo 3 Unidades de Taq/ensaio, mas apenas um par de primers. A despeito da maior quantidade de Taq disponível em ensaios com um único amplicon quando comparado com as duplas (3 unidades sendo usadas para gerar um amplicon ao invés de dois amplicons ao mesmo tempo), mais iniciação errônea ocorria nas duplas em virtude da adição dos primers Xist. De forma a obter eficácia máxima sem iniciação errônea, a concentração de Taq polimerase precisa, assim, ser otimizada levando-se em conta o número e seqüências dos primers adicionados à reação.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



43A625034A2F4783

Campo 2



923F7DF39527B50

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 0517105-9 - Listagem de Sequências - RPI 2190.txt
- Data de Geração do Código: 04-01-2013
- Hora de Geração do Código: 11:48:33
- Código de Controle:
 - Campo 1: 43A625034A2F4783
 - Campo 2: 923F7DF39527B50

REIVINDICAÇÕES

1. Método para análise de pelo menos um produto de amplificação fita simples de um processo de amplificação de ácido nucléico não-simétrico que gera ambos amplicons fita dupla e fita simples através de extensão de primers de oligonucleotídeo por meio de uma DNA polimerase e que inclui pelo menos uma temperatura de anelamento de primer **caracterizado** pelo fato de compreender:

(a) formação de uma mistura de reação de amplificação que inclui pelo menos uma sequência alvo de ácido nucleico e reagentes de detecção,

(b) amplificação da referida sequência alvo de ácido nucleico pelo dito processo de amplificação de ácido nucléico não-simétrico,

(c) detecção de amplicons fita dupla através de um sinal fluorescente,

(d) detecção do referido pelo menos um produto de amplificação fita simples através de sinal fluorescente sequência-específico em uma temperatura abaixo da pelo menos uma temperatura de anelamento de primer, e

(e) normalização do sinal fluorescente de sequência específica como uma proporção calculada da fluorescência do referido produto de amplificação fita simples para a fluorescência dos referidos amplicons fita dupla.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da detecção dos amplicons fita dupla ser por meio de um corante fluorescente de DNA.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato da detecção do referido pelo menos um produto de amplificação fita simples incluir uma sonda

de hibridização fluoroforo-rotulada que se liga ao referido produto de amplificação fita simples durante a etapa de detecção que ocorre a uma temperatura abaixo do pelo menos uma temperatura de anelamento de primer, mas não a uma referida pelo menos uma temperatura de anelamento de primer.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato da sonda de hibridização para o referido pelo menos um produto de amplificação fita simples ser uma sonda fita dupla apagada de discriminação de alelo.

5. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de compreender pelo menos duas sondas de discriminação de alelo para diferentes produtos de amplificação fita simples que são rotulados com o mesmo fluoroforo, mas têm diferentes temperaturas de fusão com relação a seus alvos, em que a referida etapa de detecção que ocorre a uma temperatura abaixo da pelo menos uma temperatura de anelamento do primer inclui detecção da emissão do referido fluoroforo em uma temperatura na qual apenas uma sonda se liga a seu alvo e em uma temperatura em que pelo menos duas sondas se ligam a seus respectivos alvos.

6. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato do primer cuja extensão gera produto de amplificação fita simples ser rotulado com um fluoroforo que é estimulado indiretamente através de emissão fluorescente do referido corante fluorescente de DNA, e em que a detecção do referido pelo menos um produto de amplificação fita simples inclui estimulação do corante fluorescente de DNA e detecção da fluorescência emitida

pelo referido primer.

7. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de compreender pelo menos uma sonda de hibridização tolerante à combinação errônea que se liga a pelo menos dois possíveis produtos de amplificação fita simples para formar híbridos tendo diferentes temperaturas de fusão abaixo da temperatura utilizada para anelar primers no referido processo de amplificação não-simétrico e que é rotulado com um fluoroforo que é estimulado indiretamente pela emissão fluorescente do referido corante fluorescente de DNA, onde a detecção de produto de amplificação fita simples inclui detecção em baixa temperatura em múltiplas temperaturas determinada pelas referidas diferentes temperaturas de fusão.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato da referida sonda de hibridização tolerante à combinação errônea ser uma sonda de hibridização linear que forma uma estrutura secundária compreendendo uma região fita dupla de 1-4 nucleotídeos de comprimento durante a referida detecção em baixa temperatura, em que a fluorescência resultante da referida estrutura secundária é internamente apagada.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato da referida sonda de hibridização tolerante à combinação errônea ser uma sonda de sinalização molecular.

10. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de compreender uma pluralidade de diferentes sondas de hibridização tolerantes à combinação errônea rotuladas fluorescentemente, cada uma das quais tem

uma temperatura de fusão, com relação a qualquer produto de amplificação, que está abaixo da temperatura de anelamento de primer e que, em combinação, se hibridizam a uma pluralidade de possíveis produtos de amplificação em diferentes temperaturas e que têm fluoroforos que são excitados por emissão fluorescente do referido corante fluorescente de DNA, em que a detecção do produto de amplificação de fita simples inclui a estimulação da referida mistura de reação de amplificação em pelo menos três temperaturas abaixo da referida temperatura de anelamento de primer com luz que excita o corante fluorescente de DNA, mas não os fluoroforos das referidas sondas tolerantes à combinação errônea e a detecção de emissões das referidas sondas de hibridização tolerante à combinação errônea.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do processo de amplificação não-simétrico ser um processo de amplificação por PCR linear-após-o-exponencial (LATE-PCR) .

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato da referida detecção ser uma detecção de end-point após o término do processo de amplificação não-simétrica.

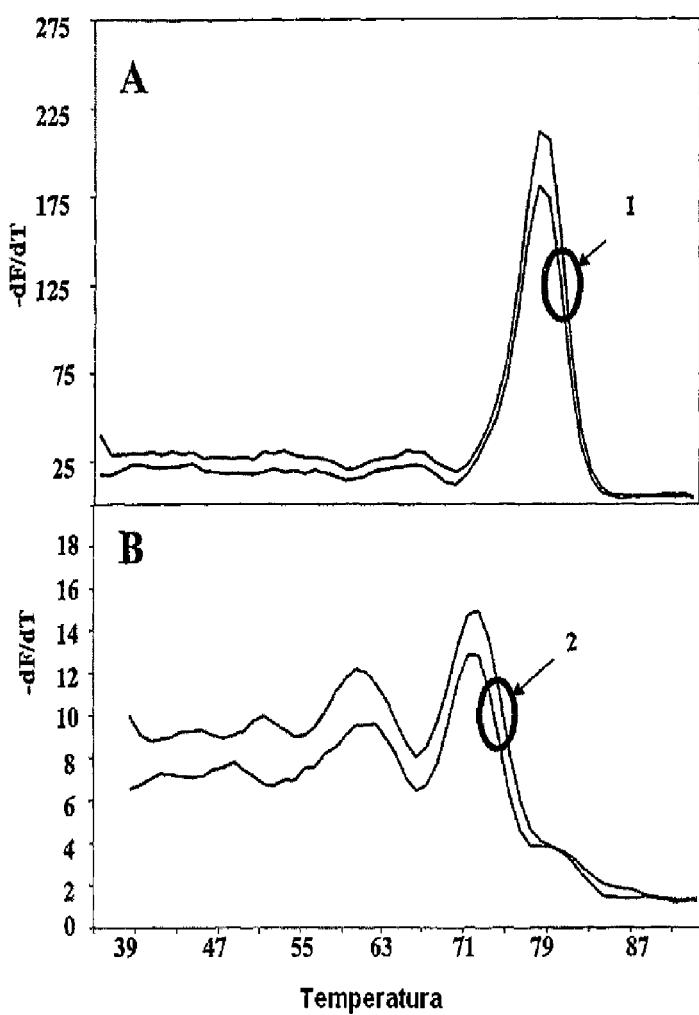
FIGURA 1

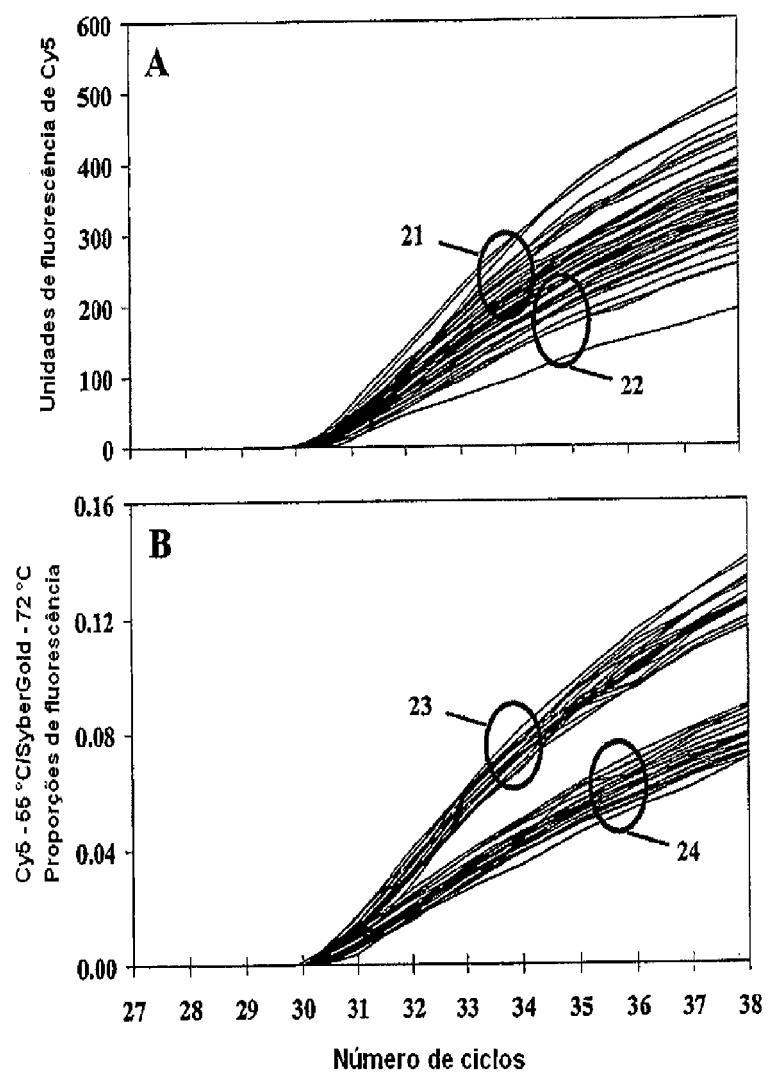
FIGURA 2

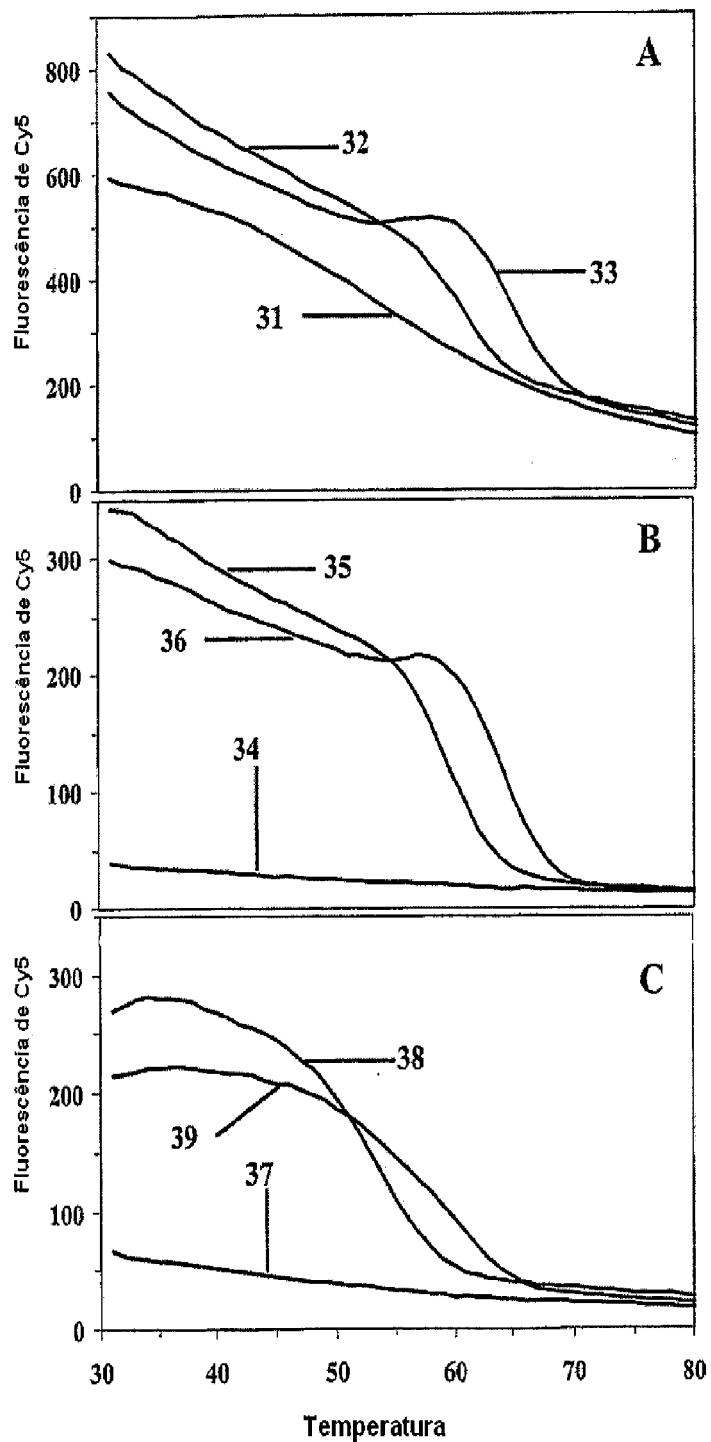
FIGURA 3

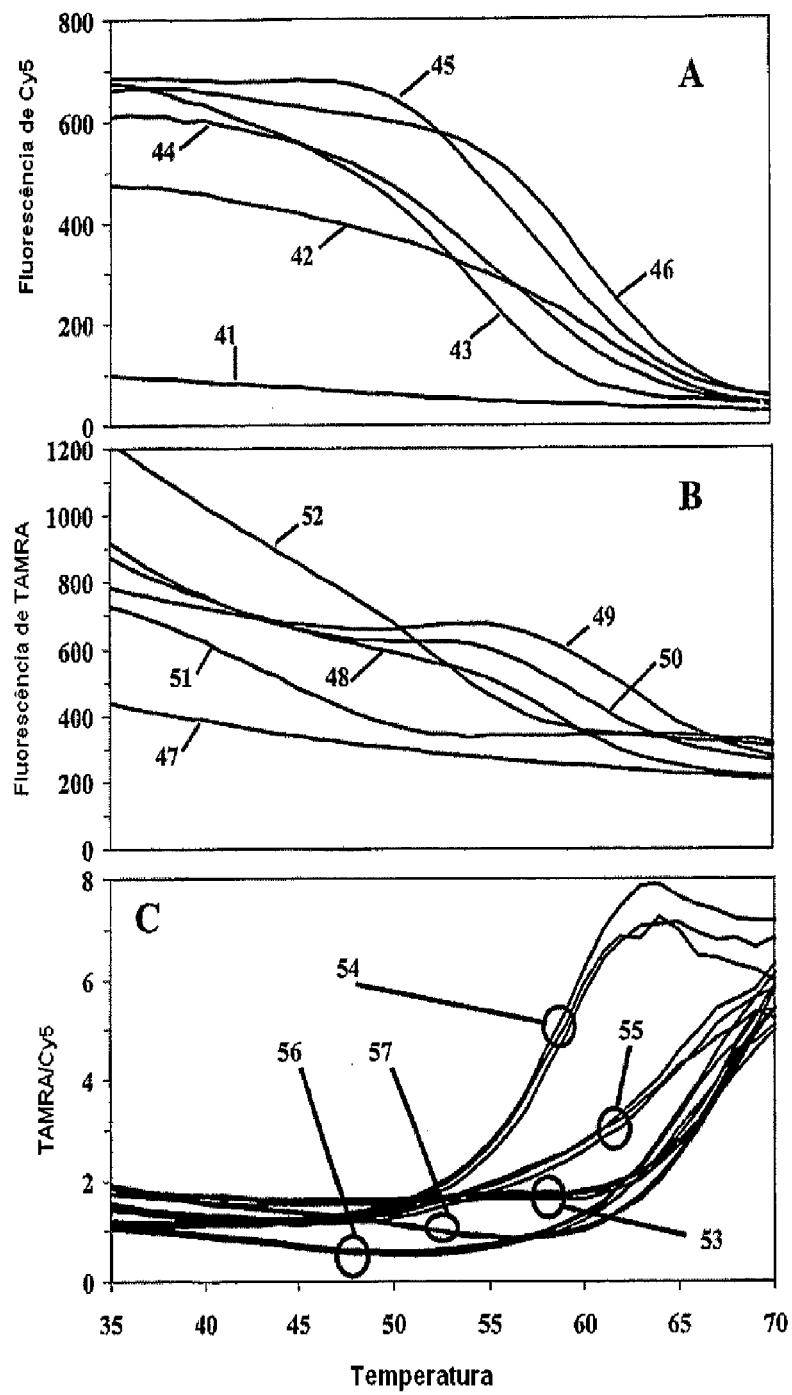
FIGURA 4

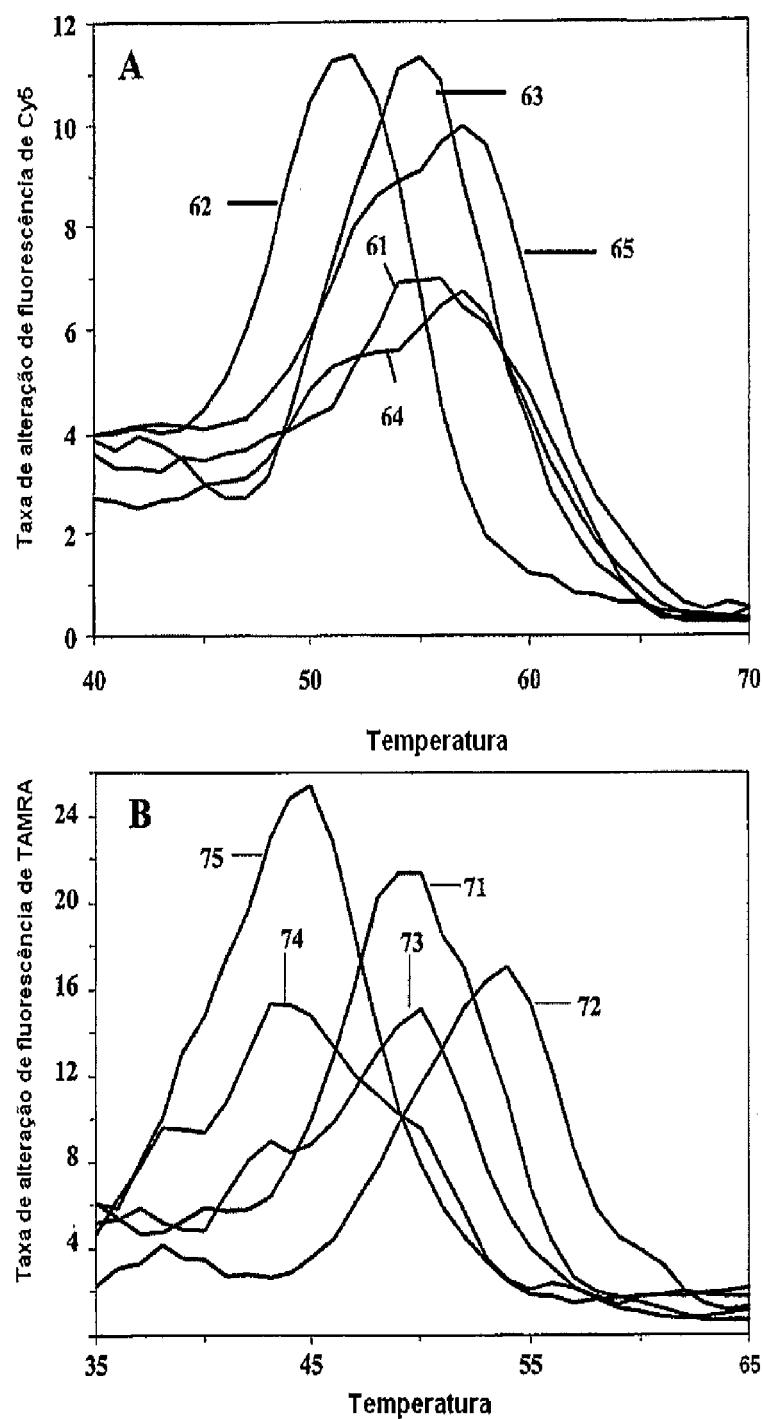
FIGURA 5

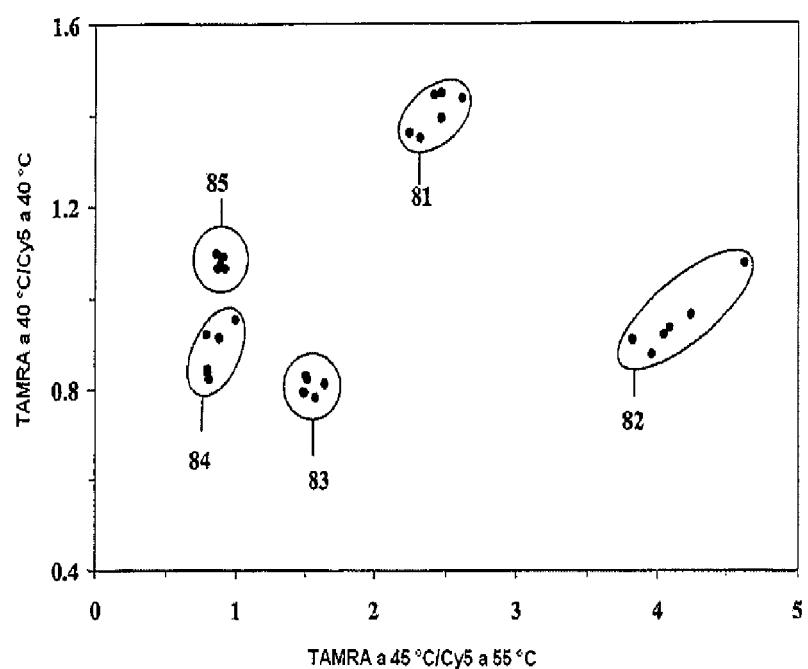
FIGURA 6

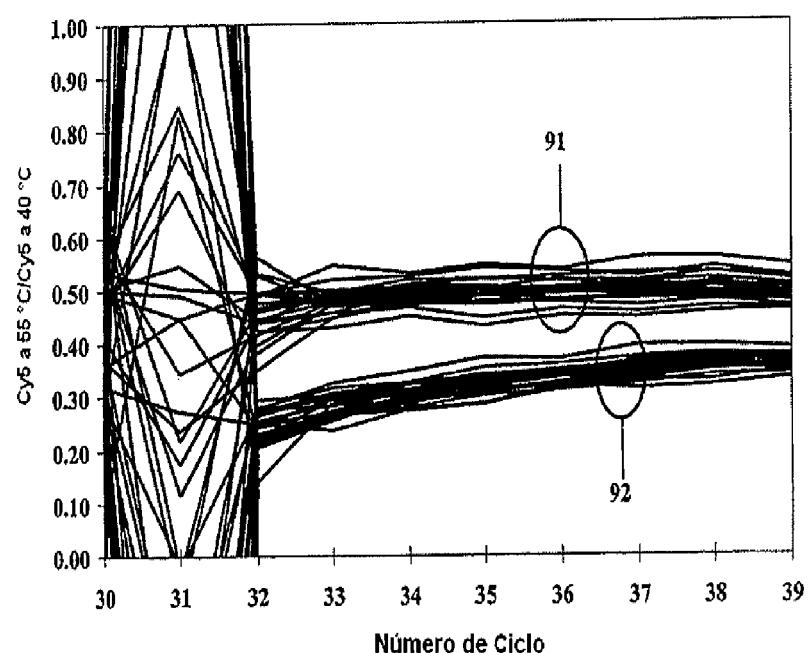
FIGURA 7

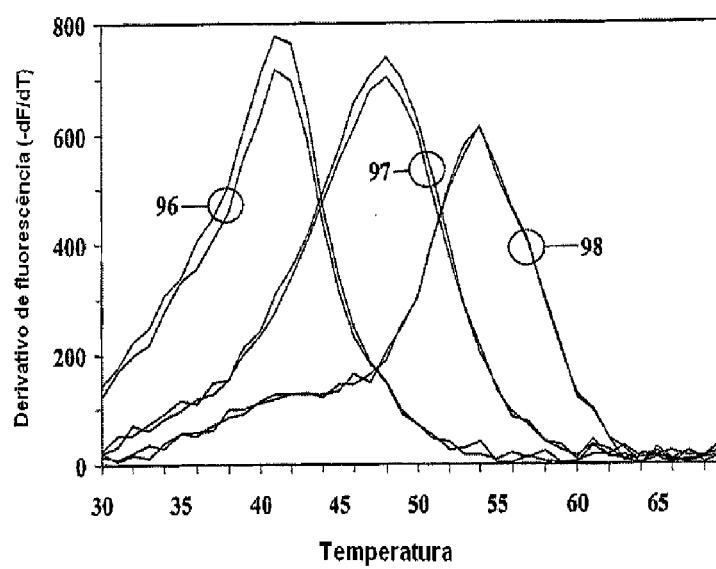
FIGURA 8

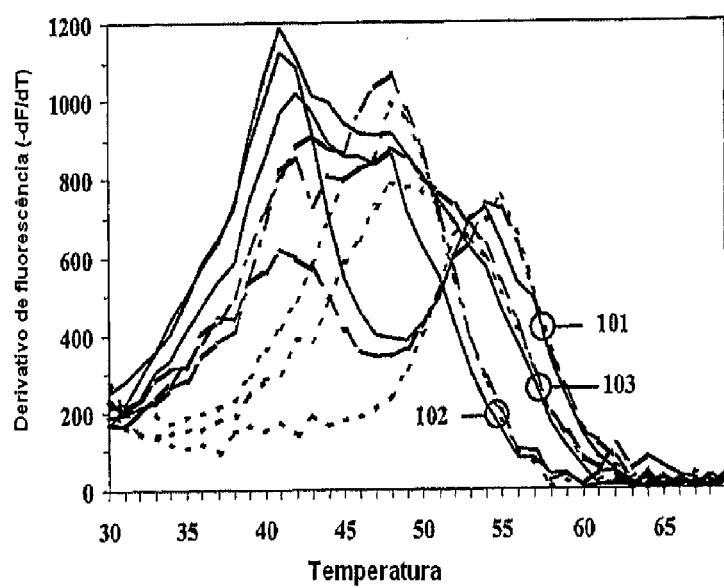
FIGURA 9

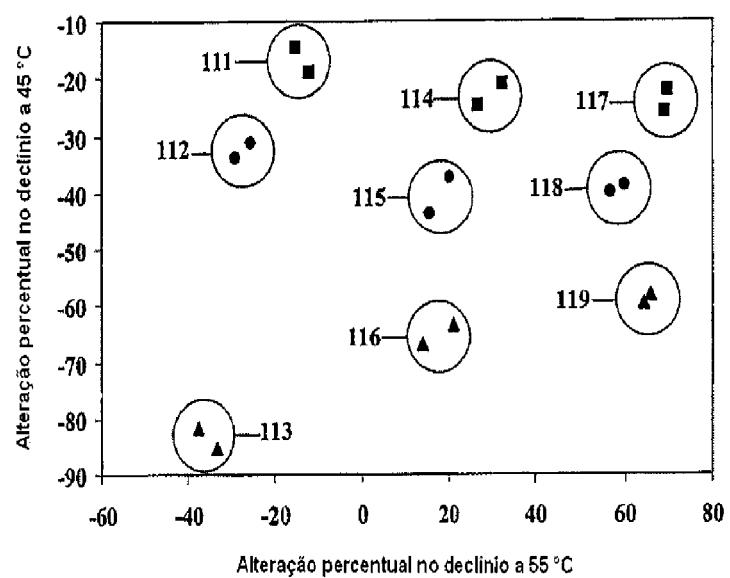
FIGURA 10

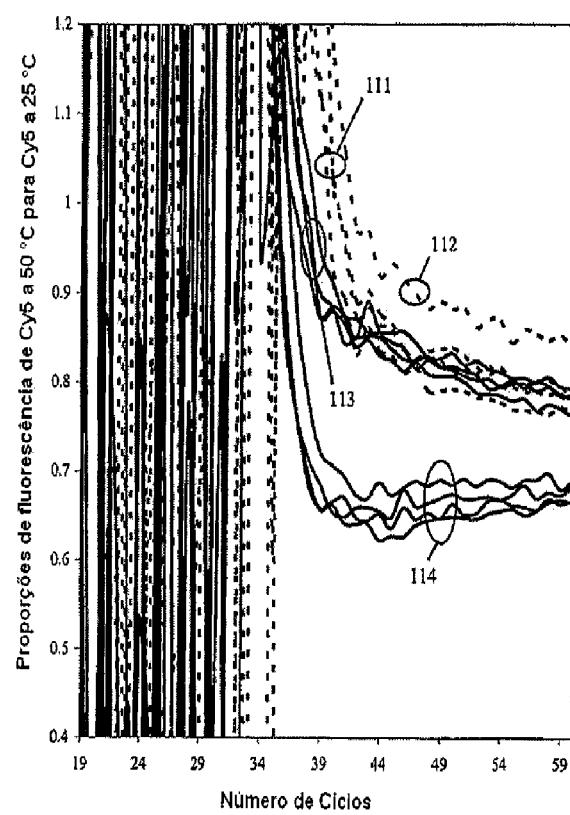
FIGURA 11

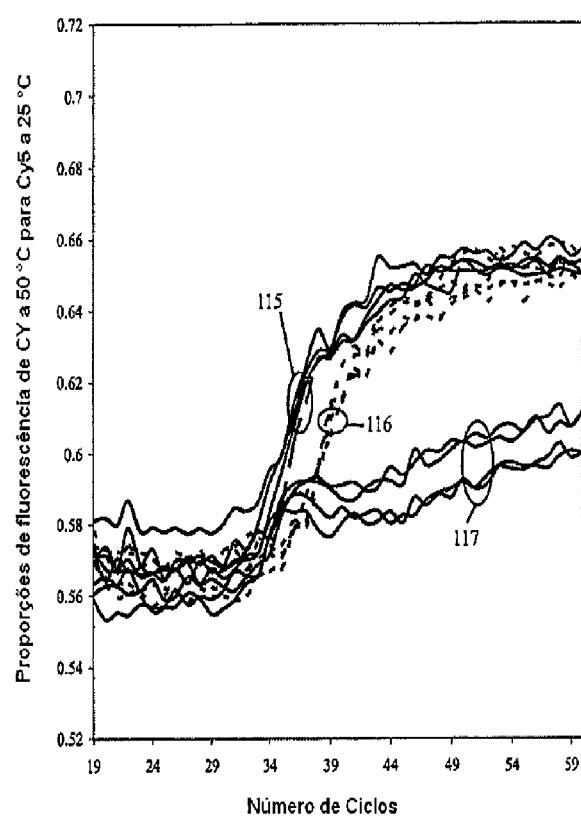
FIGURA 12

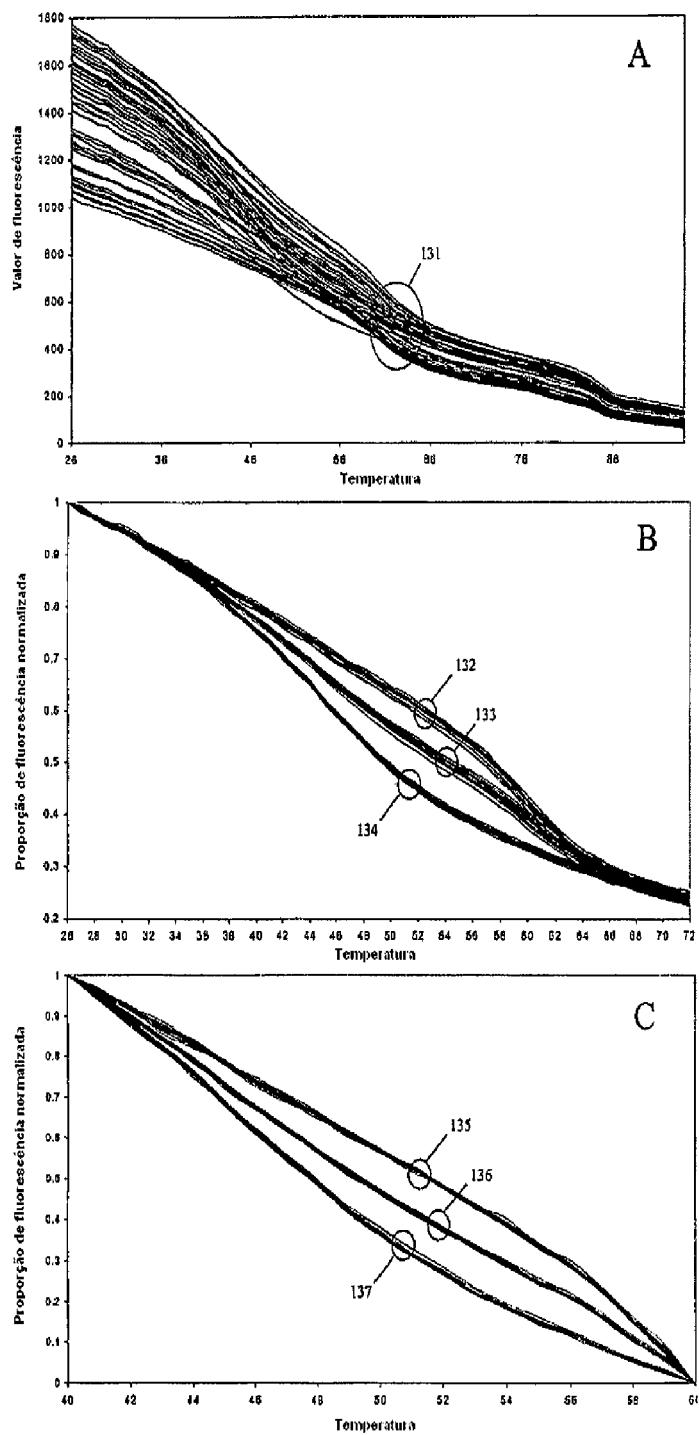
FIGURA 13

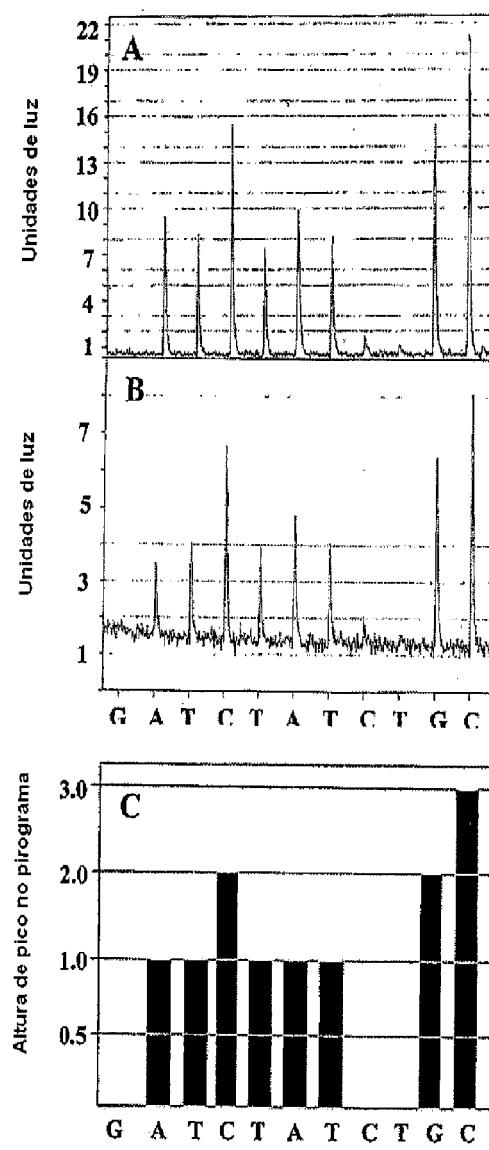
FIGURA 14

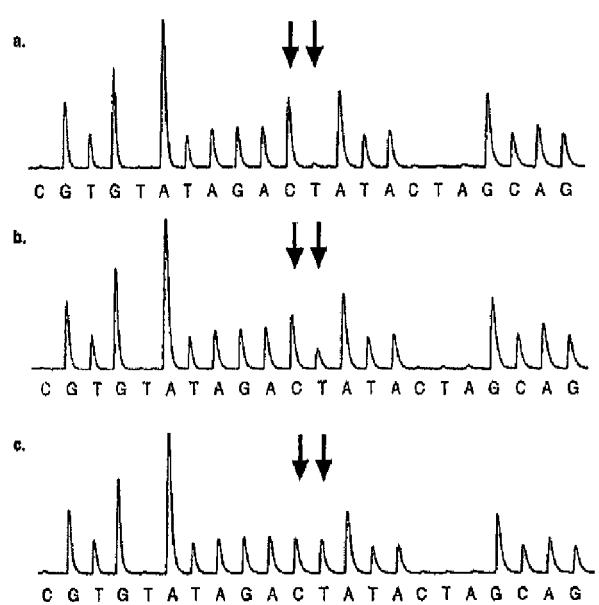
FIGURA 15

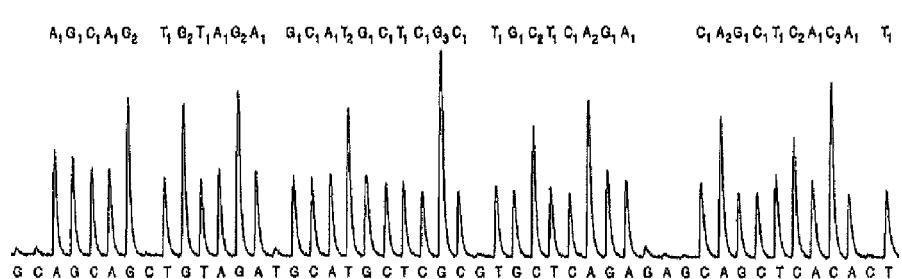
FIGURA 16

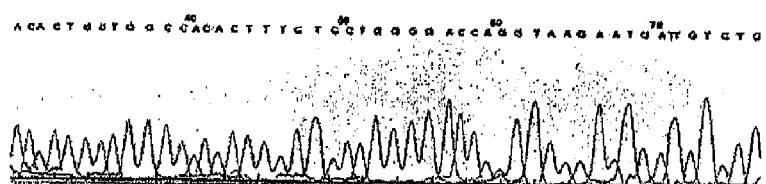
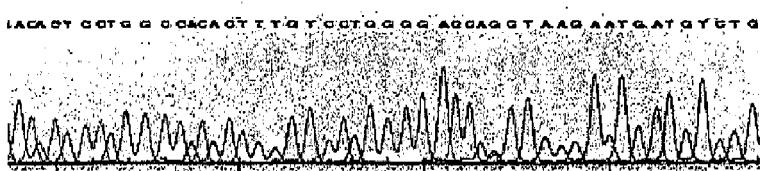
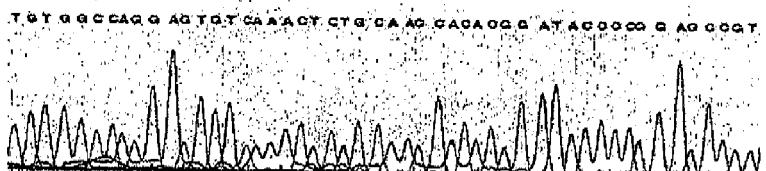
FIGURA 17**A****B****C****D**

FIGURA 18

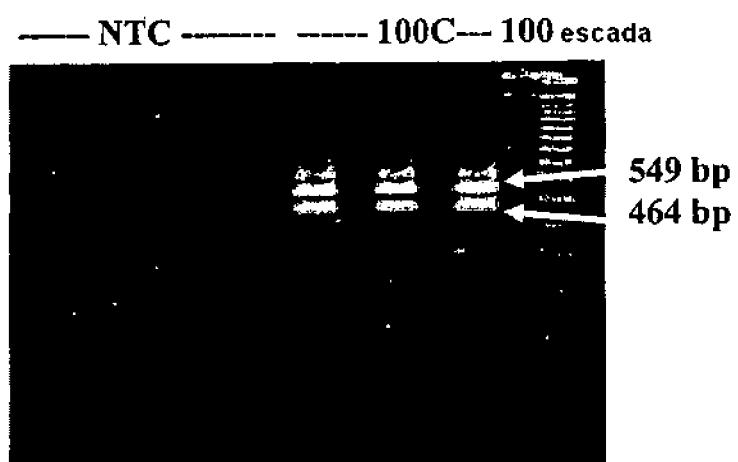
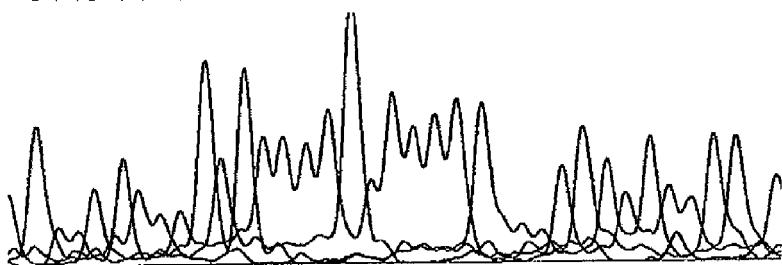
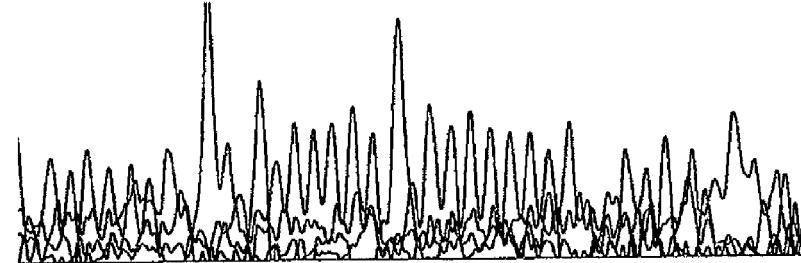


FIGURA 19**A**

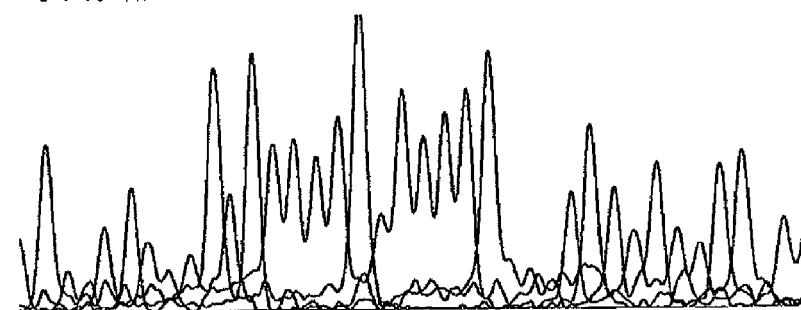
C T T G T A A G C A T G G G G A G G G G G T T T G A T G T G G A T C G

**B**

T A A N A G A C A G A G N A G A N C G A G G N A G A A G G G G N G N G N N G A T A T A A G A G T A A T N N A A T A T A

**C**

C T T G T A A G C A T G G G G A G G G G G T T T C T G A T G T G G A T T G C

**D**

A A A T C T C C A C C A A A C C C C C C C C N A C C C C C C G G C T T G C N N A G G C C A

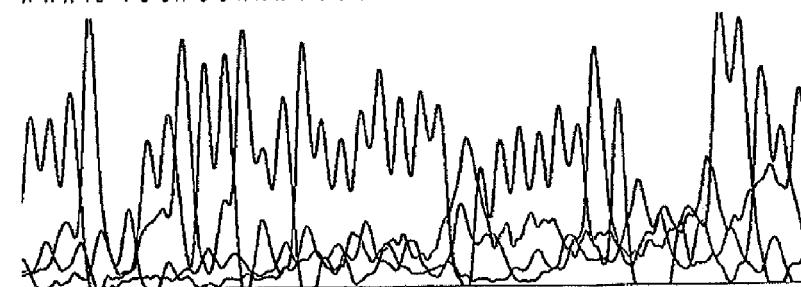


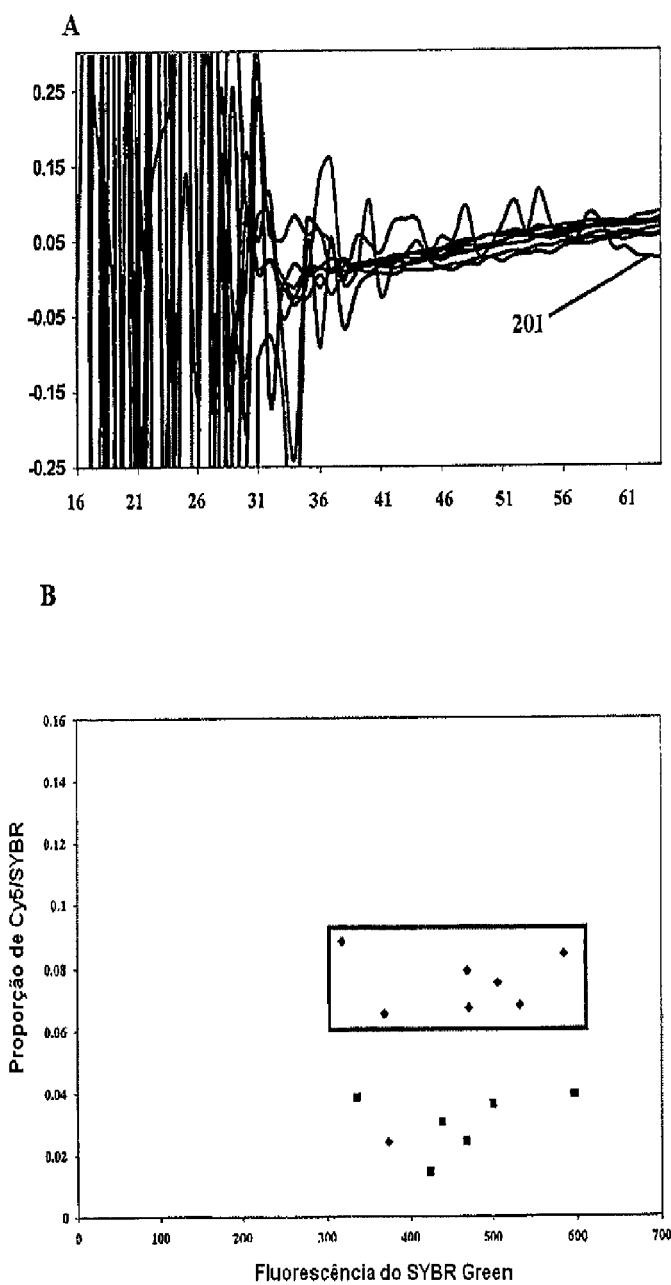
FIGURA 20

FIGURA 21

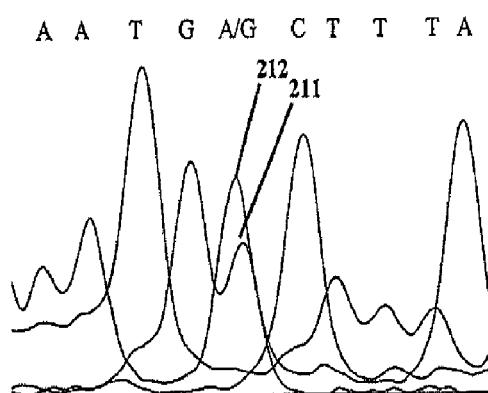


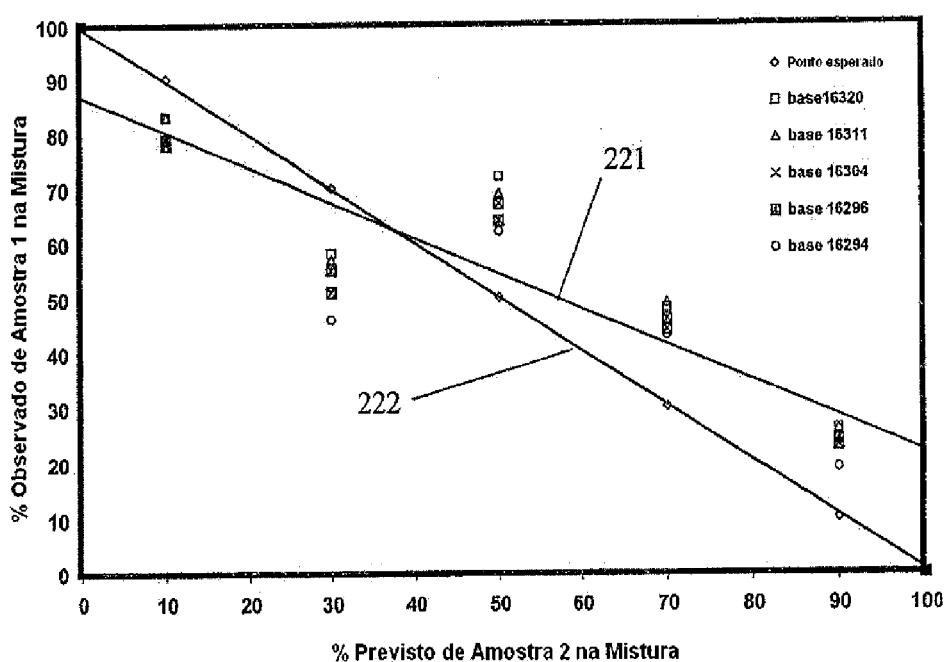
FIGURA 22

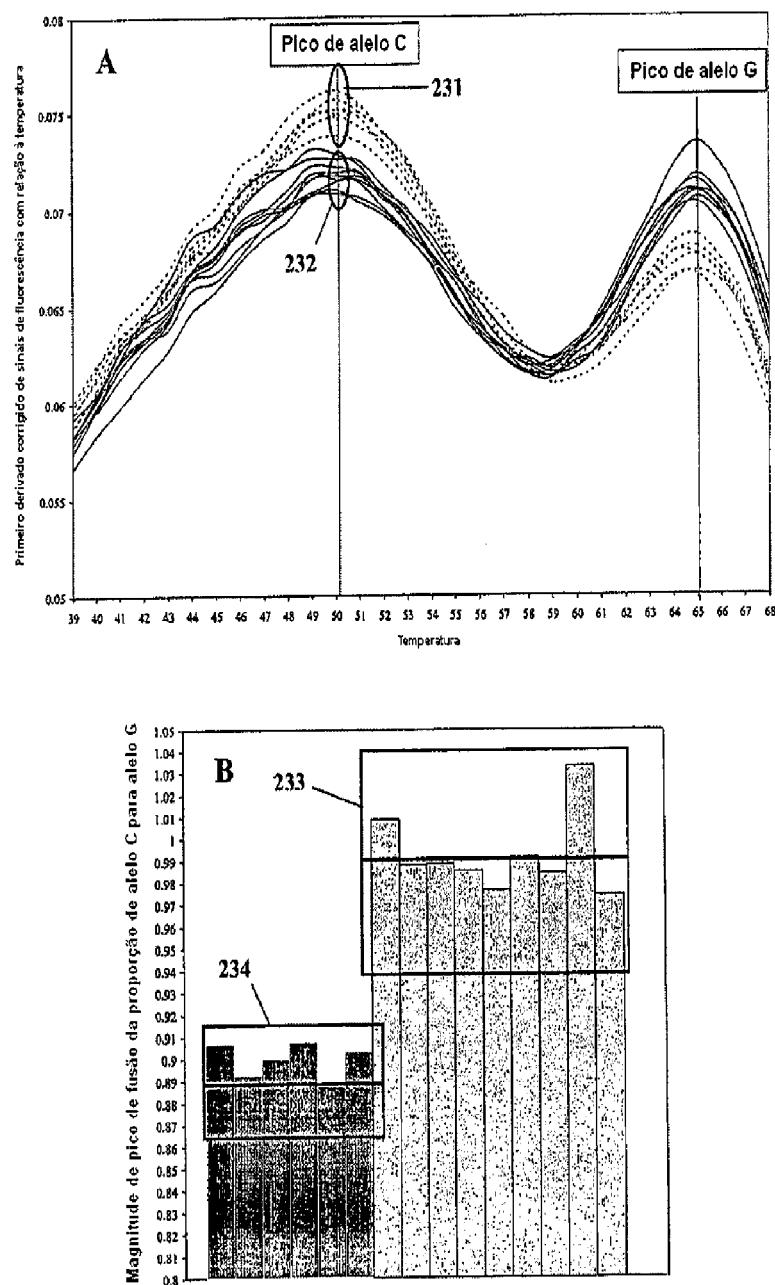
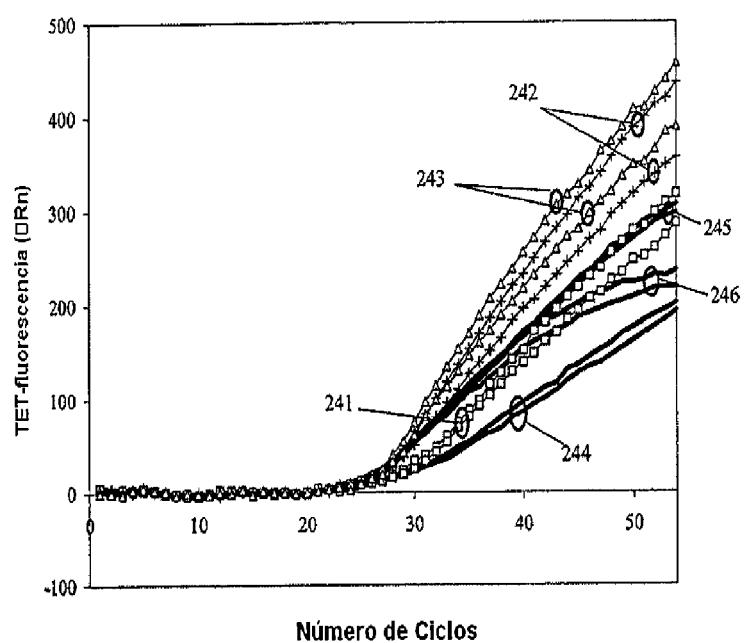
FIGURA 23

FIGURA 24



**MÉTODO PARA ANÁLISE DE PELO MENOS UM PRODUTO DE
AMPLIFICAÇÃO FITA SIMPLES DE UM PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE
ÁCIDO NUCLÉICO NÃO-SIMÉTRICO**

Detecção homogênea durante ou após amplificação por
5 PCR, de preferência LATE-PCR, utilizando corante de DNA
fluorescente e primers rotulados indiretamente excitáveis e
sondas, melhora a reproducibilidade e quantificação.
Detecção homogênea em baixa temperatura durante ou após
amplificação por PCR não-simétrica, de preferência LATE-
10 PCR, utilizando corante de DNA fluorescente e sondas
tolerantes à combinação errônea rotuladas indiretamente
excitáveis permite análise de alvos complexos. Métodos de
preparo de amostra de seqüenciamento após amplificações por
LATE-PCR reduzem a complexidade e permitem processamento em
15 "único tubo".