



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 97939 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 7 )  
C12Q001/68 A

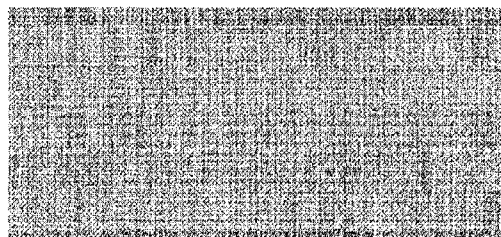
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1991.06.11</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1990.06.11 FR 90 07249</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1992.03.31</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 02-Jan 2001.02.23</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> BIO MERIEUX S.A. MARCY L'ETOILE CHARBONNIERES LES BAINS FR</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i></p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100 LISBOA PT</p>
---	---

(54) *Epígrafe:* PROCESSO DE DETECÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE UM PEDAÇO SIMPLES QUE A CONTÉM OU SUSCEPTÍVEL DE A CONTER DE ACORDO COM A TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO EM CAMADAS

(57) *Resumo:*

DETECÇÃO; SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA; TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO;  
POLÍMERO HIDRÓFOTO



MEMÓRIA DESCRITIVA

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 97.939 Z

NOME: BIO MERIEUX

francesa, industrial, com sede em 69280-Marcy  
L'Etoile, França

EPIGRAFE: " PROCESSO PARA A DETECÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA  
NUCLEOTÍDICA DE ACORDO COM A TÉCNICA DE  
HIBRIDAÇÃO EM CAMADAS "

INVENTORES: Philippe CROS, Patrice ALLIBERT, François MALLET,  
Claude MABILAT e Bernard MANDRAND, todos resi-  
dentes em França

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

1990/06/11;FR ; Nº 90 07249

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/TP

Série 12

*al. g.*  
11. JUN. 1991

1 O presente invento tem por objecto  
um processo de detecção de uma sequência nucleotídica sim-  
ples pendente de uma amostra que a contém ou susceptível  
5 de a conter, de acordo com a técnica de hibridação "em ca-  
madas". Este processo é aplicável, nomeadamente, ao diag-  
nóstico das doenças infecciosas ou genéticas bem como à ti-  
pagem celular.

10 Sabe-se que uma das propriedades ca-  
racterísticas dos ácidos nucleicos é a possibilidade de in-  
teragir com uma sequência complementar por intermédio de  
ligações hidrogénio e de formar assim um híbrido estável de  
acordo com as leis de emparelhamento A-T e G-C.

15 Um ácido nucleico pode portanto ser  
utilizado como sonda para pôr em evidência, numa amostra,  
uma sequência nucleica (chamada "alvo") contendo uma se-  
quência complementar da da sonda. A marcação do híbrido  
formado pelo alvo e a sonda, permite a detecção e a quan-  
tificação do alvo na amostra. Esta técnica foi utilizada  
20 por SOUTHERN E.M. para a análise de fragmentos de ADN a-  
pós separação por electroferese em gel: J. Mol. Biol.  
98,5639(1975)

25 Uma modificação desta técnica, que  
apresenta nomeadamente a vantagem de não necessitar de pu-  
rificação da amostra que contém o alvo, consiste em utili-  
zar um protocolo dito "em camadas". Uma primeira son-  
da nucleotídica (sonda de captura) fixada sobre um supor-  
te sólido, serve para captar o gene ou o fragmento de gene  
a detectar na amostra. Uma segunda sonda (sonda de detec-  
30 ção), complementar de uma outra região do alvo, permite a  
detecção por intermédio de um marcador, como seja um mar-  
cador radioactivo; ver por exemplo DUNN A.R. E HASSEL  
J. A., Cell, 12, 23, (1977); RANKI M. E AL., Gene, 21,  
77 (1983); PALVA A. et al., FEMS Microbiol Lett. 23, 83  
35 (1984); POLSKY-CYNKIN R. et al., Clin. Chem. 31, 1438

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/TP

Série 12

*al. 9*  
11 JUN 1991

1 (1985).

5 O método de hibridação "em camadas" pode ser realizado juntando-se numa só etapa a amostra a analisar e a sonda de detecção, num contentor onde se encontra a sonda de captura fixada ao suporte. Trata-se nesse caso do método de hibridação em camadas dito "simultâneo"; ver por exemplo os artigos de RANKI E AL., palva e al., POLSKY-CYNKIN e al., já referidos.

10 A técnica de hibridação em camadas pode igualmente ser efectuada em duas etapas; ver por exemplo LANGDALE J.A. e al., Gene 36 201 (1985) e ZOLG J. W. E AL., Mol. Biochem. Parasitol. 22, 145 (1987).

15 Para permitir a utilização destas técnicas de hibridação em ensaios de rotina, é necessário eliminar-se a marcação radioactiva da sonda de detecção. Com essa finalidade foram propostos diversos sistemas que se serviam, por exemplo, de um hapteno reconhecido por um anticorpo, ou por uma proteína afim. Propuseram-se, em especial, diversos métodos de marcação do ADN ou ARN por  
20 meio da biotina ou dos seus derivados; ver nomeadamente os pedidos de patente europeia 0285057, 0285058, 0286898 e 0097373; FORSTER e al., Nucleic Acid Res. 13, 745 (1985); CHOLLET A. e KAWASHIMA E. H., Nucleic Acid Res. 13, 1529 (1985); CHIN B. C. e al., Nucleic Acid Res. 11, 6513 (1983); COCUZZA A. J., Tetrahedron Lett. 30, 6287 (1989). Não obstante, os sistemas de detecção que utilizam  
25 métodos de marcação não radioactiva são ainda deficientes em termos de sensibilidade; ver por exemplo ZOLG e al., artigo referido.  
30

35 Por outro lado, o diagnóstico das doenças genéticas, a tipagem celular e mesmo, nalguns casos, a identificação de vírus mutantes, necessitam da detecção de mutações pontuais no genoma. Em tais casos, o aperfeiçoamento de sondas de captura suficientemente sen-

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alig*  
11. JUN. 1991

1 síveis para detectar uma mutação pontual na região do alvo  
complementar da sequência da sonda de captura, é difícil.  
Os sistemas de sondas comercializados actualmente para  
5 realizar este tipo de detecção são pouco práticos pois  
cada sistema comercial deve ser executado a uma determina-  
da temperatura, que varia com o sistema utilizado, o que  
impede que se façam determinações variadas operando-se em  
aparelhos automáticos que trabalhem a uma temperatura  
única.

10 O presente invento tem por objecto  
um processo de detecção de sequências nucleicas, de acor-  
do com a técnica de hibridação em camadas, tendo uma sensí-  
bilidade suficiente para permitir a utilização de uma son-  
da de detecção não radioactiva. Isso torna-se possível  
15 graças à utilização de sondas de captura de comprimento  
muito pequeno que se verificou que conferem ao ensaio em  
camadas uma grande especificidade, conservando ao mesmo  
tempo uma boa sensibilidade e que permitem detectar e di-  
ferenciar sequências homólogas com uma aproximação de  
20 cerca de um nucleótido. A utilização de oligonucleótidos  
de pequeno tamanho, facilita a construção de sondas em  
grande quantidade, com um rendimento aceitável e permite  
dispor de um grande leque de selectividades, Isso é parti-  
cularmente útil no caso da tipagem HLA onde as mutações que  
25 definem o tipo celular estão localizadas sobre porções  
curtas do gene.

Além disso, verificou-se que é pos-  
sível realizar-se a adsorção passiva directa, sobre um su-  
30 porte polímero como o polistireno, de sondas oligo-nucleo-  
tídicas de tamanho muito curto (até um mínimo de 11 nucleó-  
tidos), bem como a fixação passiva de sondas ainda mais  
curtas (até um mínimo de 9 nucleótidos) por intermédio de  
uma proteína a que a sonda está ligada de forma covalente.  
Trata-se de um resultado surpreendente uma vez que, até ao  
35 presente, utilizavam-se geralmente, como sondas de captura,

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

11 JUN 1991

1 sequências que comportavam mais de 100 bases (geralmente  
diversas centenas de bases) e também por que as sequências  
oligo-nucleotídicas (dT)<sub>15</sub> não se fixam de forma passiva  
5 (quer dizer, por adsorção) no polistireno; ver LACY M. J.  
e VOSS E. W., J. of Immunol. Methods, 116, 87-98 (1989).  
Outros autores procuraram favorecer a fixação da sonda de  
captura saturando o suporte de polistireno com poli (dT)<sub>4000</sub>  
10 e acoplado a sonda de captura, que comporta diversas de-  
zenas de bases, a uma "fila" de poli(dA) que tem de 30 a  
mais de 100 motivos; ver MORRISSEY D. V. E COLLINS M. L.  
Molecular and Cellular Probes, 3, 189-207 (1989). De acor-  
do com a experiência do requerente, a saturação do suporte  
sólido com poli(dT) não melhora a detecção.

15 Além disso, graças à utilização de  
sondas de pequeno tamanho que buscam uma sensibilidade a-  
crescida, o processo de acordo com o invento permite esco-  
lher à vontade uma temperatura de trabalho pré-determinada  
e construir, em cada caso, sondas de comprimento adaptado  
20 para poderem efectuar as determinações dos alvos mais di-  
versos a uma mesma temperatura de trabalho pré-determinada.  
Concebe-se finalmente a simplificação do processo e as pos-  
sibilidades de automatização que daí resultam.

25 O presente invento tem, portanto,  
como objecto, um processo de detecção de uma sequência nu-  
cleotídica simples pendente de uma amostra que a contém ou  
é susceptível de a conter, de acordo com a técnica de hi-  
bridação "em camadas" com uma sonda de captura fixada de  
forma passiva sobre um suporte sólido e uma sonda de detec-  
30 ção marcada com um marcador não radioactivo, sendo as son-  
das de captura e de detecção capazes de hibridação, res-  
pectivamente, com duas regiões não sobrepostas da sequên-  
cia nucleotídica alvo procurada, caracterizado pelo facto  
de a sonda de captura, que contém 9 a 30 nucleótidos, no-  
35 meadamente de 9 a 25 nucleótidos e em particular 9 a 20

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. 9*  
11. JUN. 1981

1 nucleótidos, estar fixada de forma passiva sobre o referido suporte sólido que é realizado em material hidrófobo.

5 Dado que a sonda de captura contém pelo menos 11 nucleótidos, é geralmente possível fixá-la de forma não específica (quer dizer, por adsorção) sobre o suporte, realizado geralmente em polímero hidrófobo como o poliestireno ou um copolímero à base de estireno, nomeadamente um copolímero de butadieno-estireno ou análogo.

10 Entre os copolímeros de estireno citar-se-ão os que contém pelo menos 10% em peso de motivos estireno e em particular os que contém pelo menos 30% em peso, de motivos estireno. O material que constitui o suporte sólido utilizado de acordo com o invento pode, além disso, ser constituído por

15 uma mistura de poliestireno e/ou de copolímero de estireno (especialmente ~~butadieno-estireno~~) com um outro polímero que permita, nomeadamente, melhorar as propriedades do suporte sólido (propriedades mecânicas, transparência, etc...)

20 O referido outro polímero é, por exemplo, um polipropileno, um policarbonato ou análogo. A mistura de um polímero estireno-acrilonitrilo, estireno-metacrilato de metilo, um polímeros que constituem o suporte sólido contém portanto pelo menos 10% em peso e de preferência pelo menos 30% em peso, de motivos estireno. Pode-se utilizar como suporte sólido, um suporte cônico comercializado por VITEK (USA)

25 e realizado com o material copolímero butadieno-estireno tal como o que é vendido sob a denominação comercial K-Resin.

30 É igualmente possível, e quando a sonda de captura é muito curta (em particular com menos de 11 nucleótidos), torna-se mesmo necessário, incluírem-se meios para melhorar a fixação da sonda de captura ao suporte sólido. Conforme anteriormente indicado pode-se por exemplo, ligar a sonda de captura, de forma covalente, de acordo com métodos conhecidos em si, a uma proteí-

35

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

11 JUL 1991  
*[Handwritten signature]*

1 na que se fixa, ela própria, de forma passiva, ao suporte (realizado com os materiais já referidos). Bem entendido, a proteína que favorece a fixação da sonda de captura não deve interferir com a detecção: por exemplo, 5 quando a sonda de detecção é marcada por uma enzima, a proteína fixada ao suporte sólido não deve ter actividade enzimática interferente. Entre as proteínas que se podem utilizar para a fixação passiva indirecta da sonda de captura sobre o suporte, podem citar-se a albumina de um mamífero (por exemplo a albumina bovina) ou uma toxina proteica bacteriana como seja a toxina tetânica. De preferência escolher-se-á uma proteína e/ou um método de junção 10 que permita fixar uma ou duas moléculas da sonda de captura por molécula de proteína.

15 A junção entre o oligo-nucleótido e a proteína pode ser realizada, por exemplo, por intermédio de um braço alquilenos com 3 a 12 átomos de carbono, que pode ser acrescentado à extremidade 5' do oligo-nucleótido que constitui a sonda de captura, aquando da síntese automática. Esse braço tem uma função amina primária que, após activação, graças a um agente de junção homobifuncional 20 como o DITC (fenileno-1,4-diisotiocianato), o DSS (dissuccinimidil suberato) ou o DIBS (ácido 4,4'-diisotiociano estilbeno 2,2'-dissulfónico), permite o enxerto sobre as funções NH<sub>2</sub> trazidas pelas lisinas da albumina. O conjugado é purificado por meio de cromatografia líquida de alto rendimento sobre coluna de troca de iões. Verificou-se que a fixação passiva da sonda de captura por intermédio de uma 25 proteína, conforme indicado acima, é muito vantajosa, nomeadamente porque fornece resultados que apresentam um grau elevado de reproductibilidade.

30 A sonda de detecção pode ser, ela própria, uma sonda curta, contendo de 9 a 30 nucleótidos. Em todo o caso, para se assegurar a especialidade desejada, 35

63.590

Ref: 11TO DCT/PT

Série 12

*al. 9*  
11 JUN 1991

1  
5  
10  
a sonda de detecção contém, de preferência, pelo menos 15 nucleótidos, por exemplo de 15 a 30 nucleótidos, quando a sonda de captura é muito curta e contém, em particular, menos de 15 nucleótidos. A sonda de detecção é ligada de forma covalente a um marcador não radioactivo, por exemplo uma enzima. A ligação covalente é efectuada de acordo com métodos conhecidos, em particular pelo método descrito acima para a ligação entre o oligonucleótido que constitui a sonda de captura e uma proteína. Pode-se utilizar como marcador enzimático, nomeadamente, uma peroxidase tal como a peroxidase de rábano, uma fosfatase alcalina, uma ~~postase~~ ~~ácida~~, a betagalactosidase a, glucose oxidase etc.

15  
20  
Evidentemente que, para se construir as sondas de captura e de detecção, é necessário conhecer-se a sequência ou uma parte da sequência do alvo, ou conhecer a sequência ou uma parte da sequência da proteína codificada pelo alvo. Pode-se então sintetizar os oligonucleótidos que constituem as sondas, com um aparelho de síntese automática de ADN tal como os modelos 380 e 381 comercializados por APPLIED BIOSYSTEMS.

As sondas de captura e/ou detecção podem ser constituídas por ADN ou ARN.

25  
30  
35  
Além disso, as sondas utilizadas de acordo com a invenção podem conter ou ser constituídas por alfa-nucleótidos análogos dos nucleótidos naturais; ver nomeadamente a patente francesa 2.607.507. Os alfa-nucleótidos podem ser obtidos em sintetizadores automáticos. São deriváveis nas extremidades 3' ou 5' e ligam-se às proteínas da mesma maneira que os beta-oligo-nucleótidos. Apresentam a vantagem de uma boa estabilidade em face de nucleases (ver THUONG N. T. e al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84.5129 (1987)). Os conjugados alfa-oligonucleótido-enzimas são mais estáveis em solução que os análogos beta e permitem conservações mais longas em diluições mais fracas.

*al. 9*  
11 JUN 1991

1 O ácido nucleico a detectar  
(alvo) pode ser o ADN de cadeia dupla, o ADN de cadeia simples, um híbrido ADN-ARN ou o ARN (ribossomático ou mensageiro). Bem entendido que, no caso de um alvo nucleico  
5 de cadeia dupla ou de um híbrido ADN-ARN, convem proceder à sua desnaturação antes de se iniciar o processo de detecção pela técnica de hibridação em camadas. O ADN de cadeia dupla pode ser ele próprio obtido após extração, de acordo com os métodos conhecidos, dos ácidos nucleicos de  
10 uma amostra a examinar. Esta extração pode ser feita por proteólise de células seguida de uma extração com fenol-clorofórmio (ver por exemplo MANIATIS e Col., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982), ou mais directamente por tratamento  
15 alcalino em presença de detergente e/ou por tratamento com ultra-sons, ou por qualquer outro processo que liberte ácidos nucleicos em fase líquida. A amostra a tratar pode conter uma mistura de células, bactérias, leveduras, vírus ou outros microorganismos. O ADN de cadeia dupla assim obtido pode ser utilizado directamente, após desnaturação de acordo com técnicas conhecidas, ou pode ser utilizada com matriz para amplificação de ácidos nucleicos, a fim de obter quantidades suficientes para permitir a detecção.

25 Para obter a forma de cadeia simples a partir de um híbrido ARN-ADN ou de um ADN de cadeia dupla, pode operar-se por desnaturação física, química ou enzimática. Um dos métodos físicos de desnaturação corresponde à separação das duas cadeias, aquecendo-se o híbrido  
30 até que ele seja totalmente desnaturado, por exemplo a uma temperatura de 80 a 105°C durante entre alguns segundos e alguns minutos. O método químico de desnaturação consiste, por exemplo, em pôr em contacto a amostra de cadeia dupla com uma solução 0,2M de hidróxido de sódio durante 10 minutos, sendo este tratamento seguido de uma neutralização  
35

63.590

Ref: 11TO DCT/PT

Série 12

*alif*  
11 JUN 1981

1 por ácido acético à mesma concentração (0,2M), até à obten-  
ção de um pH situado entre 6 e 8. Um método enzimático  
de desnaturação consiste na utilização de uma helicase. As  
5 técnicas de utilização das helicases são descritas, nomea-  
damente, por RADDING, Ann. Rev. Genetics, 16, 405-437  
(1982). Outras enzimas com a mesma função são utilizáveis  
com a mesma finalidade.

10 O processo da invenção é, de prefe-  
rência, efectuado de acordo com o método simultâneo.

Este método compreende:

15 - a fixação passiva da sonda de cap-  
tura oligonucleotídica sobre o suporte sólido, directamen-  
te ou por intermédio de uma proteína, conforme indicado an-  
teriormente; opera-se por colocação em contacto do suporte  
com uma solução aquosa que contém a sonda;

- enxaguamento do suporte e secagem  
eventual para a sua conservação;

20 - a colocação em contacto simultâneo  
do suporte assim obtido com uma solução que contém a amo-  
stra a analisar e com uma solução que contém a sonda de de-  
tecção oligonucleotídica marcada, podendo a amostra e a  
sonda de detecção ser juntas sob a forma de mistura ou se-  
paradamente;

- a incubação da mistura obtida;

25 - o enxaguamento do suporte para eli-  
minar os constituintes não fixados sobre o suporte por hi-  
bridação;

30 - e a detecção qualitativa ou quan-  
titativa com ajuda de uma reacção de revelação do marcador  
fixado sobre o suporte, por exemplo por colorimetria, fluo-  
rescência ou luminescência.

35 Vai mostrar-se a seguir uma forma

63.590  
Ref: 11TO DCT/PT  
Série 12

*alif*  
11 JUN 1991

1 de realização particular, não limitativa, de execução do processo da invenção.

5 1. Fixação da sonda de captura

A fixação da sonda de captura é obtida depositando-se por exemplo 100 µl em cada um dos poços de uma placa de micro-titulação de uma solução que contém de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml de oligonucleótidos, de preferência 1 µg/ml, sob a forma de uma solução num tampão PBS 3X (0,45 M NaCl, 0,15 M fosfato de sódio, pH 7,0).

10 Deixa-se a placa em contacto com a solução de sondas de captura durante pelo menos 2 horas a 37°C, depois lava-se com uma solução de PBS 1X (NaCl 150 mM, tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo 0,5% de Tween 20).

15 2. Incubação simultânea das amostras e da sonda de detecção marcada

20 As amostras (alvo) são colocadas sobre a placa após terem sido submetidas, se necessário, a tratamento de desnaturação; sob a forma de uma solução no tampão PBS 3X contendo o ADN heterólogo, por exemplo ADN do esperma de salmão a 10 µg/ml.

25 A sonda marcada é diluída no tampão precedente a uma concentração de 20 a 100 µg/ml. Depositam-se 50 µl desta solução no poço que contem o alvo.

30 A placa de micro-titulação é então incubada durante um tempo que pode variar, por exemplo, entre 30 e 120 minutos à temperatura escolhida, por exemplo 37°C ou durante menos tempo se for necessária uma sensibilidade fraca.

3. Lavagem

35 Efectua-se, por exemplo, a lavagem com tampão PBS 1X contendo 0,5% Tween 20 (Merk 82 21 84).

63.590

Ref: 11TO DCT/PT

Série 12



11. JUN. 1991

1 4. Revelação enzimática

5 A revelação é efectuada com o substrato correspondente à enzima utilizada. Por exemplo, pòde-se juntar ortofenileno diamina (OPD) no caso de o marcador ser a peroxidase de rábano selvagem, paranitrofenilfosfato (PNPP) ou metil-5 umbeliferil fosfato (MUP), no caso de o marcador ser fosfatase alcalina.

10 O tempo de revelação do substrato está geralmente compreendido entre 1 e 30 minutos, após o que a reacção é parada por meio da adição de NaOH 1N no caso da fosfatase alcalina, ou  $H_2SO_4$  1N no caso da peroxidase de rábano.

15 Efectua-se a leitura num leitor de microplacas, a 405 nm para o PNPP, a 492 nm para o OPD e em fluorescência para o MUP (excitação 340 nm, emissão 460 nm).

20 Debruçemo-nos a seguir sobre os estados de incubação e de lavagem consecutivos, que constituem as etapas chave do processo de hidridação "em camadas". Estas operações de incubação e de lavagem são, cada uma delas, efectuadas a uma temperatura constante compreendida entre 20 e 60°C e de preferência entre 25 e 40°C. Uma das vantagens essenciais da utilização de sondas curtas é permitir a realização de ensaios "em camadas" para a detecção de alvos diferentes operando, para essas diversas determinações, a uma temperatura única pré-determinada que será, de preferência, 37°C, uma vez que todos os laboratórios de análises estão equipados com aparelhos com termostatos regulados para essa temperatura.

35 Sabe-se que os híbridos de ADN têm uma temperatura de dissociação que depende do número de bases hibridadas (aumentando a temperatura com o tamanho do híbrido) e que depende igualmente da natureza das bases hi-

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/TP

Série 12

*alig*  
11 JUN 1991

1       bridadas e, para cada base hibridada, da natureza das bases adjacentes.

5                       A dissociação dos híbridos produz-se ao longo de um intervalo de alguns °C e pode ser facilmente determinada em espectroscopia UV: com efeito, a densidade óptica do híbrido é inferior à das sequências de cadeia simples correspondentes. É portanto possível determinar-se para cada caso, uma temperatura de semi-dissociação característica do híbrido estudado.

10                      O conhecimento da entropia e da entalpia da reacção permite aliás calcular (lei de Vant'Hoff) a temperatura de semi-dissociação de um dado híbrido, em condições normalizadas (por exemplo, uma solução de salinidade correspondente a NaCl 1M) em função da concentração total de ácido nucleico na solução; ver por exemplo, Breslauer K. J. e al., PNAS, 83, 3476 (1986); RYCHLIK W. E RHOADS R. E., Nucl. Acid. Res. 17, 8543 (1989); e FREIER S. m. E AL., PNAS 83, 9373, 1986.

15                      Na prática é sempre possível determinar experimentalmente a temperatura de semi-dissociação do híbrido formado por uma determinada sonda com o alvo de sequência complementar, por meio de simples experiências de rotina.

20                      A temperatura de hibridação do protocolo "em camadas" (temperatura de incubação e/ou temperatura de lavagem) deverá evidentemente ser escolhida abaixo da temperatura de semi-dissociação, sem que o alvo não se hibridaria com a sonda de captura e/ou de detecção e os resultados do ensaio seriam erróneos.

25                      Deve entender-se que as presentes considerações acerca da temperatura de semi-dissociação relativas ao híbrido menos estável (quer dizer, o que tenha a temperatura de semi-dissociação mais baixa) dos dois

30

35

*al. 9*  
11. JUN. 1991

1 híbridos que forma o alvo com, por um lado a sonda de cap  
tura e pelo outro a sonda de detecção. Com efeito, para  
o protocolo "em camadas" poder funcionar correctamente,  
é evidentemente necessário, no caso de se procurar um re-  
5 sultado positivo, que esses dois híbridos sejam estáveis  
à temperatura a que se opera.

Uma mutação pontual que arraste um  
mau emparelhamento centrado sobre um única par de bases  
no híbrido, leva a uma modificação, geralmente um abaixa-  
10 mento, da temperatura de semi-dissociação.

Uma vantagem essencial que resulta da  
utilização de sondas curtas é que um tal mau emparelhamen-  
to único pode arrastar um abaixamento relativamente impor-  
tante da temperatura de semi-dissociação, da ordem de 2  
15 a 4°C. Não é esse o caso com as sondas longas, onde um  
tal mau emparelhamento único não arrasta senão uma varia-  
ção muito fraca da temperatura de semi-dissociação.

Verificou-se agora que é possível ti-  
20 rar vantagens da utilização de sondas curtas para efec-  
tuar determinação de acordo com o protocolo "em camadas"  
a uma temperatura única pré-determinada, por exemplo 37°C  
conforme indicado acima.

No que se segue, vai-se dissertar a  
25 título de exemplo sobre o caso, geralmente preferido,  
onde é a sonda de captura que dá, com o alvo procurado,  
um híbrido menos estável que o híbrido alvo-sonda de detec-  
ção. Mas é evidente que também se pode adoptar um sis-  
tema onde, inversamente, é o híbrido sonda de detecção-  
30 -alvo que é o menos estável (é então suficiente substi-  
tuir, no que se segue, a expressão "sonda de captura" por  
"sonda que dá, com o alvo, o híbrido menos estável" para  
se adaptar a discussão ao caso mais geral).

35 Deve-se evidentemente operar com uma  
sonda de captura (e uma sonda de detecção) suficientemen-

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

1 te longa para que a temperatura de semi-dissociação seja superior à temperatura escolhida. Se se desejar realizar um ensaio muito sensível (em particular um ensaio sensível a uma só mutação), é conveniente utilizar-se uma sonda de  
5 captura (e/ou uma sonda de detecção) ajustada, quer dizer, de comprimento suficientemente curto e de sequência tal que a temperatura de semi-dissociação não seja senão muito pouco superior à temperatura de hibridação pré-determinada, sendo a diferença entre as duas temperaturas de, por exemplo, 1 a 3°C, porque é conveniente trabalhar então à temperatura máxima admissível, para evitar as hibridações não-específicas que seriam possíveis adoptando-se uma temperatura muito baixa relativamente à temperatura de dissociação do híbrido perfeitamente complementar.  
10 Com efeito, a diferença de temperaturas admissível, pode ser determinada para cada caso por meio de simples experiências de rotina.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

20 No caso que acaba de ser indicado, à temperatura de hibridação fixada, apenas um alvo perfeitamente homólogo da sonda de captura ficará fixado na sonda, enquanto que um alvo que comporta uma mutação pontual na região complementar da sonda não será fixado.

25 Na discussão precedente, pôs-se sobretudo em evidência a escolha de uma sonda de captura que é adaptada à temperatura de hibridação escolhida principalmente por ajustamentos do tamanho da sonda. Mas é bem evidente para os especialistas que é possível jogar-se igualmente com a escolha da sequência da sonda, uma vez que a temperatura de semi-dissociação pode variar  
30 em função da natureza das bases implicadas na formação do híbrido. É igualmente possível jogar-se com as condições de hibridação e em particular com a concentração salina da incubação e/ou da solução utilizada para a lavagem consecutiva à incubação. Sabe-se, com efeito, que o aumento da concentração salina arrasta consigo um aumento da tem-  
35

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12



11. JUN. 1991

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

peratura de semi-dissociação.

Na execução prática do processo da invenção, quando se utiliza uma sonda de captura e/ou condições de hibridação adaptadas à temperatura pré-determinada escolhida, poderá operar-se de duas maneiras.

De acordo com um primeiro modo de execução, efectua-se a etapa de incubação à referida temperatura e efectua-se a lavagem à referida temperatura ou a uma temperatura inferior. Esta forma de execução tornou-se possível porque à temperatura a que se opera apenas um alvo perfeitamente homólogo da sonda de captura se pode hibridar, de maneira que não há o risco de fixação de um alvo não perfeitamente homólogo, mesmo que se efectue a lavagem a uma temperatura inferior à temperatura de incubação.

De acordo com um segundo modo de execução, efectua-se a etapa de incubação a uma temperatura inferior à referida temperatura pré-determinada e executa-se a lavagem à referida temperatura pré-determinada. Com efeito, nesse caso, é a temperatura de lavagem que será discriminativa e qualquer híbrido eventualmente formado, à temperatura de incubação, entre a sonda de captura e um alvo não perfeitamente homólogo, não será estável à temperatura de lavagem e não ficará portanto fixado ao suporte.

Para a detecção de uma mutação pontual, pode-se operar de duas formas diferentes:

- ou a sonda de captura contem a mutação complementar da mutação procurada, caso em que só o alvo transformado se hibridará nas condições do ensaio de hibridação;

- ou a sonda de captura é perfeitamente homóloga da sequência complementar do alvo não mu-

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

1 tado, caso em que só os alvos não mutados se hibridirão.

O processo de acordo com a invenção é aplicável, nomeadamente:

5 - na detecção de ADN ou do ARN mensageiro dos vírus, ou do ARN dos retrovirus;

- na determinação do ADN, do ARN mensageiro ou ribossomático e dos híbridos ADN<sub>c</sub>-ARN das bactérias, dos parasitas e das leveduras;

10 - e na determinação do ADN dos vertebrados e em particular no homem, para se efectuar a tipagem HLA ou para se detectarem doenças genéticas (miopatia diabetes, mucoviscidose, etc...).

15 Os exemplos seguintes ilustram a invenção sem no entanto a limitarem.

Nestes exemplos representaram-se as sequências nucleótidas, de acordo com a convenção usual, com a extremidade 5' à esquerda.

20 A invenção tem igualmente por objecto a utilização das sondas descritas nos exemplos para a detecção do alvo indicado. Deve entender-se que as sondas mencioandas nos exemplos devem ser consideradas como sequências mínimas que podem ser alongadas (dentro dos limites indicados de 30, 25 ou 20 nucleótidos no máximo) por adjução de nucleótidos suplementares que são, bem entendido, escolhidos para que a sonda seja homóloga do alvo cuja sequência é aqui suposta como conhecida. As sondas mencionadas nos exemplos como satisfatórias, permitem todas operar-se a 37°C.

30 Nos exemplos para os quais se fornecem duas sequências para a sonda de captura (ou para a sonda de detecção), isso significa que se pode utilizar uma das sondas ou as duas sondas. A utilização de duas

35

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

11. JUN. 1991

1 sondas de captura e/ou de duas sondas de detecção, permite  
aumentar o sinal quando os resultados não são satisfató-  
rios com uma só sonda.

5 As indicações referentes às figuras  
1 e 2 anexas são dadas respectivamente nos exemplos 10 e  
15.

#### EXEMPLO 1

10 Preparação do braço fosforamidite para a adição de um braço  
NH<sub>2</sub> em 5' de um oligonucleótido.

15 21,0 g (0,2 mole) de amino-5 pentanol-1 (Aldriche 12304-8)  
são dissolvidos em 90 ml de THF e juntam-se 5,3 g de  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A mistura é arrefecida até -5°C e adicionam-se  
gota a gota 14 g (0,067 mole) de anidrido trifluoroacético  
(Aldrich 10623-2) dissolvidos em 50 ml de THF em 1h.

20 A mistura foi deixada durante 1  
hora sob agitação à temperatura ambiente. Após filtração  
e evaporação do THF, produto é destilado no vazio. A frac-  
ção E<sub>0,03 mm</sub> = 75-90°C é recolhida e purificada sobre gel  
de sílica por meio de uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH 80 :20.

O produto desejado tem um Rf de  
0,6. O rendimento é de 66 %.

25 0,7 g de amino álcool protegido (3,48 10<sup>-3</sup> mole) são secos  
com piridina (2 x 3 ml) com 3 ml de N-etildiisopropilamina  
(13,92 10<sup>-3</sup> mole) e dissolvidos em 15 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1,65 g  
(6,96 10<sup>-3</sup> mole) de cianoetil-2- N,N-diisopropilclorofosfo-  
30 ramidite (Aldrich 30230-9) são adicionados sob argon à tem-  
peratura ambiente durante 35 mn. Juntam-se 0,2 ml de MeOH  
e depois 10 mn sob agitação, 30 ml de acetato de etilo. A  
fase orgânica é lavada a frio com 2 vezes 60 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
10 %, depois 2 x 80 ml de NaCl saturado, seca sobre  
35 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> depois evaporada no evaporador rotativo.

63.590

Ref: 11TO DCT\_DC/PT

Série 12

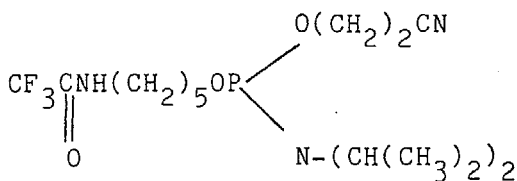
*Handwritten signature*

1

5

O produto bruto é purificado em coluna de silício numa mistura de acetato de etilo- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{NEt}_3$  (45-45-10). A fração recolhida ( $R_f = 0,75$ ) é concentrada no evaporador rotativo e conservada sob argon.

10



Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

15

### EXEMPLO 2

Preparação de um conjugado oligonucleótido ASB:

20

25

30

35

O oligonucleótido é sintetizado num aparelho automático APPLIED 381A utilizando-se a química das fosforamidites. O braço fosforamidite, dissolvido em acetonitrilo anidro com uma concentração de 0,2 molar, é colocado na posição X do sintetizador e a adição do braço faz-se de acordo com o protocolo normal em fim de síntese. Após desprotecção durante uma noite à temperatura de  $55^\circ\text{C}$  em  $\text{NH}_4\text{OH}$  33%, precipitação em etanol a  $-20^\circ\text{C}$ , o oligonucleótido é seco sob vácuo e retomado em 1 ml de água,  $3 \cdot 10^{-8}$  mole de oligonucleótido são secos sob vácuo e retomados em 25  $\mu\text{l}$  de tampão de borato de sódio 0,1 M pH 9,3. Adicionam-se 500  $\mu\text{l}$  de uma solução a 30 mg/ml de DITC (Fluka 78480) em DMF. A mistura é agitada 1 h 30 à temperatura ambiente antes da adição de 3 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Após extração da solução por meio de butanol (3 x 3 ml), a fase aquosa restante (500  $\mu\text{l}$ ) é seca sob vácuo depois retomada por meio de  $1 \cdot 10^{-7}$  mole (6,6 mg) de BSA (Pierce 30444) em 200  $\mu\text{l}$  de tampão de borato. Após uma noite sob agitação à temperatura ambiente, o conjugado é purificado por troca de iões em CHLP numa coluna de AX300 (BROWNLEE 4,6 x 100 mm) por um gradiente de NaCl (Quadro 1). O pico do conjugado é dialisado contra a água (2 x 1 litro) concentrado sob vácuo, retomado por meio de 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ .

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alif*  
11 JUN 1991

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

QUADRO 1

COMPRIMENTO	OLIGONUCLEÓTIDO	Tr min	mM NaCl	RÁCIO oligo/ASB
20	5'-AACGCTACTACTATTAGTAG-3'	11,96 (2M)	603	1,0
15	5'-TTGCATTTAGAGCCC-3'	15,50 (1M)	395	1,4
13	5'-TGCATTTAGAGCC-3'	15,47 (1M)	385	1,1
12	5'-GCATTTAGAGCC-3'	14,49 (1M)	367	1,6
11	5'-GCATTTAGAGC-3'	14,41 (1M)	365	1,2
9	5'-CATTAGAG-3'	13,99 (1M)	356	1,1

\*Tr = tempo de retenção em função da concentração em NaCl

\* O gradiente de eluição de 10% a 56% de tampão B em 25 minutos com tampão A =  
= 2= mM tampão de fosfato de sódio, pH 7,00  
tampão B = tampão A contendo 2M (ou 1M)NaCl.

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. 9*  
1. JUN. 1991

1 EXEMPLO 3

Preparação de um conjugado oligonucleótido peroxidase de rábano.

5 De acordo com o exemplo 2, o oligonucleótido activado seco sob vácuo é retomado por  $1,25 \cdot 10^{-7}$  moele (5 mg de peroxidase de rábano (Boehringer 413470) em 200  $\mu$ l de tampão de borato.

10 O protocolo de purificação é idêntico: o conjugado é guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  num tampão 50 mM tris HCl pH 7,0, 40% glicerol.

Os resultados são apresentados no quadro 2.

15

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

20

25

30

35

63.590

Ref: 11T0 DCT-DC/PT

Série 12

11 JUN 1991

*alig*

QUADRO 2

TIPO	SEQUÊNCIA 5'... 3'	Tr min	mM NaCl	Racio oligo/HRP
TEM	TGCCATAACCATGATGG	22,26 (1M)	491	1,1
TEM	ATAACACTGGGCAAC	20,01 (1M)	450	1,0
TEM	GTTGGCCGCAGTGTAT	11,03 (2M)	569	1,5
TEM	CACCTCATGGTTATGGCA	11,45 (2M)	585	1,3
B GLUCURONIDASE	GATCGGGTGTTCAGTTCTTT	11,85 (2M)	599	1,5
B GLUCURONIDASE	TTCCATGGGTTTCTCACAGA	11,83 (2M)	600	1,1
B GLOBINA	GTATCATGCCTCTTTGCACC	11,57 (2M)	590	1,0
B GLOBINA	TTTCTGGGTTAAGGCAATAGC	11,82 (2M)	600	1,1
RAS	TTCCCTCTGTGTTATTTGCCAT	22,99 (1M)	505	1,0
RAS	ACATGAGGACAGGCGAAGGC	20,97 (1M)	467	1,1

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alif*  
11 JUN 1991

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

QUADRO 2 (Cont.)

TIPO	SEQUÊNCIA 5'.... 3'	Tr min	mM NaCl	Racio oligo/HRP
C. TRACHOMATIS	AATCCTGGCTGAACCAAGCCT	20,70 (1M)	462	1,0
C. TRACHOMATIS	AAGTTTCGGCGGAGATCCT	19,30 (1M)	437	1,0
HIV 1-2 GAG	GAAGCTGCAGAAATGGGA	9,18 (2M)	501	1,3
HIV 1 ENV	AACAATTTGCTGAGGGCTAT	25,19 (1M)	545	1,0
HIV 2 ENV	GGTCAAGAGACAACAAGAA	9,19 (2M)	501	1,4
HIV 1 POL	GCCTGTGGTGGGC	9,56 (2M)	515	1,0
HLADR	CCGGGGGTGAC(G/T)GAGCTGGGGC	12,31 (2M)	616	1,3
HLADR	GAACAGCCAGAGGAC	9,84 (2M)	525	1,0
HLADQ	GGGGCCTGATCCGAGTAC	10,16 (2M)	537	1,1
HPV 6/11	GACCCTGTAGGGTTACATT	10,20 (2M)	539	1,0

63.590  
 Ref: 11TO DCT-DC/PT  
 Série 12

*alif*  
 11 JUN 1991

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

QUADRO 2 (Cont.)

TIPO	SEQUÊNCIA 5'..... 3'	Tr min	mM NaCl	Racio oligo/HRP
HPV 6/11	TGACCTGTTGCTGTGGA	9,91 (2M)	528	1,0
HPV 16	CCGGAÇAGAGCCCAATTAC	11,33 (2M)	580	1,1
HPV 16	CTCTACGCTTCGGTTGTGC	11,65 (2M)	592	1,0
HPV 18	GTATTGCATTTAGAGCCCCA	13,07 (2M)	644	1,1
HPV 18	TAAGGCAACATTGCCAAGACA	11,16 (2M)	574	1,1
Alfa HPV 18	ACCCCGAGATTTACGTTATGT	10,80 (2M)	560	1,0

\* Tr = tempo de retenção (minutos) em função da concentração salina (1M ou 2M)

\* As condições de gradiente são idênticas às descritas no exemplo 2

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

10/11/1991

1

#### EXEMPLO 4

5

Preparação de um conjugado oligonucleótido-fosfatase alcalina.

De acordo com o exemplo 2, o oligonucleótido activado seco sob vácuo é retomado por  $5,7 \cdot 10^{-8}$  mole (0,8 mg) de fosfatase alcalina (Boehringer 567752) no tampão do fabricante.

10

O protocolo de purificação é idêntico (Quadro 3). O conjugado é armazenado a  $+4^{\circ}\text{C}$  num tampão Tris HCl 30 mM, 1M NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,0.

15

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

20

25

30

35

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

  
 11. JUN. 1991

 1  
 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35

QUADRO 3

TIPO ADN	OLIGONUCLEOTIDO	Tr min	mM NaCl	Racio oligo/enzima
HPV 18	5'-GTATTGCATTTAGAGCCCCA-3'	9,53 (2M)	550	1,6
HPV 18	5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'	13,04 (2M)	680	1,4
HPV 18/33	5'-GTCCAATGCCAGGTGGATGA-3'	10,10 (2M)	572	1,0

\* Tr = tempo de retenção (minutos) em função da concentração salina

\* As condições de gradiente são as mesmas do exemplo 2.

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. g.*  
11 JUN. 1991

1 EXEMPLO 5

Detecção de uma sequência de ácido nucleico por protocolo "em camadas".

5 Numa placa de microtitulação em polistireno (Nunc 439454) é colocada uma solução de oligonucleótido 5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3' a 1 ng/ $\mu$ l (0,15  $\mu$ M) em PBS 3X (0,45 M NaCl 0,15 M fosfato de sódio pH 7,0).

A placa é incubada 2 h a 37°C.

10 Após três lavagens por 300  $\mu$ l de PBS Tween (0,15M NaCl, 0,05M fosfato de sódio, pH 7,0, PBS Tween 20 (MERK 822184)) 50  $\mu$ l da sequência (5'-AAGGTCAACCGGAATTTTCATTTTGGGGCTCTAAATGCAATACAATGTCTTGCAATGTTGCCTTA-3') a diferentes concentrações de 100 pg/ $\mu$ l (5nM) a 0,01 pg/ $\mu$ l (0,5 pM) num tampão PBS salmão (PBS3X + ADN de esperma de salmão 10  $\mu$ g/ml (Sigma D9156) são juntas nos poços seguidas de 50  $\mu$ l de uma solução do conjugado oligonucleótido-peroxidase à concentração de 0,1 ng/ $\mu$ l (15 nM) em oligonucleótido num tampão PBS de cavalo (PBS3X + 10% de soro de cavalo (BioMérieux 55842)).

20 A placa é incubada 1 h a 37°C e lavada por meio de 3 X 300  $\mu$ l de PBS Tween 100  $\mu$ l de substrato OPD (orto-fenilenodiamina Cambridge Medical Biotechnology ref/456) num tampão OPD (0,05 M ácido cítrico, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,93) à concentração de 4 mg/ml a que se junta extemporaneamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 volumes a 1/1000 por cada poço. Após 20 minutos de reacção a actividade enzimática é bloqueada por 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N e a leitura é efectuada em Axia Microreader (BioMérieux) a 492 nm.

30 Sensibilidade (Quadro 4):

35

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

*al. g.*  
11. JUN. 1981

QUADRO 4

		ALVO (pg)							
		5000	1000	500	100	50	2	0,1	0
Valor	D.O. >	2,5	1,007	0,559	0,136	0,067	0,028	0,006	0,005

D.O. = densidade óptica

O limite de detecção é de 2 pg de alvo, ou seja  $10^{-17}$  mole.

O sistema é perfeitamente específico pois o oço contém o ADN de salmão, que está sobre a forma de cadeia simples, não é detectado (poço a 0 pg/ $\mu$ l de alvo).

EXEMPLO 6

Conforme foi mostrado para anemia falciforme ou para os oncogenes (em Human Genetic Diseases, A Pratical Approach, K.E. DAVIES ed, IRL Press, 1986), as mutações pontuais, em posições específicas de um gene, são responsáveis por doenças genéticas e podem ser detectadas por hibridação do ADN genómico, com sondas nucleicas. Em certas condições, um mau emparelhamento de uma base pode destabilizar um híbrido ADN-oligonucleótido. Assim, WALLACE R.B. e col. (Nucl. Acid. Res., 6, 3543 (1979) detecta uma mutação am-3 (A-C para o gene mutado em vez de C-G para o gene normal) no gene normal) no gene do bacteriófago IX174 por um sistema de hibridação directa por filtro.

Trabalhos posteriores mostraram que as mutações não eram equivalentes do ponto de vista da destabilização de um híbrido.

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

*al. g.*  
11 JUN 1991

1 Assim, F. ABOUBELA E Col. (Nuc. Acid. Res. 13, 4811, 1985,) verificam que os maus emparelhamentos que contêm uma Guanina (GT-GG-GA) são menos destabilizadores que os maus emparelhamentos que contêm uma Citosina (CA-CC) ou um mau emparelhamento entre 2 pirimidinas (TT-CC-TC).

5 S. IKUTA e col. (Nucl. Acid. Res., 15, 797, 1987) mostram que os maus aparelhamentos GT, GA são menos estabilizadores que AA, TT, CT; CA.

10 O exemplo aqui descrito apresenta um método de detecção de um ADN perfeitamente homólogo por um protocolo em camadas a 37°C. Os oligonucleótidos de captura são fixados passivamente sobre a placa.

Os 5 alvos estão descritos no quadro 5.

15

20

25

30

35

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

*alif*  
11 JUN 1991

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

QUADRO 5

3-ATTCCGTTGTAAAGTTCTGTAAACATAACGTAAATCTCGGGGTTTACITTAAGGCCAACTGGAA-S X  
3-ATTCCGTTGTAAAGTTCTGTAAACATAACGTAAAGTCTCGGGGTTTACITTAAGGCCAACTGGAA-S XGT  
3-ATTCCGTTGTAAAGTTCTGTAAACATAACGTAAATCTCGGGGTTTACITTAAGGCCAACTGGAA-S XAA  
3-ATTCCGTTGTAAAGTTCTGTAAACATAACGTAAATCTCGGGGTTTACITTAAGGCCAACTGGAA-S XTT  
3-ATTCCGTTGTAAAGTTCTGTAAACATAACGTAAATCTCGGGGTTTACITTAAGGCCAACTGGAA-S XAG

4 mutações diferentes foram introduzidas nas 4 sequências alvo que diferem da sequência X por 1 só mutação

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. 4*  
11. Jun 1989

1 As mutações estão situadas na zona 32 a  
35 do alvo. Os 4 maus emparelhamentos são de tipo GT(XGT),  
AA(XAA), TT(XTT) e AG(XAG) e encontram-se dois maus em-  
5 parelhamentos GT e AG que são os menos destabilizantes  
para um híbrido.

A sonda de detecção D1 5'-TAAGGCAACATT-  
10 GCAAGACA-3', é complementar da região 1-20 do alvo e é co-  
mum a todos os alvos. Está marcada na extremidade 5' com  
peroxidase conforme o exemplo 3.

A especificidade do sistema é trazida  
15 pelos oligonucleótidos de captura (Quadro 6)

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

15

20

25

30

35

*al. 9*  
11. JUN. 1991

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

QUADRO 6

	OLIGONUCLEÓTIDO	T <sub>m</sub> 1,00E-0 <sub>9</sub> M °C	T <sub>m</sub> 1,00E-08 M °C
captura C15	5'-TTGCATTTAGAGCCC-3'	59,4	63,8
captura C13	5'-TGCATTTAGAGCCC-3'	49,2	54,2
captura C12	5'-GCATTTAGAGCCC-3'	43,7	48,8
captura C11	5'-GCATTTAGAGC-3'	34,3	39,8
CAPTURA C9	5'-CATTTAGAG-3'	7,7	14,1

O T<sub>m</sub> é calculado nas condições de hibridação, quer dizer 600 mM em sal para as 2 concentrações de alvo 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-9</sup> molar.

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alg*  
11 JUN 1981

1

Os 5 oligonucleótidos possuem em 5' um braço C<sub>5</sub>NH<sub>2</sub> para permitir a ligação covalente sobre a albumina de soro de boi (C15, C13, C12, C11 e C9).

5

Salvo indicações contrárias, o protocolo em camadas é idêntico ao descrito no exemplo 5.

O alvo é depositado a 10<sup>-9</sup> mole/l ou seja 20 pg/ul (Quadro 7) ou 10<sup>-8</sup> mole/l ou seja 200 pg/ul (Quadro 8).

10

QUADRO 7

15

ALVO (1,00E-09 M)					
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
C 15	2,390	0,667	0,061	0,137	0,234
C13	0,405	0,030	0,005	0,008	0,018
C12	0,271	0,015	0,003	0,005	0,007
C11	0,100	0,004	0,004	0,005	0,005
C9	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005
valor de D.O. à 492 nm					

20

25

30

35

63.590  
 Ref: 11TO DCT-DC/PT  
 Série 12

*alig*  
 11. JUN. 1991

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

QUADRO 8

ALVO (1,00E-08 M)					
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
C 15	>2,50	>2,50	0,211	0,973	1,328
C13	2,320	0,198	0,010	0,060	0,081
C12	1,500	0,095	0,005	0,028	0,032
C11	0,610	0,014	0,003	0,014	0,008
C9	0,002	0,004	0,003	0,007	0,003
Valor de D.O. 492 nm					

O híbrido formado com o alvo que contém um mau emparelhamento de tipo GT é o menos estabilizado, logo o mais difícil de detectar. O rácio sinal X/sinal\*XGT pode portanto servir de referência para se medirem os desempenhos do sistema (Quadro 9):

QUADRO 9

	RACIO X/XGT	
	1,00E-08	1,00E-09
C15	-	4
C13	12	14
C12	16	18
C11	44	25
C9	-	-

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. 9*  
11. JUN 1991

1 O oligonucleótido de captura C12 per-  
mite detectar qualquer mau emparelhamento na sequência de  
ácido nucleico, conservando para todos os maus emparelha-  
5 mentos um sinal inferior a 0,100 para as 2 concentrações e  
um rácio X/XGT 10.

### EXEMPLO 7

10 Método de detecção de um ADN perfeita-  
mente homólogo a 37°C. Os oligonucleótidos de captura es-  
tão acoplados ao ASB e fixados passivamente à placa.

O protocolo em camadas é idêntico ao  
exemplo 5.

15 Os oligonucleótidos de captura estão  
acoplados ao ASB conforme exemplo 2.

A sonda de detecção é a mesma que para  
o exemplo 6.

20 Os resultados são apresentados nos  
Quadros 10, 11 e 12.

### QUADRO 10

	ALVO (1,00E-08 M)				
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
25 C 15	2,5	2,5	0,330	1,445	2,139
C13	2,5	0,394	0,025	0,078	0,092
30 C12	2,319	0,241	0,016	0,044	0,056
C11	0,763	0,025	0,006	0,007	0,009
C9	0,010	0,007	0,005	0,007	0,006
35	Valor de D.O. a 492 nm				

= 34 =

63.590  
 Ref: 11TO DCT-DC/PT  
 Série 12

*al. g.*  
 11 JUN 1991

1

QUADRO 11

5

ALVO (1,00E-09 M)					
	X	XGT	XAA	XTT	XAG
C 15	2,421	1,154	0,080	0,200	0,364
C13	0,050	0,075	0,015	0,019	0,024
C12	0,423	0,043	0,007	0,010	0,013
C11	0,134	0,007	0,007	0,006	0,009
C9	0,006	0,006	0,007	0,005	0,009

10

15

20

QUADRO 12

RACIO X/XGT

25

30

35

	1,00E-08	1,00E-09
C 15	-	2
C13	> 6	7
C12	10	10
C11	31	19
C9	-	-

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. g.*  
11 JUN 1981

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

O oligonucleótido de captura C11 acoplado ao ASB permite detectar qualquer mau emparelhamento na sequência de ácido nucleico, conservando para todos os maus emparelhamentos um sinal inferior a 0,100 às 2 concentrações e um rácio X/XGT 10.

### EXEMPLO 8

Método de detecção de um ADN perfeitamente homólogo a diferentes temperaturas.

O protocolo de detecção é o mesmo que para o exemplo 7.

O oligonucleótido de captura C11 está ligado ao ASB e fixado passivamente à placa. A concentração do alvo é constante e fixada em  $10^{-9}$  molar. A temperatura de hibridação é variável (Quadro 13).

QUADRO 13

TEMPERATURAS °C	X	XGT	X/XGT
22	0,155	0,007	22
30	0,313	0,024	13
37	0,229	0,009	25
45	0,321	0,013	25
50	0,052	0,010	5

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

*al. 9*  
11 JUN 1991

1 EXEMPLO 9  
Método de detecção de um perfeitemento homológico a diferentes  
temperaturas. O protocolo de detecção é o mesmo que para o  
exemplo 7.

5 O oligonucleótido de captura C13 é  
fixado passivamente directamente sobre a placa. A concentra-  
ção do alvo é constante e fixada a  $10^{-8}$  molar. A tem-  
peratura de hibridação é variável (Quadro 14).

10 QUADRO 14

TEMPERATURA °C	X	XGT	X/XGT
22	2,5	0,343	7
30	2,028	0,337	6
37	2,281	0,227	10
45	1,458	0,134	11
50	0,653	0,017	38

25 EXEMPLO 10  
Detecção específica da sequência ADN ou ARN correspondente  
ao gene da  $\beta$  lactamase da E. Coli (Tem).

30 No caso de a sequência a detectar cor-  
responder ao ARN mensageiro, este é obtido seja a partir  
de uma purificação específica do ARN (MANIATIS e col.em  
"Molecular Cloning, a laboratory Manual", New York, Cold  
Spring Harbor Laboratory, 1982), seja a partir de uma lise  
directa das bactérias após aadição de soda (0,2 M final)  
sobre o depósito bacteriano. O sistema de detecção utili-  
35 zado é complementar da cadeia ARN mensageiro correspon-  
dente ao gene Tem.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

63.590

Ref: 11TO DCT\_DC/PT

Série 12

*alig*  
14 JUN 1981

1

Este sistema compõe-se de 2 oligonucleótidos de captura. A adsorção passiva é efectuada a uma concentração total de 0,15  $\mu$ M utilizada conforme descrito no exemplo 5.

5

A detecção é efectuada por meio de utilização de 2 oligonucleótidos marcados pela peroxidase (com a concentração total de 15  $\mu$ M).

10

A sequência dos oligonucleótidos utilizados são as seguintes:

CAPTURA 1 = 5'-GCACTGCATAATTCTT-3'

CAPTURA 2 = 5'-TACTGTCATGCCATCC-3'

15

DETECÇÃO 1 = 5'-GTTGGCCGCAGTGTAT-3'

DETECÇÃO 2 = 5'-CACTCATGGTTATGGCA-3'

Detecção em ARN não amplificado, purificado (Quadro 15):

20

QUADRO 15

ARN PURIFICADO	VALOR D.O.
10 ug ARN específico	0,100
1 ug ARN específico	0,014
10 ug ARN não específico	0,006

25

30

35

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

*al. g.*  
11. JUN. 1991

1 Detecção em ARN de colónias não purificado (Quadro 16):

QUADRO 16

5

NÚMERO DE COLÓNIAS	Valor D.O.
1,00E+08 colónias específicas	0,150
1,00E+07 colónias específicas	0,045
1,00E+06 colónias específicas	0,004
1,00E+05 colónias específicas	0,001
1,00E+08 colónias não específicas	0,001

10

15

20 O limite de detecção do sistema no ARN, sem amplificação, é de  $1 \mu\text{g}$  de ARN total purificado e de  $10^6 - 10^7$  colónias bacterianas.

No caso de a sequência a detectar corresponder a ADN não amplificado (plasmido pBR 322, contendo o gene da  $\beta$  lactamase).

25 Nesse caso, a detecção é efectuada directamente no ADN desnaturado segundo condições anteriormente descritas.

O sistema de detecção utilizado é o seguinte:

30 CAPTURA 1 = 5'-GGATGGCATGACAGTA-3'

CAPTURA 2 = 5'-AGAGAATTATGCAGTGC-3'

DETECÇÃO 1 = 5'-TGCCATAACCATGAGTG-3'

35 DETECÇÃO 2 = 5'-ATAACACTGCGGCAAC-3'

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alif*  
11. JUN. 1991

Os resultados são os seguintes (Quadro 17):

QUADRO 17

ADN pBR322	Valor D.O.
1 $\mu$ g	0,130
0,1 $\mu$ g	0,012
0,01 $\mu$ g	0,002
10 ug ADN salmão	0,002

A sensibilidade sobre o ADN não amplificado é de 0,1 ug, ou seja  $3,48 \cdot 10^{-14}$  mole correspondente a  $2 \cdot 10^{10}$  moléculas verdadeiras.

No caso em que o ADN a detectar corresponde a ADN amplificado por reacção em cadeia utilizando uma polimerase, os oligonucleótidos utilizado para a amplificação são os seguintes:

ISCO 1 = 5'-ATCAGCAATAACCAGC-3'

ISCO 2 = 5'-CCCCGAAGAACGTTTTTC-3'

O ADN a detectar é desnaturado pelo protocolo anteriormente referido. A detecção faz-se utilizando-se um dos dois sistemas descritos neste exemplo.

A figura 1 mostra os resultados obtidos com, nas abcissas a quantidade do ADN (ng) e em ordenadas a densidade óptica.

A sensibilidade é da ordem de 1 ng

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

*al. J*  
11. JUN. 1991

1 de ADN obtido após amplificação e considerando-se a quantidade total de ADN gerada após a amplificação da ordem dos 2,0 ug .

5 Para um fragmento amplificado de 560 pares de bases, o limiar de detecção é portanto da ordem de  $2,94 \cdot 10^{-15}$  mole ou seja  $1,7 \cdot 10^9$  moléculas verdadeiras.

#### EXEMPLO 11

10 Detecção da sequência correspondente ao gene E7 do papilomavírus humano do tipo 6.

15 No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

ISCO 1 = 5'-TACACTGCTGGACAACATGC-3'

ISCO 2 = 5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'

20 O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (detecção de cadeia)

CAPTURA 1 = 5'-CAGTGTACAGAAACA-3'

CAPTURA 2 = 5'-GAGTGCACAGACGGA-3'

25 DETECÇÃO 1 = 5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

DETECÇÃO 2 = 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

#### EXEMPLO 12

30 Detecção da sequência ADN correspondente ao gene E7 do papilomavírus humano tipo 11.

35 No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alif*  
11. JUN. 1993

1 ISCO 1 = 5'-TACACTGCTGGACAACATGC-3'

ISCO 2 = 5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'

5 O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (Detecção de cadeia).

CAPTURA 1 = 5'-GAGTGCACAGACGGA-3'

CAPTURA 2 = 5'-CAACTACAAGACCTTTTGC-3'

10 DETECÇÃO 1 = 5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

DETECÇÃO 2 = 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

#### EXEMPLO 13

15 Detecção da sequência ADN correspondente aos genes E7 dos pailomavírus humanos tipo 6 e 11.

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

20 ISCO 1 = 5'-TACACTGCTGGACAACATGC-3'

ISCO 2 = 5'-GTGCGCAGATGGGACACAC-3'

25 O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (Detecção de cadeia).

CAPTURA 1 = 5'-AGACAGCTCAGAAGATGAGG-3'

CAPTURA 2 = 5'-CAGCAACGT(T/C)CGACTGGTTG-3'

30 DETECÇÃO 1 = 5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

DETECÇÃO 2 = 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

#### EXEMPLO 14

35 Detecção da sequência ADN correspondente ao gene E7 do

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

11 JUN 1991

1 papilomavírus humanos tipo 16.

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

5

ISCO 1 = 5'-CCCAGCTGTAATCATGCATGGAGA-3'

ISCO 2 = 5'-GTGTGCCCATTAACAGGTCTTCCA-3'

10

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (Detecção de cadeia).

CAPTURA 1 = 5'TATATGTTAGATTTGCAACC-3'

CAPTURA 2 = 5'-GACAACTGATCTCTAC-3'

15

DETECÇÃO 1 = 5'-CCGGACAGAGCCCATTAC-3'

DETECÇÃO 2 = 5'-CTCTACGCTTCGGTTGTGC-3'

#### EXEMPLO 15

20

Detecção da sequência ADN correspondente ao gene E7 do papilomavírus humano tipo 18.

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

25

ISCO 1 = 5' -CGACAGGAACGACTCCAACG-3'

ISCO 2 = 5'-GCTGGTAAATGTTGATGATTAAC-3'

30

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (Detecção de cadeia).

CAPTURA 1 = 5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

CAPTURA 2 = 5'-ATGTCACGAGCAATTAAGCA-3'

35

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

11 JUN 1991

1 DETECÇÃO 1 = 5'-GTATTGCATTTAGAGCCCCA-3'

DETECÇÃO 2 = 5'-TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'

5 O ADN a detectar é desnaturado pelo protocolo anteriormente referido.

10 A figura 2 representa os resultados obtidos, com a quantidade do ADN em abcissas e a densidade óptica em ordenadas (vê-se na figura 2 que apenas é detectado o HPV18; o HPV16 não o é).

A sensibilidade é da ordem de 1 ng de ADN.

#### EXEMPLO 16

15 Sistemas de detecção de papilomavírus humano de tipo 6, 11, 16 e 18.

O exemplo descreve a detecção de cada um dos tipos após uma amplificação não específica, por reacção em cadeia utilizando uma polimerase.

20 Esta é efectuada com uma mistura de todos os oligonucleótidos descritos nos exemplos 11, 12, 13, 14 e 15.

25 Cada um dos oligonucleótidos é utilizado numa concentração de 0,3  $\mu$ M.

A captura faz-se com a utilização do conjunto dos oligonucleótidos de captura descritos nos exemplos 11, 12, 13, 14 e 15 (adsorção passiva, protocolo descrito no exemplo 5).

30 A detecção faz-se especificamente utilizando um dos pares de oligonucleótidos marcados com a peroxidase descritos nos exemplos 11, 12, 13, 14 e 15.

35 Os resultados e especificidade obtidos são os seguintes, sem o caso em que a detecção é efectuada sobre  $1/100^e$  do produto da amplificação. (Quadro 18)

63.590  
 Ref: 11TO DCT-DC/PT  
 Série 12

*alif*  
 11. JUN. 1991

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

QUADRO 18

ADN AMPLIFICAÇÃO	SISTEMA DE DETECÇÃO		
	HPV18	HPV16	HPV6/11
HPV6	0,001	0,004	1,100
HPV16	0,002	0,840	0,008
HPV18	0,600	0,028	0,002
HPV6+16	0,001	0,845	0,480
HPV6+16+18	0,540	0,821	0,320
HPV6+18	0,580	0,020	0,687
HPV16+18	0,516	0,740	0,007
HPV2 não específico	0,001	0,018	0,002
Água : testemunho não específico	0,001	0,014	0,001

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

1 EXEMPLO 17

5 Detecção da sequência ADN correspondente ao gene da proteína maior da membrana externa (MOMP) de Chlamydia Trachomatis.

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

10 ISCO DE AMPLIFICAÇÃO 1 = 5'-CACCATAGTAACCCATACGC-3'

ISCO DE AMPLIFICAÇÃO 2 = 5'-GCCGCTTTGAGTTCTGCTTCC-3'

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (detecção de cadeia)

15 CAPTURA 1 = 5'-GCCGCTTTGAGTTCTGCTTCC-3'

CAPTURA 2 = 5'-CTTGGCAAGCTCTGCCTGTGG-3'

DETECÇÃO 1 = 5'-AATCCTGGCTGAACCAAGCCT-3'

20 DETECÇÃO 2 = 5'-AAGGTTTCGGCGGAGATCCT-3'

EXEMPLO 18

25 Detecção da sequência ADN correspondente à região gag do retrovirus HIV 1.

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

30 ISCO 1 = 5'-GGACATCAAGCAGCCATGC-3'

ISCO 2 = 5'-CTAGTAGTTCCTGCTATGTC-3'

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte

35 CAPTURA 1 = 5'-AATGTAAAAGAGAC-3'

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*ulif*  
11. JUN. 1991

1      DETECÇÃO 1 = 5'GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

EXEMPLO 19

5      Detecção da sequência ADN correspondente à região gag do retrovirus HIV 2.

No caso da sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

10      ISCO 1 = 5'-GACCATCAAGCAGCCATGC-3'

ISCO 2 = 5'-CTTGTTGTCCCTGCTATGTC-3'

15      O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte

CAPTURA 1 = 5'-CTTACCAGCGGGGCAGC-3'

DETECÇÃO 1 = 5'-GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

20      EXEMPLO 20

Detecção da sequência ADN correspondente à região env do retrovirus HIV 1.

25      No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

ISCO 1 = 5'-CAGGAAGCACTATGGGCGC-3'

30      ISCO 2 = 5'GCTGCTTGATGCCCCAGAC-3'

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte:

CAPTURA 1 = 5'-TGTCTGGTATAGTGCA-3'

35      DETECÇÃO 1 = 5'-AACAAATTTGCTGAGGGCTAT-3'

63.590  
Ref: 11T0 DCT-DC/PT  
Série 12

*al. g.*  
11. JUN. 1991

1 EXEMPLO 21

Detecção da sequência ADN correspondentes à região env do retrovirus HIV 2.

5 No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

ISCO 1 = 5'-CAGGCAGTTCTGCAATGGG-3'

10 ISCO 2 = 5'-GGTTTTTCGTTCCCCAGACG-3'

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte

15 CAPTURA 1 = 5'-GCAACAGCAACAGCTGTTGGA-3'

DETECÇÃO 1 = 5'-GGTCAAGAGAGACAACAAGAA-3'

EXEMPLO 22

20 Detecção da sequência ADN correspondente à região pol do retrovirus HIV 1.

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

25 ISCO 1 = 5'-ATTAGCAGGAAGATGGCCAG-3'

ISCO 2 = 5'-CTGCCATTTGTACTGCTGGTC-3'

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte

30 CAPTURA 1 = 5'-GACAATGGCAGCAATTTACC-3'

DETECÇÃO 1 = 5'-GCCTGTTGGTGGGC-3'

EXEMPLO 23

35 Detecção da sequência ADN correspondente ao gene da região

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alif*  
11. JUN. 1991

1  $\beta$  glucoronidase de E. coli.

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

5

ISCO 1 = 5'-CAATACGCTCGAACGACGT-3'

ISCO 2 = 5'-CACGGGTTGGGGTTTCTAC-3'

10

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (detecção de cadeia).

CAPTURA 1 = 5'-TGGCTTCTGTCAACGCTGTT-3'

CAPTURA 2 = 5'-ATGCGATCTATATCACGCTG-3'

15

DETECÇÃO 1 = 5'-GATCGCGGTGTCAGTTCTTT-3'

DETECÇÃO 2 = 5'-TTCCATGGGTTTCTCACAGA-3'

20

EXEMPLO 24

Detecção da sequência ADN correspondente ao gene da região  $\beta$  globina humana.

No caso da sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

25

ISCO 1 = 5'-GACTCAGAATAATCCAGCCT-3'

ISCO 2 = 5'-TGTTTAGGCAGTCTGCCTAG-3'

30

O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (detecção de cadeia)

CAPTURA 1 = 5'-TGTTTACGCAGTCTGCCTAG-3'

CAPTURA 2 = 5'-CACATATTGACCAAATCAGG-3'

35

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

*al. 9*  
11. JUN. 1991

1  
DETECÇÃO 1 = 5'-GTATCATGCCTCTTTGCACC-3'  
DETECÇÃO 2 = 5'-TTTCTGGGTTAAGGCAATAGC-3'

5  
EXEMPLO 25

Detecção da sequência ADN correspondente ao oncogene ras

No caso de a sequência a detectar ser ADN amplificado, as sequências utilizadas são as seguintes:

10  
ISCO 1 = 5'-TGTTATGATGGTGAACCTG-3'  
ISCO 2 = 5'-CTGTAGAGGTTAATATCCGCAAA-3'

15  
O ADN amplificado ou não pode ser detectado pelo sistema seguinte (detecção de cadeia).

20  
CAPTURA 1 = 5'-CAGTGCCATGAGAGACCAAT-3'  
CAPTURA 2 = 5'-CGACGCAGCCATGGTCGATGC-3'  
DETECÇÃO 1 = 5'-TTCCTCTGTGTTTTCCTAT-3'  
DETECÇÃO 2 = 5'-ACATGAGGACAGGCGAAGGC-3'

25  
EXEMPLO 26

Utilização de alfa-oligonucleótido marcado com peroxidase na detecção.

Protocolo conforme exemplo 5.

Alvo:

30  
5'-TCATCGTTTTCTTCTCTGAGTCGCTTAATTGCTCGTGACATAGAAGGTCAACCG  
GAATTCATTTGGGGCTCTAAATGCAATACAATGTCTTGCAATG TTGCCTTA-3'

CAPTURA: 5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

35  
A sonda de detecção utilizada é o alfa-oligonucleótido

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

*al. 9*  
11. JUN. 1991

1 5'-ACCCCGAGATTTAGGTTATGT-3' enxertado com peroxidase de  
rábano de acordo com o exemplo 3.

5 O limite de detecção é de 5 pg de  
alvo, ou seja  $5 \cdot 10^{-17}$  mole (Quadro 19).

QUADRO 19

	ALVO (pg)					
	5000	500	50	5	0,5	0
Valor D.O.	>2,5	0,622	0,073	0,025	0,008	0,007

15

EXEMPLO 27

Fosfatase alcalina como enzima de detecção em colorimetria.  
Protocolo conforme exemplo 5:

20

A sonda de detecção 5'-TAAGGAACA  
TTGCAAGACA-3' está ligada à fosfatase alcalina de acordo  
com o exemplo 4.

25

100  $\mu$ l de substrato PNPP (Sigma 104-0) com a concentração de  
2 mg/ml (num tampão de dietanolamina 1,29 M;  $MgSO_4$  0,56 mM;  
 $NaNO_3$  0,38 mM; HCl 0,012N; pH 9,8) são adicionados por poço.  
Após 20 mn de reacção, a actividade enzimática é bloqueada  
por meio de 100  $\mu$ l de 1 ml de NaOH 1 N e a leitura é  
efectuada num Axiamicroreader (BioMérieux) a 402 nm.

30

Captura: 5'-TCAGAGGAAGAACGATGA-3'

Alvo: plasmido p<sup>BR</sup><sub>322</sub> contendo o gene do PVH de tipo 18  
a 20  $\mu$ g/ml

35

63.590

ReF: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

11 JUN 1991

1

QUADRO 20

5

	diluição do alvo					
	100	500	1000	2000	5000	vazio
Valor D.O.	0,505	0,086	0,054	0,029	0,008	0,008

10

O limite de detecção é de 1/2000 do alvo (Quadro 20), quer dizer, da ordem de 500 pg ou seja  $1,8 \cdot 10^{-16}$  mole.

15

**EXEMPLO 28**

Fosfatase alcalina como enzima de detecção em fluorescência.

20

O protocolo é o mesmo que para o exemplo 27 mas acrescenta-se como substrato 100  $\mu$ l de metil-4 umbeliferil fosfatase (MUP, Boehringer ref. 405663) num tampão de glicina-NaOH 100 mM,  $MgCl_2$  1 mM,  $ZnCl_2$  0,1 mM,  $NaN_3$  0,5 g/l, pH 10,3, com uma concentração de 80  $\mu$ g/ml.

25

A reacção é bloqueada após 20 minutos por meio de 100  $\mu$ l de  $KH_2PO_4$  0,5 M, pH 10,4, 10 mM EDTA e lida no fluorímetro (excitação 340 nm, emissão 460 nm) (Quadro 21).

30

QUADRO 21

	diluição do alvo					
	100	500	1000	2000	5000	vazio
Unidade fluorescência	643	167	94	82	66	47

35

63.590  
Ref: 11TO DCT-DC/PT  
Série 12

11 JUN 1984  
*[Handwritten signature]*

1

EXEMPLO 29

Deteccção do virus HIV 1.

5

a) Região NEF

Para amplificação utilizam-se as sequências seguintes

10

ISCO 1	5'-CATTGGTCTTAAAGGTACCTG-3'
ISCO 2	5'-AAGATGGGTGGCAAITGGTC-3'

15

As sondas de captura e de deteção são as seguintes:

20

CAPTURA	5'-GAGGAGGTIGGTTTTCCAGTCA-3'
DETECÇÃO	5'-GGATGGCCTICTITAAGGGAAAGAATG-3'

25

b) Região VPR

Para amplificação utilizam-se as sequências seguintes:

30

ISCO 1	5'-TGGAACAAGCCCCAGIAGACC-3'
ISCO 2	5'-TGCTATGTIGACACCCAATTCTG-3'

35

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. 9*  
11. JUN. 1991

1

As sondas de captura e de detecção são as seguintes:

5

CAPTURA	5'-TATGAAACTTATGGGGATAC-3'
DETECÇÃO	5'-GAAGCTGTTAGACATTTTCCTAG-3'

10

c) Região POL

As sondas de captura e de detecção são as seguintes:

15

CAPTURA	5'-TGAACAAGTAGATAAATTAG-3'
DETECÇÃO	5'-GGAATCAGIAAAGTACTATT-3'

20

25

30

35

Mod. 71 - 20.000 ex. - 9/08

11 JUN 1991

## = R E I V I N D I C A Ç Õ E S =

1  
5  
10  
15

1ª - Processo para a detecção de uma sequên-  
cia nucleotídica de um pedaço simples de uma amostra que a  
contém ou susceptível de a conter de acordo com a técnica  
de hibridação em camadas compreendendo uma fase de incuba-  
ção de amostra com uma sonda de captura fixa de forma pas-  
siva sobre um suporte sólido e uma sonda de detecção marca-  
da com um marcador não rádioactivo, sendo as sondas de cap-  
tura e de detecção capazes de hibridação, respectivamente,  
com duas regiões não sobrepostas da sequência nucleotídica-  
alvo procurada, sendo a fase de incubação seguida de uma  
etapa de lavagem para eliminar as substâncias reactivas não  
fixadas pela hibridação, caracterizado por a sonda de cap-  
tura conter entre 9 a 30 nucleotídicos e estar fixada de  
forma passiva sobre um suporte sólido hidrófobo.

20

2ª - Processo de acordo com a reivindicação  
1, caracterizado por o referido material hidrófobo ser um  
polímero hidrófobo.

25

3ª - Processo de acordo com a reivindicação  
2, caracterizado por o referido polímero ser um polímero ou  
copolímero de estireno.

30

4ª - Processo de acordo com a reivindicação  
1, caracterizado por a sonda de captura conter entre 9 a  
25 e em particular 9 a 20 nucleótidos.

35

5ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações anteriores, caracterizado por se operar  
a uma temperatura pré-determinada e de se escolherem son-  
das de captura e de detecção de tamanho suficientemente  
longo e de sequência tal que o híbrido de cada sonda for-  
mado com o alvo procurado seja estável à referida tempera-  
tura, nas condições de hibridação utilizadas.

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. J*  
11. JUN. 1991

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

6ª - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a referida sonda de captura e/ou a sonda de detecção serem suficientemente curtas e de sequência tal que apenas a presença de uma sequência complementar perfeitamente homóloga no alvo permite formar com a referida sonda suficientemente curta, um híbrido estável à referida temperatura nas condições de hibridação utilizadas.

7ª - Processo de acordo com as reivindicações 5 ou 6, caracterizado por se efectuar o passo de incubação à referida temperatura pré-determinada e efectuar-se a lavagem à referida temperatura ou a uma temperatura inferior.

8ª - Processo de acordo com as reivindicações 5 ou 6, caracterizado por se efectuar o passo de incubação a uma temperatura inferior à referida temperatura pré-determinada e efectuar-se a lavagem à temperatura pré-determinada.

9ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, caracterizado por a referida temperatura pré-determinada estar compreendida entre 20 e 60°C, nomeadamente entre 25 e 40°C e ser, em particular, igual a 37°C.

10ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por a sonda de detecção conter pelo menos 9 nucleótidos.

11ª - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a sonda de detecção conter pelo menos 15 nucleótidos.

12ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por o híbrido formado pela sonda de captura e o alvo procurado ser menos estável do que o híbrido formado pelo referido alvo com a sonda de detecção.

*al. 12*  
11. JUN. 1981

1                   13ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações precedentes, caracterizado por a sonda  
de detecção ser mais longa, em número de nucleótidos, que  
a sonda de captura.

5                   14ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações precedentes, caracterizado por a sonda  
de captura e/ou a sonda de detecção conterem ou serem cons-  
tituídas por alfa-D-nucleótidos.

10                  15ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações precedentes, caracterizado por a referi-  
da sonda de captura conter pelo menos onze nucleótidos e  
estar fixada de forma passiva directamente sobre o suporte  
sólido.

15                  16ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações 1 a 14, caracterizado por a sonda de  
captura estar fixada sobre o suporte por intermédio de uma  
proteína à qual se encontra ligada por ligação covalente.

20                  17ª - Processo de acordo com a reivindica-  
ção 16, caracterizado por a referida proteína ser uma al-  
bumina de mamífero ou uma toxina proteína bacteriana.

25                  18ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações anteriores, caracterizado por o suporte  
ter a forma de um tubo, <sup>esfera</sup> de partículas ou de cones de pipe-  
tagem ou a forma de placa de microtitulação.

                  19ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações anteriores, caracterizado por se operar  
com a técnica de hibridação em camadas simultâneas.

30                  20ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações anteriores, caracterizado por a sonda  
de captura ser de sequência perfeitamente homóloga à se-  
quência complementar do alvo, ou seja uma sequência con-  
tendo uma mutação pontual relativamente à sequência com-  
35                  plementar do alvo.

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

11 JUN 1991  
*[Handwritten signature]*

1

21ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por o alvo ser a sequência do ADN do virus do papiloma humano HPV 18 e a sonda de captura conter a sequência:

5

TCAGAGGAAGAAAACGATGA

22ª - Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência:

10

TAAGGCAACATTGCAAGACA

23ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser uma sequência ARN mensageira correspondente ao gene da beta-lactamase de E.Coli (Tem) e a sonda da captura conter a sequência seguinte:

15

5'-GCACTGCATAATTCTT-3'

e/ou

5'-TACTGTCATGCCATCC -3'

24ª - Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência seguinte:

20

5'-GTTGGCCGCAGTGTTAT-3'

e/ou

5'-CACTCATGGTTATGGCA-3'

25ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser uma sequência de ADN contendo o gene da beta-lactamase de E.Coli e a sonda de captura conter a seguinte sequência:

25

5'-GGATGGCATGACAGTA-3'

30

e/ou

5'-AGAGAATTATGCAGTGC-3'

26ª - Processo de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência seguinte:

35

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. 9*  
11. JUN. 1991

1 5'-TGCCATAACCATGAGTC-3'

e/ou 5'-ATAACACTGCGGCCAAC-3'

5 27ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a sequência ADN correspondente ao gene E7 do vírus do papiloma humano do tipo 6 e sonda de captura conter a sequência seguinte:

10 5'-CAGTGTACAGAAACA-3'

e/ou 5'-GAGTGCACAGACGGA-3'

15 28ª - Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência seguinte:

5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

e/ou 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

20 29ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser uma sequência ADN correspondente ao gene E7 do vírus do papiloma humano tipo 11 e a sonda de captura conter a sequência seguinte:

5'-GAGTGCACAGACGGA-3'

25 e/ou 5'-CAACTACAAGACCTTTTGC-3'

30 30ª - Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência seguinte:

5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

e/ou 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

35 31ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a sequência ADN correspondente aos genes E7 do vírus do

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

1 papiloma humano tipos 6 ou 11 e a sonda de captura conter a seguinte sequência:

5'-AGACAGCTCAGAAGATGAGG-3'

5 e/ou 5'-CAGCAACGT(T/C)CGACCTGGTTG-3'

32ª - Processo de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência seguinte:

5'-GACCCTGTAGGGTTACATT-3'

10 e/ou 5'-TGACCTGTTGCTGTGGA-3'

33ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a sequência ADN correspondente ao gene E7 do vírus do papiloma humano tipo 16 e a sonda de captura conter a sequência seguinte:

5'-TATATGTTAGATTTGCAACC-3'

15 e/ou 20 5'-GACAACTGATCTCTAC-3'

34ª - Processo de acordo com a reivindicação precedente, caracterizado por a sonda de detecção conter a seguinte sequência:

5'-CTCTACGCTTCGGTTGTGC-3'

25 e/ou 5'-CCGGACAGAGCCCATAC-3'

35ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a sequência ADN correspondente ao gene E7 do vírus do papiloma humano do tipo 18 e a sonda de captura conter a seguinte sequência seguinte:

5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

30 e/ou 35 5'-ATGTCACGAGCAATTAAGCG-3'

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. 9*  
14 JUN 1991

- 1                           36<sup>a</sup> - Processo de acordo com a reivindica-  
ção precedente, caracterizado por a sonda de detecção con-  
ter a sequência seguinte:
- 5                           5' -GTATTGCATTTAGAGCCCCA-3'
- e/ou                       5' -TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'
- 10                           37<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a  
sequência ADN correspondente ao vírus do papiloma humano  
do tipo 18 e a sonda de captura conter a sequência seguin-  
te:
- 5' -TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'
- 15                           38<sup>a</sup> - Processo de acordo com a reivindica-  
ção precedente, caracterizado por a sonda de detecção con-  
ter a sequência seguinte:
- 5' -TAAGGCAACATTGCAAGACA-3'
- 20                           39<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a  
sequência ADN correspondente ao gene da proteína maior da  
membrana externa (MOMP) de Chlamydia trachomatis e sonda  
da captura conter a sequência seguinte:
- 25                           5' -GCCGCTTGAGTTCTGCTTCC-3'
- e/ou                       5' -CTTGCAAGCTCTGCCTGTGG-3'
- 30                           40<sup>a</sup> - Processo de acordo com a reivindica-  
ção precedente, caracterizado por a sonda de detecção con-  
ter a seguinte sequência:
- 5' -AATCCTGGCTGAACCAAGCCT-3'
- e/ou                       5' -AAGGTTTCGGCGGAGATCCT-3'
- 35                           41<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Séire 12



11. JUN. 1991

1 uma sequência correspondente, sob a forma de ADN, à região  
gag do retrovirus HIV1 e a sonda de captura conter a sequên  
cia seguinte:

5 5'-AATGTTAAAAGAGAC-3'

42ª - Processo de acordo com a reivindica-  
ção precedente, caracterizado por a sonda de detecção con  
ter a sequência seguinte:

10 5'-GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

43ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser  
uma sequência correspondente, sob a forma de ADN, na região  
gag do retrovirus HIV2 e a sonda de captura conter a sequên  
cia seguinte:

15 5'-CTTACCAGCGGGGCAGC-3'

44ª - Processo de acordo com a reivindica-  
ção anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter  
a sequência seguinte:

20 5'-GAAGCTGCAGAATGGGA-3'

45ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações anteriores 1 a 20, caracterizado por o  
alvo ser uma sequência correspondente, sob a forma de ADN,  
25 à região env do retrovirus HIV1 e a sonda de captura conter  
a sequência seguinte:

30 5'-TGTCTGGTATAGTGCA-3'

46ª - Processo de acordo com a reivindica-  
ção precedente, caracterizado por a sonda de detecção con  
ter a sequência seguinte:

35 5'-AACAAATTTGCTGAGGGCTAT-3'

47ª - Processo de acordo com qualquer uma

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alif*  
11. JUN. 1981

1 das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser uma  
sequência correspondente sob a forma de ADN, à região env  
do retrovirus HIV2 e a sonda de captura conter a sequência  
5 seguinte:

5 5'-GCAACAGCAACAGCTGTTGGA-3'

48ª - Processo de acordo com a reivindica-  
ção anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter  
a sequência seguinte:

10 5'-GGTCAAGAGACAACAAGAA-3'

15 49ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser  
uma sequência correspondente, sob a forma de ADN, à região  
pol do retrovirus HIV1 e a sonda de captura conter a sequên-  
cia seguinte:

5'-GACAATGGCAGCAATTTACC-3'

20 50ª - Processo de acordo com a reivindica-  
ção anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter  
a sequência seguinte:

5'-GCCTGTTGGTGGGC-3'

25 51ª - Processo de acordo com qualquer uma  
das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a  
sequência ADN correspondente ao gene da região beta-gloco-  
ronidase de E.Coli e a sonda de captura conter a sequência  
seguinte:

30 5'-TGGCTTCTGTCAACGCTGTT-3'

e/ou

5'-ATGCGATCTATATCACGCTG-3'

35 52ª - Processo de acordo com a reivindica-  
ção anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter  
a sequência seguinte:

63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*alif*  
11 JUN 1981

1  
  
  
5  
  
  
10  
  
  
15  
  
  
20  
  
  
25  
  
  
30  
  
  
35

5'-GATCGCGGTGTCAGTTCTTT-3'

e/ou 5'-TTCCATGGGTTTCTCACAGA-3'

53ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a sequência ADN correspondente ao gene da região beta globi- dina humana e a segunda sonda de captura conter a sequên- cia seguinte:

5'-TGTTTACGCACTCTGCCTAG-3'

e/ou 5'-CACATATTGACCAAATCAGG-3'

54ª - Processo de acordo com a reivindica- ção anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência seguinte:

5'-GTATCATGCCTCTTTGCACC-3'

e/ou 5'-TTTCTGGGTTAAGGAATAGC-3'

55ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a sequência ADN correspondente ao oncogénio ras e a segunda sonda de captura conter a seguinte sequência:

5'-CAGTGCCATGAGAGACCAAT-3'

e/ou 5'-CGACGCAGCCATGGTCGATGC-3'

56ª - Processo de acordo com a reivindica- ção anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência seguinte:

5'-TTCTCTGTGTATTTGCCAT-3'

e/ou 5'-ACATGAGGACAGGCGAAGGC-3'

57ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser a sequência ADN de HPV tipo 18 e a sonda de captura conter a sequência seguinte:

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

*al. 9*  
11. JUN. 1997

1  
  
  
  
5  
  
  
10  
  
  
15  
  
  
20  
  
  
25  
  
  
30  
  
  
35

5'-TCAGAGGAAGAAAACGATGA-3'

58ª - Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência (alfa-nucleotídica) seguinte:

alfa oligonucleótido 5'- ACCCCGAGATT

59ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser uma sequência correspondente à região NEF do retrovirus HIV1 e a sonda de captura conter a sequência:

5'-GAGGAGGTIGGTTTTCCAGTCA-3'

60ª - Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência:

5'-GGATGGCCTICTITAAGGGAAAGAATG-3'

61ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser uma sequência correspondente à região VPR do retrovirus HIV1 e a sonda de captura conter a sequência:

5'-TATGAAACTTATGGGGATAC-3'

62ª - Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a sonda de detecção conter a sequência;

5'-GAAGCTGTTAGACATTTTCCTAG-3'

63ª - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado por o alvo ser uma sequência correspondente à região POL do retrovirus HIV1 e a sonda de captura conter a sequência:

5'-TGAACAAGTAGATAAATTAG-3'



63.590

Ref: 11TO DCT-DC/PT

Série 12

*al. g.*  
11. JUN. 1981

= R E S U M O =

"PROCESSO PARA A DETECÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE  
ACORDO COM A TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO EM CAMADAS"

Descreve-se um processo para a detecção de uma sequência nucleotídica de um pedaço simples de uma amostra que contém ou susceptível de conter de acordo com a técnica de hibridação em camadas compreendendo uma fase de incubação de amostra com uma sonda de captura fixa de forma passiva sobre um suporte sólido e uma sonda de detecção marcada com um marcador não radioactivo, sendo as sondas de captura e de detecção capazes de hibridação, respectivamente, com duas regiões não sobrepostas da sequência nucleotídica-alvo procurada, sendo a fase de incubação seguida de uma etapa de lavagem para eliminar as substâncias reactivas não fixadas pela hibridação caracterizado pelo facto da sonda de captura conter 9 a 30 nucleótidos e estar fixada de forma passiva sobre um suporte sólido constituído por um material à base de um polímero hidrófobo.

Esta aplicação é utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas ou genéticas tal como do tipo celular.

Handwritten signature or initials in the top right corner.

FIGURA 1

DETECÇÃO ADN Tem DEPOIS DA AMPLIFICAÇÃO

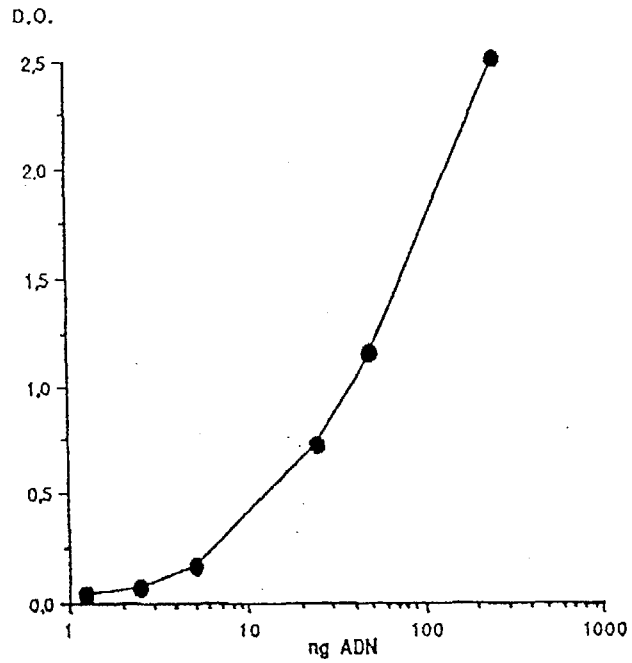


FIGURA 2

DETECÇÃO DE-- ADN AMPLIFICADO (HPV18)  
POR OLIGONUCLEOTIDO-PEROXIDASE

