

**"UTILIZAÇÃO DE TRANSCRITOS DE RNA POLIMERASE DEPENDENTES DE DNA  
COMO MOLECULAS REGISTRADORAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE SINAL EM ENSAIOS  
DE HIBRIDIZAÇÃO DE ACIDOS NUCLEICOS"**

Esta invenção refere-se a uma construção polidesoxinucleotídica para uso, em conjunto com uma RNA polimerase dependente do DNA, como um amplificador de sinal em ensaios de hibridização de ácido nucleico. A construção contém uma sequência de reconhecimento para um oligonucleótido alvo, uma sequência promotora para uma RNA polimerase dependente do DNA, e uma polimerase modelo. Um método de utilização para esta construção, em ensaios de hibridização, é também revelado. O método envolve a formação de um complexo de hibridização compreendendo a construção e a sequência alvo; a adição de uma polimerase que é específica para o promotor, na construção; e quantificação dos transcritos de RNA resultantes.

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

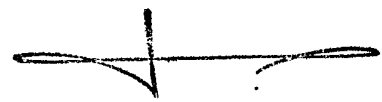
**N.º 96.458**

**REQUERENTE: CHIRON CORPORATION**

**EPÍGRAFE: "UTILIZAÇÃO DE TRANSCRITOS DE RNA POLIMERASE  
DEPENDENTES DE DNA COMO MOLECULAS REGISTRADORAS  
PARA AMPLIFICAÇÃO DE SINAL EM ENSAIOS DE HIBRI-  
DIZAÇÃO DE ACIDOS NUCLEICOS"**

**INVENTORES: Michael S. Urdea, cientista norte-americano,  
residente em 100 Bunce Meadow Road, Alamo,  
California 94507, Estados Unidos da América**

**Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.  
10 de Janeiro de 1990, nos Estados Unidos da América, sob  
o N.º. 463.022**



Titular: CHIRON CORPORATION

Epigrafe: "UTILIZAÇÃO DE TRANSCRITOS DE RNA POLIMERASE  
DEPENDENTES DE DNA COMO MOLECULAS REGISTRADORAS PARA  
AMPLIFICAÇÃO DE SINAL EM ENSAIOS DE HIBRIDIZAÇÃO DE  
ACIDOS NUCLEICOS"

M E M O R I A   D E S C R I T I V A

Campo do invento

O presente invento diz respeito à detecção e quantificação de biomoléculas através de ensaios de hibridização, e mais particularmente diz respeito a ensaios de hibridização nos quais são usadas moléculas registadoras para amplificação de sinal.

Antecedentes do invento

As hibridizações de ácidos nucleicos são agora vulgarmente utilizadas na investigação genética, na investigação biomédica e em diagnósticos clínicos para detectar e quantificar sequências de nucleótidos particulares que estão presentes em misturas heterogêneas de DNA, RNA, e/ou outros materiais. No ensaio básico de hibridização de ácidos nucleicos, um analisado

de ácido nucleico de cadeia simples ( tanto DNA como RNA ) é hibridizado, directa ou indirectamente, a uma sonda marcada de ácido nucleico, e os duplexes contendo marcação são quantificados. Foram usadas tanto sondas marcadas radioactivamente como marcadas não radioactivamente.

Ao ensaio básico falta sensibilidade. Quando o analisado está presente em pequeno número de cópias ou em concentração diluída, o sinal não consegue ser distinguido do ruído de fundo. Foram desenvolvidas variações do esquema básico, para facilitar a separação dos duplexes alvo de material estranho, e/ou para amplificar as sequências do analisado com o objectivo de facilitar a detecção, mas estas variações pecam por terem na sua generalidade procedimentos complexos e de longa duração, elevado ruído de fundo, baixa sensibilidade, e dificuldade na quantificação. Um objectivo primeiro do presente invento é fornecer um amplificador para usar nos ensaios de hibridização, que forneça um ganho em sinal altamente reproduzível, uma razão sinal/ruído altamente reproduzível, que é em si mesmo quantificável e reproduzível, e tem a capacidade de se combinar especificamente com um analisado presente em baixas concentrações e com uma metade registadora "universal" para formar um complexo estável.

A patente norte americana com o número 4.868.105, pertença da requerente, emitida em 19 de Setembro de 1989, a descrição da qual está aqui incorporada para referência, descreve uma fase de solução no ensaio "sandwich" de hibridização, no qual o analisado de ácido nucleico é hibridizado com uma "sonda marcada" e a uma "sonda de captura". O complexo analisado-sonda é




acoplado por hibridização a um suporte sólido. Isto permite que os oligonucleótidos do analisado sejam removidos da solução como um complexo de fase sólida, concentrando assim o analisado, facilitando a sua separação dos outros reagentes, e aumentando a sua subsequente detecção.

O pedido PCT com o número 84/03520 e o pedido de patente europeu com o número 124221 descrevem um ensaio de hibridização de DNA no qual: (1) o analisado é hibridizado com uma sonda de DNA de cadeia simples que tem uma cauda que é complementar aos oligonucleótidos marcados da enzima, e (2) o resultante duplex com cauda é hibridizado com um oligonucleótido marcado da enzima. O sistema de marcação da Enzo Biochem "Bio-Bridge" parece ser semelhante ao sistema descrito nestes dois pedidos de patentes. O sistema "Bio-Bridge" utiliza um desoxinucleótido transferase terminal para adicionar caudas 3'-poly T não modificadas a uma sonda de DNA. A sonda cauda poly-T é hibridizada com uma sequência de DNA alvo e depois com um poly-A modificado na biotina.

O pedido de patente europeu com o número 204510 descreve um ensaio de hibridização de DNA em que o analisado de DNA entra em contacto com uma sonda que tem uma cauda, tal como a cauda poly dT, e uma cadeia amplificadora que tem uma sequência, por exemplo, uma sequência poli dA, que hibridiza com a cauda da sonda e é capaz de se ligar a uma multiplicidade de cadeias marcadas.


O problema principal com estes ensaios de hibridização anteriores é que lhes falta especificidade e/ou sinal suficientes para serem úteis na detecção de níveis muito baixos de analisado.



Um outro pedido da requerente, o pedido de patente europeu com o número 88309697.6 ( publicação número 0317077), depositado em 17 de Outubro de 1988, a descrição do qual está aqui incorporada para referência, descreve ologonucleótidos lineares e ramificados que podem ser usados com amplificadores de sinal em ensaios de hibridização. Neste caso, o oligómero amplificador tem dois domínios - um primeiro domínio que é complementar à sequência alvo ( ou o analisado per se ou uma "sonda linker" ) e um segundo domínio, presente em unidades repetitivas, complementar a uma sequência registadora marcada. A multiplicação de sequências registadoras por sequências alvo fornece a amplificação do sinal.


Uma outra abordagem foi utilizar polimerases de ácidos nucleicos para amplificar as sequências alvo. Por exemplo, a tão falada "polimerase chain reaction" (PCR), utiliza ciclos repetidos de DNA "primed", síntese de DNA polimerase directamente a partir de DNA para amplificar sequências de interesse ( Saiki, R.K., et al., Science (1986) 230:1350-1354). O alvo amplificado é depois detectado usando o protocolo de ensaio de hibridização básico.

As RNA polimerases têm sido também utilizadas para amplificar sequências alvo (Krupp, G., e Soll, D. FEBS Letters (1987) 212:271-275). Esta abordagem foi incorporada num formato de hibridização que envolve a produção de uma cópia de cadeia dupla da sequência alvo, inserção da sequência promotora da RNA polimerase, transcrição da cópia e detecção por ensaios de hibridização (Kwoh, D.Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1989) 86:1173-1177). Dado que a RNA polimerase directamente a



partir de DNA produz até 103 cópias de RNA por cópia de modelo de DNA, são necessários poucos ciclos de amplificação. As RNA polimerases dependentes de DNA de bacteriófago ( por exemplo, T3, T7, SP6) foram previamente empregues para a preparação in vitro de sequências de RNA específicas, a partir de modelos de oligonucleótidos clonados ou sintéticos e são bem compreendidos ( Melton, D.A., et al., Nucleic Acids Res. (1984) 12:7035-7056); Chamberlin, M. e Ryan, T., (1982) no "The Enzymes", Boyer, P.D., ed., 15:87-108; Martin, C.T., e Coleman, J.E., Biochemistry (1987) 26:2690-2696). Estas polimerases têm promotores altamente específicos. São conhecidas 17 sequências de DNA de promotores T7 e foi deduzida uma sequência de consenso (Oakley, J.L., e Coleman, J.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (1977) 74:4266-4270; Dunn, J.J., e Studier, F.W., J. Molec. Biol. (1983) 166:477-535). Sabe-se também que para reter a actividade polimerásica, apenas a região promotora deve ser em cadeia dupla (Milligan, J.F., et al., Nucleic Acids Res. (1987) 15:8783-8799).

Finalmente a RNA polimerase, retirada directamente a partir de RNA, foi também usada para detectar sequências alvo (Lizardi, P.M., et al., Bio/technology (1988) 6:1197-1202; Lomeli, H., et al., Clin. Chem. (1989) 35:1826-1831). Neste sistema, uma sonda de RNA é preparada por acoplação de RNA complementar à sequência alvo com RNA (MDV-1) (patente norte americana com o número 4.786.600), que funciona como um modelo exclusivo para o bacteriófago Q-beta (Q). Primeiro, o alvo está imobilizado num substrato sólido, depois a sonda de RNA é hibridizada com o alvo e finalmente a sonda é eluída. A subsequente adição de Q-beta-polimerase à sonda gera multiplas



cópias do RNA modelo/alvo. Num ensaio relacionado, o RNA de MDV-1 foi primeiro ligado à biotina, depois acoplado a um alvo avidinilado, e subsequentemente testados como descrito acima (Chu, B.C.F., et al., Nucleic Acids Res. (1986) 14:5591-5603).

O uso de Q-beta replicase em ensaios de hibridização tem quatro grandes desvantagens:

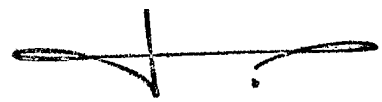
1) A Q-beta replicase é tipicamente contaminada com RNA de MDV-1. Consequentemente, este sistema tem um grande "background" ( fraca razão sinal/ruído ) quando a sequência registadora é a própria sequência MDV-1;

2) A sonda é RNA. O RNA é altamente sensível à degradação pela actividade da RNase, a qual é ubiqua em preparações celulares em bruto, e pelas condições alcalinas requeridas para desnaturar as cadeias duplas dos alvos de DNA;

3) Devido à estrutura secundária do RNA do MDV-1, há uma ligação consideravelmente não específica nos ensaios de hibridização, baixando de forma significativa a sensibilidade do ensaio e excluindo uma quantificação exacta; e,

4) A quantidade de sinal ( o RNA produto da Q-beta replicase) varia com o logaritmo do número de sondas originalmente ligadas ao alvo. Assim, este ensaio pode apenas detectar diferenças de ordem de magnitude entre as concentrações de analisado em várias amostras.

O invento aqui exposto tem várias vantagens em relação ao método da Q-beta-replicase. Primeiro, a sonda é DNA em vez de RNA. Segundo, o ensaio tem uma elevada razão sinal/ruído e uma muito elevada sensibilidade. Terceiro, dado que o sinal é amplificado em vez do alvo, o oligómero que é de facto medido,



terá sempre a mesma sequência e tamanho, permitindo assim a standartização e optimização das condições de ensaio (adicionalmente, a maioria dos reagentes biológicos pode ser usada universalmente, aumentando assim a simplificação e standartização do ensaio). Finalmente, o alvo pode ser facilmente e exactamente quantificado.

#### Sumário do invento

Um aspecto do invento é uma construção polidesoxinucleotídica (sonda modelo) para usar como um amplificador de sinal em ensaios de hibridização. A sonda modelo é constituída por três domínios como se descreve na Figura 1A:

(i) um primeiro domínio (A) que é de cadeia simples e tem uma sequência nucleotídica (a') complementar à sequência alvo (a) (Figura 2A), compreendendo a sequência alvo um domínio, quer dentro da sequência do analisado, como dentro da sequência de oligonucleótido, que também contém uma sequência do domínio complementar à sequência do analisado;

(ii) um segundo domínio (B) que é de cadeia dupla e capaz de funcionar como um promotor para a actividade da enzima RNA polimerase dependente de DNA; e

(iii) um terceiro domínio (C) que pode ser de cadeia simples ou dupla, e é adjacente ao segundo domínio, de tal forma que o terceiro domínio é capaz de funcionar como modelo (c') para a actividade do promotor do segundo domínio (Figura 2B).

Um segundo aspecto do invento é um método para amplificar o sinal biológico usado para detectar e quantificar um oligonucleótido, ou outro analisado biomolecular, num ensaio de

hibridização compreendendo as seguintes etapas:

(i) imobilização do analisado, directa ou indirectamente, num substrato sólido; e a hibridização do polidesoxinucleótido da sonda modelo descrito acima, directa ou indirectamente, com o analisado;

(ii) seguidamente, remoção da sonda modelo não hibridizada;

(iii) seguidamente, transcrição ( por via da actividade da RNA polimerase dependente de DNA) de múltiplas cópias de oligómeros de RNA (c) que são complementares à sequência modelo (c') do domínio C do amplificador; e

(iv) finalmente, quantificação dos transcritos de RNA.

#### Breve descrição dos esquemas


A Figura 1A é uma representação esquemática de uma sonda modelo monomérica. As letras grandes designam os domínios, e as letras pequenas designam as cadeias dentro do domínio. Uma primeira letra designa uma cadeia inferior (leitura de 3' para 5', da esquerda para a direita). A sequência a' é complementar à sequência alvo. O domínio B é o promotor para a RNA polimerase. A sequência c' é um modelo para a RNA polimerase. A sonda é sintetizada como uma cadeia simples. O AAAAAA representa o "linker" poly-A adicionado para permitir a auto-hibridização.

A Figura 1B é a sequência de DNA de uma configuração da sonda modelo amplificadora. O domínio promotor, B, consiste na sequência de consenso do promotor do bacteriófago T7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3') mais 15 resíduos 5' adicionais para a sequência promotora.

A Figura 1C é uma representação esquemática de uma sonda modelo multimérica, na qual as regiões de dupla cadeia são auto-hibridizáveis.

A Figura 2A é uma representação esquemática de um sistema de ensaio de hibridização "sandwich" o qual incorpora a sonda modelo. O analisado é indirectamente imobilizado num substrato sólido por hibridização com a sonda de captura do analisado, e é indirectamente ligado à sonda modelo via sonda modelo "linker". "w" representa a sequência de uma região do polinucleótido imobilizado que é complementar à região (w) da sonda de captura do analisado. "y" representa a sequência de uma região da sonda de captura do analisado que é complementar à região (y') do analisado. "x'" representa a sequência de uma região do analisado que é complementar à região (x) da sonda modelo "linker". "a" representa a sequência da sonda modelo "linker" que é complementar a a', a sequência do domínio A da sonda modelo.

A Figura 2B é uma representação esquemática do uso dos transcritos de RNA polimerase, como moléculas registadoras em ensaios de hibridização. Após a hibridização do analisado e da sonda modelo, é adicionada uma RNA polimerase e são produzidos múltiplos transcritos de RNA complementares às sequências modelo (c). Estas sequências têm dois subdomínios: c<sub>1</sub> que é complementar à sonda de captura imobilizada num substrato sólido; e c<sub>2</sub> que é complementar a uma sonda marcada. Isto permite a imobilização indirecta do marcado e a quantificação fácil do sinal do ensaio de hibridização. "\*" designa a marcação incorporada a qual pode ser radioactiva, quimioluminescente, fluorescente ou enzimática.



A Figura 2C é a sequência de DNA de um transcrito do domínio C, bem como a sequência do transcrito da sonda de captura (C<sub>1</sub>'T) e a sonda marcada (C<sub>2</sub>'). X representa o derivado N<sup>4</sup> metil desoxicitidina, [(6-aminocaproil)-2-aminoetil]-5-metil-2'-desoxicitidina, usado para acoplar a sonda de captura à fase sólida.

A Figura 3A descreve a preparação da sonda modelo pII.

A Figura 3B descreve a preparação da sonda modelo pII<sub>L</sub>.

A Figura 3C descreve a preparação da sonda modelo pII<sub>R</sub>.

A Figura 4 descreve os oligômeros do domínio A do Exemplo 9 e as sequências de DNA de oligo N, oligo S e oligo H.

A Figura 5 descreve o protocolo para um ensaio de ácido nucleico, utilizando a sonda modelo T7 e utilizando também uma sonda amplificadora para aumentar mais a sensibilidade e amplificação do sinal.

A Figura 6 é um gráfico que mostra a sensibilidade relativa e amplificação de sinal de várias sondas modelo, em ensaios para a presença de HIV no soro humano.

#### Descrição detalhada do invento

Um "sinal biológico" é um indicio bioquimicamente transmitido da ocorrência de um evento ou presença de uma molécula específica.

"RNA polimerase dependente de DNA" é uma enzima que facilita a polimerização de sequências de RNA específicas a partir de um DNA modelo complementar.

Um "domínio" é uma região particular de um polinucleótido caracterizado pela sua função.



Uma "reação imunológica" é o reconhecimento específico e ligação de um anticorpo ao seu epítipo correspondente.

Um "polidesoxinucleótido" é uma molécula de DNA polimérica. Um "polinucleótido" é uma molécula de DNA ou RNA polimérica.

Um "promotor" é o sítio num polidesoxinucleótido ao qual a enzima RNA polimerase se liga preparatoriamente para iniciar a transcrição.

A "RNA polimerase dependente de RNA" é uma enzima que facilita a polimerização de sequências de RNA específicas a partir de um modelo de RNA complementar.

A "transcrição" é um processo mediado por uma enzima, através do qual se forma RNA correspondendo a um modelo de polinucleótido complementar.

A "cadeia superior" da dupla cadeia da molécula de DNA é a cadeia em que a extremidade 5' está à esquerda, quando a sequência é lida da esquerda para a direita. A sequência desta cadeia apresenta-se sempre abaixo da sequência para a sua "cadeia inferior" complementar, a qual é lida da extremidade 3'- para a 5'-, da esquerda para a direita.

### Modos de realização do invento

#### 1. Sondas modelo

Num aspecto deste invento uma sonda de DNA (referido como "sonda modelo"), contendo três domínios funcionais, foi concebida com o objectivo de aumentar o sinal nos ensaios de hibridização.

O primeiro domínio ("A" na Figura 1A), tem uma sequência (a') usualmente de 10 a 40 nucleótidos em comprimento, preferencialmente de 15 a 30 nucleótidos, que é de cadeia simples e é concebida para hibridizar com uma sequência alvo complementar (a). Com o objectivo de conseguir estabilidade na hibridização, este domínio terá normalmente um conteúdo de CG na ordem dos 40% a 60%. A sequência alvo pode subsistir dentro de toda a sequência do polinucleótido a ser ensaiado (referido como analisado) ou pode subsistir dentro de um "linker" oligonucleotídico que também tem homologia com o analisado. Numa configuração preferida, o analisado será imobilizado num substrato sólido para facilitar os subsequentes procedimentos de lavagem. Esta imobilização pode ser directa (por exemplo, preparações polinucleotídicas contendo o analisado podem ser ligados a um filtro de nitrocelulose) ou indirectamente (por exemplo, um "linker" pode ser imobilizado no filtro e o analisado subsequentemente hibridizado ao "linker").

O segundo domínio (B), tem preferencialmente 10 a 40 pares de bases em comprimento, preferencialmente 20 a 35 nucleótidos, mais preferencialmente 30 a 35 nucleótidos, é de dupla cadeia e funciona como um promotor da RNA polimerase retirada directamente do DNA. Este promotor é usualmente derivado a partir da sequência do promotor de um bacteriófago, de preferência qualquer dos fagos T3, T7, ou SP6, mais preferencialmente a partir do bacteriófago T7. Esta classe de RNA polimerases é de promotor altamente específico. O promotor T7 é provavelmente o mais bem caracterizado. São conhecidas sequências do DNA de 17 promotores de T7 e foi deduzida uma sequência de consenso: 5'-TAATACGACTCACTATA-3' (Oakley e Coleman; Dunn e



Studier). As sequências 3' para o promotor na cadeia complementar ( o segmento c', no qual a extremidade 3' está adjacente à extremidade 5' do segmento b') serve como modelo para a transcrição, e a transcrição de variações de muitas sequências modelo pode ser adaptada. Apenas a própria região do promotor tem de ser de dupla cadeia (Milligan et al.).

Podem ser adicionadas sequências adicionais na extremidade 5' do promotor. Por exemplo, numa configuração preferida, a região B consiste na sequência de consenso do promotor T7 mais bases adicionais 5' à sequência de consenso, as quais são idênticas à sequência dos plasmídeos pT7 ( disponíveis na US Biochemicals) até ao local de restrição PvuII (Figura 1B). Estas sequências podem ou não ter um efeito na transcrição.

O terceiro domínio (C) tem a direcção 3' para o segundo domínio, e a cadeia c' desse domínio serve como modelo para o promotor do domínio B. O domínio C pode ser tão pequeno como 30 nucleótidos em comprimento ou tão longo como 10 Kb. Numa configuração preferida, o domínio tem de 40 a 45 bases. Numa outra configuração preferida o domínio tem 3,4 Kb e é substancialmente semelhante ao DNA genómico do vírus da Hepatite B. Este domínio pode ser de cadeia simples ou dupla, e a extremidade 3' da cadeia modelo c' (directamente adjacente ao promotor) é usualmente um resíduo de citosina.

É necessária uma relação adequada 5'- 3' do promotor (domínio B) para o modelo (domínio C) para haver uma transcrição adequada do modelo. o promotor tem a direcção 5' para o modelo, e o modelo é lido na direcção 3'- 5'. Contudo, será apreciado pelos especialistas nestas técnicas que a orientação dos domínios B/C



para o domínio A não é crítica. Assim, sondas modelo construídas como domínios A-B-C ou como B-C-A produzirão o mesmo transcrito e por isso podem ser construídas em qualquer uma das formas.

O produto de transcrição do RNA (c) do domínio C funciona como molécula registadora quanto à presença e quantidade do analisado. Amplificações de sinal ocorrem porque cada modelo produz  $10^1$  a  $10^4$  transcritos. A sequência deste domínio pode ser concebida com uma sequência aleatória, avaliada por análise computacional, para minimizar a possibilidade de reacções cruzadas com outras sondas no sistema, ou alternativamente, pode ser uma sequência conhecida que foi especificamente escolhida.

Maiores amplificações podem ser conseguidas concebendo uma sonda modelo com domínios promotor/modelo (B/C) multiméricos (Figura 1C). Estas unidades multiméricas podem ter tanto moléculas com um arranjo linear como ramificadas. Para mais detalhes referentes à tecnologia de produção e aplicação de tais multímeros em ensaios de hibridização, ver publicação EPA nº 0317077.

Numa sonda modelo multimérica, o número total de unidades repetitivas B/C estará usualmente no intervalo de 2 a 200, mais usualmente de 5 a 20. As unidades B/C do multímero podem estar covalentemente ligadas, dirigidas umas na direcção das outras, através de pontes fosfodiéster ou através de agentes ligantes inseridos, tais como pontes de ácidos nucleicos, de aminoácidos, de carboidratos ou de poliol, ou através de outros agentes de cruzamento que sejam capazes de fazer ligações cruzadas entre as cadeias de ácidos nucleicos. O(s) sitio(s) de ligação pode(m) ser nas extremidades da unidade (tanto na



orientação normal 3'-5', como aleatoriamente) e/ou num ou mais nucleótidos internos na cadeia. Nos multimeros lineares, as unidades individuais estão ligadas extremidade a extremidade para formar um polímero linear. Nos multimeros ramificados três ou mais unidades de oligonucleótidos emanam a partir de um ponto de origem para formar uma estrutura ramificada. O ponto de origem pode ser outra unidade oligonucleotídica ou uma molécula multifuncional à qual podem estar ligadas covalentemente pelo menos três unidades. O multímero pode ser linear na sua totalidade, totalmente ramificado, ou ser uma combinação de porções lineares e de porções ramificadas. Preferencialmente, haverá pelo menos dois pontos ramificação no multímero, mais preferencialmente pelo menos três. O multímero pode incluir um ou mais segmentos de sequências em dupla cadeia.

As sondas modelo podem ser preparadas através de clonagem, montagem enzimática, técnicas químicas de cruzamento, síntese química directa ou combinação destes. Quando preparados por clonagem, as sequências de ácidos nucleicos que codificam a totalidade da sonda ou fragmentos desta podem ser feitos em forma de cadeia simples ou dupla através do procedimento de clonagem convencional. Quando feito na forma de dupla cadeia, a sonda é desnaturada para fornecer cadeias simples. As sondas modelo podem também ser clonadas na forma cadeia simples, usando vectores de fagos de cadeia simples convencionais como o M13.

O domínio A é de cadeia simples, o domínio B é de cadeia dupla, e o domínio C pode ser de cadeia simples ou dupla. Um domínio particular (por exemplo, o domínio B) pode subsequentemente ser feito em cadeia dupla, através da



hibridização com a sua cadeia complementar clonada separadamente. Alternativamente, a totalidade da sonda modelo pode ser clonada como cadeia simples, auto-hibridização dos polinucleótidos (a' b' c' c b). Neste caso quatro a dez nucleótidos adicionais, preferencialmente 5-7 nucleótidos, são adicionados à sequência como um espaçador entre c e c' para permitir um contorno adequado da região da dupla cadeia quando é auto-hibridizada. O espaçador é usualmente o poly-A, mas pode ser modificado para minimizar a reactividade do cruzamento na hibridização entre as várias sondas no ensaio.

Se forem desejadas sondas multiméricas, os fragmentos são ligados enzimaticamente ou quimicamente para formar um multímero. Quando montadas enzimaticamente, as unidades individuais estão ligadas por uma ligase tal como a DNA ligase do T4. Quando preparadas por cruzamentos químicos, as unidades individuais podem ser sintetizadas com um ou mais ácidos nucleicos que sofreram uma derivação para terem grupos funcionais que fornecem locais de ligação ou sofreram derivação depois de o oligonucleótido ter sido sintetizado para fornecer tais locais.

Um procedimento preferido para o cruzamento químico é incorporar bases de citosina n<sup>4</sup> modificadas no nucleótido, como descrito na publicação EPA, pertença da requerente, No. 0225807.

Quando preparados directamente por síntese química, os oligonucleótidos que contêm ácidos nucleicos derivados, cujos grupos funcionais estão bloqueados, são feitos por técnicas convencionais de síntese de oligonucleótidos. Os grupos funcionais não estão bloqueados e as unidades oligonucleotídicas são sintetizadas fora do(s) local não bloqueado.

## 2. Ensaaios de hibridização amplificados

Num outro aspecto, este invento utiliza sondas modelo em ensaios de hibridização. O analisado pode ser qualquer sequência de nucleótidos de interesse - ou DNA ou RNA. A sequência do analisado pode constituir a totalidade de uma molécula ou apenas uma porção da molécula. O analisado pode ser um polinucleótido homogêneo, presente a baixa concentração no preparado da amostra, ou pode ser uma espécie minoritária numa mistura heterogênea de polinucleótidos. O analisado pode também ser proveniente de uma variedade de fontes, por exemplo, fluidos ou tecidos biológicos, substâncias alimentares, materiais ambientais, etc., ou pode ser sintetizado in vitro.

O analisado pode ser preparado para as análises de hibridização através de uma variedade de meios, por exemplo, proteinase K/SDS, sais caotrópicos, etc. Também, pode ser vantajoso diminuir a amplitude de tamanho do analisado por meios enzimáticos, físicos ou químicos, por exemplo, enzimas de restrição, sonificação, degradação química (por exemplo, iões metálicos), etc. Os fragmentos podem ser tão pequenos como 0,1 Kb, tendo usualmente pelo menos 0.5 Kb e podem ser de 1 Kb ou maiores. Quando a sequência do analisado é comprida, por exemplo no genoma viral, podem ser usadas várias regiões diferentes do analisado como alvo de uma sonda de analisado.

A sequência de analisado é fornecida na forma de cadeia simples para análise. Quando a sequência se encontra naturalmente presente na forma de cadeia simples, usualmente não é requerida a desnaturação. Contudo, se a sequência está presente na forma de dupla cadeia, a sequência será desnaturada. A desnaturação pode

ser realizada por várias técnicas, tais como a alcalina, geralmente de hidróxido 0,05 M a 0,2 M, formamida, sais caotrópicos, calor, ou combinações destes.

Numa primeira etapa, o analisado pode ser imobilizado directamente numa fase sólida ou por hibridizações "sandwich" nas quais o analisado é ligado a um oligonucleótido que é depois ligado a uma fase sólida. Uma abordagem particularmente útil é uma hibridização "sandwich" em fase de solução, pertencente à Publicação EPA No. 0225807.

No ensaio de hibridização "sandwich", com uma etapa de captura, a sonda modelo é usada como se segue: Um analisado de ácido nucleico de cadeia simples é incubado em condições de hibridização com um excesso de duas sondas de ácido nucleico de cadeia simples, (1) uma sonda de captura do analisado, tendo uma primeira sequência de ligação complementar ao analisado e uma segunda sequência de ligação que é complementar a um oligonucleótido de cadeia simples, ligado a uma fase sólida, e (2) uma sonda modelo "linker" tendo uma primeira sequência de ligação que é complementar ao analisado, e uma segunda sequência de ligação que é complementar ao domínio A da sonda modelo.

Numa configuração preferida, pode ser usado um conjunto de sondas de captura de analisado em que cada membro do conjunto tem uma primeira sequência de ligação diferente, complementar a um segmento diferente do analisado, enquanto todos os membros do conjunto têm a mesma segunda sequência de ligação. Similarmente, um conjunto de sondas modelo "linker" pode ser usado, tendo cada membro do conjunto uma primeira sequência de ligação diferente complementar a um segmento diferente do analisado, mas todos os

membros do conjunto têm a mesma segunda sequência de ligação complementar ao domínio A da sonda modelo. Esta abordagem tem a vantagem de permitir a detecção simultânea de variantes estritamente relacionados de um analisado, por exemplo, o genoma viral de estirpes relacionadas.

Através da utilização de sondas de captura de analisado e de sondas modelo "linker", a matriz sólida e a sonda modelo podem ser usadas com reagentes "universais" e não é necessário fazer, para cada analisado, diferentes matrizes oligonucleotídicas immobilizadas e diferentes sondas modelo.

Usualmente, as condições de hibridização consistem num meio aquoso, particularmente um meio aquoso tamponado, o qual inclui vários aditivos. Estes aditivos incluem os polinucleótidos a serem hibridizados, sais (por exemplo, citrato de sódio 0,017 M a 0,17 M e cloreto de sódio 0,17 M a 1,7 M), detergentes iônicos ou não iônicos (0,1 a 1%), e ácidos nucleicos transportadores. Solventes não aquosos tais como dimetilformamida, dimetilsulfóxido e formamida podem também ser utilizados. A mistura é incubada durante 15 a 75 minutos a 45°C a 70°C. O rigor da hibridização é regulado pela temperatura e concentração de sal e pode ser variado dependendo do tamanho e homologia das sequências a serem hibridizadas. Para a hibridização de sequências para ligar DNA, a forma empírica para calcular a temperatura ótima sob condições standard (0,9 M NaCl) é:

$$T(^{\circ}\text{C}) = 4(N_G + N_C) + 2(N_A + N_T) - 5^{\circ}\text{C},$$

em que  $N_G$ ,  $N_C$ ,  $N_A$ , e  $N_T$  são as percentagens das bases de G, C, A, e T na sequência (J. Meinkoth et al., Anal. Biochem

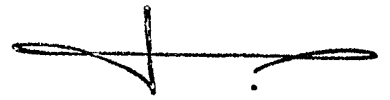
(1984) 138:267:84).

O produto resultante é um complexo de ácido nucleico com três componentes das duas sondas hibridizadas com o analisado pelas suas primeiras sequências de ligação. As segundas sequências de ligação da sonda modelo "linker" e da sonda de captura do analisado permanecem como caudas de cadeia simples, visto que não são complementares ao analisado.

Este complexo é depois adicionado sob condições de hibridização a uma fase sólida tendo um oligonucleótido de cadeia simples ligado a ele, que é complementar à segunda sequência de ligação da sonda de captura do analisado. O produto resultante compreende o complexo ligado à fase sólida, através do duplex formado pelo oligonucleótido ligado à fase sólida e à segunda sequência de ligação da sonda de captura do analisado. A fase sólida com o complexo ligado é depois separada dos materiais não ligados e lavada para remover qualquer material residual não ligado.

A sonda modelo é depois adicionada ao complexo fase sólida-analisado-sonda, sob condições de hibridização, para permitir que a sonda modelo hibridize com as segundas sequências de ligação disponíveis da sonda modelo "linker" do complexo ( a sequência alvo da sonda modelo). O complexo resultante de fase sólida é depois separado de qualquer sonda modelo não ligada e lavado.

De seguida, a RNA polimerase específica para a região promotora ( domínio B ) da sonda modelo é adicionada sob condições apropriadas para a transcrição, e são produzidas múltiplas cópias de RNA (c) do modelo do domínio C (c'). A



quantidade de transcrito é proporcional à quantidade de analisado na preparação inicial.

As condições de transcrição consistem num meio aquoso, de preferência um meio aquoso tamponado, com sais apropriados, usualmente incluindo sal de magnésio, uma mistura de NTPs (rATP, rUTP, rGTP, rCTP), a enzima RNA polimerase e, usualmente, inclui vários agentes desnaturantes, transportadores proteicos, e inibidores de RNase. A incubação é usualmente de 15 a 90 minutos, usualmente de 60 minutos; e a uma temperatura que é óptima para a enzima escolhida, usualmente de 35°C a 42°C, usualmente 37°C.

A sequência do domínio C é concebida para um esquema de detecção específico e vários de tais esquemas podem ser empregues para quantificar os transcritos. Por exemplo, o produto de transcrição (c) do domínio C pode ser sub-dividido em dois sub-dominios - c<sub>1</sub> e c<sub>2</sub> (Figura 2B). O sub-domínio c<sub>1</sub> é complementar a uma sonda de captura transcrita, a qual foi imobilizada num substrato sólido. O sub-domínio c<sub>2</sub> é complementar a uma sonda amplificadora. Após a hibridização, a quantidade de marcação retida é linearmente proporcional à quantidade de analisado presente na amostra original. Numa variante desta abordagem, os transcritos são "ensandwichados" com as sondas "linker", isto é, a sonda de captura transcrita está em solução em vez de imobilizada, e contém um segundo domínio que é complementar a um oligonucleótido imobilizado; e o sub-domínio c<sub>2</sub> é complementar a uma sonda "linker" amplificadora que por sua vez é complementar a uma sonda amplificadora. Este arranjo em "sandwich" é semelhante ao uso de sondas modelo "linker" e de sondas de captura de analisado, para "ensandwichar" o analisado, como descrito acima.

Numa configuração alternativa, o transcrito do domínio C tem apenas o sub-domínio  $c_1$ . O domínio C é transcrito na presença de ribonucleótidos trifosfatados marcados, e o transcrito marcado é subsequentemente ligado a um transcrito da sonda de captura imobilizado, através da sua complementariedade com o subdomínio  $c_1$  e quantificado.

Ainda numa outra configuração, o transcrito do domínio C tem apenas um sub-domínio  $c_2$ . O domínio C é transcrito na presença de ribonucleósidos trifosfatados biotinilados, e o transcrito é capturado em contos de avidina. O transcrito é depois hibridizado com uma sonda amplificadora, através da sua complementariedade com o subdomínio  $c_2$ , e quantificado.

Vários outros métodos de marcar e detectar o transcrito da sonda de amplificação são possíveis, incluindo o uso simultâneo de ribonucleótidos marcados e conjuntos avidina/biotina, e serão óbvios para os especialistas nestas técnicas.

#### Sondas de Captura, "Linker" e Amplificadoras

As primeiras sequências de ligação da sonda de captura do analisado e a sonda modelo "linker" são complementares à sequência do analisado. Similarmente, as primeiras sequências de ligação do transcrito da sonda de captura e da sonda "linker" amplificadora são complementares aos transcritos registadores. Cada primeira sequência de ligação tem pelo menos 12 nucleótidos (nt), usualmente pelo menos 25 nt, mais usualmente pelo menos 30 nt, e não mais do que cerca de 150, usualmente não mais de 75, e mais usualmente não mais do que cerca de 50 nt. Eles serão

normalmente escolhidos para se ligar a diferentes sequências do analisado. As primeiras sequências de ligação podem ser seleccionadas com base numa variedade de considerações. Dependendo da natureza do analisado podemos estar interessados numa sequência de consenso, numa sequência associada aos polimorfismos, num fenótipo ou genótipo particular, numa estirpe particular, ou semelhantes.

As segundas sequências de ligação da sonda de captura do analisado e da sonda modelo "linker" são seleccionadas para serem complementares, respectivamente, ao oligonucleótido ligado à fase sólida, e a uma unidade oligonucleotídica da sonda modelo e, assim, não deve ser rodeada por sequências endógenas na amostra/analisado. A segunda sequência de ligação pode ser contígua à primeira sequência de ligação, ou estar afastada dela por uma sequência não complementar intermediária. As sondas podem incluir outras sequências não complementares se desejado. Estas sequências não complementares não devem camuflar as ligações das sequências de ligação ou provocar a ocorrência de ligações não específicas.

As sondas de captura e as sondas "linker" podem ser preparadas por processos convencionais de síntese de oligonucleótidos ou por clonagem.

Será apreciado que as sequências de ligação não precisam de ter uma complementariedade perfeita para fornecer homoduplexes. Em muitas situações, heteroduplexes serão suficientes, quando menos de 10% das bases estão desencontradas, ignorando "loops" de número cinco ou mais. Consequentemente, o termo "complementariedade", como aqui usado, significa um grau de

complementariedade suficiente para fornecer uma estrutura em duplex estável e específica.

A fase sólida que é utilizada no ensaio pode ser na forma de partículas ou pode ser a superfície de uma parede sólida de uma variedade de recipientes, por exemplo, tubos de centrifuga, colunas, placas de cúpulas de microtitulação, filtros, tubos, etc. Preferencialmente, as partículas empregues serão de um tamanho entre 0,4 a 200 micra, mais usualmente de 0,8 a 4,0 micra. As partículas podem ser de qualquer material conveniente, tal como latex, ou vidro. O oligonucleótido, que é complementar à segunda sequência de ligação da sonda de captura de analisado, pode ser preso de forma estável à superfície sólida através de grupos funcionais por intermédio de procedimentos conhecidos.

Será apreciado que podemos substituir a segunda sequência de ligação da sonda de captura e o oligonucleótido preso à fase sólida, com um par ligando-receptor apropriado, que formará uma ligação estável juntando a fase sólida à primeira sequência de ligação da sonda de captura. Exemplos de tais pares são a biotina/avidina, tiroxina/ tiroxina ligada à globulina, antigene/anticorpo, carbohidrato/lectina, e semelhantes.

As sondas de amplificação incluirão uma sequência complementar ao sub-domínio c<sub>2</sub> dos transcritos da sonda modelo, ou a um sub-domínio da sonda "linker" amplificadora. A sonda amplificadora é capaz de hibridizar com uma ou mais marcações ou sondas marcadas que fornecem directamente ou indirectamente um sinal detectável. Os marcadores podem ser incorporados em resíduos individuais da sequência complementar ou podem estar



presentes como um domínio terminal ou cauda terminal tendo uma multiplicidade de marcações. Vários meios para fornecer ligações marcadas à sequência têm sido descritos na literatura. Ver, por exemplo, Urdea et al., Nucl. Acids Res (1988) 4937; Leary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1983) 80:4045; Renz e Kurz, Nucl. Acids Res. (1984) 12:3435; Richardson e Gumpert, Nucl. Acids Res. (1983) 11:6167; Smith et al., Nucl. Acids Res. (1985) 13:2399; Meinkoth e Wahl, Anal. Biochem. (1984) 138:267. Os marcadores podem ser ligados covalentemente ou não covalentemente às sequências complementares. Marcadores que podem ser empregues incluem radionuclídeos, fluorescentes, quimioluminescentes, corantes, enzimas, substratos enzimáticos, cofactores de enzimas, inibidores de enzimas, sub-unidades de enzimas, iões metálicos, e semelhantes. Marcadores específicos ilustrativos incluem fluoresceína, rodamina, vermelho do Texas, ficoeritrina, umbeliferona, luminol, NADPH, galactosidase, peroxidase de rábano bastardo, etc. Ver Urdea et al., para comparação de métodos de marcação não radioisotópicos.


As sondas marcadas podem ser convenientemente preparadas por síntese química, tal como descrito no pedido de patente co-pendente, pertencente à requerente, com o No de série 945.76. Ao fornecer grupos terminais para terem uma funcionalidade conveniente, podem ser juntos vários marcadores através da sua funcionalidade. Assim podemos fornecer grupos funcionais carboxi, tiol, amina, hidrazina, ou outros aos quais se podem juntar vários marcadores sem afectar prejudicialmente a formação de duplexes com a sequência. Como já foi indicado, podemos ter uma molécula com uma multiplicidade de marcadores



juntos na sequência complementar à sequência marcada. Alternativamente, podemos ter um ligando ligado à sequência marcada e usar um receptor marcado para se ligar ao ligando, para fornecer o complexo de analisado marcado.

A razão de sonda de captura de analisado e sonda modelo "linker", para moles anteriores de analisado, será para cada, pelo menos, estequiométrica e, de preferência, em excesso. Esta razão é preferencialmente de pelo menos cerca de 1,5:1, e mais preferencialmente de 2:1. Estará normalmente no intervalo de 2:1 a 10000:1. As concentrações de cada uma das sondas estará geralmente entre  $10^{-9}$  e  $10^{-6}$  M, com as concentrações da amostra de ácido nucleico a variar de  $10^{-21}$  a  $10^{-12}$  M. As etapas do ensaio de hibridização durarão geralmente de 10 minutos a 2 horas, estando frequentemente completas ao fim de 1 hora. A hibridização pode ser realizada a uma temperatura levemente elevada, geralmente no intervalo de desde cerca 20°C a 80°C, mais usualmente de cerca de 35°C a 70°C, particularmente a 65°C. Condições adicionais para a reacção de hibridização estão descritas a seguir.

O procedimento utilizado na separação das etapas do ensaio irá variar dependendo da natureza da fase sólida. Para partículas, a centrifugação e filtração permitirão a separação das partículas, desprezando o sobrenadante ou isolando o sobrenadante. No local onde as partículas foram ensaiadas, as partículas serão lavadas completamente, usualmente de uma a cinco vezes, com um meio apropriado tamponizado contendo detergente, por exemplo PBS com SDS. Quando os meios de separação são uma parede ou um suporte, o sobrenadante pode ser desprezado ou



isolado e a parede lavada da mesma forma que indicado para as partículas.

Dependendo da natureza do marcador, várias técnicas podem ser utilizadas para detectar a presença do marcador. Para fluorescentes, estão disponíveis um grande número de fluorómetros diferentes. Com enzimas, pode ser fornecido tanto um produto quimioluminescente, fluorescente ou colorido e determinado fluorometricamente, espectrofotometricamente ou visualmente. Os vários marcadores que foram utilizados em imunoensaios e as técnicas aplicadas nos imunoensaios podem ser utilizadas nestes ensaios.

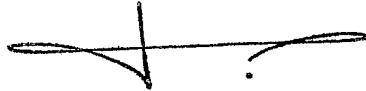
Num ensaio de hibridização no qual o ácido nucleico do analisado está directamente ligado à fase sólida, tal como um ensaio "dot blot", a sonda modelo é hibridizada directamente para o analisado ligado. Neste caso, o domínio A da sonda modelo é complementar à sequência do analisado.

A sonda modelo pode também ser utilizada noutros ensaios tais como ensaios directos, indirectos e imunoensaios "sandwich", e ensaios para receptores ligados, como, por exemplo, receptores de superfícies celulares. Nestes casos, em vez de um marcador, o reagente que desempenha o papel de anticorpo marcador ou outro ligando que se liga ao analisado (antigene ou receptor ligando), tem preso um oligonucleótido que é complementar a a', a sequência do domínio A da sonda modelo. Por exemplo, num imunoensaio em "sandwich" para um analisado antigene, a amostra de analisado é incubada com a fase sólida à qual se liga um primeiro anticorpo para o antigene. A amostra não ligada é removida da fase sólida e um segundo anticorpo para o

antigene, que é acoplado a um oligonucleótido complementar a a', reage com o complexo ligado para formar um complexo com três membros. A seguir à remoção do excesso do segundo anticorpo, a sonda modelo é depois hibridizada com o complexo, através do oligonucleótido ligado ao segundo antigene. O excesso de sonda modelo é removido e é adicionada RNA polimerase como descrito acima. Finalmente, o produto da transcrição é quantificado como descrito.

Numa configuração alternativa, a sonda modelo pode ser sintetizada sem o domínio A e acoplada directamente ao receptor ligando ou ao anticorpo, através dos meios de avidina/biotina, ou um par equivalente estavelmente ligado como descrito previamente. A sonda modelo pode também estar presa de forma covalente ao receptor ligando por meios de síntese química, descritos no pedido de patente co-pendente No. 945.876.

Kits para realizar a amplificação dos ensaios de hibridização de ácidos nucleicos, de acordo com o invento, compreenderão numa embalagem combinada os seguintes reagentes: a sonda modelo; a apropriada RNA polimerase retirada directamente do DNA, uma sonda marcadora apropriada; uma fase sólida capaz de se ligar ao analisado, opcionalmente uma sonda de captura de analisado se o formato de ensaio for tal que o analisado se liga à fase sólida através de um oligonucleótido intermédio ou outro ligando; e opcionalmente uma sonda modelo "linker" se o formato do ensaio for tal é que a sonda modelo não é hibridizada directamente no analisado. Similarmente, estes kits podem também conter transcritos de sondas de captura, de sondas de amplificação e de sondas "linker". Estes reagentes estarão



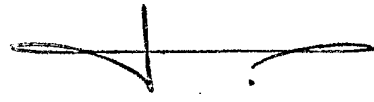
tipicamente separados em recipientes no kit. O kit pode também incluir um reagente desnaturante para desnaturar o analisado, tampões de hibridização, soluções de lavagem, controlos positivos e negativos e instruções escritas para realização do ensaio.

### EXEMPLOS

#### Exemplo 1

A. Sonda modelo T7. A sonda foi concebida como se mostra na Figura 1A. A sequência a' do domínio A está ilustrada na Figura 1B e é complementar à região a da sonda modelo "linker" descrita na Figura 2A. A sequência do domínio do promotor, B, (ilustrada na Fig. 1B) contém a sequência de consenso do promotor T7, mais 15 bases 5' adicionais para o promotor, e idêntica à sequência do plasmídeo pT7 (disponível pela US Biochemicals) até ao local de restrição PvuII. Os 15 pares de bases adicionais podem ser estranhos; contudo, eles foram incorporados desde que as experiências iniciais realizadas com sondas modelo, que tinham sido clonadas no vector pT7, provaram ser bem sucedidas. Assim, mesmo os modelos de sonda feitos por síntese química têm retida esta porção de plasmídeo. O domínio C foi concebido como uma sequência aleatória. Foi avaliado por análise computacional, para minimizar a potencial reactividade de cruzamentos na hibridização com outras sondas do sistema.

B. Sonda modelo T3. A sonda está concebida como no Exemplo 1A, acima, com a excepção de que a sequência de consenso para a RNA polimerase retirada directamente a partir do DNA da sequência promotora do bacteriófago T3 (5'-TATTAACCCTCACTAAA-3')



é substituída pela sequência de consenso do promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3').

C. Sonda modelo SP6. A sonda está concebida como no Exemplo 1A, acima, com a excepção de que a sequência de consenso para a RNA polimerase retirada directamente a partir do DNA da sequência promotora do bacteriófago SP6 (5'-ATTTAGGTGACTATA-3') é substituída pela sequência de consenso do promotor T7 e os primeiros seis nucleótidos 5' do domínio C são 5'-GAAGGG-3', em vez de 5'-GGGAGA-3, como no caso do Exemplo 1A.

Exemplo 2

Ensaio de hibridização para o DNA do gene pilin de Neisseria gonorrhoeae usando o procedimento para o ensaio de placas de microtitulação e a RNA polimerase do T7.

A. Analisado de DNA standard. Foi usada a estirpe 31707 de N. gonorrhoeae do "Neisseria Reference Laboratory" (Seattle, WA). O DNA foi preparado a partir desta estirpe, bem como a partir de outras estirpes comensais não patogénicas de Neisseria, usadas como controlos, através da adição de uma solução de proteinase K/SDS, como descrito em Urdea et al., (Gene (1987) 61:253).

B. Ligação do oligonucleótido ao suporte sólido (Figura 2A). Foi empregue um ensaio usando o procedimento da placa de microtitulação. As placas de microtitulação foram preparadas da maneira que se segue. Foram preparados dois tipos de cúpulas de



placas de microtitulação: (1) as cúpulas N para trabalho das amostras e controlos negativos, e (2) as cúpulas S para captura do complexo sonda-analisado, a partir de amostras e controlos positivos.

As cúpulas N foram produzidas como se segue: 300 µl de tampão HM (SDS 0,1%, 4\*SSC), DNA de esperma de salmão sonificado 1mg/ml, poly A 1mg/ml, BSA 10 mg/ml, foram adicionados a "Imulon II Remov-a-wells" (Dynatech Inc.). As faixas das cúpulas foram cobertas e deixadas ficar à temperatura ambiente durante 1 hora. O tampão HM foi removido por aspiração e as cúpulas foram lavadas 3 vezes com 400 µl de 1 x PBS. As faixas foram cobertas com um envólucro de plástico, e armazenadas a 4°C até serem usadas.

As cúpulas S foram preparadas a partir das faixas Imulon II da maneira que se segue. A cada cúpula, foram adicionados 200 µl de uma solução a 200 µg/ml de poli-fenilalanil-lisina (Sigma Chemical Inc.) em água. As faixas cobertas foram deixadas à temperatura ambiente durante 30 minutos a 2 horas, e depois lavadas como descrito acima.

De seguida foi sintetizado um oligómero de 21 bases, 5'-XCACCACTTTCTCCAAAGAAG-3', em que X representa o derivado de 5-metil citidina, N4-(6-aminocaproil-2-aminoetil), de acordo com o método de Warner et al. (DNA (1984) 3:401), e purificado como descrito por Urdea et al., em cima. A base de citosina modificada N4, facilita a ligação química cruzada dos oligonucleótidos, como descrito na Publicação da EPA No. 0225807, pertencente à requerente, e Urdea, M.S., et al., Nucl. Acids Res. (1988) 16: 4937-4956.

Uma amostra de 10 OD do oligonucleótido sintetizado em



60  $\mu$ l de 1 x PBS foi tratada com 140  $\mu$ l de dimetilformamida contendo 10mg de bis etileno glicol (succinimidilsuccinato) (Pierce Chemical Inc.). A mistura foi levada ao vortex e incubada no escuro à temperatura ambiente. Após 15 minutos, a solução foi passada por uma coluna de Sephadex<sup>®</sup> G-25 (PD-10 de Pharmacia), previamente equilibrada com 30 ml de 1 x PBS. O volume não preenchido da coluna foi diluído para um volume final de 35 ml com 1 x PBS. A cada cúpula foi adicionada uma alíquota de 50  $\mu$ l de solução de oligonucleótido. Após terem sido cobertas com um envólucro de plástico, as cúpulas ficaram a incubar à temperatura ambiente no escuro, durante 30 minutos, e durante uma noite. As cúpulas foram lavadas com 1 x PBS, depois cobertas com tampão HM, lavadas e armazenadas como acima.

C. Sondas de captura de analisado (Figura 2A). Um conjunto de três oligômeros de cadeia simples, cada um tendo uma porção de 30 bases variadas de comprimento, complementar a uma sequência específica do gene pilin e uma porção constante de 20 bases 5' de comprimento, complementar ao oligonucleótido ligado à fase sólida, foram sintetizados através dos procedimentos automáticos de fosforamidite descritos por Warner et al., acima citados, e purificados pelo método de Sanchez-Pescador e Urdea, citados acima. As sequências complementares ao gene pilin foram baseadas na sequência pilin de N. gonorrhoeae descrita por Bergstrom, S., et al. (PNAS USA (1986) 83:3890-3894).

As porções 5' das sondas eram complementares a segmentos da sequência pilin e eram como se segue:



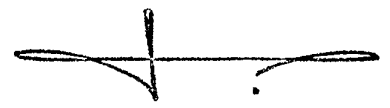
<u>Designação da sonda</u>	<u>Sequência 5'</u>
GCP-XT1-4	GAT GTG GCG GGC GCG CGT TCA AAG GCT TCG
GCP-XT1-8	GAG GCT GTA GTT TCC GTT TAT ACA ATT TCT
GCP-XT1-12	GCC AAG CCA TTT TAC CAA GAC GCC TGT CGG

A porção 3' de cada sonda de captura de analisado foi construída para ser complementar à sequência de oligonucleótidos presa ao suporte sólido descrito abaixo.

D. Sondas modelo "linker" (Figura 2A). Um conjunto de 12 oligómeros de cadeia simples, consistindo cada um numa porção variável de 30 bases de comprimento, complementares a uma sequência específica do gene pilin e uma porção 3' constante de 20 bases de comprimento, complementar à sonda modelo (Figura 2A), foram sintetizados pelos procedimentos de Warner et al., acima citado e purificados de acordo com Sanchez-Pescador e Urdea, acima citados.

As porções 5' da sonda eram complementares a segmentos da sequência pilin e eram como se segue:

<u>Designação da sonda</u>	<u>Sequência 5'</u>
GCP-LLA2C-1	ATA CTT ATG GGA AGT TTT TCC GAA ATG GGA
GCP-LLA2C-2	GCT CGA CTA CTA ACA CTA GCG ATA GCA GCC
GCP-LLA2C-3	AAA CCG CAA TCA GCG GGA AGG GCG GAT GGT
GCP-LLA2C-5	GGA AAA CCG GCT TCC AGT TTT TAG TCG GCA
GCP-LLA2C-6	GCT CAT AAT GGA CTT AAG GCC GTT TAC CGG
GCP-LLA2C-7	TTT GTT GTG AAG ACG GCC GCA CCG TAG GGG
GCP-LLA2C-9	ACT TCA ATT TTT GCC GCA GCA ATG GCG GTG
GCP-LLA2C-10	CGA AAG TTC GCC GCA TTT GTT ACT AAT GTT



GCP-LLA2C-11	GTT TTT TGA GAG GGA CAC CCG GTC CGC ACT
GCP-LLA2C-13	ATG CGC GTG GCT GCT GCT GTG GCA ACG GCT
GCP-LLA2C-14	GTT TCT GCC GTT TCT TTA GCT GTG GTT CGT
CGP-LLA2C-15	CGG CAG TTG GAC GGC GCT ATT CCG TAG ACT

A porção 3' de cada sonda modelo "linker" foi construída para ser complementar à sequência do domínio A da sonda modelo.

E. Oligómeros marcados (Figura 2B). Um oligômero de 18 bases, 5'-XGGTCCTAGCCTGACAGC-3', em que X está definido como acima, foi sintetizado como descrito, e combinado com fosfatase alcalina (FA) da seguinte maneira: FA do intestino de bezerro (3 mg em tampão; imunoenaios de qualidade, Boehringer-Mannheim), foi colocada num Centricon 30 Microconcentrator. Aproximadamente 2 ml de borato de sódio 0,1 M, pH 9,5, foram depois adicionados e o dispositivo foi regulado para 3500 rpm, até ser obtido um volume final de 40 µl. O oligonucleótido alquilamino foi depois activado com p - fenileno diisotiocianato (DITC; Pierce Chemicals) em 95:5 (v/v) de dimetilformamida: borato de sódio 0,1 M, pH 9,3, extraído com n-butanol, e combinado com a proteína. O produto final foi armazenado a 4°C. Ver Urdea et al. (Nuc. Acids Res. (1988) 16:4937).


F. Procedimento com as Placas de Microtitulação. Para análises em duplicado, foram colocados 20 µl de cada amostra em 2 cúpulas N, depois tratados com 25 µl de solução de proteinase K/SDS. As cúpulas foram cobertas com uma placa seladora de



microtitulação Linbro-Titertek, agitadas cuidadosamente, e incubadas a 65°C durante 30 minutos em banho de água. O analisado de captura e a sonda modelo "linker", que estavam colocados em NaOH 1 M, foram adicionados em 10 µl a cada cúpula. Após a selagem, as amostras foram incubadas por 10 a 30 minutos de 65°C a 72°C como acima. As soluções foram neutralizadas com 26 µl de ácido acético 0,38 M (ou ácido sulfônico 3-[N-morfolino] propano 0,76 M (MOPS), ácido livre), 12,3 x SSC, depois incubadas, cobertas, por 15-30 minutos adicionais, a 65°C. De cada cúpula N, 40 µl da amostra são transferidos para novas cúpulas S, contendo a sonda de captura no suporte sólido. As cúpulas foram seladas e postas a 65°C durante 1 hora. Cada cúpula foi depois lavada duas vezes por aspiração com SDS 0,1%, 0,1 x SSC. Ver Folberg et al. (Molec. and cell. probes (1988) 3:59).

A sonda modelo foi subsequentemente hibridizada a um complexo, por incubação de 100 fmoles de sonda modelo em 40 µl de 4 x SSC com poly A 100 µg/ml, a 55°C por 1 hora, seguindo-se duas lavagens com 0,1 x SSC, 0,1% de SDS e duas lavagens com 0,1 x SSC.

A transcrição do domínio C foi efectuada por incubação do complexo em 20 µl de uma solução contendo Tris HCl 40 mM (pH 8), MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 10 mM, Espermidina 1 mM, ditiotreititol 10 mM, albumina de soro bovino 0,15 mg/ml, rATP, rCTP, rGTP, rUTP 1,25 mM cada, RNAsin 1600 unidades/ml, e RNA polimerase de T7 2000 unidades/ml. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora. A transcrição foi terminada pela adição de 20 µl de solução contendo 8 X SSC, e 0,2% DE SDS, e a totalidade da mistura foi transferida para novas cúpulas contendo uma sonda de captura



imobilizada com as sequências  $c_1'$ . A captura dos transcritos do domínio C (Figura 2B) foi efectuada por incubação a 55°C durante 1 hora, seguindo-se duas lavagens com 0,1 X SSC, 0,1% de SDS.

Os transcritos do domínio C foram depois marcados por adição de 50 fmol da sonda com enzima marcada ( $c_2'$ ) em 40  $\mu$ l de 4 x SSC, poly A 100 $\mu$ g/ml, durante 15 minutos a 55°C. Finalmente, o complexo foi lavado duas vezes com 0,1 x SSC, SDS 0,1%, seguindo-se por duas lavagens com 0,1 x SSC.

Para detecção da FA, foi empregue uma reacção baseada no dioxetano com enzima acoplada (Schapp et al. Tet. Lett. (1987) 28:1159-1162) e a patente norte americana No. 4.857.652), disponível no Lumigen Inc.. O procedimento para a detecção foi como se segue. Para a etapa de marcação, 40  $\mu$ l de tampão HM com a sonda de FA foram adicionados a cada cúpula, e as cúpulas foram incubadas a 55°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi removido e as cúpulas foram lavadas duas vezes com 380  $\mu$ l de 0,1 x SSC e 0,1% de SDS. As cúpulas foram depois lavadas duas vezes com 380  $\mu$ l de 0,1 x SSC, para remover qualquer SDS restante. Foram adicionados a cada cúpula 20  $\mu$ l de reagente dioxetano em tampão CTAB a  $3,3 \times 10^{-4}$  M. As cúpulas foram levemente inclinadas para que o reagente caísse suavemente para o fundo e levemente agitadas para distribuir o reagente mesmo até ao fundo. As cúpulas foram cobertas com a placa seladora de microtitulação e incubadas num forno a 37°C durante uma hora. As cúpulas foram depois lidas com um luminómetro.

### Resultados

Os testes foram realizados em células bacterianas de N.



gonorrhoeae (estirpe 31707), bem como em controlos de Neisseria não patogénica, de acordo com o protocolo do Exemplo 2, descrito acima. Os resultados estão apresentados como uma razão sinal-ruído (S/R), representando o valor da amostra contra o valor do controlo. O número de células foi determinado pela viabilidade celular. Para comparação, os testes foram também realizados nas mesmas amostras, utilizando um multímero de amplificação do tipo combinado com 5 locais de ramificação, como descrito no pedido de patente norte americana co-pendente com o No. de série 109.282.

No de células	Ensaio de transcrição T7		Ensaio multiméricos	
	Trial 1	Trial 2	Trial 1	Trial 2
$8,3 \times 10^5$	186,76±25,39	139,93±44,87	90,94±48,69	82,75±16,55
$8,3 \times 10^4$	18,35±3,60	8,35±4,20	9,94±8,71	14,56±0,47
$8,3 \times 10^3$	2,43±0,37	1,55±0,37	2,58±1,40	2,55±0,42

### Exemplo 3

#### Ensaio de hibridização usando a RNA polimerase T3

O ensaio de hibridização é empregue utilizando o mesmo protocolo que no Exemplo 2, acima citado, com a excepção de que o domínio B da sonda modelo contém as sequências para o promotor da RNA polimerase T3, em vez do promotor T7. A sequência do promotor T3 foi previamente descrita por Brown, J.E., et al. (Nucleic Acids Res. (1986) 14:3521-3526). A sequência do promotor T3 é 5'-TAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GA -3' e substitui a sequência do promotor T7 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA -3'.



#### Exemplo 4

##### Ensaio de Hibridização usando a RNA Polimerase SP6

O ensaio de hibridização é empregue utilizando o mesmo protocolo que no Exemplo 2, acima citado, com a exceção de que o domínio B da sonda modelo contém a sequência para o promotor da RNA polimerase SP6, em vez do promotor T7. A sequência do promotor SP6 foi previamente descrita por Brown et al., acima citado. A sequência do promotor SP6 é 5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG GG-3' e substitui a sequência do promotor T7 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3'.

#### Exemplo 5

##### Ensaio de Hibridização para o DNA do Virus da Hepatite B (HBV) usando o Procedimento de Ensaio com Placas de Microtitulação e a RNA Polimerase do T7

Extratos de DNA de amostras de soro ou plasma de pacientes potencialmente infectados com o virus da Hepatite B (HBV) são preparados como descrito no de pedido de patente co-pendente com o No. 109282, e são usados como analisados como descrito no Exemplo 2.

Um conjunto de sondas modelo "linker" de cadeia simples, cada uma tendo uma porção variável com 30 bases de comprimento, complementar a uma sequência específica da região constante ds do genoma do HBV, e uma porção 3' constante de 20 bases de comprimento, complementar à sonda modelo usada no Exemplo 2, é sintetizada pelos procedimentos descritos no Exemplo



2. As sequências destas sondas estão apresentadas no Quadro 1, a seguir.

Quadro 1  
Sondas Modelo "linker" para HBV

<u>Designação da sonda</u>	<u>Sequência</u>
:HBV.LLA2C.70	TGA CTG [CG]CG ATT GGT [GA]GA GGC AGG [AC]GG AGG TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.69	CTT G[AT][CT] GGG [GA]TT GAA GTC CCA ATC TGG ATT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.68	GTT GCG TCA GCA AAC ACT TGG CA[CG] AGA CC[AT] TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.67	TAA GTT GGC GAG AAA GT[GA] AAA GCC TG[TC] TT[AC] TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.66	GCA GCA AA[GA] CCC AAA AGA CCC ACA A[TG][TA] C[TG][TC] TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.65	ATG TAT ACC CA[GA] AGA CA[AG] AAG AAA ATT GGT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.59	TAG AGG ACA AAC GGG CAA CAT ACC TTG [AG]TA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.58	GAT GAG GCA TAG CAG CAG GAT GAA GAG GAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.57	GAT AAA ACG CCG CAG ACA CAT CCA GCG ATA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HBV.LLA2C.56	GGA CAA [AG]TT GGA GGA CA[GA] GAG GTT GGT GAG TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC



:HBV.LLA2C.55      TTG GAG GTT GGG GAC TGG GAA TTT TGG    CCA  
                          TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HBV.LLA2C.54      CCA CCA CGA GTC TAG ACT CTG    [CT]GG    TAT  
                          TGT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HBV.LLA2C.53      GAT TCT TGT CAA CAA GAA AAA CCC CGC CTG TTA  
                          GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HBV.LLA2C.52      CAC GAG [CA]AG GGG TCC TAG GAA    TCC    TGA  
                          TGT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HBV.LLA2C.51      CAG GGT TTA CTG TTC C[TG]G AAC    TGG    AGC  
                          CAC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

Um conjunto de sondas de captura de analisado de cadeia simples, tendo cada uma uma porção variável de 30 bases de comprimento, complementar a uma sequência específica da região constante ds do genoma do HBV e uma porção 3' constante de 20 bases de comprimento, complementar ao oligonucleótido ligado à placa de microtitulação, como descrito no Exemplo 2 é sintetizado como no Exemplo 2. A sequência destas sondas está apresentada no Quadro 2, a seguir.

Quadro 2

Sondas de captura de analisado para o HBV

<u>Designação da sonda</u>	<u>Sequência</u>
:HBV.XT1.64	CTT GGC CCC CAA TAC CAC ATC ATC    CAT    ATA CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HBV.XT1.63	GAA AGC CAA ACA GTG GGG GAA AGC CCT    ACG CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG

:HBV.XT1.62           CAC TGA ACA AAT GGC ACT AGT AAA CTG AGC  
                          CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG

:HBV.XT1.61           GAG AAA CGG [AG]CT GAG GCC C[AC]C TCC CAT  
                          AGG CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG

:HBV.XT1.60           [GC]CG AAA GCC CAG GA[CT] GAT GGG ATG GGA  
                          ATA CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG

Todos os outros métodos e reagentes são os mesmos que no Exemplo 2.

#### Exemplo 6

#### Ensaio de Hibridização para TEM-1 Beta-lactamase de DNA em N. gonorrhoeae usando o Procedimento do Ensaio de Placas de Microtitulação e a RNA Polimerase T7

Análises moleculares revelaram que a resistência à penicilina, observada em N. gonorrhoeae, é, na sua maior parte devida à presença do gene Tem-1 beta-lactamase num plasmídeo não conjugativo de 3-7 M. daltons. (Este plasmídeo é homólogo aos que se encontram em H. ducreyi, H. parainfluenza e ocasionalmente em H. influenza). Um ensaio de hibridização é pois desenvolvido para detectar DNA TEM-1 em N. gonorrhoeae (ou nas outras bactérias atrás mencionadas que transportem plasmídeos homólogos) com o propósito de determinar a resistência à penicilina.

O plasmídeo de 7,3 Kb de N. gonorrhoeae que transporta o gene TEM-1 foi obtido, e um segmento contendo 80% do gene TEM-1 foi sequenciado como descrito na Publicação EPA pertencente à

requerente, com o No. 0317077. As sondas de captura do analisado e as sondas modelo "linker" são sintetizadas e purificadas como descrito no Exemplo 2, acima referido. As porções 5' das sondas modelo "linker" são complementares às sequências da região codificadora do gene; enquanto que as porções 5' das sondas de captura de analisado são complementares a sequências adjacentes do plasmideo. Alternativamente, são também preparadas sondas nas quais as porções 5' de ambos os conjuntos são dirigidas para o gene TEM-1.


Em todos os outros aspectos, o procedimento no ensaio de hibridização e os reagentes, são semelhantes aos descritos no Exemplo 2.

Este ensaio para o TEM-1 é um instrumento clínico poderoso que permitirá ao pessoal médico identificar infecções resistentes à penicilina, e otimizar o regime de tratamento, através da escolha de uma terapia de antibióticos apropriada.

#### Exemplo 7

#### Ensaio de Hibridização de DNA de Chlamydia trachomatis Utilizando o Procedimento do Ensaio de Placas de Microtitulação e Polimerase do T7

As sondas de modelo "linker" e de captura de analisado são preparadas usando a mesma estratégia que foi descrita no Exemplo 2 e concebidas para hibridizar com o plasmideo pCHL2 de Chlamydia, descrito por Palmer e Falkow (Plasmid (1986) 16:52-62). Cada sonda do conjunto é de 50 mer nas quais os primeiros 30



resíduos 5' são complementares às sequências do pCHL2, e os resíduos 3' restantes são as sequências do modelo "linker" e da captura de analisado específicas no sistema, descritas no Exemplo 2. As sequências pCHL2, usadas para conceber estas sondas estão descritas na Publicação EPA, pertença da requerente, com o No. 0317077.

Em todos os outros aspectos o ensaio de hibridização e os reagentes são os mesmos que estão descritos no Exemplo 2.

#### Exemplo 8

#### Ensaio de Hibridização para o Determinante tet M em N. gonorrhoeae.

Descobriu-se que as estirpes de N. gonorrhoeae resistentes a elevados níveis de tetraciclina, exibindo uma concentração mínima inibitória num valor abaixo de 16 g/ml, adquiriam o determinante M tet num plasmídeo conjugativo de 24,5 Md (Cannon, J.G., et al., Annual Review of Microbiology (1984) 38:111; Morse, S.A., et al., Antimicrob. Agents Chemother. (1986) 30:664). Foi assim desenvolvido um ensaio de hibridização para detectar DNA tet M em N. gonorrhoeae ( ou nas outras bactérias atrás mencionadas transportando plasmídeos homólogos) com o propósito de determinar a resistência à tetraciclina.

Dez µl de suspensão de células de N. gonorrhoeae resistentes à tetraciclina (TRNG), tanto em caldo de CG como em leite magro, são misturadas com 12,5 µl de uma solução de lise ( proteinase K 2mg/ml em Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM,

SDS 1%, pH 8,0) numa cúpula Immulon II limpa (Dynatech), e incubadas a 65°C durante 20 minutos.

As sondas de captura da analisado e as sondas modelo "linker" são sintetizadas e purificadas como descrito no Exemplo 2, acima citado, com a excepção de serem concebidas para hibridizar o gene estrutural tet M. A sequência das sondas está baseada na sequência do gene tet M do transposição "shuttle" conjugativo de estreptococo Tn 1545, descrito por Martin, P., et al., Nucl. Acids Res. (1986) 14:7047.

Em todos os outros aspectos, o procedimento do ensaio de hibridização e reagentes são os mesmos que descritos no Exemplo 2.

#### Exemplo 9

#### Comparação de Sondas Modelo com vários Números de Pares de Bases entre o domínio A e B em Ensaio para a Presença do DNA do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em Plasma Humano

Várias sondas modelo foram preparadas, cada uma tendo o mesmo domínio funcional, A, B, e C, mas com diferente número de pares de bases separando o domínio A e o promotor T7.

A estratégia geral foi preparar DNA contendo o promotor da polimerase T7, ligado de forma operacional à extremidade 5' do genoma viral da hepatite B (HBV)- cerca de 3,4 Kb de comprimento. Assim, o genoma do HBV actua como domínio C e funciona como modelo para a subsequente transcrição, enquanto que o resultante RNA específico de HBV funciona como um transcrito registador. Este fragmento de DNA foi clonado no plasmideo pGEM3Z

(comercialmente disponível na Promega, Inc.- ver Figura 3A). De seguida, um oligómero parcialmente de cadeia simples, correspondendo ao domínio A das sondas modelo, e uma pequena região espaçadora de cadeia dupla (18 nucleótidos) com uma extremidade de coesão foi também preparada (Figura 4). O oligómero foi depois ligado ao promotor/ fragmento de DNA de HBV (domínio B/C), que foram isolados a partir do plasmídeo, por digestão por endonuclease de restrição e subsequente purificação. O tamanho do fragmento varia dependendo das endonucleases de restrição utilizadas para linearizar o plasmídeo (Figura 3A-C).

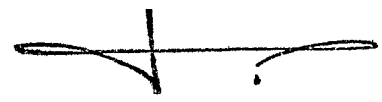
#### A. Sonda modelo pII

##### 1. Promotor T7 (domínio B) e HBV (domínio C)

Um segmento de DNA compreendendo a sequência de consenso T7, orientada com a direção 5' para linearizar o DNA genómico de HBV, foi inserido no local ECORI de pGEM3Z (pGEM3Z-HBV). Após a clonagem, o plasmídeo foi isolado e relinearizado por digestão com Nde I (Figura 3A).

##### 2. O oligómero

Um oligómero de cadeia dupla parcial foi sintetizado, o qual compreende o domínio A e um pequeno domínio de dupla cadeia terminando numa extremidade coesiva complementar à extremidade coesiva criada pela digestão com Nde I. Este oligómero é designado por oligo N. O oligo N compreende as duas cadeias de DNA. A sequência da cadeia X é 5'- GGT CGA CTA ATC GGT AGC-3'. A sequência da cadeia Y é 3'- TCC GTA TCC TGG GCA CAG CCA GCT GAT TAG CCA TCG AT-5'. As cadeias X e Y foram hibridizadas criando



um domínio A de cadeia simples na extremidade 3' da cadeia Y e uma extremidade AT coesiva na extremidade 5' da cadeia Y.

### 3. Ligação


O oligo N e o pGEM3Z-HBV linearizado por Nde I foram ligados, criando um oligonucleótido com oligo N em ambas as extremidades da molécula (Figura 3A). A molécula foi cortado com Hind III, criando dessa forma a sonda modelo designada por pII (Figura 3A). A distância entre o promotor T7 e o domínio A é de 200 pares de bases.

#### B. Sondas modelo pII<sub>L</sub>

A sonda modelo pII<sub>L</sub> foi sintetizada como descrito em A, acima, com a exceção de que o pGEM3Z-HBV foi linearizado com ScaI, criando desse modo uma região espaçadora maior entre o promotor T7 do domínio B e o domínio A (Figura 3B). Neste caso, o oligómero é designado por oligo S e consiste em cadeias X e Y'. O oligo S difere do oligo N dado que não tem extremidade coesiva. A cadeia X é a mesma que a cadeia X no oligo N, mas a cadeia Y' falta o 5'-TA. As cadeias X e Y' foram hibridizadas criando um domínio A de cadeia simples na extremidade 3' da cadeia Y' e uma extremidade não coesiva na extremidade 5' da cadeia Y'. O plasmídeo linearizado e o oligo S foram ligados na extremidade não coesiva. A distância entre o promotor T7 e o domínio A é de 900 pares de bases.

#### C. Sonda Modelo pII<sub>R</sub>

A sonda modelo pII<sub>R</sub> foi sintetizada como descrito em A,



acima, com a exceção de que o pGEM3Z-HBV foi linearizado com Hind III (Figura 3C). O oligômero é designado por oligo H e consiste em cadeias X e Y''. O oligo H difere do oligo N dado que a extremidade coesiva é complementar à extremidade coesiva gerada pela digestão com Hind III. A cadeia X é a mesma que a cadeia X no oligo N, mas a cadeia Y'' tem a sequência 3'- TCC GTA TCC TGG GCA CAG CCA GCT GAT TAG CCA TCG TCGA-5'. As cadeias X e Y'' foram hibridizadas criando um domínio A de cadeia simples na extremidade 3' da cadeia Y'' e a extremidade coesiva TCGA na extremidade 5' da cadeia Y''. O oligo H e o pGEM3Z linearizado com Hind III foram ligados, criando um oligonucleótido com oligo H em ambas as extremidades da molécula (Figura 3C). A molécula foi cortada com Nde I em vez de Hind III, criando assim a sonda modelo designada por pII<sub>R</sub>. Esta sonda difere da pII e da pII<sub>L</sub> dado que a sequência dos domínios é B-C-A. A distância entre o promotor T7 e o domínio A é de 3200 pares de bases.

D. Sondas "linker" e de captura específicas para o HIV.

O ensaio descrito a seguir ( ver Figura 5) é semelhante ao ensaio descrito no Exemplo 2 acima. Dado que o HIV é o analisado, foi necessário criar sondas de captura de analisado e sondas modelo "linker", com sub-domínios homólogos ao genoma do HIV. A sequência destas novas sondas modelo "linker" são fornecidas a seguir. A porção 5' de cada sonda é complementar a uma porção do genoma do HIV, enquanto que as porções 3' são complementares a uma sequência do oligonucleótido de captura imobilizado ( no caso das sondas de captura) ou ao domínio A da

sonda modelo T7 ( no caso das sondas modelo "linker").

Quadro 3

Sondas de captura de analisado

<u>Designação da sonda</u>	<u>Sequência</u>
:HIV.96.1.XT1	TTC TAC TAC TTT [TC]AC CCA TGC [AG]TT TAA AGC TTC TTT GGA GAA AGT GGTG
:HIV.96.2.XT1	TTC TAT TAC TTT [TC]AC CCA TGC [AG]TT CAA AGC TTC TTT GGA GAA AGT GGT G
:HIV.97.XT1	TGC TTG ATG TCC CCC CAC TGT GTT TAG CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.97.2.XT1	TGC CTG GTG TCC TCC AAC TAT GTT CAG CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.53.XT1	AGG TGA TAT GGC [CT]TG ATG TA[CT] CAT TTG CCC CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.54.XT1	CAT GGG TAT [TC]AC TTC TGG GCT [GA]AA [AG]GC CTT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.55.XT1	TTG [TC]GG GGT GGC [TC]CC [TC]TC TGA TAA TGC TGA CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.68.1.XT1	AAT TTT T[GA]A AAT TTT [TC]CC TTC CTT TTC CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.68.2.XT1	AAC TCT T[GA]A AAT TTT [TC]CC TTC CTT TTC CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.99.XT1	TTA CTG GTA CAG T[TC]T CAA TAG G[AG]C TAA T[GT]G CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG
:HIV.100.XT1	TAA C[TC][TC] TTG GGC CAT CCA T[TC]C CTG GCT TTC TTC TTT GGA GAA AGT GGT G
:HIV.101.XT1	CTT TTA TTT TTT CTT CTG TCA ATG GCC ATC



TTC TTT GGA GAA AGT GGT G  
 :HIV.102.XT1 AAA TAC TGG AGT ATT GTA TGG ATT [CT]TC  
 AGC TTC TTT GGA GAA AGT GGT G

Quadro 4

Sondas modelo "linker"

<u>Designação da sonda</u>	<u>Sequência</u>
:HIV.51.LLA2C	TCC [CG]CC GCT TAA TAC [TC]GA CGC TCT CGC ACC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.52.LLA2C	TTA [TA]AT AAT GAT [CT]TA AGT TCT TCT GAT CCT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.56.LLA2C	ACT TCC [CT]CT TGG TTC TCT CAT [CT]TG [GA]CC TGG TTA GGC ATA GGA CCC GT GTC
:HIV.57.LLA2C	TTC [CT]TG AAG GGT ACT AGT[AG]GT TCC TGC TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.58.1.LLA2C	GAT AGG TGG ATT A[CT][TG] TGT CAT CCA T[GC]C TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.58.2.LLA2C	GAT AGG TGG GTT G[TC][TG] TGT CAT CCA T[GC]C TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.59.1.LLA2C	ATT ATC CA[TC] CTT TTA TA[GA] ATT TCT CCT ACT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.59.2.LLA2C	ATT ATC CA[TC] CTT TTA TA[GA] ATG TCT CCC ACT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.60.LLA2C	CTA TAC AT[TC] CTT ACT ATT TTA TTT AAT CCC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.62.LLA2C	TT[CT] GCA TTT TGG ACC A[AG][CG] AAG GTT TCT GTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC
:HIV.63.LLA2C	CTC CCT G[AG]C ATG CTG TCA TCA TTT CTT



CTA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.64.1.LLA2C TTC A[**TG**]T TGG TGT CCT TCC TT[**TC**] CCA CAT  
TTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.64.2.LLA2C TTC A[**TG**]T TGG TGT CCT TCC CT[**TC**] CCA CAT  
CTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.65.LLA2C GCC A[**GA**]A T[**CT**]T TCC CTA AAA AAT TAG CCT  
GTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.98.LLA2C [AG]TC CCA [TG]TC TGC AGC TTC CTC ATT GAT  
[GA]GT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.66.LLA2C ATC ATT TTT GGT TTC CAT [CT]TT C[CT]T GGC  
AAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.67.LLA2C TGT C[**TC**]T ACT TTG ATA AAA CCT CCA ATT  
CCC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.70.LLA2C TCT CCA [TC]TT [AG]GT [AG]CT GTC TTT TTT  
CTT TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.71.LLA2C GTA CTG ATA TC[**TC**] A[**AC**]T CCC TGG TGT  
[CT]TC ATT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.72.LLA2C GGT GAT CCT TTC CAT CCC TGT GG[**ACT**] AGC  
ACA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.73.LLA2C TAA GAT TTT TGT CAT GCT AC[**TA**] [TC]TG GAA  
TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.69.LLA2C AGA [TC]CC TAC ATA CAA ATC ATC CAT GTA  
TTG TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.74.LLA2C TAT TTT TG[**TC**] TCT ATG [CT]TG [CT]CC TAT  
TTC TAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.75.LLA2C ATG [TC]TT TTT [GA]TC TGG TGT GGT AA[GA]  
TCC CCA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.76.LLA2C ATA [AG]CC CAT CCA AAG [GA]AA TGG [AG]GG



TTC TTT TTA GGC ATA GGA CCC GTG GTC  
:HIV.77.LLA2C TA[CT] TAA GTC TTT TGA TGG GTC ATA ATA  
[TC]AC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.78.1.LLA2C TGT TTT CAG ATT TTT AAA TGG [CT]TC TTG  
ATA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.78.2.LLA2C TGT TTT CAG ATT TTT ATA TTG [CT]TC TTG  
GTA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.79.LLA2C G[TC]T AA[TC] TGT TT[TC] ACA TCA TTA GTG  
TGG GCA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.80.LLA2C GGA [GA]T[CT] TTT CCC CAT AT[TC] ACT ATG  
CTT TCT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.81.LLA2C CCC CAT CTA CAT AGA A[GAC]G TTT CTG  
C[TA]C CTA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.82.LLA2C TGC TTG TAA [CT]TC AGT [TC]TT CTG ATT TGT  
TGT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.83.LLA2C ATC TGG TTG TGC TTG AAT [GA]AT [TC]CC  
[TC]AA TGC ATT AGG CAT AGG ACC CGT GTC  
:HIV.84.LLA2C ATC TAC TTG TTC ATT TCC TCC AAT [TC]CC  
TTT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.85.LLA2C TAG CCA TTG CTC TCC AAT T[AG][CT] TGT GAT  
ATT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.86.LLA2C GAC ATT TAT CAC AGC T[GA]G CTA CTA TTT  
C[TC]T TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.87.LLA2C TAT [AG]TA [TG]CC ACT GGC TAC ATG [AG]AC  
TGC TAC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC  
:HIV.88.LLA2C TTT TAC TGG CCA TCT TCC TGC TAA TTT TAT  
TAG GCA TAG GAC CCG TGT C



:HIV.89.LLA2C TAC TCC TTG ACT TTG GGG [AG]TT GTA GGG  
AAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.90.LLA2C TCT [TC]TC CCC TGC ACT GTA [CT]CC CCC AAT  
CCC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.91.LLA2C TAG TTT GTA TGT CTG TTG CTA T[TC]A TG[TC]  
CTA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.92.LLA2C TTT GAA TTT TTG T[AG]A TTT G[TC]T TTT GTA  
[AG]TT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.93.LLA2C TCC AGA G[GTA]A G[CT]T TTG CTG GTC CTT  
TCC AAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.94.LLA2C TAT T[AG]T C[TC]T GTA TTA CTA CTG CCC CTT  
CAC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC


:HIV.95.1.LLA2C TT[GA] CTT TTC TTC TTG GCA CTA CTT TTA  
T[GA]T TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.95.2.LLA2C TT[GA] CTT TTC TTC TTG GTA CTA CCT TTA  
T[GA]T TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

:HIV.103.LLA2C TTT TCT TTT AAA ATT GTG [AG]AT GAA [TC]AC  
TGC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC

D. Comparação das Sondas Modelo pII em Ensaio de Hibridização do HIV em Plasma Humano

Amostras de plasma humano normal com várias quantidades da sequência alvo sintética de HIV foram preparadas como descrito no Exemplo 2. 10 µl do plasma foram adicionados a 12,5 µl de tampão de extração (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%, DNA de esperma de salmão sonificado 40µg/ml, e proteinase K 2mg/ml), e incubadas em cúpulas de placas de microtitulação, a 65°C durante 30 minutos. As cúpulas foram primeiro preparadas




através da ligação de um oligonucleótido de cadeia simples com uma sequência definida ao substrato sólido, como descrito na Exemplo 2. 5 µl de NaOH 1 N com 12,5 fmoles de cúpulas de sondas de captura de HIV e sondas "linker" (descritas acima) foram adicionados e a mistura foi novamente incubada a 65°C durante 30 minutos. De seguida foram adicionados 13 µl de MOPS-SSC (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico 0,77 M, NaCl 1,845 M, citrato de sódio 0,185 M) e a mistura foi novamente a incubar a 65°C durante duas horas.

As cúpulas foram depois lavadas duas vezes com um tampão de lavagem A (0,1 x SSC, SDS 0,1%). A seguir às lavagens foram adicionados 30 fmoles de sonda modelo T7 em 40 µl de mistura "hyb" de cavalo (50 % de soro de cavalo, NaCl 0,6 M, citrato de sódio 0,06 M SDS 1%) e a mistura foi incubada a 55°C durante uma hora. (A mistura de hibridização de cavalo foi preparada da maneira que se segue: para dez ml - 504 µl de água (tratada com dietil pirocarbonato, DEPC), 336 µl de SDS 10%, 60 µl de Tris-HCl 1 M (pH 8), 100 µl de proteinase K 25 mg/ml, 6 ml de soro de cavalo, incubado a 65°C durante duas horas, adicionando-se 1ml de água (tratada com DEPC) e 2ml de 20 x SSC).

As cúpulas foram depois lavadas duas vezes com tampão de lavagem A e duas vezes com tampão de lavagem B (0,1 x SSC). De seguida são adicionados 40 µl de mistura de transcrição (Tris-HCl 40 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 80 unidades de polimerase T7 (New England Biolabs), DTT 10 mM, BSA 0,15 mg/ml, ATP, GTP, UTP, e CTP cada a 1,25 mM, RNAsin 1600 unidades/ml) e a mistura foi incubada num forno a 37°C durante 1,5 horas.

Novas cúpulas foram novamente preparadas através da



ligação de um oligonucleótido de cadeia simples com uma sequência definida ao substrato sólido (descrito no Exemplo 2). A nova cúpula foram adicionados 12,5  $\mu$ l de tampão de extração (proteínase K 2mg/ml), 5 $\mu$ l de soro humano tratado com proteínase K e SDS, 15  $\mu$ l de 20 x SSC, 5  $\mu$ l de SDS 10% contendo 12,5 fmoles de transcritos de sondas de captura e "linker" amplificadoras, e 12,5  $\mu$ l da mistura da primeira cúpula, a qual contém os transcritos de RNA recentemente formados. Esta mistura foi incubada a 65°C durante 2 horas.

De notar que, em contraste com o protocolo do Exemplo 2, os transcritos das sondas de captura e "linker" amplificadoras, são usados para "ensandwichar" o transcrito de RNA (Figura 5). Estas sondas servem por um lado como pontes entre o transcrito e o nucleótido imobilizado, e ainda entre o transcrito e a sonda amplificadora (a ser adicionada).

As cúpulas são depois lavadas duas vezes com tampão de lavagem A. Foram adicionados a cada cúpula 40  $\mu$ l de mistura de hibridização de cavalo contendo 100 fmoles de uma combinação tipo sonda amplificadora (como no Exemplo 2), e incubadas a 55°C durante 15 minutos. As cúpulas foram depois lavadas duas vezes com tampão de lavagem A. Foram adicionados a cada cúpula 40  $\mu$ l de mistura de hibridização de cavalo contendo 100 fmoles de sonda da fosfatase alcalina, e incubadas a 55°C durante 15 minutos. (a mistura de hibridização de cavalo é pré-tratada para remover actividade de RNAase residual, de acordo com a preparação do protocolo descrito atrás, com a excepção de que, após a incubação a 65°C, a solução é arrefecida e são adicionados 60  $\mu$ l de fluoreto de fenil-metil sulfonil 100 mM (PMSF) para inactivar a



proteínase K, e a mistura vai novamente a incubar a 37°C durante 1 hora.

As amostras foram ensaiadas por detecção de fosfatase alcalina como descrito no Exemplo 2, acima. As cúpulas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem A, duas vezes com tampão de lavagem B. Foram adicionados 20 µl do reagente dioxetano e incubadas a 37°C durante 30 minutos e as cúpulas foram depois lidas num luminómetro.

#### E. Resultados

Foram preparados padrões das várias quantidades de DNA de HIV clonado adicionado a amostras de soro humanas e foram ensaiados como descrito acima. Cada padrão foi ensaiado usando uma das três sondas modelo pII T7 descritas acima. A sensibilidade e amplificação estão ilustradas na Figura 6. Como um controlo standard, um padrão de DNA de HIV foi ensaiado usando apenas a sonda de ensaio tipo amplificadora de sinal descrita na publicação de Patente Europeia No. 0317077. O uso da sonda modelo T7 fornece aproximadamente um aumento de 30 vezes na sensibilidade e aproximadamente um aumento de 50 vezes na amplificação relativamente à polimerase não standard.

#### Exemplo 10

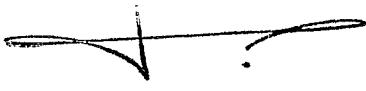
Ensaio de Hibridização para o DNA do Virus da Hepatite C (HCV)  
Usando o Procedimento de Ensaio com Placas de  
Microtitulação e a RNA Polimerase T7

Os ensaios para a presença de DNA e RNA específicos do

HCV são realizados como descrito no Exemplo 9. Conjuntos de sondas modelo "linker" e de captura de analisado são preparados como descrito no Exemplo 2 e concebidas para hibridizar com porções do genoma do HCV. Estas sondas estão descritas nas vulgarmente conhecidas PCT US90/02853, publicada a 18 de Maio de 1990. Cada sonda do conjunto tem 50 mer, na qual os 30 primeiros resíduos na extremidade 5' são complementares a sequências do HCV, e os restantes resíduos são o sistema de sequências específicas de captura de analisado e de modelo "linker", descritas no Exemplo 2.

Da mesma maneira podem ser analisados outras estirpes de bactérias patogénicas, de vírus e parasitas e outros genes que conferem resistência a antibióticos. Será apreciado que o ensaio do invento pode ser adaptado para conduzir múltiplos ensaios para diferentes analisados simultaneamente. Numa das formas, através da mudança de marcador e da sequência da sonda amplificadora para um novo analisado (bem como as sequências específicas do analisado nas sondas de captura de analisado e de modelo "linker"), é possível detectar dois diferentes analisados na mesma amostra na mesma fase sólida. Alternativamente, pela síntese de oligonucleótidos diferentes, ligados ao suporte sólido (Exemplo 2B, acima) para cada analisado, e ligando cada sequência de oligonucleótido de ligação a diferentes posições numa faixa da membrana, é possível realizar vários tipos de ensaios diferentes simultaneamente com o mesmo marcador.

Modificações dos métodos acima descritos para realizar o invento, que são óbvias para os especialistas em química de ácidos nucleicos, e ensaios clínicos e bioquímicos e áreas



relacionadas são entendidas como estando dentro do espírito das reivindicações que se seguem.

### REIVINDICAÇÕES

1- Uma construção polidesoxinucleotídica para utilização como um amplificador de sinal, em ensaios de hibridização, caracterizada pelo facto de compreender três domínios:

(a) um primeiro domínio (A) que é de cadeia simples e possui uma sequência nucleotídica complementar a uma sequência alvo;

(b) um segundo domínio (B) que é de cadeia dupla e capaz de funcionar como um promotor para a actividade da RNA polimerase dependente do DNA; e

(c) um terceiro domínio (C) que é quer de cadeia simples ou dupla e adjacente ao segundo domínio referido, de tal forma que o referido terceiro domínio é capaz de funcionar como um modelo para a actividade do promotor do referido segundo domínio.

2- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto da referida actividade da RNA polimerase dependente do DNA ser derivada a partir do bacteriófago T7.

3- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto da referida actividade da RNA polimerase dependente do DNA, ser proveniente do bacteriófago T3.

4- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme

reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto da referida actividade da RNA polimerase dependente do DNA ser proveniente do bacteriófago SP6.

5- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de o referido primeiro domínio A ter, pelo menos 10, e não mais do que 40 nucleótidos de comprimento.

6- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de o primeiro domínio A ter, pelo menos 15, e não mais do que 30 nucleótidos de comprimento.

7- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 5, caracterizada pelo facto de o referido segundo domínio B ter, pelo menos 12, e não mais do que 40 nucleótidos em comprimento.

8- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 5, caracterizada pelo facto de o referido segundo domínio B ter, pelo menos 17, e não mais do que 30 nucleótidos em comprimento.

9- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 7, caracterizada pelo facto de o referido terceiro domínio C ter, pelo menos 30, e não mais do que 10.000 nucleótidos em comprimento.

10- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 7, caracterizada pelo facto de o referido terceiro domínio C ter, pelo menos 40, e não mais do que 80 nucleótidos em comprimento.

11- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme

reivindicado na reivindicação 7, caracterizada pelo facto de o referido terceiro domínio C ter, pelo menos, 2 Kb e não mais do que 10 Kb em comprimento.

12- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 7, caracterizada pelo facto de o referido terceiro domínio C ter, pelo menos, 3 Kb e não mais do que 4 Kb em comprimento.

13- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 7, caracterizada pelo facto de o referido terceiro domínio C ser constituído, substancialmente, por todo o genoma do vírus da Hepatite B.

14- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de a sequência para o referido segundo domínio B compreender a sequência:

5' -TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'

3' -ATT ATG CTG AGT GAT AT-5'

15- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de a sequência nucleotídica do referido segundo domínio B ser:

5' -CTG GCT TAT CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'

3' -GAC CGA ATA GCT TTA ATT ATG CTG AGT GAT AT-5'

16- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de o resíduo 5' da cadeia superior da sequência nucleotídica, para o referido terceiro domínio C, ser adjacente ao referido segundo domínio B, e ser um resíduo de guanosina.

17- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme

reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a sequência para o referido terceiro domínio C ser:

5' -GGG AGA TGT GGT TGT CGT ACT TAG CGA AAT ACT GTC CGA GTC G-3'

3' -CCC TCT ACA CCA ACA GCA TGA ATC GCT TTA TGA CAG GCT CAG C-5'

18- As construções polidesoxinucleotídicas, conforme reivindicado na reivindicação 17, caracterizada pelo facto da extremidade 3' da cadeia superior da sequência nucleotídica de DNA, do referido segundo domínio B, ser ligada à extremidade 5' da cadeia superior da referida sequência nucleotídica do domínio C.

19- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto do transcrito do referido terceiro domínio C ter dois sub-dominios:

(a) um primeiro sub-domínio,  $c_1$ , que é capaz de hibridizar para um "linker" de captura de oligonucleótido, sendo este "linker" de captura capaz de hibridizar para um polinucleótido imobilizado num substrato sólido; e

(b) um segundo sub-domínio,  $c_2$ , que é capaz de se ligar a um oligonucleótido "linker" amplificador, sendo este "linker" amplificador capaz de se ligar a uma sonda quantificável.

20- Uma construção polidesoxinucleotídica, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de os primeiro e segundo dominios, B e C, estarem presentes em múltiplas unidades de repetição.

21- Um método de amplificação de um sinal biológico, usado para detectar e quantificar um oligonucleótido para análise, num ensaio de hibridização, caracterizado pelo facto de compreender:

(i) a imobilização do analisado referido, directa ou

indirectamente num substrato sólido; e hibridização da construção polidesoxinucleotídica da reivindicação 1, directa ou indirectamente no analisado;

(ii) remoção de construções polidesoxinucleotídicas não hibridizadas;

(iii) transcrição de múltiplas cópias de oligómeros de RNA que são complementares da sequência modelo, c', no referido terceiro domínio, C, da referida construção polidesoxinucleotídica através da actividade da RNA polimerase dependente do DNA; e

(iv) detecção da quantidade de transcritos de RNA formados na fase (iii).

22- Um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de o referido segundo domínio, B, ser proveniente da RNA polimerase dependente do DNA do bacteriófago T7.

23- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de o segundo domínio, B, ser derivado da RNA polimerase dependente do DNA do bacteriófago T3.

24- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de o referido segundo domínio, B, ser derivado da RNA polimerase dependente do DNA do bacteriófago SP6.

25- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto da referida construção polidesoxinucleotídica ser directamente hibridizada para um analisado de cadeia simples.

26- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de a referida construção polidesoxinucleotídica ser hibridizada para um oligonucleótido "linker" , possuindo o referido "linker" um domínio que é capaz de formar híbridos estáveis com o analisado.

27- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de:

(a) um terceiro domínio, C, da referida construção polidesoxinucleotídica ser transcrito na presença de trifosfatos ribonucleotídicos marcados;

(b) os transcritos do referido terceiro domínio possuírem um primeiro sub-domínio, c<sub>1</sub>, complementares a uma sonda de captura oligonucleotídica que se encontra imobilizada num substrato sólido; e

(c) os referidos transcritos são imobilizados e quantificados.

28- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de:

(a) um terceiro domínio, C, da referida construção polidesoxinucleotídica ser transcrito na presença de trifosfatos ribonucleotídicos biotinilizados;

(b) o referido transcrito do referido terceiro domínio possuir um primeiro sub-domínio, c<sub>2</sub>, que é complementar de uma sonda oligonucleotídica marcada; e

(c) os referidos transcritos são imobilizados sobre um substrato sólido avidinilatado; e

(d) os referidos transcritos são quantificados.

29- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme



reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de:

(a) um terceiro domínio, C, da referida construção polidesoxinucleotídica ser transcrito na presença de, ambos os trifosfatos ribonucleotídicos biotinilizados e marcados;

(b) os referidos transcritos são imobilizados sobre um substrato sólido avidinilatado; e

(c) os referidos transcritos são quantificados.

30- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de:

(a) a transcrição do referido terceiro domínio, C, da referida construção polidesoxinucleotídica, possuir dois sub-dominios:

(i) um primeiro sub-domínio,  $c_1$ , que é complementar de uma sonda polinucleotídica de captura, sendo a referida sonda imobilizada num substrato sólido; e

(ii) um segundo sub-domínio,  $c_2$ , que é complementar a uma sonda oligonucleotídica marcada;

(b) o referido transcrito é hibridizado para a referida sonda de captura;

(c) a referida sonda marcada é hibridizada para os referidos transcritos; e,

(d) os referidos transcritos são quantificados.

31 - Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de:

(a) o transcrito do referido terceiro domínio, C, da referida construção polidesoxinucleotídica ter dois sub-dominios:

(i) um primeiro sub-domínio,  $c_1$ , que é complementar de uma sonda de captura do transcrito, sendo a mesma



capaz de hibridizar para um oligonucleótido que foi imobilizado num substrato sólido; e

(ii) um segundo sub-dominio,  $c_2$ , que é complementar de uma sonda "linker", sendo a mesma capaz de hibridizar para um oligonucleótido marcador;

(b) o referido transcrito é hibridizado para a referida sonda de captura do transcrito e para a referida sonda "linker", para formar um transcrito em "sandwich";

(c) o referido transcrito em "sandwich" é hibridizada para um oligonucleótido imobilizado num substrato sólido;

(d) a referida "sandwich" imobilizada é hibridizada para um oligonucleótido marcador; e

(e) os referidos transcritos são quantificados.

32- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de:

(a) o transcrito do referido terceiro dominio,  $C$ , da referida construção polidesoxinucleotídica possuir dois sub-dominios:

(i) um primeiro sub-dominio,  $c_1$ , que é complementar de uma sonda de captura do transcrito, sendo a mesma capaz de hibridizar para um oligonucleótido que tenha sido imobilizado num substrato sólido; e

(ii) um segundo sub-dominio,  $c_2$ , que é complementar de uma sonda "linker" amplificadora, sendo a sonda "linker" capaz de hibridizar para uma sonda amplificadora;

(b) o referido transcrito é hibridizado para a referida sonda de captura do transcrito e para a referida sonda "linker" amplificadora, para formar um transcrito em "sandwich";

(c) o referido transcrito em "sandwich" de transcrito é hibridizado para um oligonucleótido imobilizado num substrato sólido;

(d) a referida "sandwich" imobilizada é hibridizada para uma sonda amplificadora;

(e) a referida sonda amplificadora é hibridizada para um oligonucleótido marcador; e

(f) os referidos transcritos são quantificados.

33- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 32, caracterizado pelo facto de o transcrito de RNA ser transcrito a partir do DNA do Virus da Hepatite B.

34- Um ensaio de hibridização de ácido nucleico, conforme reivindicado na reivindicação 21, caracterizado pelo facto de os referidos segundo e terceiro dominios, B e C, da referida construção polidesoxinucleotídica, estarem presentes em múltiplas unidades de repetição.

35- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 21, usado para detectar a presença de N. gonorrhoeae, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de o analisado compreender um segmento de DNA ou de RNA de N. gonorrhoeae.

36- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 21, usado para detectar a presença do virus da Hepatite B, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de o analisado compreender um segmento DNA ou RNA do virus da Hepatite B.

37- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 21, usado para detectar a presença de bactérias contendo o gene beta-lactamase TEM-1, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto

de o analisado compreender um segmento de DNA ou de RNA do gene da beta-lactamase TEM-1.

38- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 21, usado para detectar a presença de Chlamydia, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de o analisado compreender um segmento de DNA ou de RNA de Chlamydia.

39- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 21, usado para detectar a presença de bactérias contendo o determinante M tet, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de o analisado compreender um segmento de DNA ou de RNA do determinante M tet.

40- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 21, usado para detectar a presença de HIV, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de o analisado compreender um segmento de DNA ou RNA de HIV.

41- Método, conforme reivindicado na reivindicação 21, usado para detectar a presença de HCV, numa amostra biológica, caracterizado pelo facto de o referido analisado compreender um segmento de DNA ou RNA de HCV.

42- Um método de amplificação do sinal biológico usado para detectar e quantificar um receptor ligando, num ensaio de hibridização, caracterizado pelo facto de compreender as seguintes etapas:

(a) imobilização do referido receptor ligando directa ou indirectamente numa fase sólida;

(b) ligação, ao receptor ligando, de um ligando específico para o referido receptor, sendo o referido ligando acoplado a um oligonucleótido complementar do primeiro domínio da



construção da reivindicação 1.

(c) remoção do ligando não hibridizado;

(d) transcrição de múltiplas cópias dos oligómeros de RNA que são complementares da sequência modelo, c', do terceiro domínio, C, da referida construção polidesoxinucleotídica, através da actividade da RNA polimerase dependente do DNA; e

(e) quantificar os transcritos de RNA.

43- Um ensaio de hibridização, conforme reivindicado na reivindicação 42, caracterizado pelo facto de o receptor ligando ser um antigénio, e sendo o ligando um anticorpo que reage imunologicamente com o antigénio.

44- Uma sonda "linker" modelo, especifica para um analisado de DNA ou RNA, substancialmente similar a um DNA genómico do HBV.

45- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TGA CTG [CG]CG ATT GGT [GA]GA GGC AGG [AC]GG AGG TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

46- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CTT G[AT] [CT] GGG [GA]TT GAA GTC CCA ATC TGG ATT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

47- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GTT GCG TCA GCA AAC ACT TGG CA[CG] AGA CC[AT] TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

48- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAA GTT GGC GAG AAA GT(GA) AAA GCC TG[TC] TT[AC] TTA GGC



ATA GGA CCC GTG TC.

49- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto possuir a sequência de DNA: GCA GCA AA(GA) CCC AAA AGA CCC ACA A[TG][TA] C(TG)(TC) TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

50- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATG TAT ACC CA(GA) AGA CA[AG] AAG AAA ATT GGT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

51- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAG AGG ACA AAC GGG CAA CAT ACC TTG [AG]TA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

52- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAT GAG GCA TAG CAG CAG GAT GAA GAG GAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

53- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAT AAA ACG CCG CAG ACA CAT CCA GCG ATA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

54- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GGA CAA [AG]TT GGA GGA CA[GA] GAG GTT GGT GAG TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

55- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTG GAG GTT GGG GAC TGC GAA TTT TGG CCA TTA GGC ATA GGA

CCC GTG TC.

56- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CCA CCA CGA GTC TAG ACT CTG [CT]GG TAT TGT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

57- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAT TCT TGT CAA CAA GAA AAA CCC CGC CTG TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

58- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CAC GAG [CA]AG GGG TCC TAG GAA TCC TGA TGT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

59- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 44, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CAG GGT TTA CTG TTC C[TG]G AAC TGG AGC CAC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

60- Uma sonda de captura para análise, específica para um analizado de DNA ou de RNA substancialmente similar ao DNA genómico do HBV.

61- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 60, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CTT GGC CCC CAA TAC CAC ATC ATC CAT ATA CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

62- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 60, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAA AGC CAA ACA GTG GGG GAA AGC CCT ACG CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

63- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 60, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CAC TGA ACA AAT GGC ACT AGT AAA CTG AGC CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

64- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 60, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAG AAA CGG [AG]CT GAG GCC C[AC]C TCC CAT. AGG CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

65- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 60, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: [GC]CG AAA GCC CAG GA[CT] GAT GGG ATG GGA ATA CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

66- Uma sonda de captura para análise, especifica para um analizado de DNA ou RNA substancialmente similar ao RNA genómico de HIV.

67- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTC TAC TAC TTT [TC]AC CCA TGC [AG]TT TAA AGC TTC TTT GGA GAA AGT GGTG.

68- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTC TAT TAC TTT [TC]AC CCA TGC [AG]TT CAA AGC TTC TTT GGA GAA AGT GGT G.

69- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TGC TTG ATG TCC CCC CAC TGT GTT TAG CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

70- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado



na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TGC CTG GTG TCC TCC AAC TAT GTT CAG CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

71- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: AGG TGA TAT GGC [CT]TG ATG TA[CT] CAT TTG CCC CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

72- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CAT GGG TAT [TC]AC TTC TGG GCT [GA]AA [AG]GC CTT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

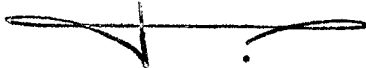
73- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTG [TC]GG GGT GGC [TC]CC [TC]TC TGA TAA TGC TGA CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

74- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: AAT TTT T[GA]A AAT TTT [TC]CC TTC CTT TTC CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

75- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: AAC TCT T[GA]A AAT TTT [TC]CC TTC CTT TTC CAT CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

76- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTA CTG GTA CAG T[TC]T CAA TAG G[AG]C TAA T[GT]G CTT CTT TGG AGA AAG TGG TG.

77- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado



na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAA C[TC][TC] TTG GGC CAT CCA T[TC]C CTG GCT TTC TTC TTT GGA GAA AGT GGT G.

78- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CTT TTA TTT TTT CTT CTG TCA ATG GCC ATC TTC TTT GGA GAA AGT GGT G.

79- Uma sonda de captura para análise, conforme reivindicado na reivindicação 66, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: AAA TAC TGG AGT ATT GTA TGG ATT [CT]TC AGC TTC TTT GGA GAA AGT GGT G.

80- Uma sonda "linker" modelo, especifica para um analisado de DNA ou de RNA substancialmente similar ao RNA genómico do HIV.

81- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TCC [CG]CC GCT TAA TAC [TC]GA CGC TCT CGC ACC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

82- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTA [TA]AT AAT GAT [CT]TA AGT TCT TCT GAT CCT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

83- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ACT TCC [CT]CT TGG TTC TCT CAT [CT]TG [GA]CC TGG TTA GGC ATA GGA CCC GT GTC.

84- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTC [CT]TG AAG GGT ACT AGT [AG]GT TCC TGC TAT TTA GGC ATA



GGA CCC GTG TC.

85- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAT AGG TGG ATT A[CT][TG] TGT CAT CCA T[GC]C TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

86- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAT AGG TGG GTT G[TC][TG] TGT CAT CCA T[GC]C TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

87- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATT ATC CA[TC] CTT TTA TA[GA] ATT TCT CCT ACT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

88- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATT ATC CA[TC] CTT TTA TA[GA] ATG TCT CCC ACT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

89- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CTA TAC AT[TC] CTT ACT ATT TTA TTT AAT CCC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

90- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TT[CT] GCA TTT TGG ACC A[AG][CG] AAG GTT TCT GTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

91- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CTC CCT G[AG]C ATG CTG TCA TCA TTT CTT CTA TTA GGC ATA



GGA CCC GTG TC.

92- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTC A[ TG ]T TGG TGT CCT TCC TT[ TC ] CCA CAT TTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

93- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTC A[ TG ]T TGG TGT CCT TCC CT[ TC ] CCA CAT CTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

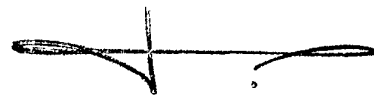
94- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GCC A[ GA ]A T[ CT ]T TCC CTA AAA AAT TAG CCT GTC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

95- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: [ AG ]TC CCA [ TG ]TC TGC AGC TTC CTC ATT GAT [ GA ]GT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

96- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATC ATT TTT GGT TTC CAT [ CT ]TT C[ CT ]T GGC AAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

97- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizado pelo facto de possuir a sequência de DNA: TGT C[ TC ]T ACT TTG ATA AAA CCT CCA ATT CCC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

98- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TCT CCA [ TC ]TT [ AG ]GT [ AG ]CT GTC TTT TTT CTT TAT TTA GGC



ATA GGA CCC GTG TC.

99- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GTA CTG ATA TC[TC] A[AC]T CCC TGG TGT [CT]TC ATT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

100- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GGT GAT CCT TTC CAT CCC TGT GG[ACT] AGC ACA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

101- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAA GAT TTT TGT CAT GCT AC[TA] [TC]TG GAA TAT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

102- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: AGA [TC]CC TAC ATA CAA ATC ATC CAT GTA TTG TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

103- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAT TTT TG[TC] TCT ATG [CT]TG [CT]CC TAT TTC TAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

104- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATG [TC]TT TTT [GA]TC TGG TGT GGT AA[GA] TCC CCA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

105- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATA [AC]CC CAT CCA AAG [GA]AA TGG [AG]GG TTC TTT TTA GGC



ATA GGA CCC GTG GTC.

106- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TA[CT] TAA GTC TTT TGA TGG GTG ATA ATA [TC]AC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

107- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TGT TTT CAG ATT TTT AAA TGG [CT]TC TTG ATA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

108- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TGT TTT CAG ATT TTT ATA TTG [CT]TC TTG GTA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

109- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: G[TC]T AA[TC] TGT TT[TC] ACA TCA TTA GTG TGG GCA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

110- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GGA [GA]T[CT] TTT CCC CAT AT(TC) ACT ATG CTT TCT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

111- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: CCC CAT CTA CAT AGA A[GAC]G TTT CTG C[TA]C CTA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

112- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TGC TTG TAA [CT]TC AGT (TC)TT CTG ATT TGT TGT TTA GGC ATA

GGA CCC GTG TC.

113- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATC TGG TTG TGC TTG AAT [GA]AT [TC]CC [TC]AA TGC ATT AGG CAT AGG ACC CGT GTC.

114- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: ATC TAC TTG TTC ATT TCC TCC AAT [TC]CC TTT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

115- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAG CCA TTG CTC TCC AAT T[AG][CT] TGT GAT ATT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

116- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: GAC ATT TAT CAC AGC T[GA]G CTA CTA TTT C[TC]T TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

117- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAT [AG]TA [TG]CC ACT GGC TAC ATG [AG]AC TGC TAC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

118- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTT TAC TGG CCA TCT TCC TGC TAA TTT TAT TAG GCA TAG GAC CCG TGT C.

119- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAC TCC TTG ACT TTG GGG (AG)TT GTA GGG AAT TTA GGC ATA



GGA CCC GTG TC.

120- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TCT [TC]TC CCC TGC ACT GTA [CT]CC CCC AAT CCC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

121- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAG TTT GTA TGT CTG TTG CTA T[TC]A TG[TC] CTA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

122- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTT GAA TTT TTG T[AG]A TTT G[TC]T TTT GTA [AG]TT TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

123- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TCC AGA G[GTA]A G[CT]T TTG CTG GTC CTT TCC AAA TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

124- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TAT T[AG]T C[TC]T GTA TTA CTA CTG CCC CTT CAC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

125- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TT [GA] CTT TTC TTC TTG GCA CTA CTT TTA T[GA]T TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

126- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TT[GA] CTT TTC TTC TTG GTA CTA CCT TTA T[GA]T TTA GGC ATA

GGA CCC GTG TC.

127- Uma sonda "linker" modelo, conforme reivindicado na reivindicação 80, caracterizada pelo facto de possuir a sequência de DNA: TTT TCT TTT AAA ATT GTG [AG]AT GAA [TC]AC TGC TTA GGC ATA GGA CCC GTG TC.

Lisboa, 10 de Janeiro de 1991

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
O ADVOGADO

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of connected loops and strokes, positioned below the typed text of the agent's name.



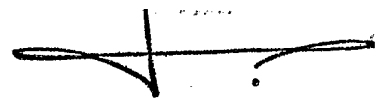
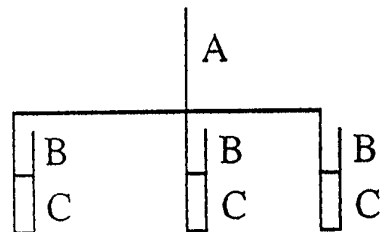


Figure 1-2



C-

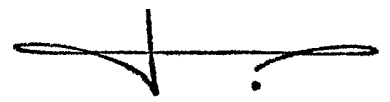
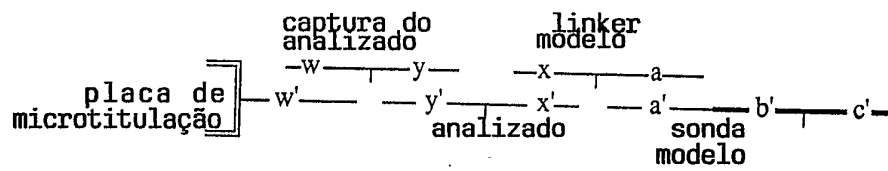


FIGURA 2-1

A -



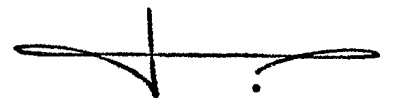
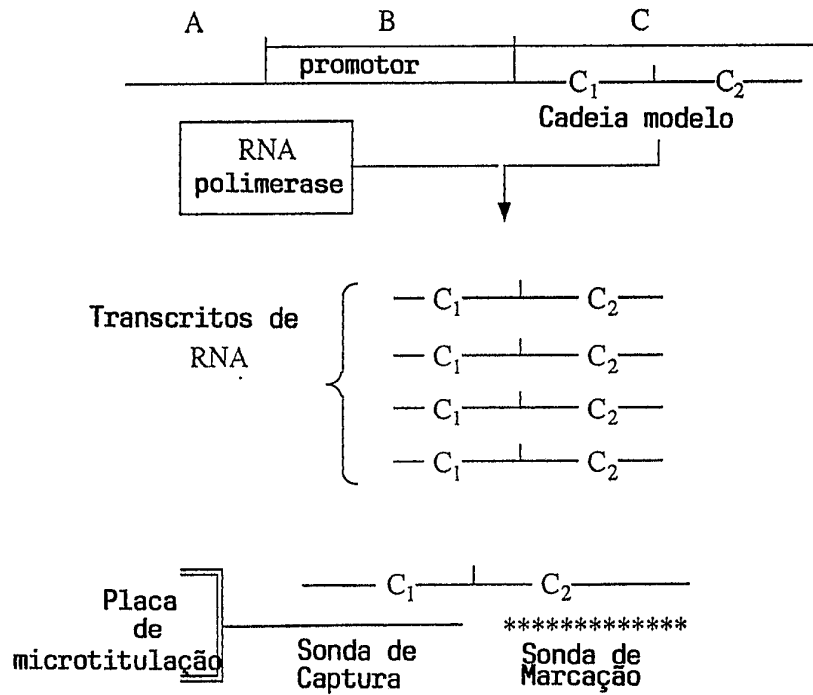


Figura 2-2

B-





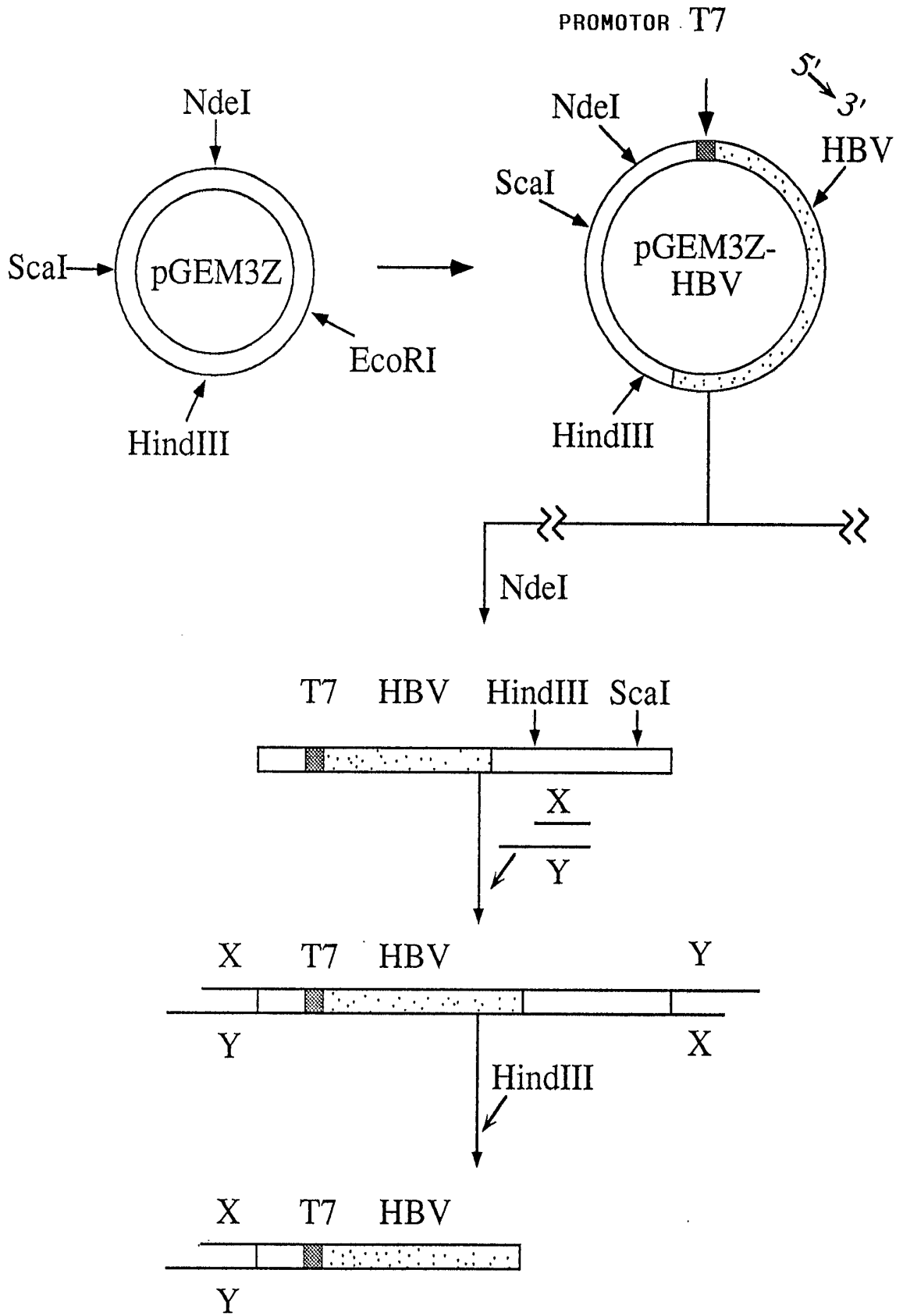
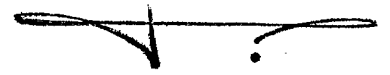


Figure 3A

pII

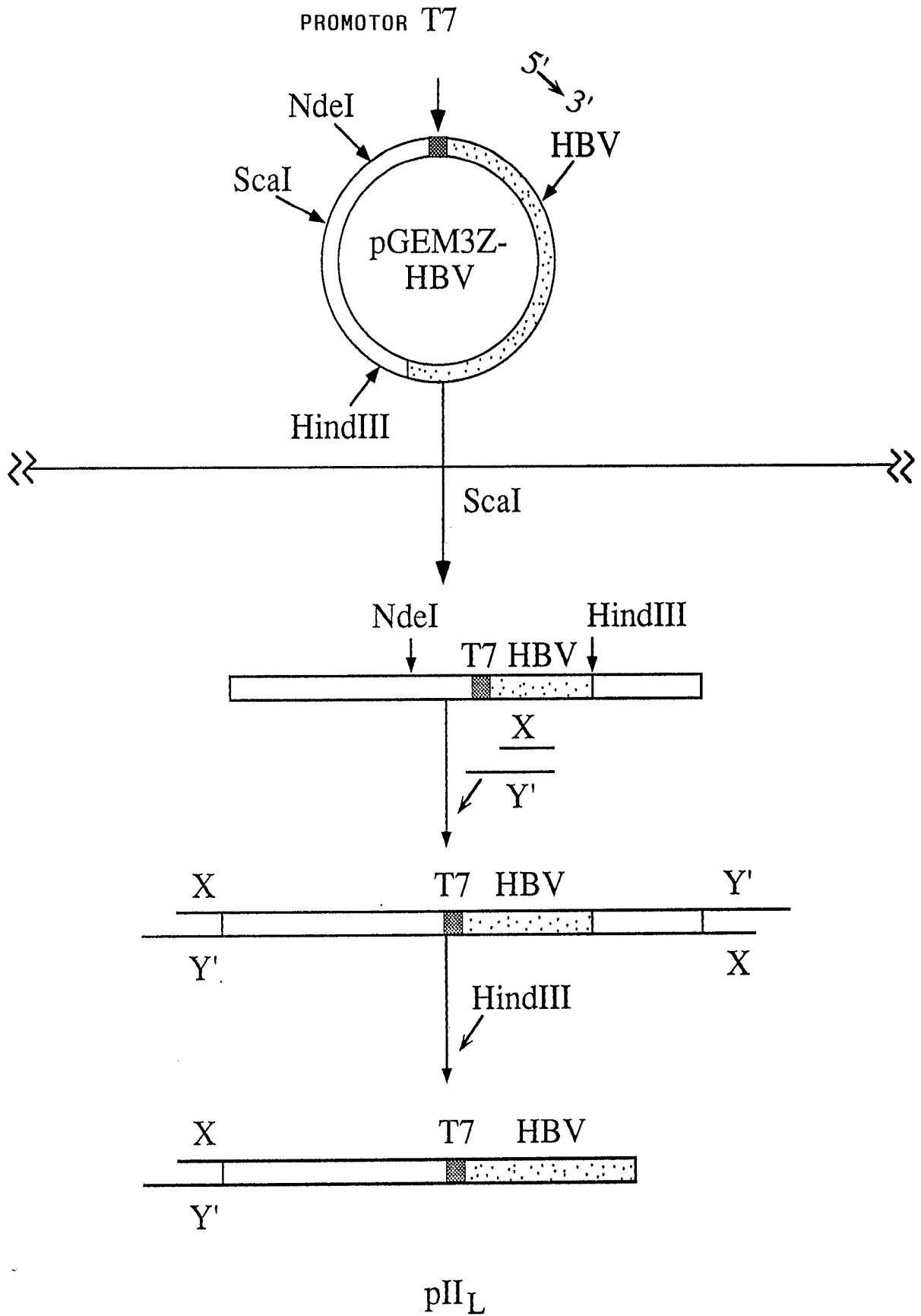
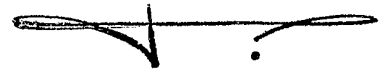


Figure 3B

pII<sub>L</sub>

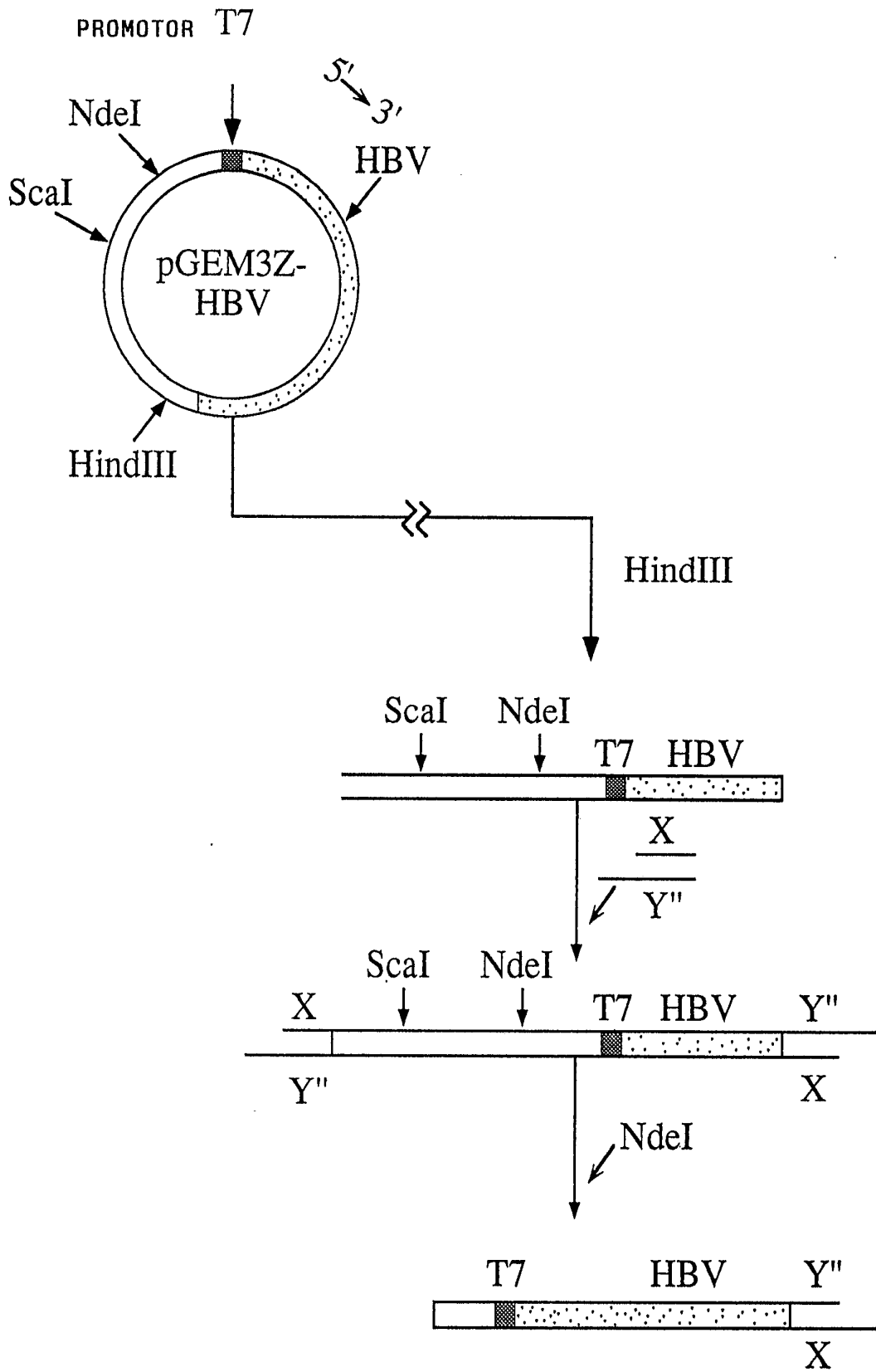


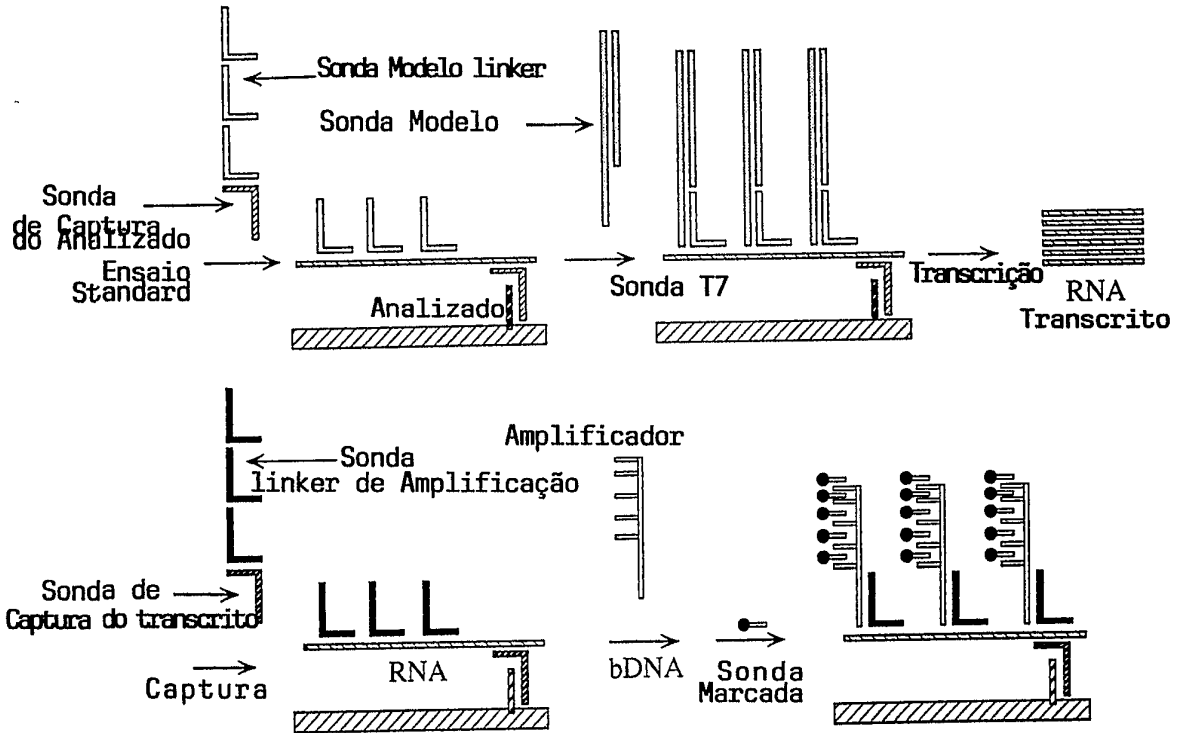
Figure 3C

pII<sub>R</sub>





Figura 5





Sonda Standard Versus PII  
Ensaio T7

