



PI02147416
PI02147416

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

CARTA PATENTE Nº PI 0214741-6

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

(21) Número do Depósito: PI 0214741-6

(22) Data do Depósito: 19/09/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 19/06/2003

(51) Classificação Internacional: C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: 08/12/2001 KR PCT/KR01/02133; 01/05/2002 KR PCT/KR02/00816

(54) Título: INICIADOR DE CONTROLE DE ANELAMENTO PARA MELHORAR A ESPECIFICIDADE DE ANELAMENTO NA AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO, KIT, MÉTODOS PARA AMPLIFICAR SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLÉICO DE UM DNA E SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO ALVO OU UMA MISTURA DE ÁCIDOS NUCLÉICOS, PARA DETECTAR A COMPLEMENTARIDADE DE DNA AO MRNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSO EM DUAS OU MAIS AMOSTRAS DE ÁCIDO NUCLÉICO, PARA AMPLIFICAR RAPIDAMENTE UM FRAGMENTO DE CDNA ALVO, PARA AMPLIFICAR UMA POPULAÇÃO DE CDNAS DE FILAMENTO DUPLO DE COMPRIMENTO COMPLETO COMPLEMENTAR AOS MRNAS, E CDNAS DE FILAMENTO DUPLO ENRIQUECIDOS EM 5' COMPLEMENTARES AOS MRNAS, PARA AMPLIFICAR MAIS DO QUE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO ALVO SIMULTANEAMENTE, PARA PRODUZIR UMA IMPRESSÃO DIGITAL DE DNA DE GDNA, E DE RNA DE UMA AMOSTRA DE MRNA, PARA IDENTIFICAR SEGMENTOS DE HOMOLOGIA CONSERVADA EM UMA FAMÍLIA DE MULTIGENE A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE MRNA, PARA IDENTIFICAR UMA VARIAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO EM UM ÁCIDO NUCLÉICO ALVO, PARA A MUTAGÊNESE EM UM ÁCIDO NUCLÉICO ALVO, E, USO DO INICIADOR.

(73) Titular: SEEGENE, INC., Companhia Coreana. Endereço: 2th Fl, Myungji Bldg., 142-21, Samsung-dong, Kangnam-gu, 135-090, Seoul, República da Coreia (KR).

(72) Inventor: JONG-YOON CHUN

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 12/05/2015, observadas as condições legais.

Expedida em: 12 de Maio de 2015.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes

“INICIADOR DE CONTROLE DE ANELAMENTO PARA MELHORAR A ESPECIFICIDADE DE ANELAMENTO NA AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO, KIT, MÉTODOS PARA AMPLIFICAR SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO DE UM DNA E SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ALVO OU UMA MISTURA DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS, PARA DETECTAR A COMPLEMENTARIDADE DE DNA AO MRNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSO EM DUAS OU MAIS AMOSTRAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO, PARA AMPLIFICAR RAPIDAMENTE UM FRAGMENTO DE CDNA ALVO, PARA AMPLIFICAR UMA POPULAÇÃO DE CDNAS DE FILAMENTO DUPLO DE COMPRIMENTO COMPLETO COMPLEMENTAR AOS MRNAS, E CDNAS DE FILAMENTO DUPLO ENRIQUECIDOS EM 5’ COMPLEMENTARES AOS MRNAS, PARA AMPLIFICAR MAIS DO QUE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO ALVO SIMULTANEAMENTE, PARA PRODUZIR UMA IMPRESSÃO DIGITAL DE DNA DE GDNA, E DE RNA DE UMA AMOSTRA DE MRNA, PARA IDENTIFICAR SEGMENTOS DE HOMOLOGIA CONSERVADA EM UMA FAMÍLIA DE MULTIGENE A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE MRNA, PARA IDENTIFICAR UMA VARIAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO EM UM ÁCIDO NUCLEÍCO ALVO, PARA A MUTAGÊNESE EM UM ÁCIDO NUCLEÍCO ALVO, E, USO DO INICIADOR”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um iniciador de controle de anelamento e suas aplicações. Mais particularmente, a presente invenção diz respeito a um iniciador de controle de anelamento para melhorar a especificidade de anelamento na amplificação de ácido nucleico e suas aplicações a todos os campos da tecnologia envolvida na amplificação de ácido nucleico.

aplicações a todos os campos da tecnologia envolvida na amplificação de ácido nucléico.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

A amplificação de ácido nucléico é um processo central para uma ampla variedade de métodos em biologia molecular, de modo que vários métodos de amplificação foram propostos. Por exemplo, Miller, H. I. et al. (WO 89/06700) divulgam uma amplificação de seqüência de ácido nucléico com base na hibridização de uma seqüência promotora/iniciadora para um DNA de filamento único alvo ("ssDNA") seguida pela transcrição de muitas cópias de RNA da seqüência. Outros procedimentos de amplificação de ácido nucléico conhecidos incluem os sistemas de amplificação com base na transcrição (Kwoh, D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 1173 (1989); e Gingeras T. R. *et al.*, WO 88/10315).

Os esquemas com base na ligação de dois ou mais oligonucleotídeos na presença de ácido nucléico tendo a seqüência do "di-oligonucleotídeo" resultante, amplificando deste modo o di-oligonucleotídeo, também são conhecidos (Wu, D. Y. *et al.*, Genomics 4: 560 (1989)), que são chamados de "Reação em cadeia de Ligação" (LCR).

Davey, C. *et al.* (European Pat. Appln. Publication N° 329.822) divulgam um processo de amplificação de ácido nucléico que envolve sintetizar ciclicamente RNA de filamento único ("ssRNA"), ssDNA, e DNA de filamento duplo (dsDNA). O ssRNA é um primeiro padrão para um primeiro oligonucleotídeo iniciador, que é alongado pela transcriptase reversa (polimerase de DNA dependente de RNA). O RNA é depois removido do duplex DNA:RNA resultante pela ação da ribonuclease H. O ssDNA resultante é um segundo padrão para um segundo iniciador, que também inclui as seqüências de um promotor da RNA polimerase. Este iniciador é depois prolongado pela DNA polimerase, resultando como uma molécula de DNA de filamento duplo ("dsDNA"), tendo uma seqüência idêntica àquela do

RNA original entre os iniciadores e tendo adicionalmente, em uma extremidade, uma seqüência promotora. Esta seqüência promotora pode ser usada pela RNA polimerase apropriada para produzir muitas cópias de RNA do DNA. Estas cópias podem depois re-entrar no ciclo que leva à
5 amplificação muito rápida.

O processo mais predominante para a amplificação de ácido nucléico conhecido como reação em cadeia da polimerase (daqui em diante aludida como “PCR”), está fundamentado em ciclos repetidos de desnaturação de DNA de filamento duplo, seguidos pelo anelamento do
10 iniciador de oligonucleotídeo ao DNA padrão e extensão do iniciador por uma DNA polimerase (Mullis *et al.* Patentes U.S. N^{os} 4.683.195, 4.683.202 e 4.800.159; Saiki *et al.* 1985). Os iniciadores de oligonucleotídeo usados na PCR são planejados para anelarem aos filamentos opostos do DNA e são posicionados de modo que o produto de extensão catalisado pela DNA
15 polimerase de um iniciador possa servir como o filamento padrão para o outro iniciador. O processo de amplificação pela PCR resulta no aumento exponencial de fragmentos de DNA separados cujo comprimento é definido pelas extremidades 5’ dos iniciadores de oligonucleotídeo.

O sucesso nas amplificações de ácido nucléico, em particular a
20 amplificação pela PCR, reside na especificidade com que um iniciador anela apenas às suas seqüências alvo (e não às não alvo) e portanto é importante otimizar esta interação molecular. Se um iniciador pode anelar apenas ao seu complemento perfeito ou também às seqüências que têm um ou mais desacordos, depende criticamente da temperatura de anelamento. No geral,
25 quanto mais alta a temperatura de anelamento, mais específico o anelamento do iniciador ao seu padrão combinado perfeito e assim maior a probabilidade de que apenas a amplificação da seqüência alvo possa ser realizada. Quanto mais baixa a temperatura, mais desacordos entre o padrão e o iniciador podem ser tolerados, o que leva à amplificação aumentada de seqüências não alvo. O

ajuste da temperatura de anelamento pode alterar a especificidade de emparelhamento entre o padrão e o iniciador. Por exemplo, se não existe nenhum produto, a temperatura pode ser muito alta e pode ser reduzida. Se existem produtos no controle onde apenas um iniciador está presente, isto
5 indica que o iniciador único é anelado a mais do que uma região do padrão. Neste caso, a temperatura de anelamento deve ser aumentada. Considerando tal efeito da temperatura de anelamento sobre a especificidade de anelamento do iniciador, permanece uma forte necessidade para um sistema de iniciador de controle de anelamento que seja capaz de controlar o anelamento do
10 iniciador de acordo com a temperatura de anelamento para realçar a especificidade de anelamento do iniciador independente do projeto do iniciador.

Além da temperatura de anelamento, diversos “parâmetros de procura de iniciador” tais como comprimento do iniciador, teor de GC e
15 comprimento de produto de PCR (Dieffenbach *et al.*, 1995) devem ser considerados para a especificidade de anelamento de iniciador. Se um iniciador, que satisfaça todos de tais parâmetros, foi utilizado, o anelamento do iniciador pode ser específico, resultando no realce significativo da especificidade de anelamento do iniciador durante a amplificação do DNA
20 alvo e o desembaraço dos problemas tais como produtos secundários e não específicos que surgem de iniciadores usados nos experimentos. É usual que iniciadores bem planejados possam ajudar a evitar o anelamento não específico e produtos secundários assim como distinguir entre cDNAs ou padrões genômicos na PCR de RNA.

25 Muitos métodos foram desenvolvidos para melhorar a especificidade de anelamento do iniciador e portanto realizar a amplificação do produto desejado. Os exemplos são PCR de contato (Don *et al.*, 1991), PCR de início quente (D'Aquila *et al.*, 1991), PCR abrigada (Mullis e Faloona, 1987) e PCR de reforço (Ruano *et al.*, 1989). Outros métodos

alternativos também reportaram que vários compostos ‘realçadores’ podem melhorar a especificidade da PCR. Os compostos realçadores incluem produtos químicos que aumentam a temperatura de anelamento eficaz da reação, proteínas de ligação de DNA e reagentes comercialmente disponíveis.

5 Entretanto, não existe nenhum aditivo ‘mágico’ que garantirá o sucesso em toda PCR e é muito tedioso testar aditivos diferentes sob condições diferentes tais como a temperatura de anelamento. Embora estes métodos tenham contribuído para a melhora da especificidade de anelamento do iniciador em alguns casos, eles não têm facilitado fundamentalmente o acesso a uma
10 solução para os problemas que surgem dos iniciadores usados na amplificação pela PCR, tais como produtos não específicos e produtos secundários altos.

Em muitos casos, a sequência iniciadora não precisa ser um complemento perfeito para a sequência padrão. A região do iniciador que deve ser perfeitamente emparelhada com o padrão é a extremidade 3’ por que
15 esta extremidade é a região do iniciador prolongado pela DNA polimerase e é portanto a mais importante para garantir a especificidade de anelamento à sequência alvo correta. A extremidade 5’ do iniciador é menos importante na determinação da especificidade de anelamento à sequência alvo e pode ser modificada para carregar sequência adicional tal como sítios de restrição e
20 sequência promotoras que não sejam complementares com o padrão (McPherson e Moller 2000). Esta noção é adaptada para o planejamento dos iniciadores de controle de anelamento desta invenção como descrito abaixo.

As técnicas com base na PCR foram amplamente usadas não apenas para a amplificação de uma sequência de DNA alvo mas também para
25 aplicações ou métodos científicos nos campos da pesquisa biológica e médica tais como a PCR de transcriptase reversa (RT-PCR), PCR de Demonstração Diferencial (DD-PCR), Clonagem de genes conhecidos ou desconhecidos pela PCR, Amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE) e análise genômica com base na PCR (McPherson e Moller, 2000). Os seguintes são

apenas representativos de aplicações da PCR.

As técnicas planejadas para identificar genes que são diferencialmente regulados pelas células sob várias condições fisiológicas ou experimentais (por exemplo, diferenciação, carcinogênese, tratamento farmacológico) têm se tornado central na biologia moderna. Um tal método para triar diferenças na expressão de gene entre vários tipos de célula ou entre estágios diferentes do desenvolvimento celular com a disponibilidade da PCR é conhecido como PCR de Demonstração Diferencial (DD-PCR), descrito por Liang e Pardee em 1992. Este método usa combinações de iniciadores arbitrários de 10 mer com iniciadores de cDNA fixados e gera fragmentos que se originam na maior parte da terminação poli(A) e se estendem a cerca de 50 a 600 nucleotídeos a montante. Combinando-se iniciadores Oligo(dT) fixados em 3' e iniciadores arbitrários 5' curtos, os subconjuntos do transcriptoma são amplificados, os fragmentos de cDNA resultantes são no geral separados em gel de poliacrilamida desnaturante e autorradiograficamente visualizados.

Embora este método seja simples e rápido e apenas requeira quantidades pequenas de RNA total, existem várias desvantagens nos métodos de DD-PCR convencionais. Os padrões de bandeamento diferencial são muitas vezes apenas deficientemente reprodutíveis devido ao uso de iniciador arbitrário curto de modo que muitos laboratórios têm tido dificuldade em obter resultados reprodutíveis com estes métodos. Foi mostrado que pelo menos 40 % das faixas diferencialmente demonstradas não são reprodutíveis entre os experimentos mesmo em mãos bem treinadas (Bauer *et al.*, 1994). Além disso, o padrão de expressão diferencial muitas vezes não pode ser reprodutível nas Northern blots e a porcentagem destes positivos falsos podem surgir em até 90 % (Sompayrac *et al.*, 1995). Como uma modificação usada para uma alternativa, o uso de iniciadores aleatórios mais longos, por exemplo de 20 bases no comprimento não soluciona satisfatoriamente o problema de reprodutibilidade (Ito *et al.*, 1994). Existem

outros fatores responsáveis pela reprodutibilidade relativamente baixa da DD-PCR tais como uma quantidade insuficiente de material de partida e concentração muito baixa de dNTP (2 a 5 μ M) utilizada para preparar os padrões de bandejamento diferentes (Matz e Lukyanov, 1998). Também é
5 difícil detectar transcritos raros com estes métodos (Matz e Lukyanov, 1998). Além disso, por que os fragmentos de cDNA obtidos a partir da DD-PCR são curtos (tipicamente de 100 a 500 pares de base) e correspondem à extremidade 3' do gene que representa principalmente a região não traduzida 3', eles usualmente não contém uma porção grande da região codificadora.
10 Portanto, a triagem de cDNA de comprimento completo de trabalho intensivo é necessária a menos que homologia de sequência significativa, informação para a classificação de gene e prognóstico de função sejam obtidos (Matz e Lukyanov, 1998).

Os Métodos de Demonstração Diferencial no geral usam
15 técnicas de detecção radioativa usando géis de poliacrilamida desnaturantes. A detecção radioativa de produtos de reação restringem o uso desta técnica aos laboratórios com o equipamento apropriado. Tempos de exposição relativamente longos e problemas com a isolamento de faixas de interesse a partir dos géis de poliacrilamida são desvantagens adicionais da técnica de
20 Demonstração Diferencial. Embora modificados métodos de Demonstração Diferencial não radioativos foram recentemente descritos, que incluem o tingimento com prata (Gottschlich *et al.* 1997; Kociok *et al.*, 1998), oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997), pelo uso de iniciadores
25 biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996) e géis de agarose tingidos com brometo de etídio (Rompf e Kahl, 1997; Jefferies *et al.*, 1998; Gromova *et al.*, 1999), estes métodos atingiram apenas sucesso limitado. Se os produtos de reação pudessem ser simplesmente detectados em géis de agarose tingidos com brometo de etídio e os resultados fossem

reprodutíveis e confiáveis, aumentar-se-ia enormemente a velocidade da análise de DD-PCR e evitar-se-ia o uso de radioatividade.

Um outro método com base na PCR chamado de Demonstração Diferencial alvejada usa um iniciador de oligonucleotídeo que

5 direciona a amplificação de membros da família de multigene com domínios de proteína conservada. As famílias de gene são grupos de genes que são muitas vezes funcionalmente caracterizados por um tipo particular de função empreendido pelos produtos de gene em uma célula e que estruturalmente têm uma ou mais regiões conservadas (domínios) em comum. Os exemplos de

10 famílias de gene incluem o MADS-box e a família de homeogene assim como outras famílias de fator de transcrição. As famílias de gene da ciclina, citocina e globina são exemplos de interesse médico. O Banco de Dados Prosite fornece uma lista de proteínas que têm domínios e motivos de seqüência comuns. O oligonucleotídeo usado na PCR pode ser um iniciador específico

15 que é usado em uma temperatura de anelamento baixa ou, como é mais freqüentemente o caso, uma mistura de iniciador degenerado para o uso em severidades mais altas (Stone e Wharton, 1994). Entretanto, as amplificações que usam iniciadores degenerados podem ser algumas vezes problemáticas e podem requerer otimização. É importante manter a temperatura de

20 anelamento tão alta quanto possível para se evitar a amplificação não específica extensiva e uma boa regra prática é usar 55 ° C como uma temperatura de partida. No geral, é difícil manter esta regra por que os iniciadores degenerados devem ser planejados com base nas seqüências de aminoácido ou seqüências de domínio conservado como uma pré condição.

25 De modo a gerar uma relação que satisfaça entre o iniciador degenerado e a temperatura de anelamento neste método, é requerido usar um iniciador de controle de anelamento que possa tolerar a alternância de temperatura de anelamento, particularmente temperatura alta tal como 68 ° C independente do projeto do iniciador.

Ainda uma outra técnica com base na PCR é a PCR imprimada arbitrária (AP-PCR) para a impressão digital de RNA. Uma eficácia excelente dos métodos de AP-PCR é a sua simplicidade (Welsh e McClelland, 1991; Williams *et al.*, 1990). A AP-PCR usa um único iniciador ou um par de iniciadores, em que os iniciadores são 10 mers ou 18 mers como o iniciador mais longo. Este método foi anteriormente usado para fornecer impressões digitais de DNA de linhagens de célula híbrida (Ledbetter *et al.*, 1990) e de regiões genômicas particulares (Welsh e McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Ele fornece uma ferramenta muito útil para a análise genômica na identificação e em estudos populacionais de bactérias, fungos e plantas, onde isolados individuais podem ser rapidamente comparados. Por exemplo, eles podem ser usados como uma ferramenta para identificar patógenos ou a ocorrência de cepas particulares ou patótipos. Habitualmente, a AP-PCR usa um único iniciador para iniciar a síntese de DNA de regiões de um padrão onde o iniciador emparelha imperfeitamente. De modo a que isto funcione, os ciclos iniciais devem ser realizados em severidade baixa (37 a 50 ° C), normalmente para os primeiros cinco ciclos, que permite o anelamento do iniciador aos sítios imperfeitos por todo o genoma. A severidade é depois aumentada (55° C) como para a amplificação padrão pela PCR e a reação é permitida por um adicional de 30 a 35 ciclos. A AP-PCR não é recomendada para o uso em aplicações tais como teste de paternidade onde resultados inequívocos são exigidos, por que produtos não precursores são ocasionalmente produzidos. Embora métodos de AP-PCR alternativos que incluem a AP-PCR abrigada fossem desenvolvidos (McClelland *et al.*, 1993; Ralph *et al.*, 1993), o problema da reprodutibilidade é ainda de interesse principal. Uma preocupação é que os padrões podem variar de dia para dia ou de laboratório para laboratório (ver, por exemplo, Meunier e Grimont, 1993).

Ainda uma outra aplicação com base na PCR é a tecnologia RACE (amplificação rápida de extremidade de cDNA). RACE é um

procedimento para a amplificação de regiões de cDNA que correspondem às extremidades 5' ou 3' de mRNA (Frohman *et al.*, 1988) e foi usado para isolar transcritos raros com sucesso. O iniciador específico de gene pode ser derivado a partir de dados de sequência de um cDNA parcial, exon genômico ou peptídeo. Em 3' RACE, a terminação poliA de moléculas de mRNA é explorada como um sítio de iniciação para a amplificação pela PCR. Os mRNAs são convertidos em cDNAs que usam a transcriptase reversa e um iniciador Oligo-dT como conhecido na técnica. Os cDNAs gerados podem ser depois diretamente amplificados pela PCR usando um iniciador específico de gene e um iniciador que anela à região poliA.

O mesmo princípio como para 3' RACE se aplicam a 5' RACE mas não existe nenhuma terminação poliA. Assim, 5' RACE é fabricado alvejando-se a extremidade 5' de um cDNA por meio de métodos diferentes (Fromont-Racine *et al.*, 1993; Schaefer, 1995; Franz *et al.*, 1999). A maioria dos métodos para o 5' RACE tal como a formação de terminação homopolimérica e a formação de terminação fixada por ligação requer um conjunto de reações enzimáticas depois da conclusão da síntese do primeiro filamento do cDNA (Schaefer, 1995). Cada etapa enzimática tem o potencial para introduzir falhas e destruir a integridade do cDNA. Recentemente, uma alternativa foi introduzida, o chamado método CapFinder (Chenchik *et al.*, 1998; Chenchik *et al.* Patentes U.S. N^{os} 5.962.271 e 5.962.272). A técnica conta com as funções duplas das transcriptases reversas: uma é a atividade de transferase terminal para adicionar nucleotídeos não padronizados à extremidade 3' de um cDNA e a outra é a atividade de mudança de padrão para mudar um padrão para um segundo padrão. Esta propriedade é utilizada durante o ciclo de vida retroviral (Clark, 1988; Kulpa *et al.*, 1997). A transcriptase reversa (RT) do vírus da leucemia de murino Moloney (M-MLV) muitas vezes adiciona de três a quatro resíduos de citosina derivada de não padrão à extremidade 3' de cDNAs recém sintetizados na presença de

manganês ou magnésio alto (Schmidt e Mueller, 1999). Este método permite a amplificação de cDNAs de comprimento completo por que a RT de M-MLV adiciona resíduos C preferencialmente ao cDNA se completo (encapsado) o mRNA serve como padrão.

5 Entretanto, o método CapFinder para os experimentos 5' - RACE podem não ser livres de problemas secundários tais como sujidade de DNA que surge da contaminação dos iniciadores de CapFinder e Oligo-dT, que são usados na síntese de cDNA (Chenchik *et al.*, 1998). Mesmo quantidades residuais destes iniciadores resultam em um alto teor de produtos
10 secundários por que ambos idealmente se adaptam a todos os cDNAs presentes na mistura de reação. Além disso, 3'-RACE e a amplificação de cDNA de comprimento completo têm os mesmos problemas secundários devido à contaminação de iniciadores usados para a síntese de cDNA em que eles geram produtos não específicos na reação de PCR (Chenchik *et al.*,
15 1998). Novos métodos para superar os problemas acima foram recentemente introduzidos. Um método é a PCR sem etapas para suprimir produtos de PCR não desejados (Matz *et al.*, 1999) mas tem sido salientado que este método ainda deixa uma sujidade de DNA ao invés de um único DNA (Schramm *et al.*, 2000). Um outro método que foi introduzido mais recentemente é usar a
20 síntese de fase sólida de cDNA e procedimentos para remover todos os contaminantes usados na síntese de cDNA (Schramm *et al.*, 2000), mas a principal desvantagem desta técnica é ser cara e consumidora de tempo requerendo a síntese de fase sólida de cDNA e os procedimentos que a acompanham. Portanto, estratégias mais eficazes, simples, rápidas e baratas
25 são requeridas para eliminar completamente os problemas que surgem da contaminação dos iniciadores tais como iniciadores Oligo-dT ou CapFinder usados para a síntese de cDNA.

Além das tecnologias RACE, nas tecnologias correntes para a construção de biblioteca de cDNA, as extremidades 5' dos genes tendem a ser

sub-representadas em populações de cDNA, especialmente onde um iniciador poli(dT) é usado durante a síntese do primeiro filamento do cDNA e o material de partida é limitado. Embora vários métodos diferentes foram desenvolvidos para superar este problema, a maioria sofre de limitações comuns que produzem cDNAs de comprimento completo ou cDNAs enriquecidos em 5' com vários problemas inerentes. Estes métodos são complexos ou caros ou consumidores de tempo requerendo-se etapas enzimáticas múltiplas e/ou não são pronunciadamente sensíveis (Carninci *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Guegler *et al.* Patentes U.S. N^{os} 6.083.727 e 6.326.175; Hayashizaki. Patente U.S. N^o 6.143.528). Portanto, existe interesse continuado no desenvolvimento de métodos melhorados para gerar cDNAs de comprimento completo ou enriquecidos em 5', particularmente com o material de partida limitado.

A PCR multiplex é uma outra variante de PCR em que mais do que uma seqüência alvo pode ser simultaneamente amplificada com mais do que um par de iniciadores na mesma reação. Desde a sua primeira descrição em 1988 (Chamberlain *et al.*, 1988), este método tem sido aplicado com sucesso em muitas áreas de teste de DNA, incluindo as análises de supressão de gene (Anônimo, 1992; Henegariu, *et al.*, 1994), a análise de mutação e polimorfismo (Shuber *et al.*, 1993; Mutirangura *et al.*, 1993), a análise quantitativa (Zimmermann *et al.*, 1996) e detecção de RNA (Zou *et al.*, 1998). No campo das doenças infecciosas, a técnica mostrou ser um método valioso para a identificação de vírus, bactérias, fungos e/ou parasitas.

Entretanto, os resultados obtidos com a PCR multiplex são freqüentemente complicados pelos artefatos do procedimento de amplificação. Estes incluem resultados “negativos falsos” devido à falha de reação e resultados “positivos falsos” tais como a amplificação de produtos ilegítimos, que podem ser causados pelo anelamento dos iniciadores para seqüências que são relacionadas mas distintas das seqüências de

reconhecimento verdadeiras. Para o uso na PCR multiplex, um iniciador deve ser planejado de modo que as suas cinéticas de hibridização prognosticadas sejam similares às daquelas dos outros iniciadores usados na reação multiplex da amostra. Embora a temperatura de anelamento e as concentrações de iniciador possam ser calculadas em algum grau, as condições no geral devem ser empiricamente determinadas para cada reação multiplex. Visto que a possibilidade de iniciação não específica aumenta com cada par de iniciador adicional, as condições devem ser modificadas como necessário conforme conjuntos de iniciador individuais são adicionados. Além disso, os artefatos que resultam da competição quanto aos recursos (por exemplo, o esgotamento de iniciadores) são aumentados na PCR multiplex, visto que as diferenças nos rendimentos de fragmentos inadequadamente amplificados são realçadas com cada ciclo. Assim, a otimização das condições de reação para a PCR multiplex pode tornar-se trabalho intensivo e consumidor de tempo. Visto que as PCRs multiplex diferentes podem ter condições de reação únicas, o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico pode tornar-se muito caro.

Portanto, existe uma necessidade na técnica para iniciadores que permitam que reações de PCR multiplex sejam planejadas e realizadas sem etapas de otimização elaboradas, independente das propriedades potencialmente divergentes dos diferentes iniciadores usados. Além disso, existe uma necessidade na técnica para iniciadores que permitam reações de PCR multiplex que, sob as mesmas condições de reação, simultaneamente produzam quantidades equivalentes de cada um dos muitos produtos de amplificação.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), as variações genéticas mais comuns encontradas no genoma humano, são marcadores importantes para identificar locais associados com doença e para estudos fármaco-genéticos (Landegren *et al.*, 1998; Roses, 2000). As SNPs aparecem no genoma humano com uma média de uma vez a cada 1000 pares de base e

totalizando >3 milhões. Uma variedade de métodos foi usada para detectar SNPs. Entretanto, um dos gargalos chave é a amplificação de DNA. Os ensaios mais correntes incluem uma etapa que produz muitas cópias de um segmento curto do DNA de amostra que transpõe cada SNP alvo. Esta
5 amplificação é usualmente necessária por que apenas quantidades pequenas de DNA podem ser colhidas de amostras clínicas típicas. Também, a amplificação melhora a relação de sinal para ruído dos ensaios, aumentando a confiabilidade de detecção. As maioria das técnicas de genotipagem realizam esta amplificação que usa a PCR. O mais importante, a especificidade de
10 amplificação pela PCR é crítica na aplicação da PCR na genotipagem de SNP. Portanto, seria benéfico se os métodos para melhorar a especificidade da PCR estivessem disponíveis e aplicados no desenvolvimento do ensaio de genotipagem de SNP. Também seria benéfico se tais métodos fossem capazes de fornecer análises múltiplas em um único ensaio (ensaios multiplex).

15 Como descrito acima, todos estes métodos e técnicas que envolvem a amplificação de ácido nucléico, em particular a amplificação pela PCR, podem não ser completamente livres das limitações e problemas que resultam da não especificidade de iniciadores usados em cada método, tais como positivos falsos, reprodutibilidade deficiente, produtos secundários altos
20 e assim por diante, embora caminhos melhorados para cada método tenham sido continuamente introduzidos. Portanto, permanece uma necessidade de iniciador novo para melhorar a especificidade de anelamento e métodos, que possam dar origem a resultados verdadeiros.

25 Por todo este pedido, várias patentes e publicações são dadas como referência e citações são fornecidas em parênteses. A divulgação destas patentes e publicações em suas entidades são aqui incorporadas por referência neste pedido de modo a descrever mais completamente esta invenção e o estado da técnica à qual esta invenção pertence.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esforços para solucionar os problemas de tais iniciador convencionais e vários métodos que envolvem a amplificação de ácido nucléico, o presente inventor desenvolveu um novo iniciador de controle de anelamento que pode permitir a amplificação de ácido nucléico com especificidade muito maior e suas aplicações ilimitadas em todos os campos da tecnologia com base na amplificação de ácido nucléico.

Conseqüentemente, é um objetivo desta invenção fornecer um iniciador de controle de anelamento para melhorar a especificidade de anelamento na amplificação de ácido nucléico.

É um outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar uma seqüência de ácido nucléico a partir de um DNA ou uma mistura de ácidos nucléicos como padrão.

É ainda um outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar seletivamente uma seqüência de ácido nucléico alvo a partir de um DNA ou uma mistura de ácidos nucléicos como padrão.

É outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar seletivamente uma seqüência de ácido nucléico alvo a partir de um mRNA.

É ainda outro objetivo desta invenção fornecer um método para detectar a complementaridade de DNA a um mRNA diferencialmente expresso em duas ou mais amostras de ácido nucléico.

É um outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar rapidamente um fragmento de cDNA alvo que compreende uma região de cDNA que corresponde à região da extremidade 3' de um mRNA.

É ainda um outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar um fragmento de cDNA alvo que compreende uma região de cDNA que corresponde à região de extremidade 5' de um mRNA.

É outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar uma população de cDNAs de filamento duplo de comprimento

completo complementares aos mRNAs.

É ainda outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar cDNAs de filamento duplo enriquecidos em 5' complementares aos mRNAs.

5 É um outro objetivo desta invenção fornecer um método para amplificar mais do que uma sequência de nucleotídeo alvo simultaneamente.

É ainda um outro objetivo desta invenção fornecer um método para produzir uma impressão digital de DNA de gDNA.

10 É ainda um outro objetivo desta invenção fornecer um método para produzir uma impressão digital de RNA de uma amostra de mRNA.

É outro objetivo desta invenção fornecer um método para identificar um segmento de homologia conservada em uma família de multigene.

15 É ainda outro objetivo desta invenção fornecer um método para identificar uma variação de nucleotídeo em um ácido nucléico alvo.

É um outro objetivo desta invenção fornecer um método para a mutagenese em um ácido nucléico alvo.

É ainda um outro objetivo desta invenção fornecer um kit que compreende um iniciador de controle de anelamento.

20 É outro objetivo desta invenção fornecer kits para uma variedade de métodos que envolvem a amplificação de ácido nucléico.

É ainda outro objetivo desta invenção fornecer um uso de um iniciador de controle de anelamento para um processo que envolve a amplificação de ácido nucléico.

25 Outros objetivos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição detalhada acompanhadas em conjugação com as reivindicações e desenhos anexos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

As FIGs. 1A e 1B mostram representações esquemáticas para

amplificar seletivamente um ácido nucléico alvo do DNA de filamento duplo (1A) ou mRNA (1B) usando o ACP da presente invenção.

As FIGs. 2A e 2B mostram representações esquemáticas para identificar diferencialmente genes expressos usando o ACP da presente invenção.

A FIG. 3 mostra uma representação esquemática para amplificar um fragmento de cDNA alvo que compreende a região da extremidade 3' que corresponde à extremidade 3' de mRNA usando o ACP da presente invenção.

As FIGs. 4A e 4B mostram as representações esquemáticas para amplificar um fragmento de cDNA alvo que compreende a região de extremidade 5' que corresponde à extremidade 5' de mRNA usando o ACP da presente invenção. O Oligo dT (4A) ou iniciador aleatório (4B) é usado como uma síntese de primeiro cDNA de filamento iniciador.

A FIG. 5 mostra uma representação esquemática para amplificar moléculas de cDNA de comprimento completo complementares às moléculas de mRNA usando o ACP da presente invenção.

A FIG. 6 mostra uma representação esquemática para amplificar moléculas de cDNA enriquecidas em 5' complementares às moléculas de mRNA que compreendem a informação da extremidade 5' usando o ACP da presente invenção.

A FIG. 7A mostra uma representação esquemática para detectar polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) usando o ACP da presente invenção.

A FIG. 7B mostra uma outra representação esquemática para detectar polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) usando o ACP da presente invenção.

A FIG. 8 é uma fotografia em gel de agarose para mostrar o efeito de um grupo de desoxiinosina posicionado entre as porções de

extremidade 3' e 5' de ACP. O cDNA foi amplificado usando RNA total isolado de tecidos de conceito em E4.5 (linhas 1 e 4), E11.5 (linhas 2 e 5) e E18.5 (linhas 3 e 6), com um conjunto dos dT₁₀-JYC2 (SEG ID NO. 29) e ACP10 (linhas 1 a 3) (SEG ID NO. 13) e um conjunto do dT₁₀-ACP1 (SEG ID NO. 30) e ACP10 (linhas 4 a 6), respectivamente.

A FIG. 9 é uma fotografia de gel de agarose para mostrar o efeito de resíduos de desoxiinosina posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' de ACP em associação com a alteração do número de desoxiinosina durante a PCR. As linhas 0, 2, 4, 6 e 8 representa o número de resíduos desoxiinosina, respectivamente.

A FIG. 10A é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os resultados de amplificações de PCR de estágio duplo para Esx1 usando um conjunto de iniciadores EsxN7 e EsxC6 (linha 1) e um conjunto de iniciadores EsxN7-ACP e EsxC6-ACP (linha 2).

A FIG. 10B é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os resultados de amplificações de PCR de estágio duplo para Esx1 usando EsxN1 (linha 1), EsxC2 (linha 2), um conjunto de EsxN1-ACP e EsxC2 (linha 3) e um conjunto de EsxN1-ACP e EsxC2-ACP (linha 4).

A FIG. 10C é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os resultados de amplificações de PCR de estágio duplo para Esx1 usando um conjunto de EsxN3 e EsxC5 (linhas 1 e 2) e um conjunto de EsxN3-ACP e EsxC5-ACP (linha 3).

A FIG. 10D é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os resultados de amplificações de PCR de estágio duplo não interrompida para Esx1 usando o iniciador EsxN1 (linha 1), EsxC2 (linha 2), um par de EsxN1 e EsxC2 (linha 3) e um par de EsxN1-ACP e EsxC2-ACP (linha 4).

A FIG. 11A é uma fotografia de géis de agarose para mostrar exemplos do ACP usado para detectar mRNAs diferencialmente expressos durante o desenvolvimento embriônico usando estágios diferentes de tecidos

de conceito de camundongo. Os cDNAs foram amplificados usando RNA total isolado de tecidos de conceito em E4.5 (linha 1), E11.5 (linha 2) e E18.5 (linha 3), com um conjunto de ACP3 (SEG ID NO. 3) e dT₁₀-ACP1. As faixas indicadas pelas setas representam os fragmentos de cDNA amplificados de mRNAs diferencialmente expressos. Os números das setas indicam os fragmentos de cDNA usados como sondas na análise de Northern blot da FIG. 13.

A FIG. 11B é uma fotografia de géis de agarose para mostrar exemplos do ACP usados para detectar mRNAs diferencialmente expressos durante o desenvolvimento embriônico usando estágios diferentes de tecidos de conceito de camundongo. Os cDNAs foram amplificados usando RNA total isolado de tecidos de conceito em E4.5 (linhas 1-2 e 7-8), E11.5 (linhas 3-4 e 9-10) e E18.5 (linhas 5-6 e 11-12), com um conjunto de ACP5 (SEG ID NO. 5) e dT₁₀-ACP1 (as linhas 1-6) e um conjunto de ACP8 (SEG ID NO. 8) e dT₁₀-ACP1 (linhas 7-12), respectivamente. As faixas indicadas pelas setas representam os fragmentos de cDNA amplificados de mRNAs diferencialmente expressos. Os números das setas indicam os fragmentos de cDNA usados como sondas na análise de Northern blot da FIG. 13.

A FIG. 11C é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os produtos de cDNA amplificados obtidos de estágios diferentes de amostras de conceito de camundongo (E4.5: linhas 1 e 2; E11.5: linhas 3 e 4; E18.5: linhas 5 e 6) usando um conjunto de iniciadores ACP10 e dT₁₀-ACP.

A FIG. 11D é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os produtos de cDNA amplificados obtidos de estágios diferentes de amostras de conceito de camundongo (E4.5: linhas 1 e 2; E11.5: linhas 3 e 4; E18.5: linhas 5 e 6) usando um conjunto de iniciadores ACP14 e T₁₀-ACP1.

A FIG. 12A é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os produtos de cDNA amplificados obtidos de estágios diferentes de amostras de conceito de camundongo (E4.5: linha 1; E11.5: linha 2; E18.5: linha 3) por

uma amplificação de estágio duplo de interrupção única pela PCR usando um conjunto de iniciadores ACP10 e JYC5-T₁₅-ACP.

5 A FIG. 12B é uma fotografia de gel de agarose para mostrar os produtos de cDNA amplificados obtidos de estágios diferentes de amostras de conceito de camundongo (E4.5: linha 1; E11.5: linha 2; E18.5: linha 3) pela amplificação de estágio duplo não interrompida pela PCR usando um conjunto de iniciadores ACP10 e JYC5-T₁₅-ACP.

10 A FIG. 13 mostra a análise de Northern blot de seis fragmentos de cDNA amplificados de mRNAs diferencialmente expressos durante o desenvolvimento embriônico. Os seis fragmentos rotulados com ³²P indicados pelas setas na FIG. 11 foram usados como sondas para a análise de Northern blot. As setas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são DEG1 (FIG. 13A), DEG3 (FIG. 13B), DEG2 (FIG. 13C), DEG8 (FIG. 13D), DEG5 (FIG. 13E) e DEG7 (FIG. 13F), respectivamente, em que os resultados das análise de sequência DEG
15 são mostrados na Tabela 1. DEG2 (SEG ID NO. 31) e DEG5 (SEG ID NO. 32) são fornecidos como genes novos (Tabela 2). Os painéis de controle (a parte inferior de cada painel) mostram cada gel antes do manchamento, tingido com brometo de etídio e fotografado sob luz UV, demonstrando níveis similares de rRNA 18S e 28S como um controle de carregamento.

20 A FIG. 14 mostra os padrões de expressão de um novo gene, DEG5, em um estágio completo de conceitos de camundongo. A análise de Northern blot foi realizada usando o fragmento de cDNA DEG5 radio-rotulado como uma sonda. O RNA total (20 µg/linha) foi preparado a partir de conceitos de camundongo nos tempos de gestação como indicados. O
25 painel de controle na parte inferior mostra um gel antes do manchamento, tingido com brometo de etídio e fotografado sob luz UV, demonstrando níveis similares de rRNA 18S e 28S como um controle de carga.

A FIG. 15 é uma fotografia de gel de agarose para mostrar a diferença entre o 3'-RACE convencional (linha 1) e o 3'-RACE com base no

ACP (linha 2) com respeito ao 3'-RACE com beta-actina.

A FIG. 16 é uma fotografia de gel de agarose para mostrar a diferença entre métodos CapFinder e métodos com base em ACP para JunB (linhas 1 e 2) e beta-actina 5' - RACE (linhas 3 e 4) de camundongo usando o iniciador convencional (linhas 1 e 3) e ACP (linhas 2 e 4), respectivamente.

A FIG. 17 é uma fotografia de gel de agarose para mostrar a diferença entre métodos CapFinder e métodos com base em ACP para PLP-C alfa 5' - RACE de camundongo usando o iniciador convencional (linha 1) e ACP (linhas 2, 3 e 4), respectivamente.

A FIG. 18 mostra os resultados da análise de Northern virtual pelos métodos CapFinder ou métodos com base em ACP para a amplificação de cDNA GAPDH de comprimento completo de camundongo.

A FIG. 19 mostra fotografias de gel de agarose para mostrar os resultados de impressões digitais genômicas de 7 manchas de camundongo usando dois conjuntos diferentes de ACPs arbitrárias.

A FIG. 20 mostra fotografias de gel de agarose para mostrar os produtos amplificados de PCR multiplex pelos métodos convencionais (A) ou métodos com base em ACP (B) para a amplificação de três ácidos nucleicos alvos.

A FIG. 21 mostra fotografias de gel de agarose para mostrar os produtos amplificados de PCR multiplex pelos métodos convencionais (A) ou métodos com base em ACP (B e C) para a amplificação de quatro ácidos nucleicos alvos. O multiplex com base em ACP foi conduzido pela amplificação pela PCR de estágio duplo de interrupção única (B) ou isenta de interrupção (C).

A FIG. 22 mostra uma fotografia de gel de agarose para mostrar os resultados da amplificação específica de alelo para um SNP no exon 4 do gene TP53 humano usando ACP.

A FIG. 23 mostra seis fotografias de gel de agarose que

mostram os resultados das amplificações específicas de alelo usando ACPs para seis SNPs adicionais cada uma presente em gene diferente tal como o receptor beta adrenérgico Beta-2 (ADRB2) (A), Quimiocina (motivo c-c) receptor 5 (CCR5) (B), Interleucina 13 receptor (C), molécula de adesão de leucócito 1 (LAM-1) (D), receptor 3 de taquicinina (TACR3) (E) e Interleucina 1, beta (IL1B) (F).

DESCRIÇÃO DETALHADA DESTA INVENÇÃO

A presente invenção está no geral direcionada a (a) um iniciador de controle de anelamento para a especificidade de amplificação de ácido nucléico e (b) suas aplicações. Os iniciadores de controle de anelamento desta invenção (daqui em diante aludidos como “ACP”) permitem que o anelamento do iniciador seja controlado em associação com a temperatura de anelamento, tal que a especificidade de amplificação de ácido nucléico (em particular, PCR) possa ser significativamente melhorada. O princípio do ACP está fundamentado na composição de um iniciador de oligonucleotídeo tendo porções distintas das extremidades 3’ e 5’ separadas por pelo menos uma base universal ou base não discriminatória. O presente inventor descobriu que o grupo de base universal ou base não discriminatória posicionado entre as porções de extremidade 3’ e 5’ desempenha como um regulador no controle do anelamento do iniciador a um ácido nucléico padrão em associação com a temperatura de anelamento durante a amplificação de ácido nucléico. A presença de grupo residual da base universal ou base não discriminatória posicionado entre as porções de extremidade 3’ e 5’ interrompe o anelamento da porção de extremidade 5’ assim como limita o anelamento do iniciador à porção da extremidade 3’ em certa temperatura de anelamento, que resulta na melhora dramática da especificidade de anelamento. Um grupo de base universal posicionado entre as porções de extremidade 3’ e 5’ do ACP é planejado para definir cada porção. Por estas razões, o ACP é fundamentalmente diferente dos iniciadores convencionais em termos da

função de melhorar a especificidade de anelamento do iniciador sob uma condição de severidade particular durante a amplificação de ácido nucléico.

O ACP desta invenção é significativamente eficaz e amplamente acessível para aplicações com base na amplificação de ácido nucléico. Também, vários problemas relacionados com a especificidade de anelamento do iniciador nas técnicas de PCR convencionais podem ser fundamentalmente resolvidos pelo ACP. Os benefícios principais a serem obtidos do uso do ACP durante a amplificação de ácido nucléico (particularmente PCR) são como segue:

(a) visto que a presença de um grupo de resíduo de base universal posicionado entre as porções de extremidade 3' e 5' restringe o anelamento da porção iniciadora à porção da extremidade 3' sob condições tais que a porção de extremidade 3' anela com o padrão, a seqüência de anelamento de um iniciador pode ser precisamente controlada, o que torna possível planejar um iniciador com um número desejado de seqüência de anelamento. É particularmente útil quando uma porção de anelamento de um iniciador deve ser limitada (por exemplo, na genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), triagem de microssérie de DNA e detecção de genes diferencialmente expressos);

(b) visto que a presença de um grupo de resíduo de base universal posicionado entre as porções de extremidade 3' e 5' interrompe o anelamento da porção de extremidade 5' com o padrão sob condições tais que a porção de extremidade 3' anele com o padrão, eventualmente a porção de extremidade 5' não envolvida no anelamento fornece a porção de extremidade 3' com a especificidade de anelamento do iniciador;

(c) a especificidade de anelamento do iniciador é altamente sensível o bastante para detectar mesmo uma má combinação de base única. Assim, é particularmente útil para a identificação de uma variação de nucleotídeo em um ácido nucléico alvo, incluir, por exemplo, polimorfismos

de nucleotídeo único e mutações pontuais;

(d) o ACP é capaz de fornecer um iniciador com uma tolerância alta em “parâmetros de procura de iniciador” para planejar o iniciador tal como o comprimento do iniciador, temperatura de anelamento, 5 teor de GC e comprimento de produto de PCR;

(e) o sistema ACP fornece amplificações pela PCR de estágio duplo que permitem que os produtos sejam excluídos da amplificação não específica;

(f) a eficiência de amplificação pela PCR é aumentada, o que 10 torna mais fácil detectar mRNAs raros; e

(g) a reprodutibilidade de produtos de PCR é aumentada, o que economiza uma enorme quantidade de tempo e custo.

Princípio do ACP

Em um aspecto desta invenção, é fornecido um iniciador de 15 controle de anelamento para melhorar a especificidade de anelamento na amplificação de ácido nucléico, que compreende: (a) uma porção de extremidade 3' tendo uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a um sítio em um ácido nucléico padrão para hibridizar com ela; (b) uma porção de extremidade 5' tendo uma sequência de 20 nucleotídeo pré selecionada arbitrária; e (c) uma porção reguladora posicionada entre a dita porção de extremidade 3' e a dita porção de extremidade 5' que compreende pelo menos uma base universal ou base não discriminatória análoga, por meio da qual a dita porção reguladora é capaz de regular uma porção de anelamento do dito iniciador em associação com a 25 temperatura de anelamento.

O princípio do ACP está fundamentado na composição de um iniciador de oligonucleotídeo tendo porções de extremidade 3' e 5' distintas separadas por uma porção reguladora que compreende pelo menos uma base universal ou base não discriminatória e no efeito da porção reguladora sobre

as porções de extremidade 3' e 5' no iniciador de oligonucleotídeo. A presença da porção reguladora que compreende pelo menos uma base universal ou base não discriminatória entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP atua como um fator principal que é responsável pela melhora de especificidade de anelamento do iniciador.

O termo “padrão” refere-se ao ácido nucléico. O termo “ácido nucléico” é um polímero de desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos na forma de filamento único ou duplo, incluindo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais a menos que de outro modo indicado. Portanto, o ACP desta invenção pode ser utilizado na amplificação de ácido nucléico usando gDNA, cDNA ou mRNA de filamento único ou duplo como padrão. O termo “porção” aqui usada em conjunção com o iniciador desta invenção refere-se a uma sequência de nucleotídeo separada pela porção reguladora. O termo “porção de extremidade 3'” ou “porção de extremidade 5'” refere-se a uma sequência de nucleotídeo na extremidade 3' ou extremidade 5' do iniciador desta invenção, respectivamente, que é separada pela porção reguladora.

O termo “iniciador” como aqui usado refere-se a um oligonucleotídeo, seja de ocorrência natural ou sinteticamente produzido, que é capaz de atuar como um ponto de início de síntese quando colocado sob condições em que a síntese de extensão do produto iniciador que é complementar a um filamento de ácido nucléico (padrão) é induzida, isto é, na presença de nucleotídeos e um agente para a polimerização tal como DNA polimerase e em uma temperatura e pH adequados. O iniciador é preferivelmente de filamento único para a eficiência máxima na amplificação. Preferivelmente, o iniciador é um oligodesoxirribonucleotídeo. O iniciador desta invenção pode ser compreendido de dNMP que ocorre naturalmente (isto é, dAMP, dGM, dCMP e dTMP), nucleotídeos modificados ou nucleotídeos não naturais. O iniciador também pode incluir ribonucleotídeos. O iniciador deve ser suficientemente longo para preparar a síntese de produtos

Preferivelmente, taxas de vazamento menores do que $10 \text{ cm}^3/\text{min}$, mais preferivelmente menores do que $5 \text{ cm}^3/\text{min}$, podem ser obtidas. As válvulas de exalação que foram produzidas de acordo com a presente invenção podem demonstrar uma taxa de vazamento na faixa de cerca de 1 a $10 \text{ cm}^3/\text{min}$.

5 A queda de pressão de abertura da válvula mede a resistência ao levantamento inicial da aba da superfície de selagem da válvula. Este parâmetro pode ser determinado como descrita abaixo no Teste de Queda de Pressão. Tipicamente, a queda de pressão de abertura de válvula a 10 l/min é menor do que 30 Pa, preferivelmente menor do que 25 Pa e, mais
10 preferivelmente, menor do que 20 Pa, quando testando uma válvula de acordo com o Teste de Queda de Pressão descrita abaixo. Tipicamente, a queda de pressão de abertura de válvula é de cerca de 5 a 30 Pa a 10 l/min , quando testando uma válvula de acordo com o Teste de Queda de Pressão descrita abaixo.

15 Exemplos de materiais de que a primeira camada da aba flexível pode ser produzido incluem aqueles que promoveriam uma boa selagem entre a aba flexível e a sede de válvula. Estes materiais podem geralmente incluir elastômeros, tanto termocurados como termoplásticos, e termoplásticos/plastômeros.

20 Os elastômeros, que podem ser elastômeros termoplásticos ou borrachas reticuladas, podem incluir materiais borrachosos, tais como poliisopreno, borracha de poli (estireno-butadieno), polibutadieno, borracha butílica, borracha de etileno-propileno-dieno, borracha de etileno-propileno, borracha de nitrila, borracha de policloropreno, borracha de polietileno clorado,
25 borracha de polietileno clorossulfonada, elastômero de poliacrilato, borracha de etileno-acrílico, elastômeros contendo flúor, borracha de silicone, poliuretano, borracha de epicloroidrina, borrada de óxido de propileno, borracha de polissulfeto, borracha de polifosfazeno e borracha de látex, elastômero de copolímero em bloco de estireno-butadieno-estireno, elastômero de copolímero

preferivelmente pelo menos 8 nucleotídeos de desoxitimidina, mais preferivelmente pelo menos 10 nucleotídeos de desoxitimidina e o mais preferivelmente, pelo menos 10 nucleotídeos contíguos de desoxitimidina. Para o processo que envolve a transcrição reversa como acima, em uma forma

5 de realização, a porção de extremidade 3' da ACP tem pelo menos 10 nucleotídeos contíguos de desoxitimidina tendo 3'-V na sua extremidade 3'; em que V é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxicitidina e desoxiguanosina, em uma outra forma de realização, pelo menos 10 nucleotídeos contíguos de desoxitimidina tendo 3'-NV na sua

10 extremidade 3'; em que V é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxicitidina e desoxiguanosina e N é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxicitidina e desoxiguanosina.

Além disso, onde o ACP é utilizado na amplificação de uma

15 seqüência de ácido nucléico alvo, a sua porção de extremidade 3' compreende uma seqüência de nucleotídeo substancialmente complementar a uma seqüência alvo; na PCR de Demonstração Diferencial, uma seqüência arbitrária substancialmente complementar a um sítio em um cDNA de um mRNA; no RACE, uma seqüência específica de gene substancialmente

20 complementar a um sítio em um cDNA de um mRNA; na amplificação de cDNAs enriquecidos em 5', uma seqüência aleatória de pelo menos seis nucleotídeos substancialmente complementares aos sítios em mRNAs; na identificação de segmento de homologia conservada, uma seqüência de nucleotídeo substancialmente complementar a uma seqüência de consenso

25 encontrada em uma família de gene ou seqüência degenerada selecionada de uma pluralidade de combinações de nucleotídeos que codificam uma seqüência de aminoácido predeterminada; na identificação de uma variação de nucleotídeo (por exemplo, sítio alélico) em um ácido nucléico alvo, uma seqüência de nucleotídeo que compreende um nucleotídeo complementar ao

nucleotídeo correspondente de uma variação de nucleotídeo; e na mutagênese, uma seqüência de nucleotídeo que compreende pelo menos um nucleotídeo de ligação inespecífica a um ácido nucléico alvo.

O termo seqüência de nucleotídeo “arbitrária” é aqui usado para significar a seqüência de nucleotídeo que é escolhida sem o conhecimento da seqüência dos ácidos nucléicos alvos a serem amplificados. O termo arbitrária não deve ser confundido com “aleatória” em referência ao iniciador que significa um iniciador composto de uma população aleatória de iniciadores cada um de seqüência diferente e aleatória. O termo seqüência “degenerada” em conjunção com ACP para a identificação de segmento de homologia conservada refere-se à seqüência de nucleotídeo que é deduzida da seqüência de aminoácido, de modo que a seqüência degenerada possa formar um agrupamento das seqüências de nucleotídeo de uma seqüência de aminoácido devido à degenerescência do códon genético.

De acordo com uma forma de realização preferida do ACP, a seqüência de nucleotídeo arbitrária pré selecionada da porção de extremidade 5' não é substancialmente complementar a nenhum sítio no ácido nucléico padrão.

De acordo com uma forma de realização preferida, os iniciadores de controle de anelamento desta invenção podem ser representados por uma fórmula geral (1) de 5' - X_p - Y_q - Z_r - 3', em que X_p representa a porção de extremidade 5' tendo a seqüência de nucleotídeo arbitrária pré selecionada substancialmente não complementar a nenhum sítio no ácido nucléico padrão; Y_q representa a porção reguladora que compreende pelo menos uma base universal ou base não discriminatória análoga; Z_r representa a porção de extremidade 3' tendo uma seqüência de nucleotídeo substancialmente complementar a um sítio no ácido nucléico padrão; em que p, q e r representam o número de nucleotídeos; e em que X, Y e Z são desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos.

A porção reguladora que compreende pelo menos uma base universal ou base não discriminatória análoga é responsável pela função principal do ACP em associação com a alteração da temperatura de anelamento durante a amplificação de ácido nucléico. O termo “base universal ou base não discriminatória análoga” aqui usado refere-se a um capaz de formar pares de base com cada uma das bases de DNA/RNA naturais com pouca discriminação entre elas.

Foi amplamente conhecido que nucleotídeos em algumas posições ambíguas de iniciadores degenerados foram substituídos pela base universal ou um análogo não discriminatório tal como desoxiinosina (Ohtsuka *et al.*, 1985; Sakanari *et al.*, 1989), 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol (Nichols *et al.*, 1994) e 5-nitroindol (Loakes e Brown, 1994) para solucionar os problemas de planejamento associados com os iniciadores degenerados por que tais bases universais são capazes de emparelhar base de modo não específico com todas as quatro bases convencionais. Entretanto, não há qualquer relato de que esta base universal ou um análogo não discriminatório tal como desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol e 5-nitroindol sejam usadas para aumentar a especificidade de anelamento do iniciador durante a PCR.

A presença da base universal tal como desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol e 5-nitroindol em um iniciador gera temperaturas de anelamento baixas devido às suas interações de ligação de hidrogênio mais fracas no emparelhamento de base. Como uma extensão desta teoria, o presente inventor induziu que a presença das bases universais contíguas entre a extremidade 3' e a extremidade 5' de um iniciador poderia gerar uma região que tivesse temperatura de fusão mais baixa, forma um limite para cada uma das porções de extremidade 3' e 5' do iniciador e afeta o anelamento de cada porção, respectivamente. Esta teoria fornece a base dos iniciadores de controle de anelamento desta invenção.

Em uma forma de realização preferida, o ACP contém pelo menos 2 resíduos de base universal ou base não discriminatória análoga entre as seqüências das porções de extremidade 3' e 5', mais preferivelmente, pelo menos 3 bases universais ou bases não discriminatórias análogas.

5 Vantajosamente, os resíduos de base universal entre as seqüências das porções de extremidade 3' e 5' podem ser de até 15 resíduos no comprimento. De acordo com uma forma de realização, o ACP contém de 2 a 15 resíduos de base universal ou base não discriminatória análoga. O mais preferivelmente, as bases universais entre as seqüências das porções de extremidade 3' e 5' são
10 de cerca de 5 resíduos no comprimento.

Com referência ao número ótimo de base universal, isto é, 5 resíduos, o número mínimo de resíduos de base universal entre as porções de extremidade 3' e 5' de ACP é preferido de modo a interromper o anelamento da porção de extremidade 5' com o padrão durante a amplificação de ácido
15 nucléico em certa temperatura de anelamento. É muito provável que o comprimento da base universal na seqüência (8 a 10 bases) não faça uma diferença significativa na sua própria função no ACP.

O uso de resíduos de base universal entre as seqüências das porções de extremidade 3' e 5' é considerado como uma característica chave
20 na presente invenção por que ele fornece cada porção (extremidades 3' e 5') com uma especificidade de anelamento distinta em associação com uma temperatura de anelamento durante a amplificação de ácido nucléico, por exemplo PCR.

De acordo com uma forma de realização preferida, a base
25 universal ou base não discriminatória análoga na porção reguladora inclui desoxiinosina, inosina, 7-desaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, desóxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3-nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, 1-(2'-desóxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desóxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe 5-nitroindol, 2'-F 5-nitroindol,

desóxi 4-nitrobenzimidazol, 4-nitro-benzimidazol, desóxi 4-aminobenzimidazol, 4-aminobenzimidazol, desóxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobenzimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobenzimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobenzimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4-nitrobenzimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-0-metoxietil inosina, 2'-0-metoxietil nebularina, 2'-0-metoxietil 5-nitroindol, 2'-0-metoxietil 4-nitrobenzimidazol, 2'-0-metoxietil 3-nitropirrol e combinações destes, mas não a eles limitadas. Mais preferivelmente, a base universal ou base não discriminatória análoga é desoxiinosina, 1-(2'-desóxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ou 5-nitroindol, o mais preferivelmente, desoxiinosina.

O comprimento preferido de um iniciador de oligonucleotídeo, como aqui usado, é determinado a partir da especificidade desejada de anelamento e do número de oligonucleotídeos tendo a especificidade desejada que são requeridos para hibridizar com o padrão. Por exemplo, um iniciador de oligonucleotídeo de 20 nucleotídeos é mais específico do que um iniciador de oligonucleotídeo de 10 nucleotídeos por que a adição de cada nucleotídeo a um oligonucleotídeo aumenta a temperatura de anelamento do iniciador com o padrão.

Os comprimentos das seqüências das porções de extremidade 3' e 5' do ACP podem variar e dependem em parte do objetivo de cada aplicação que usa o ACP. Em uma forma de realização preferida, a porção de extremidade 3' do ACP é de pelo menos 6 nucleotídeos no comprimento, que é considerado uma exigência mínima de comprimento para o anelamento do iniciador. Mais preferivelmente, a seqüência da porção de extremidade 3' é de 10 a 25 nucleotídeos e pode ser de até 60 nucleotídeos no comprimento. Em uma outra forma de realização, a porção de extremidade 3' do ACP pode

incluir ribonucleotídeos assim como desoxirribonucleotídeos.

Em uma outra forma de realização preferida, a porção de extremidade 5' do ACP contém pelo menos 15 nucleotídeos no comprimento, que é considerado uma exigência mínima de comprimento para anelamento sob condições de alta severidade. Preferivelmente, a sequência da porção de extremidade 5' pode ser de até 60 nucleotídeos no comprimento. Mais preferivelmente, a sequência da porção de extremidade 5' é de 6 a 50 nucleotídeos, o mais preferivelmente, de 20 a 25 nucleotídeos no comprimento. O ACP inteiro é preferivelmente de 35 a 50 nucleotídeos no comprimento e pode ser de até 100 nucleotídeos no comprimento.

A porção de extremidade 5' do ACP tem uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária substancialmente não complementar a nenhum sítio no ácido nucléico padrão e esta sequência de nucleotídeo pode servir como um sítio de iniciação para a amplificação subsequente. O termo sequência de nucleotídeo "arbitrária pré selecionada" aqui usada refere-se como qualquer sequência de desoxirribonucleotídeo, ribonucleotídeo ou desoxirribonucleotídeo misto definida ou pré selecionada contendo uma sequência particular de nucleotídeos naturais ou modificados. Em alguma forma de realização, a sequência de nucleotídeo arbitrária pré selecionada da porção de extremidade 5' pode ser composta de uma sequência iniciadora universal tal como a sequência promotora T3, sequência promotora T7, sequência promotora SP6 e sequência universal avançada ou reversa M13. Usando uma sequência arbitrária mais longa (cerca de 25 a 60 bases) na porção de extremidade 5' do ACP reduz a eficiência do ACP, sequências mais curtas (cerca de 15 a 17 bases) reduzem a eficiência de anelamento em condições de alta severidade do ACP. Também é uma característica chave da presente invenção usar uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária na porção de extremidade 5' do ACP como um sítio de iniciação para a amplificação subsequente.

De acordo com uma forma de realização da presente invenção, algumas modificações na porção de extremidade 5' do ACP podem ser feitas a menos que as modificações anulem as vantagens do ACP, isto é, a melhora na especificidade de anelamento. Por exemplo, a porção de extremidade 5' pode compreender uma seqüência ou seqüências reconhecidas por uma endonuclease ou endonucleases de restrição, o que torna praticável clonar o produto amplificado no vetor adequado. Além disso, a porção de extremidade 5' pode compreender pelo menos um nucleotídeo com um rótulo para a detecção ou isolamento de produto amplificado. Os rótulos adequados incluem, mas não são limitados aos, fluoróforos, cromóforos, quimioluminescedores, partículas magnéticas, radioisótopos, rótulos de massa, partículas de elétron denso, enzimas, cofatores, substratos para enzimas e haptenos tendo parceiros de ligação específicos, por exemplo, um anticorpo, estreptavidina, biotina, digoxigenina e grupo quelante. A porção de extremidade 5' também compreende promotor de bacteriófago da região da RNA polimerase.

De acordo com a forma de realização preferida desta invenção, o ACP é aplicado à PCR. Mais preferivelmente, a PCR é realizada sob uma primeira e uma segunda temperatura de anelamento, isto é, sob condições severas diferentes. A primeira temperatura de anelamento pode ser igual ou mais baixa do que a segunda temperatura de anelamento e preferivelmente, a segunda temperatura de anelamento é mais alta do que a primeira temperatura de anelamento. No processo da PCR realizado sob duas temperaturas de anelamento diferentes, isto é, a PCR de estágio duplo, a extremidade 3' do ACP está envolvida no anelamento na primeira temperatura de anelamento e a extremidade 5' do ACP incorporada no produto amplificado do primeiro estágio de amplificação serve como um sítio de iniciação na segunda temperatura de anelamento. Neste caso, as vantagens do ACP serão demonstradas de acordo com as seguintes hipóteses:

(1) visto que uma porção reguladora do ACP é composta de

pelo menos uma base universal ou análogo não discriminatório que tem T_m mais baixa do que a outra porção no ACP devido às suas interações de ligação de hidrogênio mais fracas no emparelhamento de base, a porção reguladora do ACP não é favorável no anelamento com o ácido nucléico padrão sob as condições em que a porção de extremidade 3' do ACP anela a um sítio do padrão em uma primeira temperatura de anelamento. Conseqüentemente, a presença de uma porção reguladora que compreende pelo menos uma base universal ou análogo não discriminatório entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP restringe a porção de anelamento do iniciador à porção de extremidade 3' na primeira temperatura de anelamento;

(2) a porção de extremidade 5' que não está envolvida no anelamento sob a primeira temperatura de anelamento mantém a perturbação do anelamento da porção de extremidade 3' com o padrão;

(3) assim, a força em que o anelamento da seqüência da porção de extremidade 3' específica ocorre é relativamente mais forte do que a força em que o anelamento não específico ocorre, sob a primeira temperatura de anelamento, o que resulta na melhora de especificidade de anelamento do iniciador na porção de extremidade 3';

(4) onde a porção de extremidade 5' compreende uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária, a porção serve como um sítio de iniciação em uma segunda temperatura de anelamento, que são condições de alta severidade e também deve ser mais alta do que a primeira temperatura de anelamento, para a amplificação subsequente do produto de reação gerado a partir do anelamento e extensão da seqüência da porção de extremidade 3'; e

(5) conseqüentemente, apenas o produto de reação gerado a partir do anelamento e extensão da seqüência da porção de extremidade 3' pode ser amplificado próximo ao ótimo teórico de um aumento de duas vezes do produto para cada ciclo de PCR sob a segunda temperatura de anelamento.

Portanto, a porção de extremidade 3' do ACP atua apenas como sítio de anelamento com o padrão na primeira temperatura de anelamento e a porção de extremidade 5' do ACP é usada como um sítio de iniciação na segunda temperatura de anelamento para a amplificação subsequente do produto gerado contactando-se e estendendo-se a porção de extremidade 3' do ACP com o padrão.

Pode ser avaliado que o ACP da presente invenção é muito útil em uma variedade de métodos de amplificação de ácido nucléico com base no iniciador incluindo os métodos de Miller, H. I. (WO 89/06700) e Davey, C. *et al.* (EP 329.822), Reação em cadeia de Ligase (LCR, Wu, D. Y. *et al.*, Genomics 4: 560 (1989)), Reação em cadeia de Ligase da Polimerease (Barany, PCR Methods and Applic., 1: 5 a 16 (1991)), Gap-LCR (WO 90/01069), Reação em cadeia de Reparo (EP 439.182), 3SR (Kwoh *et al.*, PNAS, USA, 86: 1173 (1989)) e NASBA (Patente U.S. Nº 5.130.238), mas não a estes limitado.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento de acordo com a presente invenção. De acordo com uma forma de realização desta invenção, este kit ainda compreende um iniciador ou um par de iniciadores tendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde à porção de extremidade 5' do ACP; no caso em que a porção de extremidade 5' compreende a seqüência iniciadora universal, é mais preferido que o kit compreenda os iniciadores universais. Os presentes kits podem opcionalmente incluir os reagentes requeridos para realizar as reações de PCR tais como tampões, DNA polimerase, cofatores da DNA polimerase e desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfatos. Opcionalmente, os kits também podem incluir várias moléculas de polinucleotídeo, transcriptase reversa, vários tampões e reagentes e anticorpos que inibem a atividade de DNA polimerase. Os kits também podem incluir os reagentes necessários para

realizar as reações de controle positiva e negativa. Quantidades ótimas de reagentes a serem usadas em uma dada reação podem ser facilmente determinadas pelo técnico habilitado tendo o benefício da divulgação atual. Os kits, tipicamente, são adaptados para conter em embalagens ou
5 compartimentos separados os constituintes anteriormente descritos.

O ACP da invenção objeto pode ser aplicado a uma variedade de tecnologias com base na amplificação de ácido nucléico. Os exemplos representativos para comprovar o efeito do ACP são:

- I. Aplicação para amplificar uma seqüência de ácido nucléico;
- 10 II. Aplicação para amplificar uma seqüência de ácido nucléico alvo;
- III. Aplicação para a amplificação de DNA multiplex;
- IV. Aplicação para a identificação de genes diferencialmente expressos;
- 15 V. Aplicação para a amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE);
- VI. Aplicação para amplificar cDNA de comprimento completo;
- VII. Aplicação para amplificar cDNA enriquecido em 5';
- 20 VIII. Aplicação para a impressão digital de DNA ou RNA;
- IX. Aplicação para a identificação de segmentos de homologia conservada em famílias de multigene;
- X. Aplicação para a identificação de uma variação de seqüência de nucleotídeo;
- 25 XI. Aplicação para mutagênese; e
- XII. Outras aplicações.
- I. Aplicação para Amplificar uma Seqüência de Ácido Nucléico (alvo)

Ainda em uma outra desta invenção, é fornecido um método

para amplificar uma sequência de ácido nucléico de um DNA ou uma mistura de ácido nucléicos, que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador de acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico para hibridizar com ela.

Em uma forma de realização específica deste método, é fornecido um método que usa amplificações de estágio duplo para amplificar uma sequência de ácido nucléico de um DNA ou uma mistura de ácidos nucléicos, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da sequência de ácido nucléico em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o par de iniciadores de qualquer um dos ACPs descritos acima cada um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela à região da sequência de ácido nucléico, por meio das quais o produto de amplificação da sequência de ácido nucléico é gerado; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do produto de amplificação gerado da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa (a) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do produto de amplificação, respectivamente, por meio

das quais o produto de amplificação é re-amplificado.

Onde o método é aplicado à amplificação de uma sequência de ácido nucléico alvo, o par de iniciadores usado tem na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela. Portanto, em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para amplificar seletivamente uma sequência de ácido nucléico alvo de um DNA ou uma mistura de ácidos nucléicos, em que o método compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado do ACP descrito acima. Preferivelmente, o iniciador de acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela.

Em uma forma de realização específica deste método, é fornecido um método que usa amplificações de estágio duplo para amplificar seletivamente uma sequência de ácido nucléico alvo de um DNA ou uma mistura de ácidos nucléicos, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da sequência de ácido nucléico alvo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o par de iniciadores de qualquer um dos ACPs descritos acima cada um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela à sua sequência de nucleotídeo alvo, por meio das quais o produto de amplificação da sequência de nucleotídeo alvo é gerado; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do produto de amplificação gerado da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo

menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa (a) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos
5 iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do produto de amplificação, respectivamente, por meio das quais o produto de amplificação é re-amplificado.

Onde o padrão para a amplificação é o mRNA, a produção de cDNA é requerida antes da amplificação. Portanto, ainda em um outro
10 aspecto desta invenção, é fornecido um método para amplificar seletivamente uma seqüência de ácido nucléico alvo a partir de um mRNA, em que o método compreende transcrever de modo reverso o mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado do ACP descrito acima. Preferivelmente, o iniciador de
15 acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da seqüência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido um método que usa amplificações de estágio duplo para amplificar
20 seletivamente uma seqüência de ácido nucléico alvo a partir de um mRNA que compreende:

(a) contactar o mRNA com um iniciador de oligonucleotídeo dT que é hibridizado à terminação poliA do mRNA sob condições suficientes para que o direcionamento padrão da síntese de ácido desoxirribonucléico
25 enzimática ocorra;

(b) transcrever de modo reverso o mRNA ao qual o iniciador de oligonucleotídeo dT hibridiza para produzir um primeiro filamento de DNA que é complementar ao mRNA ao qual o iniciador de oligonucleotídeo dT hibridiza;

(c) realizar uma amplificação de primeiro estágio da sequência de ácido nucléico alvo do primeiro filamento de DNA obtido da etapa (b) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o

5 par de iniciadores do ACP descrito acima tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela à sua sequência de nucleotídeo alvo, por meio das quais o produto de amplificação da sequência de nucleotídeo alvo é gerado; e

10 (d) realizar uma amplificação de segundo estágio do produto de amplificação gerado da etapa (c) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa (c) ou um par de

15 iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos iniciadores usados na etapa (c), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do produto de amplificação, respectivamente, por meio das quais o produto de amplificação é re-amplificado.

20 Visto que os métodos de amplificação desta invenção utiliza o ACP desta invenção, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida.

Esta aplicação que usa o ACP da invenção objeto pode

25 fornecer um método melhorado para amplificar seletivamente uma sequência de ácido nucléico alvo a partir de um ácido nucléico ou uma mistura de ácidos nucléicos (DNA ou mRNA) realizando-se amplificações de ácido nucléico, preferivelmente, PCR. Visto que o efeito do ACP fornece iniciadores convencionais com especificidade de anelamento do iniciador independente

de “parâmetros de procura de iniciador” para planejar o iniciador tal como o comprimento do iniciador, temperatura de anelamento, teor de GC e comprimento do produto, é particularmente recomendado usar o ACP quando os iniciadores convencionais usados para amplificar um fragmento de ácido
5 nucléico alvo são muito sensíveis a tais parâmetros para gerar produtos de amplificação de ácido nucléico específicos.

Uma representação esquemática para amplificar seletivamente um ácido nucléico alvo de DNA de filamento duplo usando o novo sistema ACP como descrito acima é ilustrada na FIG. 1A. A FIG. 1B ilustra uma
10 representação esquemática para amplificar seletivamente um ácido nucléico alvo de mRNA usando o novo sistema de ACP. Referindo-se às FIGs. 1A e 1B, os presentes métodos serão descritos em mais detalhes.

Os presentes métodos para amplificar uma sequência de ácido nucléico podem ser realizados de acordo com várias amplificações de ácido
15 nucléico com base em iniciador conhecidas na técnica. Preferivelmente, os métodos são realizados de acordo com as amplificações de estágio duplo desenvolvidas pelo presente inventor, mais preferivelmente, a amplificação é realizada pela reação em cadeia da polimerase conhecida na técnica e o mais preferivelmente, o método de PCR de início quente.

Os métodos da presente invenção, para amplificar uma sequência de ácido nucléico podem ser usados para amplificar qualquer
20 molécula de ácido nucléico desejada. Tais moléculas pode ser DNA ou RNA. A molécula pode estar em um forma de filamento duplo ou de filamento único, preferivelmente, de filamento duplo. Onde o ácido nucléico como material de partida é de filamento duplo, é preferido para tornar a forma de
25 filamento duplo em uma de filamento único ou parcialmente de filamento único. Os métodos conhecidos para separar filamentos incluem, mas não são limitados ao tratamento térmico, com álcali, formamida, uréia e glicoxal, métodos enzimáticos (por exemplo, ação de helicase) e proteínas de ligação.

Por exemplo, a separação de filamento pode ser obtida pelo aquecimento a uma temperatura variando de 80° C a 105° C. Os métodos gerais para realizar este tratamento são fornecidos por Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001).

Onde um mRNA é utilizado como material de partida para a amplificação, uma etapa de transcrição reversa é necessária antes da amplificação, os detalhes da qual são encontrados em Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); e Noonan, K. F. *et al.*, Nucleic Acids Res. 16: 10366 (1988)). Para a transcrição reversa, um iniciador de oligonucleotídeo dT hibridizável à terminação poliA do mRNA é usado. O iniciador de oligonucleotídeo dT é compreendido de dTMPs, um ou mais dos quais podem ser substituídos com outros dNMPs contanto que o iniciador de dT possa servir como iniciador. A transcrição reversa pode ser feita com uma transcriptase reversa que tenha atividade de RNase H. Se um usa uma enzima tendo atividade de RNase H, pode ser possível omitir uma etapa de digestão com RNase H separada, escolhendo-se cuidadosamente as condições de reação.

Os presentes métodos não requerem que as moléculas a serem amplificadas tenham qualquer seqüência ou comprimento particulares. Em particular, as moléculas que pode ser amplificadas incluem qualquer ácido nucléico que ocorra naturalmente procariótico, eucariótico (por exemplo, protozoários e parasitas, fungos, leveduras, vegetais superiores, animais inferiores ou superiores, incluindo mamíferos e seres humanos) ou viral (por exemplo, vírus do herpes, HIV, vírus da influenza, vírus de Epstein-Barr, vírus da hepatite, vírus da pólio vírus, etc.) ou ácido nucléico viróide. A molécula de ácido nucléico também pode ser qualquer molécula de ácido nucléico que foi ou pode ser quimicamente sintetizada. Assim, a seqüência de

ácido nucléico pode ou não ser encontrada na natureza.

O ACP usado para a presente invenção é hibridizado ou anelado a uma região no padrão de modo que a estrutura de filamento duplo seja formada. As condições de hibridização de ácido nucléico adequadas para formar tais estruturas de filamento duplo são descritas por Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) e Haymes, B. D., *et al.*, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Method, IRL Press, Washington, D.C. (1985). A seqüência da porção de extremidade 3' do ACP não precisa 5
10
exibir complementaridade exata, mas precisa ser apenas substancialmente complementar na seqüência para ser capaz de formar uma estrutura de filamento duplo estável. Assim, partidas de complementaridade completa são permissíveis, contanto que tais partidas não sejam suficientes para impedir completamente a hibridização para formar uma estrutura de filamento duplo. 15
A hibridização do ACP a uma região no ácido nucléico padrão é um pré requisito para a sua polimerização dependente de padrão com polimerases. Fatores (ver Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); e Haymes, B. D., *et al.*, Nucleic Acid Hybridization, A Practical 20
Method, IRL Press, Washington, D.C. (1985)) que afetam o emparelhamento de base do ACP aos seus ácidos nucléicos complementares subsequentemente afetam a eficiência de iniciação. A composição de nucleotídeo do ACP pode afetar a temperatura na qual o anelamento é ótimo e portanto pode afetar a sua eficiência de iniciação.

25 Uma variedade de DNA polimerases podem ser usadas na etapa de amplificação dos presentes métodos, incluindo o fragmento “Klenow” da DNA polimerase I da *E. coli*, uma DNA polimerase termoestável e bacteriófago T7 DNA polimerase. Preferivelmente, a polimerase é uma DNA polimerase termoestável tal como pode ser obtido a

partir de uma variedade de espécies bacterianas, incluindo *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* e *Pyrococcus furiosus* (Pfu). Muitas destas polimerases podem ser isoladas da própria bactéria ou comercialmente obtidas. A polimerase a ser usada com a invenção objeto também pode ser obtida a partir de células que expressam altos níveis dos genes clonados que codificam a polimerase. Quando uma reação de polimerização está sendo conduzida, é preferível fornecer os componentes requeridos para tal reação em excesso no vaso de reação. O excesso em referência aos componentes da reação de amplificação refere-se a uma quantidade de cada componente tal que a capacidade para se obter a amplificação desejada não seja substancialmente limitada pela concentração daquele componente. É desejável fornecer à mistura de reação uma quantidade de cofatores requeridos tais como Mg^{2+} e dATP, dCTP, dGTP e dTTP em quantidades suficientes para sustentar o grau de amplificação desejado.

Todas as enzimas usadas nesta reação de amplificação podem ser ativas sob as mesmas condições de reação. Na verdade, tampões existem em que todas as enzimas estão próximas às suas condições de reação ótimas. Portanto, o processo de amplificação da presente invenção pode ser feito em um único volume de reação sem qualquer mudança de condições tais como a adição de reagentes.

Deve ser entendido que as porções da extremidade 5' de um conjunto de ACPs usado na etapa da amplificação de primeiro estágio pode compreender seqüências idênticas ou diferentes; se elas são idêntica, um iniciador que corresponde à seqüência da porção de extremidade 5' será usado na etapa da amplificação de segundo estágio, ao passo que se elas são diferentes, dois iniciadores cada um correspondendo à seqüência de cada porção de extremidade 5' do ACPs serão usados na etapa da amplificação de segundo estágio.

A presente invenção inclui um processo alternativo para amplificar seletivamente um fragmento de ácido nucléico alvo a partir de um ácido nucléico ou uma mistura que usa ACP, em que um conjunto de iniciadores que compreende um ACP e um iniciador convencional pode ser
5 usado na primeira etapa de amplificação, ao invés de um conjunto de ACP. O termo “iniciador convencional” aqui usado refere-se a qualquer iniciador tendo uma estrutura diferente da ACP, especialmente, em termos da presença da porção reguladora contendo a base universal. Neste caso, o iniciador convencional é adicionado apenas na primeira etapa de amplificação com o
10 ACP e apenas um iniciador pré selecionado arbitrário que corresponde à sequência da porção de extremidade 5’ do ACP é adicionado na segunda etapa de amplificação. Em uma forma de realização preferida, o processo alternativo pode ser usado quando cada porção 3’ de um par do ACP a ser usado na primeira etapa de amplificação tem temperatura de fusão diferente
15 (T_m). “ T_m ” refere-se à temperatura na qual metade dos iniciadores são anelados à região alvo.

Duas etapas de amplificação dos presentes métodos (no caso de amplificação a partir do mRNA, incluindo a transcrição reversa) são separadas apenas no tempo. A amplificação do primeiro estágio deve ser
20 seguida pela amplificação do segundo estágio. Deve ser entendido que a mistura de reação de amplificação do primeiro estágio pode incluir os iniciadores que correspondem à porção de extremidade 5’ que será usada para anelar às sequências das porções da extremidade 5’ dos ACPs na amplificação do segundo estágio, o que significa que os iniciadores que correspondem à
25 porção de extremidade 5’ podem ser adicionados à mistura de reação no momento ou depois da etapa de amplificação do primeiro estágio.

Como um processo alternativo, na etapa de amplificação do segundo estágio as sequências completas dos ACPs usados na etapa de amplificação do primeiro estágio, ao invés dos iniciadores que correspondem

às porções da extremidade 5' dos ACPs, podem ser usadas como iniciadores nas condições de alta severidade para re-amplificar o produto gerado da etapa de amplificação do primeiro estágio, em que as extremidades 3' e 5' do produto da primeira etapa de amplificação que é gerado do anelamento e extensão da sequência da porção de extremidade 3' do conjunto de ACP com o ácido nucléico padrão nas condições de severidade baixa compreende a sequência ou sequência complementar do ACP e também serve como sítios de emparelhamento perfeitos para o conjunto de ACP. Neste ponto de vista, este processo alternativo é preferido por que não é necessário adicionar os iniciadores que correspondem às porções da extremidade 5' dos ACPs à mistura de reação no momento ou depois da etapa de amplificação do primeiro estágio. A FIG. 1A também ilustra uma representação esquemática para amplificar seletivamente um ácido nucléico alvo pelo processo alternativo estabelecido acima.

O anelamento ou hibridização nos presentes métodos são realizados sob condições severas que permitem a ligação específica entre uma sequência de nucleotídeo e o ACP. Tais condições severas para o anelamento será dependente da sequência e variado dependendo de parâmetros ambientais. Nos presentes métodos, a amplificação do segundo estágio é no geral realizada sob condições severas mais altas do que a amplificação do primeiro estágio.

Em uma forma de realização preferida, a primeira temperatura de anelamento varia de cerca de 30° C a 68° C para a etapa de amplificação do primeiro estágio, mais preferivelmente, de 40° C a 65° C. É preferido que a segunda temperatura de anelamento varie de cerca de 50° C a 72° C para a amplificação do segundo estágio. De acordo com uma forma de realização mais preferida, a primeira temperatura de anelamento é igual ou mais baixa do que a segunda temperatura de anelamento. O comprimento ou a temperatura de fusão (T_m) da sequência da porção de extremidade 3' do ACP

determinará a temperatura de anelamento para a amplificação do primeiro estágio. Por exemplo, no caso em que o ACP compreende 10 nucleotídeos arbitrários na porção de extremidade 3', preferivelmente, a temperatura de anelamento estará entre cerca de 45° C e 55° C para a amplificação do primeiro estágio.

De acordo com os presentes métodos, a amplificação do primeiro estágio sob condições de severidade baixa é realizada por pelo menos 2 ciclos de anelamento, estendendo e desnaturando para melhorar a especificidade de anelamento do iniciador durante a amplificação do primeiro estágio e através dos ciclos subseqüentes, a amplificação do segundo estágio é processada mais eficazmente sob condições de alta severidade. A amplificação do primeiro estágio pode ser realizada em até 30 ciclos. Em uma forma de realização preferida, a amplificação do primeiro estágio é realizada por 2 ciclos. Em uma outra forma de realização, a amplificação do segundo estágio sob condições de alta severidade é realizada por pelo menos um ciclo (preferivelmente, pelo menos 5 ciclos) e até 45 ciclos para amplificar o produto do primeiro estágio. Em uma forma de realização mais preferida, a amplificação do segundo estágio é realizada por 25 a 35 ciclos. As condições de severidade alta e baixa podem ser facilmente determinadas a partir dos padrões conhecidos na técnica. "Ciclo" refere-se ao processo que resulta na produção de uma cópia de ácido nucléico alvo. Um ciclo inclui uma etapa de desnaturação, uma etapa de anelamento e uma etapa de extensão.

Na forma de realização mais preferível, a amplificação é realizada de acordo com a PCR que é divulgada nas Patentes U.S. N^{os} 4.683.195, 4.683.202 e 4.800.159.

De acordo com uma forma de realização preferida, quando a amplificação do primeiro estágio é realizada, a porção de extremidade 3' do par de iniciadores do ACP está envolvida no anelamento na primeira temperatura de anelamento e quando a amplificação do segundo estágio é

realizada, a porção de extremidade 5' do par de iniciadores serve como um sítio de iniciação. tal alteração da porção a envolver no anelamento é principalmente atribuída ao próprio ACP, em particular, à porção reguladora do ACP. Nos presentes métodos, a porção reguladora do ACP é capaz de restringir a porção de anelamento do ACP à sua porção de extremidade 3' na primeira temperatura de anelamento, responsável por melhorar a especificidade de anelamento a uma sequência alvo.

Os presentes métodos podem ser combinados com muitos outros processos conhecidos na técnica para se obter um objetivo específico. Por exemplo, a isolamento (ou purificação) de produto amplificado pode seguir a amplificação do segundo estágio. Esta pode ser realizada pela eletroforese em gel, cromatografia de coluna, cromatografia de afinidade ou hibridização. Além disso, o produto amplificado desta invenção pode ser inserido em um veículo adequado para a clonagem. Além disso, o produto amplificado desta invenção pode ser expresso em um hospedeiro adequado que abriga o vetor de expressão. De modo a expressar o produto amplificado, poder-se-ia preparar um vetor de expressão que carregasse o produto amplificado sob o controle de um promotor ou operativamente ligado a um promotor. O promotor é originado do próprio vetor ou da porção de extremidade do produto amplificado, que pode corresponder à porção de extremidade 5' do ACP. Muitas técnicas padrão estão disponíveis para construir vetores de expressão que contenham o produto amplificado e sequências transcrpcionais/translacionais/de controle de modo a obter a expressão da proteína ou peptídeo em uma variedade de sistemas de expressão hospedeiros. O promotor usado para hospedeiro procariótico inclui, mas não é limitado ao promotor pL λ , promotor trp, promotor lac e promotor T7. O promotor usado para hospedeiro eucariótico inclui, mas não é limitado ao promotor da metalotioneína, promotor tardio de adenovírus, promotor de 7,5 K do vírus da vacínia e os promotores derivados de polioma, adenovírus 2, vírus símio 40 e

citomegalovírus. Certos exemplos de hospedeiros procarióticos são *E. coli*, *Bacillus subtilis* e outras *Enterobacteriaceae* tais como *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* e várias espécies *Pseudomonas*. Além de microorganismos, culturas de células derivadas de organismos multicelulares também podem ser usados como hospedeiros. Em princípio, qualquer de tais culturas celulares é trabalhável, sejam culturas de vertebrado ou invertebrado. Além de células de mamífero, estas incluem sistemas de célula de inseto infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, baculovírus); e sistemas de célula vegetal infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (por exemplo, vírus mosaico da couve-flor, vírus mosaico do tabaco) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinante (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo uma ou mais seqüências codificadoras. O polipeptídeo expresso a partir do produto amplificado pode ser no geral purificado com uma variedade de propósitos de acordo com o método conhecido na técnica.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para a amplificação do ácido nucléico da presente invenção anteriormente descrito, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento indicados acima.

Ainda em uma outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para a amplificação seletiva de uma seqüência de ácido nucléico alvo a partir de DNA anteriormente descrito, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento indicados acima.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para a amplificação seletiva de uma seqüência de ácido nucléico alvo a partir do mRNA anteriormente descrito, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento indicados acima.

De acordo com uma forma de realização desta invenção, estes kits ainda compreendem um iniciador ou um par de iniciadores cada um tendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde à porção de extremidade 5' do ACP; no caso em que a porção de extremidade 5' compreende a seqüência iniciadora universal, é mais preferido que o kit compreenda os iniciadores universais. Os presentes kits podem opcionalmente incluir os reagentes requeridos para realizar as reações de PCR tais como tampões, DNA polimerase, cofatores da DNA polimerase e desoxirribonucleotídeos-5'-trifosfatos. Opcionalmente, os kits também podem incluir várias moléculas de polinucleotídeo, transcriptase reversa, vários tampões e reagentes e anticorpos que inibem a atividade de DNA polimerase. Os kits também podem incluir reagentes necessários para realizar reações de controle positiva e negativa. Quantidades ótimas de reagentes a serem usados em uma dada reação podem ser facilmente determinadas pelo técnico habilitado tendo o benefício da divulgação atual. Os kits, tipicamente, são adaptados para conter em embalagens ou compartimentos separados os constituintes anteriormente descritos.

II. Aplicação para a amplificação de DNA multiplex

Esta aplicação que usa o ACP da invenção objeto também pode fornecer um método melhorado para amplificar mais do que uma seqüência alvo usando mais do que um par de iniciadores na mesma reação. No geral, é extremamente difícil ajustar as condições de PCR para amplificar mais do que 10 alvos em paralelo por que uma reação de PCR ótima é requerida para amplificar mesmo um local específico sem qualquer subproduto não específico, de modo que aqueles pesquisadores que obtiveram a PCR multiplex tiveram que trabalhar duro para otimizar os seus sistemas. Visto que o anelamento precisa ocorrer em uma temperatura suficientemente alta para permitir que o emparelhamento de DNA-DNA perfeito ocorra na reação, o ACP da invenção objeto é ideal na otimização da amplificação de

DNA multiplex devido à sua função de melhorar a especificidade de amplificação. A “PCR multiplex” como aqui usada refere-se à amplificação simultânea de alvos de DNA multiplex em uma única mistura de reação em cadeia da polimerase (PCR).

5 Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para amplificar mais do que uma sequência de nucleotídeo alvo simultaneamente usando mais do que um par de iniciadores na mesma reação, em que o método compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de
10 qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador de acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3’ uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela.

 Em uma forma de realização específica desta invenção, é
15 fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

 (a) realizar uma amplificação de primeiro estágio de mais do que uma sequência de nucleotídeo alvo em uma primeira temperatura de anelamento compreendendo pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os pares de iniciadores de
20 qualquer um dos ACPs acima em que cada uma de sua porção de extremidade 3’ do pares de iniciadores tem uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a uma região da sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, sob condições em que cada um de cada par de iniciadores anela à sua sequência de nucleotídeo alvo, por meio das quais os
25 produtos de amplificação de sequências de nucleotídeo alvos são gerados; e

 (b) realizar uma amplificação de segundo estágio dos produtos de amplificação gerados da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, compreendendo pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador,

usando os mesmos pares de iniciadores como usados na etapa (a) ou pares de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos pares de iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada um de
5 cada par de iniciadores anela às seqüências de extremidades 3' e 5' dos produtos de amplificação gerados da etapa (a), respectivamente, por meio das quais os produtos de amplificação são re-amplificados na mesma reação.

Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção é realizada de acordo com os presentes métodos para a amplificação de
10 seqüência de ácido nucléico anteriormente debatidos, exceto para o uso de mais do que uma seqüência de nucleotídeo alvo e pares de iniciadores, as descrições comuns entre eles são omitidos de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida.

Por exemplo, a composição e a estrutura do ACP usado e das
15 condições para a amplificação, são comuns entre este processo e os presentes métodos para a amplificação de seqüência de ácido nucléico anteriormente debatida.

Em uma forma de realização preferida, os produtos amplificados de cada uma das seqüências de nucleotídeo alvos são diferentes
20 em tamanho em relação à análise subsequente.

De acordo com uma forma de realização preferida, os produtos de amplificação de seqüências de nucleotídeo alvos multiplex podem ser analisados através da separação por tamanho. A comparação de separação por tamanho é realizada usando uma variedade de métodos conhecidos na técnica,
25 tais como eletroforese através de uma matriz de gel de poliacrilamida ou matriz de gel de agarose e seqüenciamento de nucleotídeo. O seqüenciamento de nucleotídeo pode ser rapidamente realizado com um seqüenciador automático disponível de vários fabricantes.

Como exemplificado no Exemplo abaixo, o ACP desta

invenção permite que o produto final amplificado seja livre dos problemas secundários assim como da não especificidade que surge a partir dos iniciadores convencionais usados nos métodos de amplificação de ácido nucléico multiplex conhecidos na técnica.

5 A vantagem da amplificação multiplex é que numerosas doenças ou alterações de seqüência de nucleotídeo específicas (por exemplo, polimorfismo de nucleotídeo único ou mutação de ponto) podem ser ensaiadas na mesma reação.

10 O número de análises que pode ser rodado simultaneamente é ilimitado; entretanto, o limite superior é provavelmente de cerca de 20 e é provável seja dependente da diferença de tamanho requerida para a resolução e métodos que estão disponíveis para resolver o produto amplificado.

15 Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para amplificar mais do que uma seqüência de nucleotídeo alvo simultaneamente na mesma reação, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima. De acordo com uma forma de realização desta invenção, estes kits ainda compreendem um iniciador ou um par de iniciadores tendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde à porção de extremidade 5' do ACP; no caso em que a
20 porção de extremidade 5' compreende a seqüência iniciadora universal, é mais preferido que o kit compreenda os iniciadores universais. Os presentes kits podem opcionalmente incluir os reagentes requeridos para realizar as reações de PCR tais como tampões, DNA polimerase, cofatores da DNA polimerase e desoxirribonucleotídeos-5'-trifosfatos. Opcionalmente, os kits
25 também podem incluir várias moléculas de polinucleotídeo, transcriptase reversa, vários tampões e reagentes e anticorpos que inibem a atividade da DNA polimerase. Os kits também podem incluir reagentes necessários para realizar reações de controle positiva e negativa. Quantidades ótimas de reagentes a serem usados em uma dada reação podem ser facilmente

determinadas pelo técnico habilitado tendo o benefício da divulgação atual. Os kits, tipicamente, são adaptados para conter em embalagens ou compartimentos separados os constituintes anteriormente descritos.

O método e kit da presente invenção podem ser aplicados ao diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, determinação de gênero, análise de ligação genética e estudos forenses.

III. Aplicação para a Identificação de Genes Diferencialmente Expressos

Esta aplicação usando o ACP da invenção objeto também pode fornecer um método melhorado para detectar e clonar cDNAs complementares aos mRNAs diferencialmente expressos em duas ou mais amostras de ácido nucléico.

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para detectar complementaridade de DNA ao mRNA diferencialmente expresso em duas ou mais amostras de ácido nucléico, em que o método compreende transcrever de modo reverso o mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador de acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora (mais preferivelmente, seqüência arbitrária) substancialmente complementar a uma região de filamentos de cDNA gerados a partir da transcrição reversa.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) fornecer uma primeira amostra de ácidos nucléicos representando uma primeira população de transcritos de mRNA e uma segunda amostra de ácidos nucléicos representando uma segunda população de transcritos de mRNA;

(b) separadamente contactar cada uma da primeira amostra de

ácido nucléico e da segunda amostra de ácido nucléico com um primeiro iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima, em que a porção de extremidade 3' do primeiro iniciador compreende uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a um primeiro sítio no mRNA diferencialmente expresso para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

(c) transcrever de modo reverso o mRNA diferencialmente expresso ao qual o primeiro iniciador hibridiza para produzir uma primeira população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares ao mRNA diferencialmente expresso na primeira amostra de ácido nucléico à qual o primeiro iniciador hibridiza e uma segunda população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares ao mRNA diferencialmente expresso na segunda amostra de ácido nucléico à qual o primeiro iniciador hibridiza;

(d) purificar e quantificar cada uma da primeira e segunda populações dos primeiros filamentos de cDNA;

(e) realizar uma amplificação de primeiro estágio de cada uma da primeira e segunda populações dos primeiros filamentos de DNA obtidas da etapa (d) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um segundo iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a um segundo sítio na primeira e segunda populações de primeiros filamentos de cDNA, sob condições em que o segundo iniciador anele ao segundo sítio em cada população dos primeiros filamentos de cDNA, por meio da qual a primeira e segunda populações de segundos filamentos de DNA são geradas;

(f) realizar uma amplificação de segundo estágio de cada

síntese do segundo cDNA de filamento gerado da etapa (e) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, compreendendo pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (b) e (e), respectivamente ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária correspondendo a cada porção de extremidade 5' do primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (b) e (e), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às sequências das extremidades 3' e 5' de cada síntese do segundo cDNA de filamento, respectivamente, por meio da qual os produtos de amplificação dos segundos filamentos de DNA são gerados, e

(g) comparar a presença ou nível de produtos de amplificação individuais na primeira e segunda populações de produtos de amplificação obtidos da etapa (f).

Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza os presentes métodos para a amplificação da sequência de ácido nucléico anteriormente debatidos, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida.

Uma representação esquemática para identificar genes diferencialmente expressos que usam os novos ACP é ilustrada na FIG. 2A.

No presente método, a amostra de ácido nucléico que representa uma população de transcritos de mRNA pode ser obtida a partir de uma ampla variedade de materiais biológicos. No geral, a primeira amostra de ácido nucléico compreende mRNA expresso em uma primeira célula e a segunda amostra de ácido nucléico compreende mRNA expresso em uma segunda célula. Em particular, a primeira amostra de ácido nucléico compreende mRNA expresso em uma célula em um primeiro estágio de

desenvolvimento e a segunda amostra de ácido nucléico compreende mRNA expresso em uma célula em um segundo estágio de desenvolvimento. Além disso, a primeira amostra de ácido nucléico compreende mRNA expresso em uma célula tumorigênica e a segunda amostra de ácido nucléico compreende mRNA expresso em um célula normal.

As etapas (e) e (f) da aplicação objeto podem ocorrer em um único tubo usando a mesma mistura de reação exceto para os iniciadores, o que significa que as etapas (e) e (f) são separadas apenas em tempo. Deve ser entendido que os iniciadores que correspondem à porção de extremidade 5' podem ser adicionados à mistura de reação no momento ou depois da síntese do segundo cDNA de filamento. Em uma forma de realização preferida, os iniciadores que correspondem à porção de extremidade 5' são adicionados à mistura de reação exatamente depois que a etapa (e) é completada, seguidos pela amplificação subsequente pela PCR dos segundos filamentos de DNA.

Também deve ser entendido que as seqüências da porção de extremidade 5' do primeiro e segundo ACPs usados nas etapas (b) e (e), respectivamente, podem ser seqüências idênticas ou diferentes; se elas são idênticas, um iniciador que corresponde à seqüência da porção de extremidade 5' será usado na etapa (f), ao passo que se eles são diferentes, dois iniciadores cada um correspondendo à seqüência de cada porção de extremidade 5' do ACPs serão usados na etapa (f). Em uma forma de realização preferida, a seqüência da porção de extremidade 5' do primeiro e segundo ACPs usados nas etapas (b) e (e) são diferentes e assim, dois iniciadores cada um correspondendo à seqüência de cada porção de extremidade 5' dos ACPs são usados na etapa (f).

Como um processo alternativo, na etapa (f) as seqüências completas do primeiro e segundo ACPs usados nas etapas (b) e (e), respectivamente, ao invés dos iniciadores que correspondem às porções da

extremidade 5' dos ACPs, podem ser usadas como iniciadores nas condições de alta severidade para amplificar cada segundo filamento de DNA obtido da etapa (e), em que as extremidades 3' e 5' dos segundos filamentos de DNA que são inicialmente sintetizados usando o segundo ACP compreende a
5 sequência do primeiro ACP e a sequência complementar do segundo ACP, respectivamente e também serve como sítios de emparelhamento perfeito para o primeiro e segundo ACPs. Neste ponto de vista, este processo alternativo é preferido por que não existe nenhuma necessidade para adicionar os iniciadores que correspondem às porções da extremidade 5' dos ACPs à
10 mistura de reação no momento ou depois da reação de PCR de primeiro estágio. A FIG. 2B ilustra uma representação esquemática para identificar genes diferencialmente expressos pelo processo alternativo estabelecido acima.

O método da aplicação objeto para detectar diferenças na
15 expressão de gene usa apenas um único iniciador de síntese de cDNA (o primeiro ACP) para reagir com o mRNA, diferente da PCR de Demonstração Diferencial convencional que requer iniciadores de fixação de síntese de cDNA múltiplos. No método da Demonstração Diferencial original esboçado por Liang e Pardee em 1992, doze iniciadores de fixação foram introduzidos.
20 Os iniciadores de fixação por exemplo, tendo uma sequência de T_{12MN} , onde M é A, C ou G e N é A, C, G ou T, produziram doze populações de cDNA separadas. Recentemente, iniciadores de fixação modificados foram propostos alterando-se o número de nucleotídeos tal como um ou três ao invés de dois na extremidade 3' que pode hibridizar a uma sequência que esteja
25 imediatamente a 5' em relação à terminação poli A de mRNAs ou estendendo-se nucleotídeos adicionais na extremidade 5' enquanto retém a terminação Oligo (dT)_{9-12 MN} que resulta em pelo menos 21 nucleotídeos no comprimento (Villeponteau *et al.*, 1996, Combates *et al.*, 2000).

A invenção objeto diz respeito às formas de realização do ACP

usadas neste método para a identificação de genes diferencialmente expressos, em que o primeiro ACP usado na etapa (b) é representado pela seguinte fórmula geral (2): 5' - dX_p-dY_q-dT_r- 3' em que dX é um dos quatro desoxirribonucleotídeos, A, C, G ou T; dY é uma porção reguladora que
 5 compreende bases universais responsáveis pela função principal do ACP associada com a alteração da temperatura de anelamento durante a PCR; dT é um desoxirribonucleotídeo T; p, q e r representam um número inteiro, respectivamente; dX_p representa a porção de extremidade 5' e contém uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária; dY_q contém pelo menos 2
 10 bases universais; dT_r representa a porção de extremidade 3'; a seqüência de nucleotídeo da porção de extremidade 3' deve ter T_m mais baixa do que aquela da porção de extremidade 5'. A fórmula (2) basicamente segue a regra da fórmula (1). A porção de extremidade 3' da fórmula (2) consiste das seqüências capazes de anelamento à terminação poli A do mRNA e serve
 15 como um iniciador da síntese de cDNA para a transcrição reversa de mRNA.

Em uma forma de realização preferida, a porção de extremidade 3' do primeiro ACP usado na etapa (b) contém pelo menos 6 nucleotídeos T no comprimento, o que é considerado uma exigência mínima de comprimento para anelamento do iniciador. Mais preferivelmente, a
 20 seqüência da porção de extremidade 3' é de 10 a 20 nucleotídeos T e pode ser de até 30 nucleotídeos T no comprimento. O mais preferivelmente, a seqüência da porção de extremidade 3' é de cerca de 15 nucleotídeos T no comprimento. Este iniciador é denominado iniciador de controle de anelamento dT₁₅ (dT₁₅-ACP). Em uma forma de realização preferida, o
 25 primeiro iniciador tem uma fórmula geral de 5' - dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dT₁₀₋₂₀ - 3', em que dX representa um desoxirribonucleotídeo e compreende uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária não substancialmente complementar à primeira e segunda populações de mRNA; dY representa a porção reguladora que compreende 2 a 10 bases universais ou bases não

discriminatórias análogas; e dT representa uma desoxitimidina contígua capaz de anelamento ao primeiro sítio na primeira e segunda populações de mRNA.

Em uma forma de realização, a porção de extremidade 3' do primeiro ACP usado na etapa (b) pode conter pelo menos um nucleotídeo adicional na extremidade 3' que pode hibridizar a uma sequência de mRNA que está imediatamente a montante da terminação poliA. Os nucleotídeos adicionais na extremidade 3' do primeiro ACP pode ser de até 3 no comprimento. Por exemplo, dT pode ainda compreender 3'-V na sua extremidade 3'; em que V é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxicitidina e desoxiguanosina. Além disso, dT pode ainda compreender 3'-NV na sua extremidade 3'; em que V é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxicitidina e desoxiguanosina e N é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxicitidina e desoxiguanosina. O mais preferivelmente, a sequência da porção de extremidade 3' do primeiro ACP usado na etapa (b) contém apenas dT₁₅.

Em uma forma de realização preferida, o primeiro ACP inteiro é de cerca de 40 a 45 nucleotídeos no comprimento e compreende dT₁₅ na porção de extremidade 3', dX₂₀₋₂₅ na porção de extremidade 5' e dY₅ entre as porções de extremidade 3' e 5'. O primeiro ACP inteiro pode ser de até 100 nucleotídeos no comprimento. O primeiro iniciador é exemplificado pelas SEQ ID NOs: 30, 39, 57 e 61 a 63.

O primeiro ACP aqui descrito é hibridizado à terminação poli A do mRNA, que está presente em todos os mRNAs, exceto para uma pequena minoria de mRNA. O uso do primeiro ACP usado nesta invenção resulta em apenas uma reação e produz apenas uma população de cDNA, ao contrário de pelo menos 3 a 64 populações de cDNA separadas geradas pelos iniciadores de fixação convencionais da técnica de Demonstração Diferencial. Isto aumenta enormemente a eficiência do método pela geração de um

agrupamento substancialmente padrão de cDNA de filamento único de cada população de mRNA experimental.

Na etapa (d), os agrupamentos padrão de cDNAs sintetizados pelo primeiro ACP devem ser purificados e depois quantificados pelas técnicas bem conhecidas por aqueles de habilidade comum na técnica tais como espectrofotometria. Esta etapa é necessária para controlar precisamente as suas entradas na etapa de amplificação e depois comparar os produtos finais amplificados entre duas ou mais amostras. Preferivelmente, a quantidade de cDNA produzida neste ponto no método é medida. É mais preferido que esta determinação seja feita usando a espectroscopia de ultravioleta, embora qualquer procedimento padrão conhecido para quantificar o cDNA conhecido por aqueles de habilidade comum na técnica é aceitável para o uso para este propósito. Quando do uso do procedimento de espectroscopia de UV, uma absorbância de cerca de 260 nm de luz UV é vantajosamente usada. Pela medição da quantidade de cDNA nesta etapa, portanto, a quantidade de cDNA pode ser padronizada entre ou comparada às amostras na seguinte reação de amplificação.

Depois da síntese dos primeiros filamentos de cDNA que usam o primeiro ACP, os segundos filamentos de DNA são sintetizados usando o segundo ACP iniciador sob condições de severidade baixa, pelo menos por um ciclo que compreende desnaturação, anelamento e extensão do iniciador, em que os primeiros filamentos de cDNA resultantes são usados como padrão.

O segundo ACP basicamente segue a regra da fórmula (1) e a sua porção de extremidade 3' compreende uma seqüência arbitrária curta, que preferivelmente tem T_m mais baixa do que aquela da porção de extremidade 5'. Este iniciador é denominado de um iniciador de controle de anelamento arbitrário (AR-ACP). Em uma forma de realização preferida, a porção de extremidade 3' do segundo ACP pode ter de 8 a 15 nucleotídeos no

comprimento. O mais preferivelmente, a porção de extremidade 3' do segundo ACP contém cerca de 10 nucleotídeos no comprimento.

De acordo com uma forma de realização preferida, o segundo ACP tem a fórmula geral de 5' - dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dZ₈₋₁₅ - 3', em que dX
 5 representa um desoxirribonucleotídeo e compreende uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária não substancialmente complementar à primeira e segunda populações dos primeiros filamentos de cDNA; dY representa a porção reguladora que compreende 2 a 10 bases universais ou bases não discriminatórias análogas; dZ representa uma seqüência
 10 hibridizadora de nucleotídeo arbitrária capaz de anelamento ao segundo sítio na primeira e segunda populações de filamentos de DNA. Mais preferivelmente, o segundo ACP inteiro é de cerca de 40 a 45 nucleotídeos no comprimento que compreende dZ₁₀ na porção de extremidade 3', dX₂₀₋₂₅ na porção de extremidade 5' e dY₅ entre as porções de extremidade 3' e 5'. O
 15 segundo ACP inteiro pode ser de até 100 nucleotídeos no comprimento. O segundo iniciador é exemplificado pelas SEQ ID NOs: 1 a 9, 13 a 18 e 20 a 23.

O segundo ACP aqui descrito é diferente de um chamado iniciador arbitrário longo, como usado na técnica de Demonstração
 20 Diferencial modificada conhecida. Por exemplo, os iniciadores arbitrários longos convencionais como descrito por Villeponteau *et al.* (1996) e Diachenko *et al.* (1996), tendo pelo menos 21 ou 25 nucleotídeos no comprimento, compreendidos apenas de nucleotídeos arbitrários nas seqüências inteiras. Estes iniciadores arbitrários longos convencionais
 25 hibridizarão em uma maneira não prognosticável sob a temperatura de anelamento baixa (cerca de 40° C) que é requerida para se obter a iniciação arbitrária no ciclo de PCR precoce, tal que seja impossível planejar um conjunto representativo de iniciadores racionalmente. Além disso, muitas das faixas representam o mesmo mRNA devido à "Viscosidade" dos iniciadores

longos quando usados sob uma tal severidade baixa.

As vantagens do presente método para detectar genes diferencialmente expressos são predominantemente atribuídos ao uso do segundo ACP. Visto que o segundo ACP é planejado para limitar o
5 anelamento do segundo ACP à sua seqüência da porção de extremidade 3', não à sua seqüência de porção de extremidade 5', em associação com a temperatura de anelamento, o anelamento resultante ocorrerá em uma maneira prognosticável, tal que é possível planejar um conjunto de iniciadores representativos racionalmente. Além disso, o uso do segundo ACP permite
10 evitar problemas de falso positivo causados pela "Viscosidade" dos iniciadores longos convencionais sob condições de severidade baixa como usado na técnica de Demonstração Diferencial anterior.

A temperatura de anelamento usada para a síntese dos segundos filamentos de DNA sob condições de severidade baixa usados na
15 etapa (e) está preferivelmente entre cerca de 40° C a 65° C, mais preferivelmente, entre cerca de 45° C e 55° C e o mais preferivelmente, de cerca de 50° C. Entretanto, diferente da Demonstração Diferencial, que usa as temperaturas de anelamento entre 35° C e 45° C, a temperatura de anelamento de condições de severidade baixa usadas na aplicação objeto é relativamente
20 mais alta do que aquela usada nas técnicas de Demonstração Diferencial clássica ou realçada conhecidas com iniciadores arbitrários.

Outras características únicas e significantes da aplicação objeto para detectar genes diferencialmente expressos é amplificar apenas os segundos filamentos de DNA inicialmente sintetizados pela amplificação
25 subsequente, em que as extremidades 3' e 5' dos segundos filamentos de DNA que foram inicialmente sintetizados usando o segundo ACP compreende a seqüência complementar do primeiro ACP e a seqüência do segundo ACP, respectivamente e assim, as seqüências inteiras do primeiro e segundo ACPs ou apenas as suas seqüências da porção de extremidade 5' do

primeiro e segundo ACPs, são usadas como seqüências iniciadoras 3' e 5' para a amplificação dos segundos filamentos de DNA.

Visto que o ACP na aplicação objeto leva à amplificação de produtos específicos, pode ser possível eliminar fundamentalmente a causa de problemas de gargalo principais, tais como produtos falsos e reprodutibilidade deficiente, que resultam do anelamento não específico dos iniciadores arbitrários e dT convencionais para primeiro e segundo filamentos de DNA assim como para os produtos amplificados durante a PCR nos métodos de Demonstração Diferencial conhecidos.

Em uma forma de realização preferida, a síntese de segundos filamentos de DNA na etapa (e) é realizada em pelo menos 1 ciclo de amplificação sob condições de severidade baixa para se obter a iniciação arbitrária e através dos ciclos subseqüentes, a amplificação é processada mais eficazmente para a amplificação dos segundos filamentos de DNA resultantes sob condições de alta severidade usadas na etapa (f). O mais preferivelmente, a síntese de segundos filamentos de DNA na etapa (e) é realizada por um ciclo de amplificação sob condições de severidade baixa.

Em uma forma de realização preferida, a amplificação dos segundos filamentos de DNA resultantes sintetizados pela etapa (e) é realizada sob condições de alta severidade usando as seqüências completas do primeiro e segundo ACPs usados nas etapas (b) e (e), respectivamente, como seqüências iniciadoras, em que as extremidades 3' e 5' dos segundos filamentos de DNA resultantes fornecem sítios de emparelhamento perfeito ao primeiro e segundo ACPs. Entretanto, é interessante que o primeiro e segundo ACPs não estejam envolvidos em qualquer outro anelamento com o ácido nucléico padrão, exceto o anelamento e extensão das extremidades 3' e 5' dos segundos filamentos de DNA como uma unidade de reação em uma tal condição de severidade alta por que as suas porções de extremidade 3' requerem temperatura de anelamento relativamente baixa e as condições de

alta severidade não permitem que elas anelem a nenhum sítio do padrão, exceto às extremidades 3' e 5' dos segundos filamentos de DNA. Conseqüentemente, devido a esta função do ACP, que é capaz de anelar seletivamente com o padrão em associação com a temperatura de anelamento, os produtos amplificados podem ser isentos dos problemas da taxa de falso positivo alta, reprodutibilidade deficiente e possível sub-representação de frações de mRNA menores na análise que são os problemas principais da Demonstração Diferencial conhecida. Neste ponto de vista, existe uma diferença significativa entre este método objeto e os métodos de Demonstração Diferencial convencionais a despeito do fato de que eles terem em comum o uso dos mesmos iniciadores para condições de alta severidade assim como para condições de severidade baixa.

Em uma forma de realização preferida, a temperatura de anelamento da amplificação para condições de alta severidade usadas na etapa (f) é preferivelmente de cerca de entre 55° C e 72° C. O mais preferivelmente, a temperatura de anelamento usada para as condições de alta severidade é de cerca de 65 a 68° C

Em uma forma de realização preferida, a amplificação sob condições de alta severidade usada na etapa (f) é realizada em pelo menos 10 ciclos e até 50 ciclos para amplificar os segundos filamentos de DNA resultantes sintetizados pela etapa (e) durante a PCR. O mais preferivelmente, a amplificação pela PCR é realizada em 40 a 45 ciclos.

O síntese do segundo cDNA de filamento é preferivelmente sintetizado pela PCR, mais preferivelmente, o método de PCR de início quente em que o procedimento é ajustar as reações completas sem a DNA polimerase e incubar os tubos no ciclador térmico para completar a etapa de desnaturação inicial a > 90° C. Depois, enquanto mantém os tubos a uma temperatura acima de 70° C, a quantidade apropriada de DNA polimerase pode ser pipetada na reação. Em uma forma de realização preferida, a adição

dos iniciadores para a amplificação do segundo estágio na mistura de reação depois da reação completa da síntese do segundo cDNA de filamento é também realizada sob a temperatura de desnaturação tal como $> 90^{\circ} \text{C}$. Depois, enquanto mantém os tubos a uma temperatura de cerca de 90°C , a quantidade apropriada dos iniciadores para a amplificação do segundo estágio pode ser pipetada na reação.

Um exemplo da síntese do segundo filamento de DNA e a amplificação subsequente dos segundos filamentos de DNA resultantes em um único tubo usando a sequência arbitrária pré selecionada das porções da extremidade 5' do primeiro e segundo ACPs é conduzido sob as seguintes condições: os segundos filamentos de DNA são sintetizados sob condições de severidade baixa por um ciclo da amplificação do primeiro estágio que compreende reação de anelamento, extensão e desnaturação; a mistura de reação contendo o primeiro filamento do cDNA, o tampão de reação de PCR (por exemplo, disponível da Roche), dNTP e o segundo ACP é pré aquecida a cerca de 94°C , enquanto mantém o tubo contendo a mistura de reação a cerca de 94°C , a Taq polimerase (por exemplo, disponível da Roche) é adicionada na mistura de reação; as reações de PCR são como segue: um ciclo de 94°C durante 1 min, 50°C durante 3 min e 72°C durante 1 min; seguido pela desnaturação do produto de amplificação a 94°C ; depois da reação completa da síntese do segundo filamento de DNA na etapa (e), o iniciador 5' pré selecionado arbitrário e o iniciador 3' pré selecionado arbitrário são adicionados à mistura de reação e depois o segundo estágio de amplificação é conduzido como segue: 40 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 68°C durante 40 segundos e 72°C durante 40 segundos; seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72°C .

Um exemplo alternativo da síntese do segundo filamento de DNA e a amplificação subsequente dos segundos filamentos de DNA resultantes em um único tubo usando as sequências completas do primeiro e

segundo ACPs usados nas etapas (b) e (e), respectivamente, ao invés das seqüências arbitrárias pré selecionadas das porções da extremidade 5' do primeiro e segundo ACPs, é conduzido sob as seguintes condições: os segundos filamentos de DNA são sintetizados sob condições de severidade
5 baixa por um ciclo da amplificação do primeiro estágio que compreende reação de anelamento, extensão e desnaturação; a mistura de reação contendo o primeiro cDNA de filamento, o tampão de reação de PCR (por exemplo, disponível da Roche), dNTP, o primeiro ACP (dT₁₅-ACP) e o segundo ACP (AR-ACP) é pré aquecida a cerca de 94° C, enquanto mantém o tubo
10 contendo a mistura de reação a cerca de 94° C, a Taq polimerase (por exemplo, disponível da Roche) é adicionada na mistura de reação; as reações de PCR são como segue: um ciclo de 94° C durante 1 minuto, 50° C durante 3 minutos e 72° C durante 1 minuto; seguida pela amplificação pela PCR de segundo estágio que compreende a reação de anelamento, extensão e
15 desnaturação; as reações de PCR são como segue: 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 65° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

Deve ser mencionado que uma concentração apropriada de ACP arbitrário (o segundo ACP) é usada para sintetizar os segundos cDNAs
20 de filamento por um ciclo da amplificação do primeiro estágio. Se a quantidade do segundo ACP usado na etapa (e) é muito baixa, os produtos amplificados resultantes não são reprodutíveis. Ao contrário, a quantidade em excesso do segundo ACP usado na etapa (e) gera produtos secundários tais como sujidade de DNA durante a PCR. Em uma forma de realização
25 preferida, a concentração do segundo ACP usado na etapa (e) está entre cerca de 0,1 µM e 1,0 µM. O mais preferivelmente, a concentração do segundo ACP assim como o primeiro ACP é de cerca de 0,2 µM. Em uma forma de realização preferida, a concentração dos iniciadores usados na etapa (f) está entre cerca de 0,1 µM e 1 µM, o mais preferivelmente, de cerca de 0,4 µM.

Uma outra característica significativa da aplicação objeto para a identificação de diferenças na expressão de gene é o uso de alta temperatura de anelamento em um método. A alta temperatura de anelamento usada na etapa (f) aumenta a especificidade de anelamento do iniciador durante a PCR, o que resulta na eliminação de produtos falso positivos completamente e no aumento da reprodutibilidade. A liberação de positivos falsos que é um gargalo principal que permanece na técnica de Demonstração Diferencial anterior é especialmente importante na etapa de triagem para a verificação dos fragmentos de cDNA identificados pela Demonstração Diferencial.

A etapa de comparar a presença ou nível de produtos de amplificação obtidos da etapa (f) pode ser realizada de acordo com vários métodos conhecidos na técnica. Em uma forma de realização preferida, cada uma da primeira e segunda populações de produtos de amplificação da etapa (f) são separados pela eletroforese para identificar mRNA diferencialmente expresso. Mais preferivelmente, os fragmentos de PCR resultantes de cDNA são detectados em um gel de agarose tingido com brometo de etídio. Uma outra característica proeminente desta aplicação objeto é o uso de gel de agarose tingido com brometo de etídio para identificar mRNA diferencialmente expresso. No geral, os métodos de Demonstração Diferencial convencionais usam técnicas de detecção radioativa que usam géis de poliacrilamida desnaturantes. Entretanto, de acordo com o presente método, a quantidade significativa dos fragmentos de cDNA amplificados obtidos através das amplificações de estágio duplo permite usar um gel de agarose tingido com brometo de etídio para detectar os cDNAs amplificados, o que resulta em aumento da velocidade e evita o uso de radioatividade.

Alternativamente, os fragmentos de cDNA resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como o tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso

de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

5 Em uma outra forma de realização, seria útil para os propósitos de diagnóstico usar um sistema automático tal como um seqüenciador de DNA automático junto com qualquer rotulação distinta dos ACPs para detectar ou analisar os produtos amplificados (Bauer, *et al.*, 1993).

10 Considerando as características do ACP nesta aplicação objeto, o presente método para detectar e clonar genes diferencialmente expressos difere fundamentalmente das técnicas de Demonstração Diferencial anteriores como descritas acima.

Em conclusão, o uso do ACP neste método torna possível permitir a amplificação apenas de segundos filamentos de DNA e o uso da quantidade suficiente de materiais de partida assim como a alta concentração de dNTP, que resultam nos seguintes benefícios: a) aumento da especificidade de anelamento do iniciador, b) eliminação do problema de positivos falsos que requer o trabalho intensivo subsequente para verificar os positivos verdadeiros, c) melhora na confiabilidade e reprodutibilidade, d) detecção de mRNAs raros, e) geração de produtos de PCR de distância longa variando no tamanho de 150 pares de base a 2,0 kb, f) permitir o uso de géis de agarose tingidos com brometo de etídio para detectar os produtos, g) aumento da velocidade de análise, h) particularmente, não requer mãos bem treinadas para conduzir este método e i) permite o planejamento racional de um conjunto representativo de iniciadores.

25 Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para detectar a complementaridade de DNA ao mRNA diferencialmente expresso, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima (o primeiro e segundo iniciador). De acordo com uma forma de realização desta invenção, estes kits

ainda compreendem um iniciador ou um par de iniciadores tendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde à porção de extremidade 5' dos ACPs; no caso em que a porção de extremidade 5' compreenda a sequência iniciadora universal, ela é mais preferida que o kit que compreende os iniciadores universais. Os presentes kits podem opcionalmente incluir os reagentes requeridos para realizar reações de PCR tais como tampões, DNA polimerase, cofatores da DNA polimerase e desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfatos. Opcionalmente, os kits também podem incluir várias moléculas de polinucleotídeo, transcriptase reversa, vários tampões e reagentes e anticorpos que inibem a atividade da DNA polimerase. Os kits também podem incluir reagentes necessários para realizar reações de controle positiva e negativa. Quantidades ótimas de reagentes a serem usadas em uma dada reação podem ser facilmente determinadas pelo técnico habilitado tendo o benefício da divulgação atual. Os kits, tipicamente, são adaptados para conter em embalagens ou compartimentos separados os constituintes anteriormente descritos.

IV. Aplicação para a amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE)

Esta aplicação usando o ACP da invenção objeto pode fornecer um método melhorado para amplificar rapidamente extremidades de cDNA, chamada tecnologias RACE. Para ser específico, o ACP da aplicação objeto é adaptada às tecnologias RACE relacionadas com cada uma das extremidades 3' e 5' e elimina os problemas secundários que resultam dos iniciadores usados nas tecnologias RACE convencionais.

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para amplificar rapidamente um fragmento de cDNA alvo que compreende uma região de cDNA que corresponde à região da extremidade 3' de um mRNA, em que o método compreende transcrever de modo reverso o dito mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores,

distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador de acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora específica de gene substancialmente complementar a um sítio no cDNA gerado a partir da transcrição reversa e/ou um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA dos mRNAs.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

10 (a) contactar mRNAs com um primeiro iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima, em que a porção de extremidade 3' do iniciador compreende uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA dos mRNAs para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucleico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

15 (b) transcrever de modo reverso os mRNAs aos quais o primeiro iniciador hibridiza para produzir uma população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares aos mRNAs aos quais o primeiro iniciador hibridiza;

20 (c) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos primeiros filamentos de cDNA em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um segundo iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora específica de gene substancialmente complementar a um sítio em um dos primeiros filamentos de cDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o segundo iniciador anela a um sítio específico de gene em um dos primeiros filamentos de cDNA, por meio das quais um síntese do segundo cDNA de filamento específico de gene é gerado;

e

(d) realizar uma amplificação de segundo estágio do síntese do segundo cDNA de filamento específico de gene gerado da etapa (c) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta
5 severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (a) e (c), respectivamente ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' do
10 primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (a) e (c), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências das extremidades 3' e 5' de um síntese do segundo cDNA de filamento específico de gene, respectivamente, por meio das quais um produto de amplificação de um filamento de cDNA específico de gene é gerado.

15 Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza os presentes métodos para a amplificação de seqüência de ácido nucléico anteriormente debatida, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida.

20 Uma representação esquemática para amplificar um fragmento de cDNA alvo que compreende a região da extremidade 3' que corresponde à extremidade 3' de mRNA usando o novo sistema ACP, chamado como 3' RACE com base em ACP, é ilustrada na FIG. 3.

25 As etapas (c) e (d) da aplicação objeto podem ocorrer em um único tubo usando a mesma mistura de reação exceto para os iniciadores, o que significa que as etapas (c) e (d) são separadas apenas no tempo. Deve ser entendido que os iniciadores que correspondem à porção de extremidade 5' podem ser adicionados à mistura de reação no momento ou depois da síntese do síntese do segundo cDNA de filamento. Em uma forma de realização

preferida, os iniciadores que correspondem à porção de extremidade 5' são adicionados à mistura de reação exatamente depois da etapa (2) estar completa, seguidos pela amplificação subsequente de segundos filamentos de DNA.

5 Como um processo alternativo, na etapa (d) as seqüências completas do primeiro e segundo ACPs, ao invés dos iniciadores que correspondem às porções da extremidade 5' do primeiro e segundo ACPs, podem ser usados como iniciadores 3' e 5' para amplificar o segundo cDNA de filamento obtidos da etapa (c), em que as extremidades 3' e 5' do segundo
10 cDNA de filamento que são inicialmente sintetizados usando o segundo ACP compreende a seqüência complementar do primeiro ACP e a seqüência do segundo ACP, respectivamente e também serve como sítios de emparelhamento perfeito para o primeiro e segundo ACPs. A FIG. 3 também ilustra uma representação esquemática para amplificar um fragmento de
15 cDNA alvo que compreende a região da extremidade 3' que corresponde à extremidade 3' do mRNA pelo processo alternativo estabelecido acima.

Uma das características significantes da presente invenção durante 3'-RACE é que o primeiro ACP que compreende a seqüência de nucleotídeo substancialmente complementar à terminação poliA do mRNA é
20 usado como um iniciador da síntese de cDNA e depois os cDNAs resultantes são diretamente usados como padrão para a amplificação subsequente sem qualquer etapa de purificação adicional para remover o iniciador de síntese de cDNA.

O anelamento do primeiro ACP com os padrões será
25 interrompido durante subsequente pelo efeito da porção reguladora sobre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP sob condições de severidade relativamente altas como descrito no princípio do ACP. Como um resultado, a aplicação objeto à 3'-RACE simplifica os métodos RACE convencionais reduzindo-se a etapa de purificação e também, o ACP usado na aplicação

objeto não envolve os problemas secundários por que o anelamento da porção de extremidade 3' é especificado pela presença da porção reguladora posicionada entre as porções da extremidade 3' e 5' nos ACPs, ao passo que os iniciadores da síntese de cDNA convencionais tais como iniciadores Oligo-dT durante 3'-RACE geram produtos secundários durante a PCR, que são produtos não específicos. De acordo com uma forma de realização preferida, a fórmula do primeiro ACP para a síntese de cDNA pode ser idêntica à fórmula (2).

Quando um iniciador específico de gene é usado como iniciador 5', a primeira amplificação de um fragmento de cDNA alvo contendo uma sequência de extremidade 3' na etapa (c) é realizada de acordo com métodos de PCR convencionais como conhecido na técnica. O termo "específico de gene" na sequência de referência aqui usada refere-se a uma sequência parcial de um gene específico ou complemento deste que foi no geral conhecido ou disponível a uma pessoa habilitada na técnica. Portanto, o iniciador específico de gene significa um que compreende a sequência específica de gene.

O síntese do segundo cDNA de filamento gerado é amplificado pela amplificação do segundo estágio que é usada na aplicação da presente invenção para amplificar uma sequência de ácido nucléico alvo acima. Visto que o ACP descrito nesta invenção pode gerar T_m estável em um iniciador e também tolera "parâmetros de procura de iniciador" para o planejamento de iniciador tal como o comprimento do iniciador, a temperatura de anelamento, o teor de GC e o comprimento de produto de PCR, ele é útil quando as sequências do iniciador específico de gene têm T_m baixo ou são muito sensíveis a tais parâmetros para gerar produtos específicos.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para amplificar rapidamente um fragmento de DNA alvo que compreende

uma região de cDNA que corresponde à região de extremidade 5' de um mRNA, em que o método compreende transcrever de modo reverso o mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos
5 acima. Preferivelmente, o iniciador de acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora específica de gene substancialmente complementar a um sítio no cDNA gerado a partir da transcrição reversa.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é
10 fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) contactar mRNAs com um iniciador de oligonucleotídeo dT ou iniciador aleatório como um iniciador de síntese de cDNA sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucleico enzimática direcionada pelo padrão ocorra, em que o iniciador de síntese de
15 cDNA compreende uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a uma região de um mRNA para hibridizar com ela;

(b) transcrever de modo reverso os mRNAs, usando uma transcriptase reversa, com a qual o iniciador de síntese de cDNA hibridiza
20 para produzir uma população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares aos mRNAs aos quais o iniciador de síntese de cDNA hibridiza, por meio da qual intermediários de mRNA-cDNA são gerados;

(c) permitir que resíduos de citosina sejam formem terminação nas extremidades 3' dos primeiros filamentos de cDNA na forma dos
25 intermediários de mRNA-cDNA pela reação de transferase terminal da transcriptase reversa;

(d) contactar as terminações de citosina nas extremidades 3' dos primeiros filamentos de cDNA gerados a partir da etapa (c) com um oligonucleotídeo que compreende uma porção de extremidade 3' e uma

porção de extremidade 5' separadas por um grupo de base universal ou base não discriminatória análoga, em que a porção de extremidade 3' compreende pelo menos três resíduos de guanina na sua extremidade 3' para hibridizar com as terminações de citosina nas extremidades 3' dos primeiros filamentos de cDNA e a porção de extremidade 5' compreende uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária, sob condições em que a porção de extremidade 3' do oligonucleotídeo é hibridizada às terminações de citosina;

(e) estender as extremidades 3' formadas em terminação dos primeiros filamentos de cDNA para gerar uma sequência adicional complementar ao oligonucleotídeo usando a transcriptase reversa, em que o oligonucleotídeo serve como um padrão na reação de extensão, por meio da qual os primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo são prolongados;

(f) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo obtidos a partir da etapa (e) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende (i) e (ii) como segue:

(i) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um primeiro iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeo substancialmente complementar às sequências da extremidade 3' dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo sob condições em que o primeiro iniciador anela aos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, sob condições em que o primeiro iniciador anela às extremidades 3' dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, por meio da qual os segundos filamentos de DNA de comprimento completo são gerados;

(ii) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um segundo iniciador de qualquer uma das reivindicações de 1 a 25 tendo na sua porção de extremidade 3' uma

seqüência hibridizadora específica de gene substancialmente complementar a uma região em um dos segundos filamentos de DNA de comprimento completo para hibridizar com ela, sob condições em que o segundo iniciador anela a um sítio específico de gene em um dos segundos filamentos de DNA de comprimento completo, por meio da qual um filamento de cDNA específico de gene é gerado; e

(g) realizar uma amplificação de segundo estágio do filamento de cDNA específico de gene em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, compreendendo pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (f)-(i) e (f)-(ii), respectivamente ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (f)-(i) e (f)-(ii), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' de um filamento de cDNA específico de gene, respectivamente, por meio da qual um produto de amplificação de um filamento de cDNA específico de gene é gerado.

As representações esquemáticas para amplificar um fragmento de cDNA alvo que compreende a região de extremidade 5' que corresponde à extremidade 5' de mRNA usando o novo sistema ACP, chamado como 5' RACE com base no ACP, é ilustrada nas FIGs. 4A (usando iniciador de oligonucleotídeo dT) e 4B (usando iniciador aleatório).

As descrições do iniciador de oligonucleotídeo dT usado na etapa (a) são idênticas as daqueles usados no presente método para a amplificação de uma seqüência de ácido nucléico alvo a partir de um mRNA. Alternativamente, quando o tamanho de um mRNA alvo é tão grande que a transcriptase reversa falha antes de atingir as seqüências 5' completas, o iniciador aleatório é usado como iniciador de síntese de cDNA.

De acordo com uma forma de realização preferida, a etapa (c), que permite que resíduos de citosina seja formados em terminação é realizada na presença de íon manganês.

As etapas (f) e (g) da aplicação objeto podem ocorrer em um único tubo usando a mesma mistura de reação exceto para iniciadores, o que significa que as etapas (f) e (g) são separadas apenas no tempo. Deve ser entendido que o(s) iniciador(es) usado(s) em cada etapa (f) e (g) pode(m) ser adicionado(s) à mistura de reação no momento ou depois de cada etapa. Em uma forma de realização preferida, o(s) iniciador(es) é(são) adicionado(s) à mistura de reação exatamente depois que cada etapa é completada, seguido(s) pela amplificação subsequente pela PCR de segundos filamentos de DNA.

Quando um iniciador específico de gene é usado como iniciador 5', a amplificação de um fragmento de cDNA alvo contendo uma seqüência de extremidade 5' na etapa (f) é realizada sob condições de alta severidade de acordo com os métodos de PCR convencionais como conhecido na técnica.

Em uma forma de realização preferida, um fragmento de cDNA alvo contendo uma seqüência de extremidade 5' na etapa (f) é amplificada usando um segundo ACP que compreende uma seqüência específica de gene na porção de extremidade 3', pelas amplificações de PCR de estágio duplo que são usadas na aplicação da presente invenção para amplificar uma seqüência de ácido nucléico alvo acima. Visto que o ACP descrito nesta invenção pode gerar T_m estável em um iniciador e também tolera "parâmetros de procura de iniciador" tais como planejamento de iniciador, que compreende o comprimento do iniciador, a temperatura de anelamento, o teor de GC e o comprimento do produto de PCR, é particularmente útil quando as seqüências do iniciador específico de gene têm T_m baixa ou são muito sensíveis a tais parâmetros para gerar produtos específicos. A fórmula do segundo ACP é idêntica à fórmula (1) em que a

porção de extremidade 3' contém uma sequência específica de gene.

O oligonucleotídeo para a etapa (d) é similar ao iniciador CapFinder (Chenchik *et al.*, 1998; Chenchik *et al.* Patentes U.S. Nºs 5.962.271 e 5.962.272) no sentido de que ambos compreendem pelo menos
5 três resíduos de guanina na sua extremidade 3' e uso deles como um iniciador que muda o padrão para a extensão da extremidade 3' do primeiro cDNA de filamento pela transcriptase reversa, ao passo que eles são claramente diferentes um do outro em termos da função de uma mudança no controle do
10 anelamento do iniciador a um ácido nucléico padrão em associação com a temperatura de anelamento durante a PCR. O iniciador CapFinder não compreende grupo de resíduo de base universal que é responsável pela regulação do anelamento do iniciador no ACP, de modo que o método de PCR com CapFinder durante a 5' - RACE (Chenchik *et al.*, 1998) não pode
15 ser livre de um alto teor de produtos secundários tal como ramos de DNA que surgem da contaminação dos iniciadores tais como os iniciadores CapFinder e Oligo-dT usados na síntese de cDNA durante a PCR. Por outro lado, o grupo de resíduo de base universal do primeiro ACP desempenha um papel chave na regulação do anelamento do iniciador, de modo que o método objeto não fornece qualquer causa para os problemas secundários durante a amplificação
20 subsequente pela PCR; esta é uma característica chave da aplicação do ACP ao 5' - RACE.

Além disso, quando o ACP da presente invenção é usado na tecnologia de 5' - RACE, é desnecessário conduzir o processo de separação física tal como uma síntese de fase sólida de cDNA e procedimentos que
25 tenham sido introduzidos como um método alternativo para remover todos os contaminantes usados na síntese de cDNA (Schramm *et al.*, 2000).

Em uma forma de realização preferida, o oligonucleotídeo para formar um par ou pares de base com a terminação de citosina durante 5' - RACE que tem uma estrutura similar ao ACP, em que o oligonucleotídeo é

representado pela seguinte fórmula geral (3): 5' - dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dZ₁₋₁₀-G₃₋₅ - 3', em que dX representa um desoxirribonucleotídeo e compreende uma sequência arbitrária pré selecionada; dY representa uma porção reguladora que compreende 2 a 10 bases universais ou bases não discriminatórias análogas; dZ representa um desoxirribonucleotídeo e compreende uma
5 sequência arbitrária pré selecionada; e G₃₋₅ representa três a cinco guaninas.

O mais preferivelmente, a sequência da porção de extremidade 3' dZ é de cerca de 2 a 3 nucleotídeos no comprimento. Além disso, em uma forma de realização, a porção de extremidade 5' dX pode incluir uma
10 sequência que é reconhecida por uma endonuclease de restrição.

O G₃₋₅ pode ser de três a cinco riboguaninas ou desoxiguaninas ou uma combinação de riboguanina e desoxirriboguanina. Em uma forma de realização mais preferida, o G₃₋₅ compreende duas riboguaninas e uma desoxirriboguanina (r(G)₂-d(G) - 3'), o mais preferivelmente, três
15 riboguaninas.

Quando o iniciador específico de gene na etapa (f) é usado como iniciador 3' durante 5' - RACE, um fragmento de cDNA alvo contendo uma sequência de extremidade 5' é amplificado sob condições de alta severidade pelos métodos de PCR convencionais como conhecido na técnica.

Em uma forma de realização preferida, um fragmento de cDNA alvo contendo uma sequência de extremidade 5' é amplificado usando um segundo ACP que compreende uma sequência específica de gene na porção de extremidade 3', pelas amplificações de PCR de estágio duplo que são conduzidas na aplicação para amplificar uma sequência de ácido nucléico
20 alvo na presente invenção. Visto que o ACP descrito nesta invenção pode fornecer T_m estável em um iniciador e também tolera "parâmetros de procura de iniciador" para o planejamento de iniciador tal como o comprimento do iniciador, a temperatura de anelamento, o teor de GC e o comprimento de produto de PCR, ele é útil quando as sequências do iniciador específico de
25

gene têm T_m baixo ou são muito sensíveis a tais parâmetros para gerar produtos específicos. A fórmula do segundo ACP é idêntica à fórmula (1) em que a porção de extremidade 3' contém uma sequência específica de gene.

O uso de ACP na tecnologia RACE significativamente simplifica e melhora as tecnologias de RACE convencionais com respeito à amplificação de extremidades de cDNA como descrito acima. A característica vital do método objeto é ser livre dos problemas secundários que surgem dos iniciadores usados nos métodos RACE convencionais. Conseqüentemente este método aqui descrito pode ser mais eficaz, mais fácil, menos intensivo em trabalho e mais reprodutíveis do que os métodos de RACE convencionais.

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para amplificar rapidamente um fragmento de cDNA alvo que compreende a região da extremidade 3' de mRNA, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento anteriormente descritos (incluindo o primeiro e segundo iniciadores). De acordo com uma forma de realização desta invenção, estes kits ainda compreendem um iniciador ou um par de iniciadores tendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde à porção de extremidade 5' dos ACPs; no caso em que a porção de extremidade 5' compreende a sequência iniciadora universal, é mais preferido que o kit compreenda os iniciadores universais. Os presentes kits podem opcionalmente incluir os reagentes requeridos para realizar reações de PCR tais como tampões, DNA polimerase, cofatores da DNA polimerase e desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfatos. Opcionalmente, os kits também podem incluir várias moléculas de polinucleotídeo, transcriptase reversa, vários tampões e reagentes e anticorpos que inibem a atividade da DNA polimerase. Os kits também podem incluir reagentes necessários para realizar reações de controle positiva e negativa. Quantidades ótimas de reagentes a serem usadas em uma dada reação pode ser facilmente determinada pelo técnico habilitado tendo o benefício da divulgação atual. Os

kits, tipicamente, são adaptados para conter em embalagens ou compartimentos separados os constituintes anteriormente descritos.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para amplificar rapidamente um fragmento de cDNA alvo que compreende a
5 região de extremidade 5' de mRNA, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima (incluindo o iniciador de oligonucleotídeo dT e o iniciador aleatório para a síntese de cDNA, o oligonucleotídeo para formar um par ou
10 pares de base com a terminação de citosina, o primeiro iniciador e o segundo iniciador). De acordo com uma forma de realização desta invenção, estes kits ainda compreende um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do primeiro e segundo iniciadores como usado nas etapas (f)-(i) e (f)-(ii); no caso
15 em que a porção de extremidade 5' compreende a sequência iniciadora universal, é mais preferido que o kit compreenda os iniciadores universais.

V. Aplicação para amplificar cDNA de comprimento completo

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para amplificar uma população de cDNAs de filamento duplo de comprimento completo complementar aos mRNAs, em que o método
20 compreende transcrever de modo reverso o mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador tendo a estrutura do ACP é um tendo uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA dos
25 mRNAs.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método que compreende:

(a) contactar os mRNAs com um primeiro iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima, em que a porção de extremidade 3'

do primeiro iniciador tem uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliAs dos mRNAs para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

5 (b) transcrever de modo reverso os mRNAs, usando uma transcriptase reversa, à qual o primeiro iniciador hibridiza para produzir a população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares aos mRNAs aos quais o iniciador hibridiza, por meio da qual intermediários de mRNA-cDNA são gerados;

10 (c) permitir que resíduos de citosina sejam formados em terminação nas extremidades 3' dos primeiros filamentos de cDNA na forma dos intermediários de mRNA-cDNA pela reação de transferase terminal da transcriptase reversa;

 (d) contactar as terminações de citosina nas extremidades 3'
15 dos primeiros filamentos de cDNA gerados a partir da etapa (c) com um oligonucleotídeo que compreende uma porção de extremidade 3' e uma porção de extremidade 5' separadas por um grupo de base universal ou base não discriminatória análoga, em que a porção de extremidade 3' compreende pelo menos três resíduos de guanina na sua extremidade 3' para hibridizar
20 com as terminações de citosina nas extremidades 3' dos primeiros filamentos de cDNA e a porção de extremidade 5' compreende uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária, sob condições em que a porção de extremidade 3' do oligonucleotídeo é hibridizada às terminações de citosina;

 (e) estender as extremidades 3' formadas em terminação dos
25 primeiros filamentos de cDNA para gerar uma sequência adicional complementar ao oligonucleotídeo usando a transcriptase reversa, em que o oligonucleotídeo serve como um padrão na reação de extensão, por meio da qual os primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo são prolongados; e

(f) realizar uma amplificação dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo gerados a partir da etapa (e) que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde ao mesmo primeiro iniciador e oligonucleotídeo como usados nas etapas (a) e (d), respectivamente ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponda a cada porção de extremidade 5' do primeiro iniciador e oligonucleotídeo usados nas etapas (a) e (d), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, respectivamente, por meio das quais os produtos de amplificação dos filamentos de cDNA de comprimento completo complementares aos mRNAs são gerados.

Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza em princípio os presentes métodos para a amplificação da seqüência de ácido nucléico anteriormente debatida, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida. Além disso, o ACP descrito acima em que a porção de extremidade 3' tem uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA é em princípio idêntico ao primeiro iniciador para o presente método durante a 3'-RACE. Além disso, o oligonucleotídeo para formar um par ou pares de base com a terminação de citosina e o par de iniciadores usados na etapa (f) são em princípio idênticos àqueles para a 5' - RACE desta invenção debatida acima.

Uma representação esquemática para amplificar moléculas de cDNA de comprimento completo da presente invenção é ilustrada na FIG. 5.

O uso de ACP significativamente simplifica e melhora as tecnologias convencionais com respeito à amplificação de cDNAs de comprimento completo como descrito acima. A característica vital do método

objeto é ser livre dos problemas secundários que surgem dos iniciadores usados nos métodos convencionais. Conseqüentemente este método aqui descrito pode ser mais eficaz, mais fácil, menos intensivo em trabalho e mais reprodutível do que os métodos convencionais.

5 Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para amplificar um cDNA de filamento duplo de comprimento completo complementar ao mRNA, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima (incluindo o iniciador de oligonucleotídeo dT, o oligonucleotídeo para
10 formar um par ou pares de base com a terminação de citosina, o(s) iniciador(es) usado(s) na etapa (f)). De acordo com uma forma de realização desta invenção, estes kits ainda compreendem um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do iniciador e oligonucleotídeo usados nas etapas (a) e (d),
15 respectivamente; no caso em que a porção de extremidade 5' compreende a seqüência iniciadora universal, é mais preferido que o kit compreenda os iniciadores universais. Os presentes kits podem opcionalmente incluir os reagentes requeridos para realizar as reações de PCR tais como tampões, DNA polimerase, cofatores da DNA polimerase e desoxirribonucleotídeos-5'-
20 trifosfatos. Opcionalmente, os kits também podem incluir várias moléculas de polinucleotídeo, transcriptase reversa, vários tampões e reagentes e anticorpos que inibem a Atividade de DNA polimerase. Os kits também podem incluir reagentes necessários para realizar reações de controle positiva e negativa. Quantidades ótimas de reagentes a serem usados em uma dada reação podem
25 ser facilmente determinadas pelo técnico habilitado tendo o benefício da divulgação atual. Os kits, tipicamente, são adaptados para conter em embalagens ou compartimentos separados os constituintes anteriormente descritos.

VI. Aplicação para amplificar cDNA enriquecido em 5'

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para amplificar uma população de cDNAs de filamento duplo enriquecidos em 5' que compreende regiões de cDNA que corresponde às regiões de extremidade 5' de mRNAs, em que o método compreende transcrever de modo reverso o mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador tendo a estrutura do ACP usada para a síntese de cDNA é um tendo na sua porção de extremidade 3' pelo menos seis seqüências de nucleotídeo aleatórias.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método que compreende:

(a) contactar os mRNAs com um primeiro iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucleico enzimática direcionada pelo padrão ocorra, em que a porção de extremidade 3' do primeiro iniciador tem pelo menos seis seqüências de nucleotídeo aleatórias;

(b) realizar as etapas (b)-(e) do método para amplificar uma população de cDNAs de filamento duplo de comprimento completo, por meio das quais primeiros filamentos de cDNA enriquecidos em 5' são prolongados;

(c) realizar uma amplificação dos primeiros filamentos de cDNA enriquecidos em 5' gerados a partir da etapa (b) que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponda a cada porção de extremidade 5' do iniciador e o oligonucleotídeo usado nas etapas (a) e (b), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' dos primeiros filamentos de cDNA enriquecidos em 5', respectivamente, por meio da qual os produtos de amplificação dos filamentos de cDNA enriquecidos em 5' são gerados.

Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza em princípio os presentes métodos para a amplificação da sequência de ácido nucléico anteriormente debatida, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida. Além disso, o oligonucleotídeo para formar um par ou pares de base com a terminação de citosina e o par de iniciadores usado na etapa (c) são em princípio idênticos àqueles para a 5' - RACE desta invenção debatida acima.

Uma representação esquemática para o método para amplificar cDNAs de filamento duplo enriquecidos em 5' complementares aos mRNAs é ilustrada na FIG. 6.

“cDNAs enriquecidos em 5'” refere-se a uma porção significativa dos constituintes de cDNA que contém a informação de sequência de nucleotídeo da extremidade 5' dos mRNAs a partir da qual os cDNAs são derivados.

A fórmula do primeiro iniciador é idêntica à fórmula (1) em que a porção de extremidade 3' compreende uma sequência aleatória de nucleotídeo. Em uma forma de realização preferida, a porção de extremidade 3' do primeiro iniciador usado na etapa (a) contém pelo menos seis desoxirribonucleotídeos aleatórios. Em uma forma de realização preferida, a porção de extremidade 5' do primeiro iniciador usada na etapa (a) pode incluir uma sequência que é reconhecida por uma endonuclease de restrição.

Os métodos convencionais requerem mais etapas para amplificar as moléculas de cDNA enriquecidas em 5' complementares às moléculas de mRNA do que o método objeto por que os métodos convencionais usam os iniciadores convencionais que não têm a função de controlar o anelamento do iniciador. Ao contrário, este método objeto é consideravelmente um método simples e eficaz devido à função de regular o anelamento do iniciador gerado pelo efeito de um grupo de resíduo de base

universal no ACP.

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para amplificar cDNAs de filamento duplo enriquecidos em 5' complementares aos mRNAs, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima (o primeiro iniciador, o oligonucleotídeo para formar um par ou pares de base com a terminação de citosina). De acordo com uma forma de realização desta invenção, estes kits ainda compreendem um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do iniciador e oligonucleotídeo usados nas etapas (a) e (b), respectivamente; no caso em que a porção de extremidade 5' compreende a seqüência iniciadora universal, é mais preferido que o kit compreenda os iniciadores universais. Os presentes kits podem opcionalmente incluir os reagentes requeridos para realizar as reações de PCR tais como tampões, DNA polimerase, cofatores da DNA polimerase e desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfatos. Opcionalmente, os kits também podem incluir várias moléculas de polinucleotídeo, transcriptase reversa, vários tampões e reagentes e anticorpos que inibem a atividade de DNA polimerase. Os kits também podem incluir reagentes necessários para realizar as reações de controle positiva e negativa. Quantidades ótimas de reagentes a serem usados em uma dada reação podem ser facilmente determinadas pelo técnico habilitado tendo o benefício da divulgação atual. Os kits, tipicamente, são adaptados para conter em embalagens ou compartimentos separados os constituintes anteriormente descritos.

VII. Aplicação para a Impressão Digital de DNA ou RNA

Esta aplicação usando o ACP da invenção objeto pode fornecer um método melhorado para detectar polimorfismos no DNA genômico (impressão digital do DNA) ou para detectar a expressão de gene diferencial no mRNA (impressão digital do RNA).

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para produzir uma impressão digital de DNA do gDNA, em que o método compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador tendo a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência arbitrária de nucleotídeo substancialmente complementar aos sítios no gDNA.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

10 (a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da impressão digital do DNA, que é um conjunto de segmentos de DNA separados característicos do genoma, a partir do gDNA em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o iniciador ou o par de iniciadores de qualquer um dos ACPs descritos acima, em que cada iniciador tem na sua porção de extremidade 3' uma sequência arbitrária de nucleotídeo substancialmente complementar aos sítios no gDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o iniciador ou o par de iniciadores anela ao gDNA, por meio das quais o conjunto de segmentos de DNA separados caracterizados como uma impressão digital de DNA é produzido; e

20 (b) realizar uma amplificação de segundo estágio do conjunto de segmentos de DNA separados gerado a partir da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo iniciador ou par de iniciadores como usados na etapa (a) ou um iniciador ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponda a cada porção de extremidade 5' do iniciador ou par de iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que o iniciador ou cada um dos pares de iniciadores anelem às

seqüências de extremidades 3' e 5' do conjunto de segmentos de DNA separados gerado a partir da etapa (a), respectivamente, por meio da qual o conjunto de segmentos de DNA separado é re-amplificado.

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para produzir uma impressão digital de RNA de uma amostra de mRNA, em que o método compreende transcrever de modo reverso e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs. Preferivelmente, o iniciador de acordo com a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência arbitrária de nucleotídeo substancialmente complementar aos sítios nos filamentos de cDNA gerados a partir da transcrição reversa e/ou um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA dos mRNAs.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) contactar a amostra de mRNA com um primeiro iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima, em que o primeiro iniciador tem uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA da amostra de mRNA para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

(b) transcrever de modo reverso a amostra de mRNA à qual o primeiro iniciador hibridiza para produzir uma população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares à amostra de mRNA à qual o primeiro iniciador hibridiza;

(c) realizar uma amplificação de primeiro estágio da população de primeiros filamentos de cDNA gerados a partir da etapa (b) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de

anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um segundo iniciador ou par de iniciadores de qualquer um dos ACPs descritos acima, em que cada iniciador tem na sua porção de extremidade 3' uma seqüência arbitrária de nucleotídeo substancialmente complementar aos sítios nos primeiros filamentos de cDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o iniciador ou par de iniciadores anela à amostra de mRNA, por meio da qual um conjunto de segmentos de cDNA separados caracterizados como uma impressão digital de RNA é produzido; e

(d) realizar uma amplificação de segundo estágio do conjunto de segmentos de cDNA separados gerados a partir da etapa (c) em uma segunda temperatura de anelamento que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo iniciador ou par de iniciadores como usados na etapa (c) ou um iniciador ou par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponda a cada porção de extremidade 5' do iniciador ou par de iniciadores usados na etapa (c), sob condições em que o iniciador ou cada um do par de iniciadores anele às seqüências de extremidades 3' e 5' do conjunto de segmentos de cDNA separados gerados a partir da etapa (c), respectivamente, por meio da qual o conjunto de segmentos de cDNA separado é re-amplificado.

Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza em princípio os presentes métodos para a amplificação da seqüência de ácido nucléico anteriormente debatida, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida. Além disso, a impressão digital do RNA em princípio segue o presente método para detectar a complementaridade do DNA ao mRNA diferencialmente expresso.

O termo "DNA genômico" como aqui usado refere-se a uma população de DNA que compreende o componente genético completo de uma

espécie. Assim, o DNA genômico compreende o conjunto completo de genes presentes em uma espécie pré selecionada. O conjunto completo de genes em uma espécie é também aludido como genoma. O termo “impressão digital” de DNA ou RNA como aqui usado refere-se a um conjunto de produtos de
5 amplificação de DNA separados característicos de um genoma ou um conjunto de segmentos de cDNA separados característicos de uma amostra de mRNA, respectivamente.

Nas impressões digitais pela PCR arbitrariamente preparadas anteriores, chamadas de AP-PCR, iniciadores arbitrários curtos ou longos
10 foram usados sob condições não severas para 2 a 5 ciclos iniciais de amplificação pela PCR por que uma temperatura de anelamento baixa é requerida para se obter a iniciação arbitrária, tal que uma porção significativa de fragmentos isolados não seja ainda reproduzível embora a amplificação eficaz se processe nos ciclos seguintes sob condição de severidade alta.

15 Ao contrário da AP-PCR, a PCR com base no ACP para a impressão digital aumenta a especificidade de anelamento do iniciador durante a PCR devido à função de um grupo de resíduo de base universal posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP, em que o grupo de resíduo de base universal restringe o sítio de anelamento à porção de
20 extremidade 3' do ACP e também permite que esta porção de extremidade 3' anele a uma temperatura de anelamento relativamente alta. Assim, a PCR com base no ACP para a impressão digital elimina completamente produtos positivos falsos e significativamente aumenta a reprodutibilidade.

25 Em uma forma de realização preferida, o ACP contém uma sequência arbitrária na porção de extremidade 3' com pelo menos 6 nucleotídeos no comprimento. Mais preferivelmente, a porção de extremidade 3' contém de 8 a 15 nucleotídeos no comprimento, o mais preferivelmente, de cerca de 10 nucleotídeos no comprimento.

Um único ACP ou um par de ACPs podem ser usados para

detectar polimorfismos na impressão digital do DNA. Preferivelmente, um par do ACP é usado para a impressão digital do DNA por que um par de ACPs produz mais produtos do que um único ACP arbitrário.

Um exemplo da impressão digital do DNA usando ACP é
5 conduzido por dois estágios de amplificações pela PCR sob as seguintes condições: as reações de amplificação são realizadas sob condições de severidade baixa por dois ciclos da PCR do primeiro estágio que compreende anelamento, estender e desnaturar a reação; a mistura de reação contendo DNA genômico, o tampão de reação de PCR, $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP,
10 dGTP e dTTP), um par dos ACPs é pré aquecida, a Taq polimerase é adicionada na mistura de reação; as reações de PCR são realizadas, seguidas pela desnaturação do produto de amplificação; depois da reação completa da PCR do primeiro estágio, o iniciador pré selecionado arbitrário JYC4 que corresponde à porção de extremidade 5' dos ACPs é adicionado à mistura de
15 reação e depois a amplificação pela PCR de segundo estágio é conduzida.

Deve ser mencionado que uma concentração apropriada do ACP é usada para produzir a impressão digital do DNA. Se a quantidade do ACP é muito baixa, os produtos amplificados resultantes de PCR não são reprodutíveis. Ao contrário, a quantidade em excesso do ACP gera produtos
20 secundários tais como sujidade de DNA durante a PCR. Em uma forma de realização preferida, a concentração do ACP está entre cerca de $0,1 \mu M$ e $2 \mu M$. O mais preferivelmente, a concentração do ACP é de cerca de $1,4 \mu M$.

Em uma forma de realização preferida, a concentração do iniciador que corresponde à porção de extremidade 5' dos ACPs está entre
25 cerca de $0,1 \mu M$ e $2 \mu M$, o mais preferivelmente, cerca de $0,8 \mu M$.

As amostras de DNA genômico e mRNA podem ser obtidas de uma ampla variedade de biomateriais e condições. Por exemplo, elas podem ser obtidas de plantas, animal (ser humano) e micróbios e de organismos individuais diferentes.

Os produtos amplificados podem ser analisados pela eletroforese em gel. Em uma forma de realização, os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como o tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para produzir uma impressão digital de DNA pelo uso de gDNA ou mRNA, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima. As descrições dos kits para a amplificação de sequência de ácido nucléico e para detectar a complementaridade de DNA para mRNA diferencialmente expresso desta invenção podem ser aplicadas ao presente kit.

VIII. Aplicação para a Identificação de Segmento de Homologia Conservada em Famílias de Multigene

Esta aplicação usando a ACP da invenção objeto também pode fornecer um método melhorado para a identificação de segmento de homologia conservada em famílias de multigene.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para identificar segmentos de homologia conservada em uma família de multigene a partir de uma amostra de mRNA, em que o método compreende transcrever de modo reverso e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador tendo a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso

ou uma sequência degenerada que codifica a sequência de aminoácido de um segmento de homologia conservada nos filamentos de cDNA gerados a partir da transcrição reversa e/ou um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA dos mRNAs.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) contactar a amostra de mRNA com um primeiro iniciador de qualquer uma das reivindicações de 1 a 29, em que o primeiro iniciador tem uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às terminações poliA da amostra de mRNA para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

(b) transcrever de modo reverso a amostra de mRNA à qual o primeiro iniciador hibridiza para produzir uma população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares à amostra de mRNA à qual o primeiro iniciador hibridiza;

(c) realizar uma amplificação de primeiro estágio da população de primeiros filamentos de cDNA gerados a partir da etapa (b) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um segundo iniciador de qualquer uma das reivindicações de 1 a 25 tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso ou uma sequência degenerada que codifica a sequência de aminoácido de um segmento de homologia conservada nos primeiros filamentos de cDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o segundo iniciador anela à sequência de consenso ou sequência degenerada de primeiros filamentos de cDNA, por meio da qual os segmentos de cDNA da extremidade 3' tendo a sequência de consenso ou

seqüência degenerada são gerados; e

(d) realizar uma amplificação de segundo estágio dos segmentos de cDNA da extremidade 3' gerados a partir da etapa (c) em uma segunda temperatura de anelamento que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (a) e (c) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (a) e (c), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' de segmentos de cDNA da extremidade 3', respectivamente, por meio das quais a os seguimentos de cDNA de homologia conservada da extremidade 3' são amplificados.

Esta forma de realização específica segue em princípio, o presente método durante 3' RACE como debatido anteriormente exceto para o segundo iniciador usado.

Em uma outra forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) realizar as etapas de (a)-(e) do método para amplificar uma população cDNA de filamento duplo de comprimento completo, por meio das quais os filamentos de cDNA de comprimento completo são gerados;

(b) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo obtidos a partir da etapa (a) em uma primeira temperatura de anelamento, que compreende as etapas de:

(i) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um primeiro iniciador que compreende uma seqüência de nucleotídeo substancialmente complementar às seqüências de extremidade 3' dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo

sob condições em que o primeiro iniciador anela aos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, sob condições em que o primeiro iniciador anela às extremidades 3' dos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, por meio das quais segundos filamentos de DNA de comprimento completo são gerados; e

(ii) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um segundo iniciador de qualquer uma das reivindicações de 1 a 25 tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso ou uma sequência degenerada que codifica a sequência de aminoácido de um segmento de homologia conservada nos segundos filamentos de DNA de comprimento completo para hibridizar com ela, sob condições em que o segundo iniciador anela à sequência de consenso ou sequência degenerada de segundos filamentos de DNA de comprimento completo, por meio das quais os segmentos de cDNA da extremidade 5' tendo a sequência de consenso ou sequência degenerada são gerados; e

(c) realizar uma amplificação de segundo estágio dos segmentos de cDNA da extremidade 5' gerados a partir da etapa (b) em uma segunda temperatura de anelamento que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (b)-(i) e (b)-(ii), respectivamente ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (b)-(i) e (b)-(ii), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às sequências de extremidades 3' e 5' dos segmentos de cDNA da extremidade 5', respectivamente, por meio das quais os segmentos de cDNA de homologia conservada da extremidade 5' são amplificados.

Esta forma de realização específica segue em princípio, o presente método para a 5' RACE como debatida anteriormente exceto para o segundo iniciador usado.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método
5 para identificar segmentos de homologia conservada em uma família de multigene a partir do gDNA, em que o método compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador tendo a estrutura do ACP é um tendo na sua
10 porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso ou uma sequência degenerada que codifica a sequência de aminoácido de um segmento de homologia conservada no gDNA.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é
15 fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos segmentos de homologia conservada do gDNA em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o iniciador ou o par de
20 iniciadores de qualquer um dos ACPs descritos acima, em que cada iniciador tem na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso ou uma sequência degenerada que codifica a sequência de aminoácido de um segmento de homologia conservada no gDNA para hibridizar com ela, sob
25 condições em que o iniciador ou o par de iniciadores anela à sequência de consenso ou sequência degenerada de gDNA, por meio da qual os segmentos de DNA genômico tendo a sequência de consenso ou a sequência degenerada são gerados; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio dos

segmentos de DNA genômico gerados a partir da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo iniciador ou par de iniciadores como
5 usados na etapa (a) ou um iniciador ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do iniciador ou par de iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que o iniciador ou cada um do par de iniciadores anela às seqüências de extremidades 3' e 5' dos segmentos de DNA genômico gerados
10 a partir da etapa (a), respectivamente, por meio da qual os segmentos de genômicos de homologia conservada são amplificados.

O presente método segue em princípio, o presente método para amplificar uma seqüência de ácido nucléico alvo de um DNA como debatido anteriormente exceto para o iniciador usado.

15 Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza em princípio os presentes métodos para a amplificação de seqüência de ácido nucléico anteriormente debatidos, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida. Além disso, onde um mRNA é usado como
20 material de partida, os presentes métodos para 3' ou 5' RACE são em princípio aplicados aos presentes métodos para a identificação de segmentos de homologia conservada em famílias de multigene.

A fórmula do ACP para a identificação de segmentos de homologia conservada em famílias de multigene é idêntica à fórmula (1) em
25 que a porção de extremidade 3' do ACP tem uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência de consenso em uma família de gene ou uma seqüência degenerada que codifica a seqüência de aminoácido de uma homologia conservada.

Existem dois métodos principais para o planejamento do

iniciador degenerado: (a) usando os dados da sequência de peptídeo obtidos a partir de uma proteína purificada; e (b) usando dados da sequência da proteína de consenso dos alinhamentos de famílias de gene. Se ortólogos do gene de interesse foram clonados a partir de outros organismos ou se o gene é um membro de uma família de gene, será possível gerar alinhamentos de sequência de proteína.

Estes podem revelar regiões apropriadas para o planejamento de iniciadores degenerados, por exemplo, a partir de sequência de consenso de regiões altamente conservadas. As amplificações usando iniciadores degenerados podem ser algumas vezes problemáticas e podem requerer otimização. O primeiro parâmetro é a temperatura de anelamento. É importante manter a temperatura de anelamento tão alta quanto possível para se evitar a amplificação não específica extensiva e uma boa regra prática é usar 55° C como uma temperatura de partida. No geral, é difícil manter esta regra por que os iniciadores degenerados devem ser planejados com base nas sequências de aminoácidos como uma pré condição. Entretanto, o ACP da presente invenção não tem que satisfazer esta exigência por que ele permite uma temperatura de anelamento alta tal como 65° C no segundo estágio de amplificação pela PCR independente do planejamento do iniciador.

De acordo com uma forma de realização preferida, o segundo iniciador é uma reunião de iniciadores cada um compreendendo uma sequência degenerada selecionada de uma pluralidade dos nucleotídeos que codificam a sequência de aminoácido da sequência de consenso.

O termo “região conservada” e mais especificamente “região conservada de um gene em uma família de multigene” como aqui usado refere-se a um segmento de sequência de nucleotídeo de um gene ou sequência de aminoácido de uma proteína que é significativamente similar entre membros de famílias de gene. O grau de similaridade pode variar. Em alguns casos as regiões conservadas serão idênticas entre os membros da

família. Em alguns casos a sequência de nucleotídeo pode variar significativamente mas ainda codifica segmentos de aminoácido que são conservados entre os membros da família. O termo “sequência de consenso” como aqui usado refere-se às bases mais frequentemente encontradas em qualquer posição dada quando da comparação de uma quantidade grande de

5 sequências de nucleotídeos similares.

Alternativamente, os presentes métodos para a identificação de segmentos de homologia conservada também podem ser combinados com aqueles para detectar mRNAs diferencialmente expressos.

10 Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para identificar um segmento de homologia conservada em uma família de multigene pelo uso de mRNA ou gDNA, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima. As descrições dos kits para a amplificação da

15 sequência de ácido nucléico, 3' RACE e 5' RACE desta invenção podem ser aplicadas ao presente kit.

IX. Aplicação para a Identificação de uma Variação de Nucleotídeo

Esta aplicação usando o sistema ACP da invenção objeto

20 também pode fornecer um método melhorado para identificar uma variação de nucleotídeo em um ácido nucléico alvo.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para identificar uma variação de nucleotídeo em um ácido nucléico alvo, em que o método compreende realizar uma reação de amplificação usando

25 iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador tendo a estrutura do ACP é (a) um primeiro iniciador tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência pré selecionada em um primeiro sítio de ácido nucléico alvo,

em que cada um do primeiro iniciador e do primeiro sítio compreende uma posição de interrogação que corresponde à variação de nucleotídeo, e/ou (b) um segundo iniciador tendo uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré selecionada a um segundo sítio de ácido nucléico alvo.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio para produzir um primeiro filamento de DNA complementar ao ácido nucléico alvo incluindo a variação de nucleotídeo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um primeiro iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré selecionada em um primeiro sítio do ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, em que cada um do primeiro iniciador e do primeiro sítio compreende uma posição de interrogação que corresponde à variação de nucleotídeo, por meio da qual o primeiro filamento de DNA complementar ao ácido nucléico alvo incluindo a variação de nucleotídeo é gerado quando a posição de interrogação é ocupada pelo nucleotídeo complementar do primeiro iniciador ao seu nucleotídeo correspondente do primeiro sítio; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do primeiro filamento de DNA gerado a partir da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende as etapas:

(i) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um segundo iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré

selecionada em um segundo sítio do ácido nucléico alvo para hibridizar com ela sob condições em que o segundo iniciador anela ao segundo sítio do ácido nucléico alvo, por meio das quais um segundo filamento de DNA complementar ao primeiro filamento de DNA incluindo a variação de nucleotídeo é gerado; e

(ii) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (a) e (b)-(i) ou um par de iniciadores cada um tendo uma seqüência hibridizadora complementar ou que corresponde às extremidades 3' e 5' do segundo filamento de DNA gerado a partir da etapa (b)-(i) para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' do segundo filamento de DNA, respectivamente, por meio das quais o segundo filamento de DNA que compreende o primeiro e segundo sítios do ácido nucléico alvo nas suas extremidades 3' e 5' é amplificado de modo que um segmento de nucleotídeo alvo curto que corresponde ao segundo filamento de DNA contendo a variação de nucleotídeo é gerado.

Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza em princípio os presentes métodos para a amplificação da seqüência de ácido nucléico anteriormente debatida, as descrições comuns entre eles são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida.

Uma representação esquemática desta forma de realização específica para genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) usando o novo ACP é ilustrada na FIG. 7A.

A fórmula do ACP para a detecção de uma variação de nucleotídeo, é idêntica à fórmula (1) em que a sua porção de extremidade 3' compreende uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré selecionada em um sítio do ácido nucléico alvo para

hibridizar com ela contendo a variação de nucleotídeo, em que os nucleotídeos que correspondem à variação de nucleotídeo e seus nucleotídeos complementares do ACP ocupam uma posição de interrogação. O processo para esta aplicação é realizada pelas amplificações de PCR de estágio duplo usando o DNA genômico obtido a partir de amostras tais como o sangue do paciente ou um segmento curto do DNA da amostra, que inclui uma variação de nucleotídeo alvo. A amostra de nucleotídeo de interesse pode ser obtida a partir de ácido nucléico humano e um organismo que possa causar uma doença infecciosa.

O método usando amplificações pela PCR de estágio duplo para detectar a genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) basicamente segue o processo usado para amplificar uma seqüência de ácido nucléico alvo usando DNA genômico como um material de partida. Além disso, o processo para a amplificação de DNA multiplex pode ser adaptado para esta aplicação.

Usar um segmento curto do DNA da amostra incluindo uma variação de nucleotídeo alvo como um material de partida para o processo acima, é preferível que o segmento curto alvo seja pré amplificado antes da etapa (a) usando um par de iniciadores em que cada um tem uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar ao DNA da amostra para hibridizar com ela. Além disso, mais do que um segmento de nucleotídeo alvo cada um incluindo um SNP pode ser preparado pela amplificação de DNA multiplex como descrito na Aplicação II a ser usado como um material de partida na invenção objeto para triar SNP múltiplo.

O primeiro ACP usado na etapa (a) para a detecção de uma base polimórfica é um ACP específico de alelo que contém uma posição de interrogação dentro da sua porção de extremidade 3' ocupada por um nucleotídeo complementar aos nucleotídeos correspondentes da variação de nucleotídeo em um ácido nucléico alvo. Preferivelmente, a posição de

interrogação do primeiro iniciador está no meio da sua porção de extremidade 3'. Em uma forma de realização mais preferida, a posição de interrogação do ACP específico de alelo está dentro de cerca de 10 bases do nucleotídeo da extremidade 3'. Mais vantajosamente, a posição de interrogação do ACP específico de alelo está dentro de cerca de 6 bases do nucleotídeo da extremidade 3' do ACP específico de alelo. Em uma outra forma de realização preferida, a posição de interrogação do ACP específico de alelo está localizada dentro das posições 4 e 6 a partir do nucleotídeo da extremidade 3'. O mais preferivelmente, a posição de interrogação do ACP específico de alelo está localizada na posição 5 a partir do nucleotídeo da extremidade 3'. O termo "nucleotídeo da extremidade 3'" aqui usado refere-se a um nucleotídeo que está posicionado na extremidade 3' do ACP.

Em uma outra forma de realização, a porção de extremidade 3' do ACP específico de alelo usado na etapa (a) contém pelo menos 6 nucleotídeos no comprimento, que é uma exigência mínima de comprimento para o anelamento do iniciador. Preferivelmente, a sequência da porção de extremidade 3' é de cerca de 8 a 20 nucleotídeos no comprimento. O mais preferivelmente, a sequência da porção de extremidade 3' é de cerca de 10 nucleotídeos no comprimento incluindo uma posição de interrogação.

Em uma forma de realização, pelo menos um desemparelhamento artificial também pode ser colocado dentro da porção de extremidade 3' do ACP usando a base universal ou análogo não discriminatório que minimamente se liga por hidrogênio com todas as quatro bases sem o rompimento estérico do duplex DNA. Embora a posição do desemparelhamento artificial possa variar dependendo dos planejamentos experimentais, é preferido que o nucleotídeo de ligação inespecífica seja substancialmente adjacente à posição de interrogação do primeiro iniciador.

Em uma forma de realização preferida, o primeiro ou segundo iniciadores compreendem pelo menos um nucleotídeo com um rótulo para

detecção ou isolamento.

De acordo com uma forma de realização preferida, o primeiro filamento de DNA incluindo variação de nucleotídeo na etapa (a) é gerado por um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador. É preferido que o segundo filamento de DNA incluindo a variação de nucleotídeo na etapa (b)-(i) seja gerado por um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador. Preferivelmente, o segundo filamento de DNA incluindo a variação de nucleotídeo na etapa (b)-(ii) é amplificado por pelo menos 5 ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador.

Em uma outra forma de realização específica desta invenção usando fragmento de filamento de DNA curto amplificado contendo a variação de nucleotídeo, é fornecido o método usando duas amplificações individuais de uma primeira e uma segunda amplificações em que a segunda amplificação é realizada usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) realizar a primeira amplificação para produzir um fragmento de filamento de DNA curto contendo a variação de nucleotídeo entre as suas extremidades compreendendo pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores cada iniciador compreendendo uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência pré selecionada em um sítio do ácido nucléico alvo sob condições em que a variação de nucleotídeo é posicionada entre as sequências pré selecionadas, em que pelo menos um iniciador do conjunto de iniciadores é qualquer um dos ACPs descritos acima tendo na sua porção de extremidade 3' a sequência hibridizadora, por meio da qual o fragmento de filamento de DNA curto contendo a variação de nucleotídeo entre as suas extremidades é amplificado;

(b) realizar uma amplificação de primeiro estágio da segunda

- amplificação para produzir um primeiro filamento de DNA complementar ao fragmento de filamento de DNA curto incluindo a variação de nucleotídeo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando
- 5 um primeiro iniciador de qualquer um dos ACPs descritos acima tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré selecionada em um primeiro sítio do ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, em que cada um do primeiro iniciador e do primeiro sítio compreende uma posição de interrogação que corresponde à
- 10 variação de nucleotídeo, por meio da qual o primeiro filamento de DNA complementar ao ácido nucléico alvo incluindo a variação de nucleotídeo é gerado quando a posição de interrogação é ocupada pelos nucleotídeos complementares do primeiro iniciador aos seus nucleotídeos correspondentes do primeiro sítio; e
- 15 (c) realizar uma amplificação de segundo estágio da segunda amplificação do primeiro filamento de DNA gerado a partir da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um par de iniciadores em que entre o
- 20 par de iniciadores um é o mesmo que o iniciador de qualquer um dos ACPs usados na etapa (a) o outro é o mesmo que o primeiro iniciador usado na etapa (b) ou um par de iniciadores cada um tendo uma seqüência hibridizadora complementar ou que corresponde às extremidades 3' e 5' do primeiro filamento de DNA gerado a partir da etapa (b) para hibridizar com
- 25 ela, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' do primeiro filamento de DNA, respectivamente, por meio das quais o primeiro filamento de DNA é amplificado de modo que um segmento de nucleotídeo alvo curto que corresponde ao primeiro filamento de DNA contendo a variação de nucleotídeo é gerado.

Uma representação esquemática de uma outra forma de realização específica para a genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) usando o novo ACP é ilustrada na FIG. 7B. Visto que esta forma de realização específica é realizada em uma maneira similar à forma de realização acima, as descrições comuns entre elas são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida.

O presente método pode ser aplicado a uma variedade de variações de nucleotídeos incluindo polimorfismo de nucleotídeo único e mutação pontual (substituição, supressão e inserção).

Os produtos amplificados podem ser analisados pela eletroforese em gel. Em uma forma de realização, os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinizados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Os produtos amplificados gerados pela amplificação de DNA multiplex para a triagem de SNP múltipla pode ser comparada através da separação por tamanho dos produtos. A comparação da separação por tamanho é também realizada pela eletroforese através de uma matriz de gel de agarose ou matriz de gel de poliacrilamida ou seqüenciamento. Os produtos também podem ser detectados pelo uso de iniciadores de oligonucleotídeo fluorescentemente rotulados para a análise automática.

O termo “posição de interrogação” como aqui usado refere-se à localização de uma base de nucleotídeo específica de interesse dentro de um ácido nucléico alvo. Por exemplo, na análise de SNPs, a “posição de

interrogação” no ácido nucléico alvo está na posição que pode ser diferente do tipo selvagem. A posição de interrogação também inclui a localização da seqüência de nucleotídeo de um iniciador que é complementar a uma posição de interrogação do ácido nucléico alvo. A posição de interrogação do ácido nucléico alvo é oposta à posição de interrogação do iniciador, quando o iniciador é hibridizado com o ácido nucléico alvo.

O termo “polimorfismo” como aqui usado refere-se à presença de duas ou mais seqüências genômicas alternativas ou alelos entre ou misturado com genomas ou indivíduos diferentes. “Polimórfico” refere-se à condição em que duas ou mais variantes de uma seqüência genômica específica podem ser encontradas em uma população. Um “sítio polimórfico” é o local em que a variação ocorre. Um polimorfismo de nucleotídeo único ou SNP, é uma variante de par de base única, tipicamente da substituição de um nucleotídeo por um outro nucleotídeo no sítio polimórfico. A supressão de um único nucleotídeo ou a inserção de um único nucleotídeo, também dá origem a polimorfismos de nucleotídeo único. Tipicamente, entre genomas diferentes ou entre indivíduos diferentes, o sítio polimórfico pode ser ocupado por dois nucleotídeos diferentes. O termo “alelo” como aqui usado refere-se a um membro específico de uma coleção de variantes de seqüência que ocorrem naturalmente (detectáveis dentro de uma população de indivíduos) em um local ou marcador genômico específico.

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para identificar uma variação de nucleotídeo em um ácido nucléico alvo, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento (incluindo o primeiro e segundo iniciadores) descritos acima. As descrições dos kits para a amplificação da seqüência de ácido nucléico desta invenção podem ser aplicadas ao presente kit.

X. Aplicação para Mutagênese

Esta aplicação usando o ACP da invenção objeto também pode fornecer um método melhorado para a mutagênese. A PCR com base no ACP fornece uma ferramenta excelente para a mutagênese, incluindo a supressão ou inserção de seqüências, a alteração de um ou de uns poucos nucleotídeos específicos e a mutação aleatória de seqüência de nucleotídeo.

Em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um método para a mutagênese em um ácido nucléico alvo, que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ser derivado de qualquer um dos ACPs descritos acima. Preferivelmente, o iniciador tendo a estrutura do ACP é um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da seqüência de ácido nucléico alvo, em que a seqüência hibridizadora tem uma seqüência de nucleotídeo responsável pela mutagênese.

Em uma forma de realização específica desta invenção, é fornecido o método usando amplificações de estágio duplo, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da seqüência de ácido nucléico alvo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores de qualquer um dos ACPs descritos acima cada um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da seqüência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, em que a seqüência hibridizadora tem pelo menos um nucleotídeo de ligação inespecífica para gerar a mutação direcionada a sítio, sob condições em que o iniciador ou par de iniciadores anela à sua seqüência de nucleotídeo alvo, por meio da qual um produto de amplificação contendo o sítio de mutação direcionada a sítio é gerado; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do produto

de amplificação gerado a partir da etapa (a) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa (a) ou um par de
5 iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do produto de amplificação, respectivamente, por meio das quais o produto de amplificação contendo o sítio de mutação direcionada
10 a sítio é re-amplificado.

Esta forma de realização específica diz respeito à mutagênese direcionada a sítio.

Visto que esta aplicação usando o ACP desta invenção utiliza em princípio os presentes métodos para a amplificação de sequência de ácido
15 nucléico anteriormente debatida, as descrições comuns entre elas são omitidas de modo a se evitar a complexidade deste relatório descritivo que leva à multiplicidade indevida.

A fórmula do ACP para a mutagênese por PCR é idêntica à fórmula (1) em que a porção de extremidade 3' compreende uma sequência
20 para a mutagênese direcionada a sítio ou para a mutação aleatória.

Ainda em um outro aspecto desta invenção, é fornecido um kit para a mutagênese em um ácido nucléico alvo, que compreende o iniciador de controle de anelamento ou o conjunto de iniciadores de controle de anelamento descritos acima. As descrições dos kits para a amplificação de
25 sequência de ácido nucléico desta invenção pode ser aplicado ao presente kit.

XI. Outras Aplicações

O ACP da invenção objeto também pode ser útil em uma variedade de processos que envolve amplificações de ácido nucléico, particularmente, a PCR. Por exemplo, os processos incluem a amplificação

preparada por oligonucleotídeo misto de cDNA, PCR de faixa longa, PCR linear, PCR inversa, PCR quantitativa, PCR de contato, seqüenciamento, PCR *in situ*, PCR de *vetorette* e PCR entrelaçada assimétrica térmica. Os procedimentos gerais para estes métodos pode ser encontrados em Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) e M. J. McPherson, *et al.*, PCR, Springer-Verlag Nova Iorque Inc., N.Y. (2000).

Portanto, a presente invenção abrange todos os usos do iniciador de acordo com o ACP para o processo que envolve a amplificação de ácido nucléico, particularmente a PCR.

O ACP desta invenção é significativamente eficaz e amplamente acessível para a aplicações com base na amplificação de ácido nucléico. Também, vários problemas relacionados com a especificidade de anelamento do iniciador que permanece nas técnicas de amplificação de ácido nucléico anteriores podem ser fundamentalmente resolvidos pelo ACP e pelos métodos da presente invenção. Os benefícios principais a serem obtidos a partir do uso do ACP durante a amplificação de ácido nucléico são como segue:

(a) visto que a presença de uma porção reguladora posicionada entre as porções de extremidade 3' e 5' restringe o anelamento da porção do iniciador à porção de extremidade 3' sob condições tais que a porção de extremidade 3' anela com o padrão, a seqüência de anelamento de um iniciador pode ser precisamente controlada, o que torna possível planejar um iniciador capaz de ter apenas um número desejado de seqüência anelada (ou possível planejar um iniciador capaz de controlar uma porção de anelamento desta). É particularmente útil quando uma porção de anelamento de um iniciador deva ser limitada (por exemplo, genotipagem de SNP, triagem de microssérie de DNA e detecção de genes diferencialmente expressos);

(b) visto que a presença da uma porção reguladora posicionada

entre as porções de extremidade 3' e 5' interrompe o anelamento da porção de extremidade 5' com o padrão sob condições tais que a porção de extremidade 3' anela com o padrão, eventualmente a porção de extremidade 5' não envolvida no anelamento fornece a porção de extremidade 3' com a especificidade de anelamento do iniciador;

(c) a especificidade de anelamento do iniciador é altamente sensível o bastante para detectar mesmo uma má combinação de base única. É particularmente útil para a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs);

(d) o ACP é capaz de fornecer um iniciador com uma tolerância alta em “parâmetros de procura de iniciador” para o planejamento de iniciador tais como o comprimento do iniciador, a temperatura de anelamento, o teor de GC e o comprimento de produto de PCR;

(e) o ACP fornece amplificações de ácido nucléico de estágio duplo que permitem que o produto amplificado seja excluído da amplificação não específica;

(f) a eficiência de amplificação de ácido nucléico é aumentada, o que torna mais fácil detectar mRNAs raros; e

(g) a reprodutibilidade da amplificação de produtos de ácido nucléico é aumentada, o que economiza uma enorme quantidade de tempo e custo.

Tanto quanto a tecnologia de amplificação de ácido nucléico tal como a PCR tem influenciado o campo biotecnológico, o uso de ACP fundamentalmente altera os princípios dos métodos de amplificação de ácido nucléico correntemente existentes, como mencionado acima, pela exibição de aplicabilidade ilimitada e têm atualizado significativamente a mesma de uma vez. Em conseqüência, o ACP e suas várias aplicações aqui descritas fornecem um ponto decisivo para abrir uma era biotecnológica nova desde a introdução da tecnologia de amplificação de ácido nucléico.

Os seguintes exemplos específicos são intencionados a serem ilustrativos da invenção e não devem ser interpretados como limitando o escopo da invenção como definido pelas reivindicações anexas.

EXEMPLOS

5 Na divulgação experimental que segue, as seguintes abreviações se aplicam: M (molar), mM (milimolar), μ M (micromolar), g (grama), μ g (microgramas), ng (nanogramas), l (litros), ml (mililitros), μ l (microlitros), °C (grau Centígrado); Promega (Promega Co., Madison, USA); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, USA); Roche (Roche
10 Diagnostics, Mannheim, Alemanha); QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

Os iniciadores usados na invenção objeto são apresentados na Tabela 1.

EXEMPLO 1: Avaliação do Efeito da Base Universal no ACP

15 O efeito dos resíduos de base universal posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP foi avaliado pela RT-PCR usando tecidos de conceito de camundongo.

O RNA total foi isolado dos conceitos inteiros de camundongo da cepa ICR nos dias de 4,5, 11,5 e 18,5 durante o período de
20 gestação usando o Tri-reagent (Sigma) ou o método de LiCl/Uréia (Hogan *et al.*, 1994) como anteriormente descrito (Chun *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000). Dois experimentos individuais de amplificações de cDNA usando ACP foram realizados para examinar o efeito da base universal, particularmente, resíduos de desoxiinosina posicionados entre as porções de extremidade 3' e
25 5' do ACP como segue: A. O efeito dos resíduos de desoxiinosina posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP em comparação com o ACP e o iniciador convencional não contendo um grupo desoxiinosina; B. O efeito de resíduos de desoxiinosina posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP em associação com a alteração do número de

desoxiinosina.

Estes experimentos foram conduzidos com base nas seguintes hipóteses:

(i) a presença dos resíduos de base universal que têm T_m mais baixa do que outras porções no ACP devido às suas interações de ligação de hidrogênio mais fracas no emparelhamento de base não estariam envolvidas no anelamento com o ácido nucléico padrão sob as condições em que a porção de extremidade 3' do ACP anela a um sítio do padrão em uma primeira temperatura de anelamento.

(ii) a presença da pelo menos um resíduo de base universal entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP seria capaz de interromper o anelamento da porção de extremidade 5' e restringir um anelamento da porção iniciadora à extremidade 3'.

(iii) a porção de extremidade 3' do ACP atuaria apenas como uma porção de anelamento com o padrão durante a PCR.

(iv) a porção de extremidade 3' de dT₁₀-ACP que é dT₁₀ compreendendo 10 nucleotídeos T também tem T_m muito baixa para ligar o ácido nucléico padrão.

(v) conseqüentemente, o dT₁₀-ACP não produz quaisquer produtos de PCR sob temperatura de anelamento alta.

A. O efeito de resíduos de desoxiinosina posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP em comparação com o ACP com o iniciador não contendo um grupo desoxiinosina

(a) Síntese de primeiro cDNA de filamento

dT₁₀-JYC2 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTT - 3' (SEQ ID NO: 29) ou dT₁₀-ACP1 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTT - 3' (SEQ ID NO: 30) foram usados como um iniciador de síntese de cDNA.

Três microgramas de RNA total e 2 µl de dT₁₀-JYC2 a 10 µM

ou dT₁₀-ACP1 a 10 µM foram combinados em um volume final de 20 µl. A solução foi aquecida a 65° C durante 10 minutos, extinta em gelo e microcentrifugada para coletar o solvente no fundo. Os seguintes componentes foram sequencialmente adicionados ao iniciador anelado/padrão em gelo: 0.5 µl (40 unidades/µl) de inibidor RNasin ribonuclease (Promega), 4 µl de tampão de reação 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT; Promega), 5 µl de cada mistura de desoxinucleotídeos a 2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 1 µl da transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (M-MLV) (200 unidades/µl; Promega). Os 20 µl de mistura de reação foram incubados a 37° C durante 90 minutos, microcentrifugados e colocados em gelo durante 2 minutos. A reação foi interrompida pela incubação a 94° C durante 2 minutos.

(b) Amplificação de cDNA usando ACPs

O dT₁₀-ACP1 foi usado para examinar o efeito de um grupo desoxiinosina posicionado entre as porções de extremidade 3' e 5' durante a PCR. O dT₁₀-JYC2 não contendo um grupo desoxiinosina foi usado como um controle.

O ACP10 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCC ATCGACC - 3' (SEQ ID NO: 13) foi usado como o iniciador 5' para este experimento.

A amplificação pela PCR foi conduzida em um volume de 50 µl contendo 50 ng do primeiro cDNA de filamento, 5 µl de tampão de PCR 10 x, 1 µl de iniciador 5' a 10 µM (ACP10), 1 µl de iniciador 3' a 10 µM (dT₁₀-JYC2 ou dT₁₀-ACP1), 3 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP a 2 mM, 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl). As reações de PCR foram conduzidas sob as seguintes condições: 5 minutos a 94° C seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 54° C durante 1 minuto e 72° C durante 1 minuto; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C. Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 %

seguida por tingimento com brometo de etídio.

Como um resultado, a FIG. 8 mostra que o dT₁₀-ACP1 contendo um grupo desoxiinosina quase não produziu nenhum produto (linhas 4-6), ao passo que o dT₁₀-JYC2 não contendo um grupo desoxiinosina produziu uma pluralidade de produtos de cDNA amplificados (linhas 1-3). Compatível com a nossa hipótese, os resultados claramente indicam que o grupo desoxiinosina posicionado entre as porções da extremidade 3' e 5' afeta o anelamento das porções de extremidade 3' e 5' do dT₁₀-ACP com o cDNA padrão sob tal temperatura de anelamento alta, que resulta em nenhum produto como estabelecido na hipótese acima.

B. O efeito de resíduos de desoxiinosina posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' do ACP em associação com a alteração do número de desoxiinosina

(a) Síntese de primeiro cDNA de filamento

O primeiro cDNA de filamento foi sintetizado a partir do RNA total de conceptos de camundongo usando dT₁₀-JYC2 como um iniciador de síntese de cDNA como acima.

(b) Amplificação de cDNA usando ACPs

Este experimento usou quatro ACPs cada um compreendendo número diferente de resíduos de desoxiinosina como segue, para examinar o efeito de resíduos de desoxiinosina posicionados entre as porções de extremidade 3' e 5' em associação com a alteração do número de desoxiinosina, sob uma condição de severidade particular.

ACP16 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATII GCCATCGACC - 3' (SEQ ID NO: 20);

ACP17 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIII GCCATCGACC - 3' (SEQ ID NO: 21);

ACP18 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIII GCCATCGACC - 3' (SEQ ID NO: 22);

ACP19 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIIIGCCATCGACC - 3'
(SEQ ID NO: 23); e

CRP2I0 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGCCATCGACC - 3' (SEQ ID
NO: 19) não contendo um grupo desoxiinosina foram usadas como um
5 controle.

O primeiro cDNA de filamento resultante gerado a partir da
etapa (a), compreendendo a sequência arbitrária pré selecionada do dT₁₀-ACP
na sua extremidade 5', foi usado como um padrão e o iniciador JYC2 5' -
GCTTGACTACGATACTGTGCGA - 3' (SEQ ID NO: 10) que corresponde
10 à porção de extremidade 5' do dT₁₀-ACP foi usado como 3' iniciador.

A amplificação pela PCR foi conduzida em um volume de 50
μl contendo 50 ng do primeiro cDNA de filamento, 5 μl de tampão de PCR
10 x, 1 μl de iniciador 5' a 10 μM (ACP16, 17, 18, 19 ou CRP2I0), 1 μl de
iniciador 3' a 10 μM (JYC2), 3 μl de MgCl₂ a 25 mM, 5 μl de dNTP a 2 mM,
15 0,5 μl de Taq polimerase (5 unidades/μl). As reações de PCR foram
compreendidas de: 5 minutos a 94° C, seguidos por 30 ciclos de 94° C
durante 1 minuto, 57° C durante 1 minuto e 72° C durante 1 minuto; seguida
por uma extensão final de 5 minutos a 72° C. Os produto amplificados foram
analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % seguido por
20 tingimento com brometo de etídio.

Como um resultado, a FIG. 9 mostra que o CRP2I0 não
contendo quaisquer resíduos de desoxiinosina produziu uma pluralidade de
produtos de cDNA amplificados, ao passo que os ACPs contendo pelo menos
dois resíduos de desoxiinosina geraram a redução significativa de produtos de
25 cDNA amplificados e ainda mais, o ACP contendo oito resíduos de
desoxiinosina quase não produziu nenhum produto. Compatível com a nossa
hipótese, os resultados claramente indicam que o anelamento da porção de
extremidade 3' do ACP com o padrão pode ser separada da porção 5' visto
que um grupo de resíduos de desoxiinosina contíguos separam o anelamento

das porções de extremidade 3' e extremidade 5' sob condições de alta severidade devido à propriedade da desoxiinosina tal como a sua interação de ligação de hidrogênio mais fraca no emparelhamento de base.

5 EXEMPLO 2: Método para Amplificar uma Sequência de Ácido Nucléico Alvo Usando ACP

O ACP da invenção objeto foi aplicado para amplificar as seqüências de nucleotídeo alvo do cDNA do gene Esx1 homeobox específico da placenta de camundongo. O processo e os resultados para a amplificação das seqüências de nucleotídeo alvo do cDNA de Esx1 usando ACPs são aqui
10 descritos. O RNA total (3 µg) obtido da placenta de 18,5 dias de idade de camundongo foi usado como um material de partida. Os primeiros cDNAs de filamento foram preparados sob as mesmas condições como usadas na síntese de cDNA do Exemplo 1, exceto que Oligo-dT₁₅ foi usado como o iniciador na síntese de primeiro cDNA de filamento.

15 Oligo-dT₁₅ 5' - TTTTTTTTTTTTTTTT - 3' (SEQ ID NO: 54)

Os primeiros cDNAs de filamento resultantes foram usados como padrão para amplificar fragmentos de cDNA alvo de Esx1 usando ACPs. Estes experimentos conduziram amplificações de PCR de estágio duplo, que é uma das características únicas da presente invenção.

20 Os iniciadores convencionais de Esx1 usados no Exemplo são:

EsxN7 5' - GCCGGTTGCAGAAGCACC - 3' (SEQ ID NO: 44);

EsxC6 5' - GAACCATGTTTCTGAATGCC - 3' (SEQ ID NO: 45);

EsxN1 5' - GAATCTGAAACAACCTTCTA - 3' (SEQ ID NO: 48);

EsxC2 5' - GATGCATGGGACGAGGCACC - 3' (SEQ ID NO: 49);

25 EsxN3 5' - CGCCGCAACCCCTGCCCGCA - 3' (SEQ ID NO: 51); e

EsxC5 5' - GATGCATGGGACGAGGCA - 3' (SEQ ID NO: 52).

Três conjuntos de iniciador, EsxN7 e EsxC6, EsxN1 e EsxC2, e EsxN3 e EsxC5, foram usados no Exemplo por que eles são conhecidos como os conjuntos de iniciador que geram produtos secundários altos assim

como produtos não específicos nos métodos de PCR convencionais como conhecido na técnica.

De acordo com os sistemas de PCR de alvo único, os iniciadores com temperaturas de fusão similares (T_m) devem ser escolhidos.

5 Entretanto, um conjunto de iniciador de EsxN1 (T_m 50,7° C) e EsxC2 (T_m 71,9° C) mostra cerca de 20° C de temperatura de fusão diferente entre eles e um conjunto de iniciador de EsxN3 (T_m 86,9° C) e EsxC5 (T_m 66,2° C) ambos tem temperaturas de fusão altas. Também, um conjunto de iniciador de EsxN7 (T_m 68,2° C) e EsxC6 (T_m 61,2° C), que tem temperaturas de fusão
10 relativamente similares, são selecionados para observar o efeito do ACP.

O ACP da invenção objeto foi aplicado a estes três conjuntos de iniciador convencional para demonstrar se o sistema ACP pode superar os problemas principais que surgem a partir destes conjuntos de iniciador convencionais, tais como produtos secundários e produtos não específicos.

15 Os seguintes ACPs compreendem as seqüências dos iniciadores convencionais acima em suas porções de extremidade 3' e foram usados como iniciadores específicos de gene Esx1 para a amplificação pela PCR de primeiro estágio:

Iniciador EsxN7-ACP 5' 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIII
20 GCCGGTTGCAGAAGCACC - 3' (SEQ ID NO: 46);

Iniciador EsxC6-ACP 3' 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIII
GAACCATGTTTCTGAATGCC - 3' (SEQ ID NO: 47);

Iniciador EsxN1-ACP 5' 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIII
GAATCTGAAACAACCTTTCTA - 3' (SEQ ID NO: 50);

25 Iniciador EsxC2-ACP 3' 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIII
GATGCATGGGACGAGGCACC - 3' (SEQ ID NO: 55);

Iniciador EsxN3-ACP 5' 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIII
CGCCGCAACCCCTGCCCGCA - 3' (SEQ ID NO: 53); e

Iniciador EsxC5-ACP 3' 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIII

GATGCATGGGACGAGGCA - 3' (SEQ ID NO: 56).

A sequência da porção de extremidade 5' dos ACPs foram servidos como seqüências iniciadoras arbitrárias pré selecionadas apenas para a amplificação pela PCR de segundo estágio: JYC2 e JYC4 5' -
 5 GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT - 3' (SEQ ID NO: 12).

Durante a amplificação pela PCR de primeiro estágio, o conjunto de iniciador de EsxN7-ACP e EsxC6-ACP foi usado como iniciadores 5' e 3', respectivamente, para gerar o fragmento de 520 pares de base do cDNA de Esx1, o conjunto de iniciador de EsxN1-ACP e EsxC2-
 10 ACP foi usado como iniciadores 5' e 3', respectivamente, para gerar o fragmento de 784 pares de base do cDNA de Esx1 e o conjunto de iniciador de EsxN3-ACP e EsxC5-ACP foi usado como iniciadores 5' e 3', respectivamente, para gerar o fragmento de 483 pares de base do cDNA de Esx1.

15 Durante a amplificação pela PCR de segundo estágio, JYC4 e JYC2 foram usados como iniciadores 5' e 3' arbitrários pré selecionados, respectivamente (PROTOCOLO A). Como uma alternativa, as seqüências completas dos ACPs, ao invés dos iniciadores arbitrários pré selecionados tais como JYC4 e JYC2, podem ser usadas como iniciadores 5' e 3' para a
 20 amplificação pela PCR de segundo estágio nas condições de alta severidade. Neste caso, não é necessário adicionar os iniciadores arbitrários pré selecionados à mistura de reação no momento ou depois da reação de PCR do primeiro estágio (PROTOCOLO B).

25 PROTOCOLO A: a Amplificações de PCR de estágio duplo de parada única

(a) Amplificação de PCR de primeiro estágio

A amplificação pela PCR de primeiro estágio foi realizada pelo método de PCR de início quente em que o procedimento é ajustar as reações completas sem a DNA polimerase e incubar os tubos no ciclador

térmico para completar a etapa de desnaturação inicial a $>90^{\circ}\text{C}$. Depois, enquanto se mantém os tubos a uma temperatura acima de 70°C , a quantidade apropriada de DNA polimerase pode ser pipetada na reação.

A amplificação pela PCR de primeiro estágio foi conduzido por dois ciclos de PCR que consistem da reação de anelamento, extensão e desnaturação; a mistura de reação em um volume final de $49,5\ \mu\text{l}$ contendo 50 ng do primeiro cDNA de filamento, $5\ \mu\text{l}$ de tampão de reação de PCR 10 x (Promega), $5\ \mu\text{l}$ de MgCl_2 a 25 mM, $5\ \mu\text{l}$ de dNTP (2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), $1,35\ \mu\text{l}$ de 5' ACP (1 μM) e $1,35\ \mu\text{l}$ de 3' ACP (1 μM) é pré aquecida a 94°C , enquanto se mantém o tubo contendo a mistura de reação a 94°C , $0,5\ \mu\text{l}$ de Taq polimerase (5 unidades/ μl ; Promega) é adicionado à mistura de reação; as reações de PCR compreendem dois ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C durante 40 segundos e 72°C durante 40 segundos; seguida pela desnaturação do produto de amplificação a 94°C .

15 (B) Amplificação de PCR de Segundo Estágio

O produto de cDNA resultante gerado pela amplificação pela PCR de primeiro estágio usando ACPs específicos de gene Esx1 foi depois amplificado pelas seguintes amplificações do segundo estágio pela PCR sob temperatura de anelamento mais alta. Depois da conclusão da amplificação pela PCR de primeiro estágio, cada $1\ \mu\text{l}$ de iniciadores arbitrários pré selecionados a 10 μM , JYC4 e JYC2, foi adicionado à mistura de reação obtida da amplificação pela PCR de primeiro estágio, sob temperatura desnaturante tal como a 94°C . A reação de PCR do segundo estágio foi como segue: 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 68°C durante 40 segundos e 72°C durante 40 segundos; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72°C .

Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % e detectados tingindo-se com brometo de etídio. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de

poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e
 5 pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Como mostrado nas FIGs. 10A-C, as amplificações pela PCR de estágio duplo de parada única para Esx1 usando cada conjunto de iniciador de EsxN7-ACP e EsxC6-ACP, EsxN1-ACP e EsxC2-ACP, e EsxN3-ACP e
 10 EsxC5-ACP geraram uma faixa única que corresponde ao tamanho esperado, 520 pares de base (FIG. 10A, linha 2), 784 pares de base (FIG. 10B, linha 4) e 483 pares de base (FIG. 10C, linha 3) de fragmentos de cDNA de Esx1, respectivamente. A clonagem e a análise de seqüência subseqüentes dos clones confirmam que as faixas são de fragmentos de cDNA de Esx1. Ao
 15 contrário, os conjuntos de iniciador convencionais, que contêm as seqüências que correspondem apenas às porções da extremidade 3' de cada um dos conjuntos de ACP, produziram produtos não específicos assim como produtos secundários altos tais como sujidade de DNA (FIG. 10A, linha 1; FIG. 10B, linha 3; FIG. 10C, linhas 1 e 2). Visto que os produtos de PCR usando um
 20 conjunto de ACP compreenderam as seqüências arbitrárias pré selecionadas nas suas extremidades 5' e 3', seqüências de 54 pares de base adicionais que correspondem às seqüências arbitrárias pré selecionadas e resíduos de desoxiinosina foram encontrados.

A FIG. 10A mostra os produtos de cDNA amplificados
 25 gerados pelos seguintes conjuntos de iniciadores; um conjunto de EsxN7 e EsxC6 (linha 1) e um conjunto de EsxN7-ACP e EsxC6-ACP (linha 2). As reações de PCR usando o conjunto de iniciador convencional EsxN7 e EsxC6 foram como segue: 5 minutos a 94° C seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 60° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos;

seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

A FIG. 10B mostra os produtos de cDNA amplificados gerados por um iniciador único ou um par de iniciadores como segue: os iniciadores, EsxN1 e EsxC2, foram usados nas linhas 1 e 2, respectivamente; uma combinação de EsxN1-ACP e iniciador convencional EsxC2 foi usada na linha 3; dois ACPs EsxN1-ACP e EsxC2-ACP foram usados na linha 4. Quando um conjunto de iniciador convencional, EsxN1 e EsxC2, foi usado sob temperatura de anelamento alta de 60° C, nenhum produto alvo específico foi produzido. Quando um conjunto de iniciador que compreende um ACP EsxN1-ACP e um iniciador convencional de EsxC2 foi usado, um produto específico alvo assim como produtos não específicos foram amplificados devido à ligação não específica do iniciador convencional EsxC2 (linha 3). Entretanto, quando um conjunto de ACP foi usado, apenas um único produto específico alvo foi amplificado (linha 4), o que indica que o ACP da invenção objeto fornece iniciadores com tolerância ao “parâmetro de planejamento de iniciador” relacionado com as temperaturas de fusão de iniciadores gerais requisitados para sistemas de PCR de alvo único.

A FIG. 10C mostra os produtos de cDNA amplificados gerados usando-se os seguintes conjuntos de iniciadores: um conjunto de EsxN3 e EsxC5 foi usado nas linhas 1 e 2 e um conjunto de EsxN3-ACP e EsxC5-ACP foi usado na linha 3. As reações de PCR usando o conjunto de iniciador convencional de EsxN3 e EsxC5 foram como segue: 5 minutos a 94° C seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 58° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C (linha 1). O conjunto de iniciador convencional também foi comparado com o conjunto de ACP conduzindo-se as mesmas amplificações de PCR de estágio duplo como usadas no ACP, tal que a sua temperatura de anelamento fosse aumentada de 60° C para 68° C (linha 2). Estes resultados também indicam que embora os iniciadores convencionais incluindo aqueles

tendo T_m alta fossem usados na mesma amplificação pela PCR de estágio duplo, eles podem não estar livres dos problemas de produtos não específicos e produtos secundários, ao passo que o ACP da invenção objeto pode ajudar a superar tais problemas que surgem destes iniciadores convencionais.

5 PROTOCOLO B: Amplificações pela PCR de Estágio Duplo sem Parada

Alternativamente, as seqüências completas dos ACPs, ao invés dos iniciadores arbitrários pré selecionados tais como JYC4 e JYC2, podem ser usadas como iniciadores para a amplificação pela PCR de segundo estágio nas condições de alta severidade. Neste caso, não é necessário adicionar os iniciadores arbitrários pré selecionados à mistura de reação no momento ou depois da reação de PCR de primeiro estágio.

O processo das amplificações pela PCR de estágio duplo sem parada é basicamente idêntico ao Protocolo A, exceto que os ACPs, 1 µl de 5' ACP (10 µM) e 1 µl de 3' ACP (10 µM), são adicionados ao amplificação pela PCR de primeiro estágio e a amplificação pela PCR de segundo estágio imediatamente segue a amplificação pela PCR de primeiro estágio sem qualquer demora por que não existe nenhuma etapa de adicionar iniciadores arbitrários pré selecionados.

20 Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % e detectados tingindo-se com brometo de etídio. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

A FIG. 10D mostra os produtos de cDNA amplificados

gerados pelas amplificações pela PCR de estágio duplo sem parada usando os seguintes iniciadores únicos ou um pares de iniciadores; os iniciadores EsxN1 e EsxC2 foram usados na linha 1 e 2, respectivamente; um par de EsxN1 e EsxC2 foi usado na linha 3; e um par de EsxN1-ACP e EsxC2-ACP foi usado na linha 4. Quando um conjunto de iniciador convencional, EsxN1 e EsxC2, foi usado, nenhum produto alvo específico foi produzido. Entretanto, quando um conjunto de ACP foi usado em amplificações pela PCR de estágio duplo sem parada, apenas um único produto específico alvo foi amplificado (linha 4), que é compatível com os resultados das amplificações pela PCR de estágio duplo de parada única (FIG. 10B).

Estes exemplos ilustram que o ACP permite que os produtos sejam livres dos problemas secundários assim como da não especificidade que surge a partir dos iniciadores convencionais usados nos métodos de PCR como descrito na técnica. Também deve ser entendido que o ACP permite a geração dos produtos independentes específico do planejamento de iniciadores específicos de gene.

EXEMPLO 3: Identificação e Caracterização de mRNAs Diferencialmente Expressos Durante o Desenvolvimento Embriônico de Camundongo Usando o ACP

O ACP da invenção objeto foi aplicado para detectar mRNAs diferencialmente expressos em desenvolvimentos embriônicos. Especificamente, três procedimentos e resultados diferentes usando estágios diferente de RNAs totais de conceito como materiais de partida são aqui descritos. Os iniciadores usados na invenção objeto são mostrados na Tabela 1.

A1. PROCEDIMENTO 1

Etapa (1): Síntese do primeiro cDNA de filamento

Os primeiros cDNAs de filamento foram preparados sob as mesmas condições como usadas na síntese de cDNA do Exemplo 1 usando o

dT₁₀-ACP1 ou JYC5-T₁₅-ACP como um iniciador de síntese de cDNA. Os cDNAs resultantes foram purificados por uma coluna giratória (Kit de purificação de PCR, QIAGEN) para remover os iniciadores, dNTP e os reagentes acima. É necessário realizar a etapa de purificação antes da determinação da concentração de cDNAs usando a espectroscopia de UV a uma absorbância de 260 nm. A mesma quantidade de cDNAs de cada amostra foi usada para comparar os seus padrões de amplificação usando o sistema ACP aqui descrito.

Etapa (2): Amplificação pela PCR de primeiro estágio usando

10 ACP

Os seguintes ACPs foram usados como ACPs arbitrários (AR-ACPs) para a primeira amplificação pela PCR:

ACP3 5' -

15 GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACS - 3' (SEQ ID NO: 3);

ACP5 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCS - 3' (SEQ ID NO: 5);

ACP8 5' -

20 GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICTCCGATGCS - 3' (SEQ ID NO: 8);

ACP10 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC - 3' (SEQ ID NO: 13);

25 ACP13 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATG CG - 3' (SEQ ID NO: 16); e

ACP14 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICTCCGATG CC - 3' (SEQ ID NO:

17).

As seqüências da porção de extremidade 5' do dT₁₀-ACP1 e AR-ACPs servem como seqüências iniciadoras pré selecionadas arbitrárias apenas para a amplificação pela PCR secundária. Os iniciadores arbitrários pré selecionados são JYC2 e JYC4.

Os primeiros cDNAs de filamento produzidos a partir da etapa (1) foram amplificados pela seguinte amplificação pela PCR de primeiro estágio usando um dos AR-ACPs (ACP3, ACP5, ACP8, ACP10, ACP13 ou ACP14) e o dT₁₀-ACP1 como iniciadores 5' e 3', respectivamente. A amplificação pela PCR de primeiro estágio foi conduzida em um volume de 50 µl contendo 50 ng do primeiro cDNA de filamento, 5 µl de tampão de reação de PCR 10 x (Promega), 3 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP (0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µl de iniciador 5' (1 µM), 5 µl de iniciador 3' (1 µM) e 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl; Promega). As reações de PCR foram como segue: 5 minutos a 94° C seguidos por 20 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 50° C durante 1 minuto e 72° C durante 1 minuto; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

O ciclo da amplificação pela PCR de primeiro estágio pode ser variado dependendo dos tipos de amostras. Por exemplo, os 20 ciclos da amplificação pela PCR primária foram usados para as amostras de conceito de camundongo.

Etapa (3): Amplificação pela PCR de segundo estágio usando iniciadores arbitrários pré selecionados que correspondem às seqüências da porção de extremidade 5' dos ACPs

Os produtos de cDNA amplificados produzidos a partir da etapa (2) são re-amplificados pela seguinte amplificação pela PCR de segundo estágio usando dois iniciadores arbitrários pré selecionados, JYC4 e JYC2, cada um correspondendo à seqüência da porção de extremidade 5' de AR-ACP e dT₁₀-ACP1, respectivamente. A amplificação pela PCR de segundo

estágio foi conduzida em um volume de 50 µl contendo 5 µl dos produtos de cDNA amplificados primeiro (50 µl), 5 µl de tampão de reação de PCR 10 x (Promega), 3 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP a 2 mM, 1 µl de iniciador 5' (10 µM), 1 µl de iniciador 3' (10 µM) e 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl). As reações de PCR foram como segue: 5 minutos a 94° C seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 65° C durante 1 minuto e 72° C durante 1 minuto; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

A2. PROCEDIMENTO 2

O procedimento alternativo compreende as seguintes etapas de:

(a) fornecer uma primeira amostra de ácidos nucleicos que representem uma primeira população de transcritos de mRNA e uma segunda amostra de ácidos nucleicos que representem uma segunda população de transcritos de mRNA;

(b) contactar cada uma da primeira amostra de ácido nucleico e da segunda amostra de ácido nucleico com um primeiro ACP, em que o primeiro ACP tem uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da primeira e segunda população de transcritos de mRNA para hibridizar com ela;

(c) transcrever de modo reverso o mRNA ao qual o primeiro ACP hibridiza para produzir uma primeira população de filamentos de DNA que são complementares aos mRNAs na primeira amostra de ácido nucleico aos quais o primeiro ACP hibridiza e uma segunda população de filamentos de DNA que são complementares ao mRNA na segunda amostra de ácido nucleico ao qual o primeiro ACP hibridiza;

(d) purificar e quantificar os filamentos de DNA complementares produzidos como um resultado da etapa de transcrição reversa (c);

(e) sintetizar um segundo filamento de DNA complementar a

cada uma da primeira e segunda populações de filamentos de DNA usando um segundo ACP sob condições de severidade baixa, em pelo menos um ciclo de PCR que compreende a desnaturação, anelamento e extensão do iniciador, em que o segundo ACP tem uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar à primeira e segunda populações de filamentos de DNA;

(f) amplificar cada segundo filamento de DNA obtido a partir da etapa (e) sob condições de alta severidade, em pelo menos um ciclo de PCR que compreende a desnaturação, anelamento e extensão do iniciador para gerar a primeira e segunda populações de produtos de amplificação usando dois iniciadores arbitrários pré selecionados cada um compreendendo uma seqüência que corresponde a cada porção de extremidade 5' do primeiro e segundo iniciadores de controle de anelamento; e

(g) comparar a quantidade de produtos de amplificação individuais na primeira e segunda populações de produtos de amplificação.

Os primeiros cDNAs de filamento são sintetizados usando JYC5-T₁₅-ACP 5' - CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTT TTTTTTTT - 3' (SEQ ID NO: 61).

A seqüência da porção de extremidade 5' do JYC5-T₁₅-ACP serve como uma seqüência de iniciador 3' pré selecionado arbitrário a ser usada apenas para o segundo estágio de amplificação pela PCR:

JYC5 5' - CTGTGAATGCTGCGACTACGAT - 3' (SEQ ID NO: 60).

Etapa (1): Síntese de primeiro cDNA de filamento

1. Combina 3 µg de RNA total e 2 µl de JYC5-T₁₅-ACP a 10 µM em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml.

2. Adicionar H₂O estéril a um volume final de 9,5 µl. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrífuga.

3. Incubar o tubo a 80° C durante 3 minutos ou usar um termociclador para o mesmo propósito.

4. Esfriar o tubo em gelo durante 2 minutos. Girar os conteúdos do tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

5. Ao mesmo tubo de reação adicionar os seguintes reagentes: 4 µl de tampão Filamento primário 5x (Promega), 5 µl de dNTP (2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µl de inibidor RNasin (40 unidades/µl, Promega) e 1 µl de transcriptase reversa M-MLV (200 U/µl).

6. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

7. Incubar o tubo a 42 ° C durante 90 minutos.

10 8. Incubar o tubo a 94 ° C durante 2 minutos para terminar a síntese de filamento primário.

9. Colocar o tubo em gelo durante 2 minutos.

15 10. Purificar os cDNAs resultantes em uma coluna giratória (Kit de purificação de PCR, QIAGEN) para remover os iniciadores, dNTP e os reagentes acima.

11. Em seguida, medir a concentração dos cDNAs usando a espectroscopia de UV a uma absorbância de 260 nm.

12. Processo para a etapa 2.

20 Etapa (2): Síntese do segundo cDNA de filamento usando ACP

A mesma quantidade de cDNAs de cada amostra foi usada para a comparação de seus padrões usando os ACPs aqui descritos. O segundo cDNA de filamento foi sintetizado usando o ACP10 arbitrário pelo método de PCR de início quente em que o procedimento é ajustar as reações completas sem a DNA polimerase e incubar os tubos no ciclador térmico para completar a etapa de desnaturação inicial a >90° C. Depois, enquanto se mantém os tubos a uma temperatura acima de 90° C, a quantidade apropriada de DNA polimerase pode ser pipetada na reação.

1. Combinar os seguintes reagentes em um tubo de

microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 49,5 µl do volume total contendo 1 µl de primeiro cDNA de filamento (50 ng/µl) preparado pela etapa 1, 5 µl de tampão de PCR 10 x (Roche), 5 µl de dNTP a 2 mM, 1 µl de ACP arbitrário a 10 µM (iniciador 5') e 37,5 µl de dH₂O estéril.

- 5 2. Misturar conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.
3. Colocar o tubo no ciclador térmico pré aquecido a 94° C.
4. Adicionar o 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl; Roche) na reação, enquanto se mantém o tubo na temperatura de 94° C.
- 10 5. Conduzir a reação de PCR sob as seguintes condições: um ciclo de 94° C durante 5 minutos, 50 ° C durante 3 minutos e 72° C durante 1 minuto; seguidos pela desnaturação do primeiro produto de amplificação a 94° C.

15 Etapa (3): Amplificação pela PCR dos segundos cDNAs de filamento usando iniciadores arbitrários pré selecionados que correspondem às seqüências da porção de extremidade 5' dos ACPs

1. Depois da conclusão da amplificação pela PCR de primeiro estágio, enquanto se mantém os tubos a uma temperatura acima de 94° C, adicionar 2 µl de JYC4 a 10 µM e 2 µl de JYC5 a 10 µM, em que cada um
- 20 corresponde à seqüência da porção de extremidade 5' tanto do ACP 5' quanto 3', respectivamente, à mistura de reação usada na etapa (2).

2. Conduzir as reações de PCR de segundo estágio sob as seguintes condições: 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 68° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; seguida por uma extensão final de
- 25 5 minutos a 72° C.

A3. PROCEDIMENTO 3

Como um processo alternativo, na etapa (f) do PROCEDIMENTO 2 as seqüências completas do primeiro e segundo ACPs usados nas etapas (b) e (e) do PROCEDIMENTO 2, ao invés das seqüências

arbitrárias pré selecionadas das porções da extremidade 5' do primeiro e segundo ACPs, podem ser usadas como iniciadores 3' e 5', respectivamente, nas condições de alta severidade para amplificar cada segundo filamento de DNA obtido da etapa (e) do PROCEDIMENTO 2, em que a extremidades 3' e 5' dos segundos filamentos de DNA que foram inicialmente sintetizados usando o segundo ACP compreendem a sequência do primeiro ACP e a sequência complementar do segundo ACP, respectivamente e também servem como sítios de emparelhamento perfeito para o primeiro e segundo ACPs. Neste caso, não é necessário para adicionar os iniciadores arbitrários pré selecionados à mistura de reação no momento ou depois da reação de PCR de primeiro estágio.

Etapa (1): Síntese de primeiro cDNA de filamento

Os primeiros cDNAs de filamento foram preparados sob as mesmas condições como usadas na síntese de cDNA do PROCEDIMENTO 2 usando o JYC5-T₁₅-ACP como um iniciador de síntese de cDNA.

Etapa (2): Síntese do segundo cDNA de filamento e amplificação usando a PCR de estágio duplo sem parada

A mesma quantidade de cDNAs de cada amostra foi usada para a comparação de seus padrões usando os ACPs aqui descritos. O segundo cDNA de filamento foi sintetizado usando ACP10 arbitrário pelo método de PCR de início quente em que o procedimento é ajustar as reações completas sem a DNA polimerase e incubar os tubos no ciclador térmico para completar a etapa de desnaturação inicial a $>90^{\circ}$ C. Depois, enquanto se mantém os tubos a uma temperatura acima de 90° C, a quantidade apropriada de DNA polimerase pode ser pipetada na reação.

1. Combinar os seguintes reagentes em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 49,5 μ l do volume total contendo 1 μ l de primeiro cDNA de filamento (50 ng/ μ l) preparado pela etapa 1, 5 μ l de tampão de PCR 10 x (Roche), 5 μ l de dNTP a 2 mM, 1 μ l de ACP10

arbitrário a 10 μ M (iniciador 5'), 1 μ l de JYC5-T₁₅-ACP a 10 μ M (iniciador 3') e 36,5 μ l de dH₂O estéril.

2. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

5 3. Colocar o tubo no ciclador térmico pré aquecido a 94° C.

4. Adicionar o 0,5 μ l de Taq polimerase (5 unidades/ μ l; Roche) na reação, enquanto se mantém o tubo à temperatura de 94° C.

5. Conduzir a reação de PCR sob as seguintes condições: um ciclo de 94° C durante 1 minuto, 50° C durante 3 minutos e 72° C durante 1
10 minuto; seguidos por 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 65° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; e seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

B. Separação de produtos amplificados de PCR pela análise de eletroforese e recuperação das faixas diferencialmente demonstradas

15 Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % e detectados tingindo-se com brometo de etídio. Diversas faixas maiores diferencialmente expressas durante o desenvolvimento embriônico (E4.5, E11.5 e E18.5) foram selecionadas, excisadas e extraídas dos géis usando o Kit GENE CLEAN II (BIO 101). Os
20 produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e
25 pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

C. Re-amplificação das Faixas Recuperadas

As faixas obtidas a partir da etapa B foram re-amplificadas usando os mesmos iniciadores arbitrários pré selecionados e condições de

PCR como usados nos PROCEDIMENTOS 1, 2 e 3.

D. Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos re-amplificados

Cada fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e seqüenciado com o Analisador Genético ABI PRISM 310 (Perkin Elmer Biosystem) usando o kit de seqüenciamento de ciclo BigDye Terminator (Perkin Elmer). A análise de seqüência auxiliada por computador foi realizada usando o programa de procura BLAST (Ferramenta de Procura de Alinhamento Local Básico).

10 E. Análise de Northern

Vinte microgramas de RNA total de tecidos de conceito foram separadas em géis de agarose a 1 % desnaturantes contendo formaldeído, transferidas sobre membranas de náilon (Hybond-N, Amersham, USA) e hibridizadas com um produto de PCR subclonado rotulado com ^{32}P em solução QuikHyb (Stratagene, USA) durante a noite a 58° C como anteriormente descrito (Chun *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000). As manchas foram lavadas a 65° C duas vezes durante 20 minutos em 2 x SSC, 0,1 % SDS, duas vezes durante 20 minutos em 1 x SSC, 0,1 % SDS e duas vezes durante 20 minutos em 0,1 x SSC, 0,1 % SDS. As membranas foram expostas à película Kodak X-Omat XK-1 com uma tela intensificadora Fuji a -80° C.

As FIGs. 11A-D mostram os produtos de cDNA amplificados, em que as amostras de conceito de camundongo obtidas de estágios diferentes foram amplificadas pelo PROCEDIMENTO 1 usando os conjuntos de iniciadores como segue; um conjunto de ACP3 e dT₁₀-ACP1 para as linhas 1-3 da FIG. 11A; um conjunto de ACP5 e dT₁₀-ACP1 para as linhas 1-6 e da FIG. 11B e um conjunto de ACP8 e dT₁₀-ACP1 para as linhas 7-12 da FIG. 10B, respectivamente. A FIG. 11B também mostra resultados adicionais dos produtos de cDNA amplificados gerados usando-se um outro conjunto de ACP. FIGs. 11C-D mostram os produtos amplificados gerados usando-se dois

conjuntos de iniciadores do ACP10 e dT₁₀-ACP1 (FIG. 11C) e ACP14 e dT₁₀-ACP1 (FIG. 11D), respectivamente. Muitas faixas diferencialmente expressas em um estágio específico foram obtidas, subclonadas no vetor pGEM-T Easy (Promega) e seqüenciadas. A análise de seqüência revela que todos os clones
5 são genes conhecidos exceto os dois genes novos (Tabela 2). Os padrões de expressão foram confirmados pela análise de Northern blot usando mancha de estágio conceito de camundongo (Seegene, Inc., Seoul, Coréia).

A FIG. 12A mostra os produtos de cDNA amplificados, em que as amostras de conceito de camundongo (E4.5: linha 1; E11.5: linha 2; E18.5: linha 3) obtidos de estágios diferentes foram amplificados pelo
10 PROCEDIMENTO 2 usando um conjunto de ACP10 e JYC5-T₁₅-ACP. Muitas faixas diferencialmente expressas em um estágio específico foram obtidas, subclonadas no vetor pGEM-T Easy (Promega) e seqüenciadas. A análise de seqüência revela que todos os clones são genes conhecidos exceto
15 um DEG 2 (Tabela 2). Os padrões de expressão foram confirmados pela análise de Northern blot usando mancha de estágio de conceito de camundongo (Seegene, Inc., Seoul, Coréia).

A FIG. 12B mostra os produtos de cDNA amplificados, em que amostras de conceito de camundongo em estágios diferentes (E4.5: linha
20 3; E11.5: linha 4; E18.5: linha 5) foram amplificados pelas amplificações pela PCR de estágio duplo sem parada usando um conjunto de ACP10 e JYC5-T₁₅-ACP como mencionado acima no PROCEDIMENTO 3. Quando um conjunto de ACP10 e JYC5-T₁₅-ACP (linhas 3-5) foi usado, as faixas resultantes foram idênticas às faixas que foram obtidas pelo PROCEDIMENTO 2 que
25 compreende amplificações pela PCR de estágio duplo de parada única (FIG. 12A). Entretanto, nenhum produto foi gerado quando um único iniciador, ACP10 (linha 1) ou JYC5-T₁₅-ACP (linha 2) foi usado, o que indica que os produtos amplificados foram gerados apenas quando tanto ACP10 quanto JYC5-T₁₅-ACP como um conjunto foram usados para as suas ligações

específicas.

A FIG. 13 mostra os resultados da hibridização de Northern blot para representar seis clones diferentes usando DEG1 (A; seta 1 da FIG. 10A, FIG. 11 e FIG. 12), DEG2 (C), DEG3 (B; seta 2 da FIG. 10A, FIG. 11 e FIG. 12), DEG5 (E), DEG7 (F) e DEG8 (D; seta 4 da FIG. 10A, FIG. 11 e FIG. 12) como sondas. A sonda DEG1 também foi hibridizada à isoforma alternativa de Tropomiosina 2 (seta 1' da FIG. 11 e FIG. 12), que foi descoberta por esta presente invenção. Compatível com os resultados da análise em gel de agarose, a análise de Northern blot mostrou que os padrões de expressão dos clones são idênticos às faixas originais nos géis de agarose, indicando que todos os clones são produtos positivos verdadeiros. Assim, o ACP produz apenas produtos positivos sem quaisquer positivos falsos, o que significa que o ACP elimina o problema de positivos falsos.

A FIG. 14 mostra os resultados da hibridização de Northern blot para a expressão de DEG5 durante o desenvolvimento embriônico de camundongo. DEG5, que é apresentado como um novo gene pela análise de sequência, mostra um padrão de expressão interessante: depois de uma expressão forte apareceu no estágio de gravidez inicial (E4.5), a sua expressão foi gradualmente reduzida nos estágios intermediários e gradualmente aumentada mais uma vez no estágio de desenvolvimento final (E17.5 e E18.5).

Estes resultados indicam que o método usando o ACP para isolar genes diferencialmente expressos produz apenas produtos de PCR reais e elimina completamente produtos positivos falsos. A independência de positivos falsos que foram um gargalo principal que permanece para a técnica anterior de Demonstração Diferencial permite evitar o trabalho intensivo subsequente requerido para a verificação dos fragmentos de cDNA identificados pela Demonstração Diferencial.

EXEMPLO 5: Método para a Amplificação Rápida de

Extremidades 3' de cDNA (3'-RACE) Usando ACP

O presente exemplo compara a 3'-RACE com base no ACP e a 3'-RACE convencional de modo a demonstrar se o ACP da presente invenção pode excluir tais problemas secundários que surgem de iniciadores oligo-dT convencionais usados na síntese de cDNA.

Na 3'-RACE convencional, a terminação poli(a) de moléculas de mRNA é explorada como um sítio de iniciação para a amplificação pela PCR e assim o iniciador oligo-dT é usado como um iniciador 3' para a 3'-RACE convencional. Ao contrário, o ACP da presente invenção usa a terminação poli(a) de mRNA como um sítio de iniciação apenas para a síntese de cDNA mas não para a amplificação subsequente pela PCR.

primeiros cDNAs de filamento de camundongo foram preparados sob as mesmas condições como usadas na síntese de cDNA do Exemplo 1 usando Oligo VdT₁₅-ACP 5' - GCTTGACTACGATACT GTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTTTTTTV - 3' (SEQ ID NO: 57) (V é A, C ou G) como um iniciador de síntese de cDNA e depois, diretamente usados como padrão para a amplificação subsequente pela PCR sem a etapa de purificação para a remoção do iniciador de síntese de cDNA.

Para a 3'-RACE convencional, os primeiros cDNAs de filamento foram sintetizados usando os seguintes iniciadores de síntese de cDNA;

CDS III/3' 5' - ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-(dT)₃₀-VN - 3' (SEQ ID NO: 35) (V é A, C ou G; e N é A, C, T ou G).

Este iniciador de síntese de cDNA, CDS III/3', foi usado como iniciador 3' para a amplificação subsequente pela PCR.

A amplificação pela PCR foi conduzida em um volume de 50 µl contendo 50 ng do primeiro cDNA de filamento, 5 µl de tampão de PCR 10 x (Promega), 1 µl de um iniciador 5' específico de gene (10 µM), 1 µl de iniciador 3' JYC2 arbitrário pré selecionado (10 µM) ou CDS III/3' (10 µM),

3 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP a 2 mM, 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl; Promega). As reações de PCR foram conduzidas sob as seguintes condições: 5 minutos a 94° C seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 65° C durante 1 minuto e 72° C durante 1 minuto; seguida por uma
 5 extensão final de 5 minutos a 72° C. Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % seguida por tingimento com brometo de etídio. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela
 10 autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

A FIG. 15 mostra os resultados da beta-actina 3'-RACE. A 3'-
 15 RACE convencional (linha 1) foi comparada com a 3'-RACE com base no ACP (linha 2). O método 3'-RACE convencional produziu produtos não específicos assim como sujidade de DNA secundário, ao passo que a 3'-RACE com base em ACP produziu apenas uma única faixa, que é o tamanho esperado de 348 pares de base. Estes resultados indicam que o 3'-RACE com
 20 base em ACP pode excluir os problemas secundários tais como a sujidade de DNA e produtos não específicos.

EXEMPLO 6: Método para a Amplificação Rápida de Extremidade 5' (5' - RACE) e cDNAs de comprimento completo Usando ACP

25 O ACP da invenção objeto também foi usado para amplificar a extremidade 5' de fragmentos de cDNA. Os primeiros cDNAs de filamento foram sintetizados usando Oligo VdT₁₅-ACP ou dN₆-ACP aleatório:

Oligo	VdT ₁₅ -ACP	5'	-
GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTT TTTTTTTTTTV - 3' (SEQ			

ID NO: 57), em que V pode ser A, C ou G;

dN₆-ACP Aleatório 5' -

GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIINNNN NN - 3' (SEQ ID NO: 58),
em que N pode ser A, C, G ou T.

5 Depois da síntese completa das seqüências de primeiro cDNA
de filamento presentes na forma de intermediários de mRNA-cDNA, resíduos
de citosina são formados em terminação na extremidade 3' das seqüências de
primeiro cDNA de filamento pela reação de transferase terminal da
transcriptase reversa na presença de manganês. As extremidades 3' dos
10 primeiros cDNAs de filamento foram prolongadas usando o ACP extensor de
extremidade 3' de primeiro cDNA de filamento (rG3-ACP, rG2-ACP ou dG3-
ACP) e depois, diretamente usadas como padrão para a amplificação
subsequente pela PCR sem uma etapa de purificação para a remoção do ACP
extensor de extremidade 3' de primeiro cDNA de filamento assim como o
15 iniciador de síntese de cDNA.

As seqüências dos ACPs extensores de extremidade 3' de
primeiro cDNA de filamento são:

rG3-ACP 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(GGG) - 3' (SEQ ID NO: 36);

20 rG2-ACP 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(GG)-dG - 3' (SEQ ID NO: 37);

rG1-ACP 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(G)-d(GG) - 3' (SEQ ID NO:
59); ou

25 dG3-ACP 5' -

GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGd(GGG) - 3' (SEQ ID NO: 38)
(em que r e d representam ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos,
respectivamente).

A. Síntese de cDNA de comprimento completo de primeiro

filamento

PROTOCOLO A: Síntese de primeiro cDNA de filamento usando o ACP da invenção objeto

1. Combinar os seguintes em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 3 µg de RNA total e 2 µl de 10 µM de Oligo VdT₁₅-ACP ou dN₆-ACP aleatório.
2. Adicionar H₂O estéril a um volume final de 10 µl. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.
3. Incubar o tubo em um banho de água a 65° C durante 15 minutos ou usar um termociclador para o mesmo propósito.
4. Esfriar o tubo em gelo por pelo menos 2 minutos. Girar os conteúdos do tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.
5. Adicionar os seguintes reagentes ao mesmo tubo de reação: 4 µl de tampão de primeiro filamento 5x (Invitrogen), 1 µl de DTT a 0,1 M, 2 µl de BSA (1 mg/ml), 2 µl de dNTP (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µl de MnCl₂ a 100 mM e 0,5 µl de inibidor RNasin (40 unidades/µl, Promega).
6. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.
7. Incubar o tubo a 42° C durante 2 minutos em um incubador ou termociclador.
8. Adicionar 1 µl de transcriptase reversa SuperScript II (200 unidades/µl; Invitrogen).
9. Incubar o tubo a 42° C durante 1 hora em um incubador ou termociclador.
10. Adicionar 1 µl de ACP extensor de extremidade 3' de primeiro cDNA de filamento a 10 µM (rG3-ACP, rG2-ACP ou dG3-ACP).
11. Adicionar 0,3 µl de transcriptase reversa SuperScript II (200 unidades/µl; Invitrogen).

12. Incubar o tubo a 42° C durante 30 minutos em um incubador ou termociclador.

13. Incubar o tubo a 70° C durante 15 minutos em um incubador ou termociclador para terminar a síntese de primeiro filamento.

5 14. Colocar o tubo em gelo ou pode ser armazenado a -20° C.

PROTOCOLO B: Síntese de cDNA de comprimento completo de primeiro filamento pelo método CapFinder

Os seguintes iniciadores são usados no método CapFinder (Clontech):

10 Oligonucleotídeo SMART IVTM 5' -
AAGCAGTGGTATCAACGCAG AGTGGCCATTACGGCCr(GGG) - 3'
(SEQ ID NO: 33); e

Iniciador 5' PCR 5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -
3' (SEQ ID NO: 34) e iniciador de PCR CDS III/3'.

15 1. Combinar os seguintes em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 3 µg de RNA total, 1 µl de iniciador de PCR CDS III/3' a 10 µM (Clontech) e 1 µl de Oligonucleotídeo SMART IV a 10 µM (Clontech).

20 2. Adicionar H₂O estéril a um volume final de 5 µl. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

3. Incubar o tubo a 72° C durante 2 minutos.

4. Esfriar o tubo em gelo durante 2 minutos. Girar os conteúdos do tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

25 5. Adicionar os seguintes reagentes ao mesmo tubo de reação:
10 µl do volume total contendo 2 µl de tampão de primeiro filamento 5x (Clontech), 1 µl de DTT a 20 mM, 1 µl de dNTP (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 1 µl de Transcriptase reversa PowerScript (Clontech).

6. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

7. Incubar o tubo a 42° C durante 1 hora.

8. Colocar o tubo em gelo ou pode ser armazenado a -20° C.

B. Amplificação pela PCR

PROTOCOLO C: Amplificação de um fragmento de cDNA de

5 extremidade 5' alvo usando o sistema ACP ou o método 5' - RACE convencional

O presente exemplo compara a tecnologia de CapFinder 5' - RACE corrente e método de 5' RACE com base no ACP, em que a tecnologia de CapFinder 5' - RACE corrente não pode excluir o alto teor de produto secundário devido à quantidade residual dos iniciadores durante o processo. De modo a demonstrar se o ACP da presente invenção pode eliminar tais problemas de produto secundário que surgem de iniciadores tais como o iniciador CapFinder, Oligonucleotídeo SMART IV (Clontech) e iniciador de síntese de cDNA, iniciador de PCR CDS III/3' (Clontech), usados na síntese de cDNA, tanto o 5' - RACE com base em ACP quanto o CapFinder 5' - RACE para a amplificação de extremidade 5' de cDNAs JunB e beta-actina de camundongo foram conduzidos nas mesmas condições. O mRNA JunB de camundongo é um transcrito relativamente raro no RNA de placenta de 18,5 dias de idade de camundongo, ao passo que a beta-actina de camundongo é um relativamente abundante.

1. Combinar os seguintes reagentes em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 50 µl do volume total contendo 1 µl de primeiro cDNA de filamento preparado a partir do Protocolo A ou B, 5 µl de tampão de PCR 10 x (Promega), 5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP a 2 mM, 1 µl de iniciador 5' - RACE específico de gene a 10 µM, 1 µl de iniciador JYC2 ou 5' PCR a 10 µM (Clontech), 0,5 µl de Taq Polimerase (5 unidades/µl; Promega) e 31,5 µl de dH₂O estéril.

2. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

3. Conduzir a reação de PCR sob as seguintes condições: 5 minutos a 94° C, seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 58° C durante 40 segundos e 72° C durante 1 minuto 30 segundos; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

5 4. Analisar os produtos amplificados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % seguido por tingimento com brometo de etídio.

Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Como mostrado na FIG. 16, os métodos CapFinder para JunB e beta-actina 5' - RACE de camundongo usando o iniciador 5' PCR (Clontech) e o iniciador específico de gene produziram altos teores de produtos secundários tais como sujidade de DNA (linhas 1 e 3) como descrito por muitos pesquisadores (Chenchik *et al.*, 1998; Matz *et al.*, 1999; Schramm *et al.*, 2000), ao passo que o 5' - RACE com base no ACP da presente invenção gerou apenas uma única faixa que corresponde a cada um dos tamanhos esperados de 155 pares de base ou 319 pares de base de fragmento de cDNA de extremidade 5' de JunB de camundongo (linha 2) ou beta-actina de camundongo (linha 4), respectivamente. Estes exemplos ilustram que o ACP pode ser usado para eliminar fundamentalmente tais problemas de produtos secundários que surgem da contaminação de iniciadores usados durante a síntese de cDNA, sem a etapa de purificação para a remoção dos iniciadores usados na síntese de cDNA.

A FIG. 17 também mostra que o ACP da invenção objeto não permite que os produtos não específicos sejam formados, que são gerados

pelo método CapFinder (linha 1). O primeiro cDNA de filamento foi sintetizado pelo método CapFinder (linha 1) ou método do ACP (linhas 2, 3 e 4) e depois, diretamente usado como padrão na amplificação pela PCR subsequente para a proteína semelhante à prolactina de camundongo PLP-C alfa 5' - RACE. O iniciador de 5' - RACE específico de PLP-C alfa é: PLP-C alfa 5' - GAGAGGATAGTT TCAGGGAC - 3' (SEQ ID NO: 40). Os ACPs extensores da extremidade 3' de primeiro cDNA de filamento que compreende as três riboguaninas (rG3-ACP; linha 2), três desoxirriboguaninas (dG3-ACP; linha 4) ou uma combinação das duas riboguaninas e uma desoxirriboguanina (rG2-ACP; linha 3) na extremidade 3' geraram cDNAs de extremidade 5' de modo que uma única faixa que corresponde ao fragmento de cDNA de extremidade 5' de tamanho esperado de 506 pares de base de PLP-C alfa de camundongo foi produzido a partir da PCR com base no ACP para PLP-C alfa 5' - RACE.

15 PROTOCOLO D: Amplificação de fragmentos de cDNA enriquecidos em 5' usando ACP

Os primeiros cDNAs de filamento são sintetizados usando dN₆-ACP aleatório no Protocolo A. A amplificação pela PCR foi realizada pelo método de PCR de início quente em que o procedimento é ajustar as reações completas sem a DNA polimerase e incubar os tubos no ciclador térmico para completar a etapa de desnaturação inicial a >90° C Depois, enquanto se mantém os tubos a uma temperatura acima de 70° C, a quantidade apropriada de DNA polimerase pode ser pipetada na reação.

1. Combinar os seguintes reagentes em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 49,5 µl do volume total contendo 1 µl de primeiro cDNA de filamento preparado pelo dN₆-ACP aleatório no Protocolo A, 5 µl de tampão de PCR 10 x (Promega), 5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP a 2 mM, 1 µl de JYC2 a 10 µM (iniciador 3'), 1 µl de JYC4 a 10 µM (iniciador 5') e 31,5 µl de dH₂O estéril.

2. Misturar conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

3. Colocar o tubo no ciclador térmico pré aquecido a 94° C.

4. Adicionar o 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl; Promega) na reação, enquanto se mantém o tubo na temperatura de 94° C.

5. Conduzir a reação de PCR sob as seguintes condições: 5 minutos a 94° C seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 68° C durante 40 segundos e 72° C durante 1 minuto 30 segundos; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C

6. Analisar os produtos amplificados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % seguido por tingimento com brometo de etídio.

Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

PROTOCOLO E: Amplificação de cDNAs enriquecidos de comprimento completo usando ACP

Os primeiros cDNAs de filamento são sintetizados usando Oligo VdT₁₅-ACP no Protocolo A. A amplificação pela PCR foi realizada pelo método de PCR de início quente como no Protocolo D.

1. Combinar os seguintes reagentes em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 49,5 µl do volume total contendo 1 µl de primeiro cDNA de filamento preparado pelo Oligo VdT₁₅-ACP no Protocolo A, 5 µl de tampão de PCR 10 x (Promega), 5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP a 2 mM, 1 µl de JYC2 a 10 µM (iniciador 3'), 1 µl de JYC4 a 10 µM (iniciador 5') e 31,5 µl de dH₂O estéril.

2. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

3. Colocar o tubo no ciclador térmico pré aquecido a 94° C.

4. Adicionar o 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl; Promega, Madison, USA) na reação, enquanto se mantém o tubo na temperatura de 94° C.

5. Conduzir a reação de PCR sob as seguintes condições: 5 minutos a 94° C seguidos por 30 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 68° C durante 40 segundos e 72° C durante 1 minuto 30 segundos; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

6. Analisar os produtos amplificados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % seguido por tingimento com brometo de etídio.

Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Para avaliar a eficiência do método usando ACP na amplificação de cDNAs de comprimento completo, os cDNAs de comprimento completo amplificados pelos procedimentos acima do método do ACP ou o método CapFinder corrente foram manchados em uma membrana Hybond-N (Amersham/United States Biochemical). O cDNA da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de camundongo (GAPDH) foi rotulado com [alfa-³²P]dCTP usando um kit de rotulação aleatória (Roche Diagnostics Co, Indianapolis, USA) e usado como uma sonda.

Como mostrado na FIG. 18, a sonda de cDNA GAPDH detectou uma única faixa que corresponde ao tamanho esperado de 1,3-kb de

cDNA de GAPDH de comprimento completo. Como esperado, os sinais dos produtos de PCR gerados pelo método do ACP acima (linha 2) foram diversas vezes mais fortes do que aqueles pelo método CapFinder (linha 1). Este exemplo ilustra que o método do ACP da presente invenção muito mais eficazmente amplifica os cDNAs de comprimento completo do que o método CapFinder.

EXEMPLO 7: Impressão Digital Genômica Usando PCR Arbitrariamente Preparada com base no ACP

O ACP da invenção objeto foi aplicado para detectar polimorfismos em camundongo. Os DNAs genômicos das cepas de camundongo C57BL/6J, CBA, BALB/cJ, NOR, SPRETUS, PANCEVO e Korean Wild Mouse foram usados como materiais de partida. O DNA genômico foi preparado a partir do fígado de camundongos usando o Kit QIAamp Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemanha). As ACPs arbitrárias usadas na invenção objeto são:

ACP101 5'-
GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCGGAGGATC-3' (SEQ ID NO: 64);

ACP109 5'-
GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTGCAGGACG-3' (SEQ ID NO: 65); e

ACP116 5'-
GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICGGAGCATCC-3' (SEQ ID NO: 66).

Um conjunto de ACPs arbitrários, ACP101 e ACP109 (FIG. 19A) ou ACP101 e ACP116 (FIG. 19B), foi usado como iniciadores para a impressão digital genômica de camundongo. A amplificação pela PCR foi realizada pelo método de PCR de início quente como descrito no Exemplo 2. A impressão digital genômica usando ACP é conduzida por dois estágios de

amplificações pela PCR sob as seguintes condições: as reações de amplificação são realizadas sob condições de severidade baixa em dois ciclos da PCR de primeiro estágio que compreende reação de anelamento, extensão e desnaturação; a mistura de reação no volume final de 49,5 µl contendo 50
5 ng do DNA genômico, 5 µl de tampão de reação de PCR 10x (Promega), 5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP (2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cada 7 µl de um par dos ACPs (cada 10 µM) é pré aquecida a 94° C, enquanto se mantém o tubo contendo a mistura de reação a 94° C, 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl; Promega) é adicionado à mistura de reação; as
10 reações de PCR são como segue: dois ciclos de 94° C durante 40 segundos, 52° C durante 3 minutos e 72° C durante 1 minuto; seguida pela desnaturação do produto de amplificação a 94° C; depois da reação completa da PCR de primeiro estágio, 4 µl do iniciador pré selecionado arbitrário JYC4 (10 µM) que corresponde à porção de extremidade 5' dos ACPs são adicionados à
15 mistura de reação e depois a amplificação pela PCR de segundo estágio é conduzida como segue: 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 68° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

Os produtos de amplificação foram separados e analisados
20 pela eletroforese em um gel de agarose a 2,0 que foi tingido com brometo de etídio e fotografado. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos
25 fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

A FIG. 19 mostra os resultados de um experimento em que um par de ACPs arbitrários foram usados para amplificar segmentos de DNA

genômico de uma variedade de cepas de camundongo. Para examinar a reprodutibilidade da impressão digital genômica, a impressão digital de cada cepa de camundongo foi duplicada usando dois conjuntos diferentes dos ACPs. A amplificação pela PCR com base no ACP produziu diversos

5 segmentos de DNA de cada conjunto de iniciadores e os resultados foram reprodutíveis. Os polimorfismos foram evidentes entre cepas de camundongos, indicando que as cepas de camundongos podem ser distinguidas através de polimorfismos nas impressões digitais genômicas geradas pela PCR arbitrariamente preparada com base no ACP. Assim, o ACP

10 da invenção objeto é útil para detectar polimorfismos e construir mapas genéticos.

EXEMPLO 8: PCR multiplex Usando a PCR com Base no ACP

Para demonstrar a aplicação do ACP na PCR multiplex, as

15 porções contendo polimorfismos de nucleotídeo único da molécula de adesão de leucócito humana I (ELAM1) e genes p53 humanos (TP53) foram amplificados com iniciadores convencionais ou ACP. O processo e resultados para a amplificação pela PCR multiplex usando ACPs são aqui descritos. O DNA padrão foi obtido a partir da placenta humana.

20 Os iniciadores convencionais para o exon3 de ELAM1 (155 pares de base) usados no Exemplo são:

ELAM1N1 5' - TTGCACACTGTTGATTCTAA - 3' (SEQ ID NO: 67); e

ELAM1C1 5' - TTATTGATGGTCTCTACACA - 3' (SEQ ID NO: 68).

Os iniciadores convencionais para o exon10 de ELAM1 (287 pares de base)

25 usados no Exemplo são:

ELAM1N2 5' - CCACTGAGTCCAACATTC - 3' (SEQ ID NO: 69); e

ELAM1C2 5' - CTGAAACACTTCCCACAC - 3' (SEQ ID NO: 70).

Os iniciadores convencionais para o exon4 de TP53 (349 pares de base) usados no Exemplo são:

P53N1 5' - CCTCTGACTGCTCTTTTCAC - 3' (SEQ ID NO: 71); e

P53C1 5' - ATTGAAGTCTCATGGAAGCC - 3' (SEQ ID NO: 72).

Os iniciadores convencionais para os exons 7-8 de TP53 (750 pares de base) usados no Exemplo são:

5 P53N2 5' - TGCTTGCCACAGGTCTC - 3' (SEQ ID NO: 73); e

P53C2 5' - GCAGTGCTAGGAAAGAGG - 3' (SEQ ID NO: 74).

Estes iniciadores convencionais usados no Exemplo são conhecidos como os iniciadores que geram produtos não específicos nos métodos de PCR multiplex convencional como conhecido na técnica.

10 Os ACPs da invenção objeto foram aplicados a estes quatro conjuntos de iniciadores convencionais para demonstrar se o ACP pode superar os problemas tais como produtos não específicos que resultam do uso destes conjuntos de iniciadores convencionais para a PCR multiplex.

15 As porções de extremidade 3' dos ACPs compreendem as seqüências dos iniciadores convencionais acima como segue e assim o tamanho dos ACPs é de 26 pares de base ou 27 pares de base maiores do que aquele dos iniciadores convencionais:

ELAM1N1-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGCAC
ACTGTTGATTCTAA - 3' (SEQ ID NO: 75);

20 ELAM1C1-ACP 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIITTATTG
ATGGTCTCTACACA - 3' (SEQ ID NO: 76);

ELAM1N2-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCACTG
AGTCCAACATTC - 3' (SEQ ID NO: 77);

25 ELAM1C2-ACP 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICTGAAA
CACTTCCCACAC - 3' (SEQ ID NO: 78);

P53N1-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCTCTGACT
GCTCTTTTCAC - 3' (SEQ ID NO: 79);

P53C1-ACP 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTC
TCATGGAAGCC - 3' (SEQ ID NO: 80);

P53N2-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGCTTGCCA
CAGGTCTC - 3' (SEQ ID NO: 81); e

P53C2-ACP 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIIGCAGTGCTA
GGAAAGAGG - 3' (SEQ ID NO: 82).

5 As seqüências da porção de extremidade 5' dos ACPs
compreendem e servem como seqüências iniciadoras arbitrárias pré
selecionadas apenas para a amplificação pela PCR de segundo estágio:

JYC3 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGA - 3' (SEQ ID
NO: 11) e

10 JYC4 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT - 3' (SEQ ID
NO: 12).

As amplificações pela PCR multiplex foram conduzidas pelas
amplificações pela PCR de estágio duplo de parada única ou sem parada, que
é uma característica única da presente invenção. A amplificação pela PCR foi
15 realizada pelo método de PCR de início quente como descrito no Exemplo 2.

PROTOCOLO A: Amplificações pela PCR de estágio duplo
de parada única

(a) Amplificação pela PCR de primeiro estágio

20 A amplificação pela PCR de primeiro estágio foi conduzida
por dois ciclos de PCR que compreendem da reação de anelamento, extensão
e desnaturação; a mistura de reação no volume final de 49,5 µl contendo 50
ng de DNA genômico humano, 8 µl de tampão de reação de PCR 10 x
(Promega), 7 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP (2 mM de cada dATP,
dCTP, dGTP, dTTP), cada 0,5 µl de cada 5' ACP (10 µM) e 3' ACP (10 µM)
25 ajustada é pré aquecida a 94° C, enquanto se mantém o tubo contendo a
mistura de reação em 94° C, 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl;
Promega) é adicionado à mistura de reação; as reações de PCR são como
segue: dois ciclos de 94° C durante 40 segundos, 60° C durante 40 segundos e
72° C durante 40 segundos; seguida pela desnaturação do produto de

amplificação a 94° C.

(B) Amplificação pela PCR de segundo estágio

Os produtos resultantes gerados pela amplificação pela PCR de primeiro estágio usando conjuntos múltiplos dos ACPs foram depois amplificados pelas seguintes amplificações pela PCR de segundo estágio sob temperatura de anelamento mais alta. Depois da conclusão da amplificação pela PCR de primeiro estágio, cada 2 µl de iniciadores arbitrários pré selecionados a 10 µM, JYC3 e JYC4, foram adicionados à mistura de reação obtida da amplificação pela PCR de primeiro estágio, sob temperatura desnaturante tal como a 94° C. A reação de PCR do segundo estágio foi como segue: 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 68° C durante 40 segundos e 72° C durante 1 minuto; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % e detectados tingindo-se com brometo de etídio. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

As FIGs. 20 e 21 mostram os resultados de experimentos em que três ou quatro conjuntos de iniciadores foram usados para amplificar segmentos mutiplex de DNA genômico em uma reação. O conjunto de iniciadores convencionais gerou produtos não específicos assim como produtos alvo específicos de três conjuntos (FIG. 20A) ou quatro conjuntos (FIG. 21A) de iniciadores. Ao contrário, os três conjuntos (FIG. 20B) ou quatro conjuntos (FIG. 21B) dos ACPs produziram apenas produtos alvo mutiplex. Assim, o ACP da invenção objeto pode ser usado para a aplicação

da PCR multiplex.

PROTOCOLO B: Amplificações pela PCR de estágio duplo sem parada

Alternativamente, as seqüências completas de cada conjunto de ACP, ao invés dos iniciadores arbitrários pré selecionados tais como JYC3 e JYC4, podem ser usados como iniciadores para a amplificação pela PCR de segundo estágio nas condições de alta severidade. Neste caso, não é necessário adicionar os iniciadores arbitrários pré selecionados à mistura de reação no momento ou depois da reação de PCR do primeiro estágio.

O processo das amplificações pela PCR de estágio duplo sem parada é basicamente idêntico ao Protocolo A, exceto que a amplificação pela PCR de segundo estágio deve imediatamente seguir a amplificação pela PCR de primeiro estágio sem qualquer demora por que não existe nenhuma etapa de adicionar iniciadores arbitrários pré selecionados e que a concentração de cada conjunto de ACP, cada 1 µl de conjunto de 5' ACP (10 µM) e 3' ACP (10 µM), é adicionado à amplificação pela PCR de primeiro estágio.

Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % e detectados tingindo-se com brometo de etídio. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Compatível com os resultados de amplificações pela PCR de estágio duplo de parada única (FIG. 21B), a amplificação pela PCR de estágio duplo sem parada também produziu apenas produtos específicos de multiplex alvo (FIG. 21C). Estes exemplos ilustram que o ACP permite que os produtos

sejam livres dos problemas de produtos secundários assim como da não especificidade que surge dos iniciadores convencionais usados nos métodos da PCR multiplex como conhecido na técnica.

EXEMPLO 9: Identificação de Segmentos de Homologia

5 Conservada em Famílias de Multigene Usando ACP

O ACP da invenção objeto foi aplicado para detectar e clonar segmentos de homologia conservada em famílias de multigene. No presente exemplo, iniciadores degenerados foram planejados para detectar seqüências de homeobox. Os genes de homeobox são caracterizados por uma seqüência
10 de nucleotídeo de 180 pares de base conservadas conhecida como o homeobox, que codifica um homeodomínio de ligação de DNA de 60 aminoácidos. Para isolar os genes homeobox envolvidos no desenvolvimento de embrião de camundongo, o RNA total obtido de três estágios diferentes de desenvolvimento de conceito, conceitos de camundongo de 4,5, 11,5 e 18,5
15 dias de idade, foi usado como um material de partida. Os primeiros cDNAs de filamento foram preparados sob as mesmas condições como usadas na síntese de cDNA do Exemplo 3, em que JYC5-T₁₅-ACP foi usado como o iniciador da síntese de primeiro cDNA de filamento.

Os seguintes ACPs compreendem as seqüências degeneradas
20 para a seqüência homeobox em suas porções de extremidade 3' e foram usados como iniciadores específicos de homeobox degenerados para a amplificação pela PCR de primeiro estágio:

JYC2-HD1 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTG
TGGTT - 3' (SEQ ID NO: 83);

25 JYC2-HD2 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTC
TGGTT - 3' (SEQ ID NO: 84); e

JYC2-HD3 5' - GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTT
TGGTT - 3' (SEQ ID NO: 85).

A amplificação pela PCR foi realizada pelo método de PCR de

início quente como descrito no Exemplo 2 e conduzida pelas amplificações pela PCR de estágio duplo de parada única ou sem parada. O seguinte é um exemplo do processo de amplificações pela PCR de estágio duplo de parada única.

5 1. Combinar os seguintes reagentes em um tubo de microcentrifuga estéril de 0,2 ml: 49,5 μ l do volume total contendo 1 μ l de primeiro cDNA de filamento (50 ng/ μ l), 5 μ l de tampão de PCR 10 x (Roche), 5 μ l de dNTP a 2 mM, 1 μ l de um de JYC2-HD1, JYC2-HD2 ou JYC2-HD3 a 10 μ M (iniciador 5'), 1 μ l de JYC5-T₁₅-ACP a 10 μ M (iniciador 3') e 36,5 μ l de dH₂O estéril.

2. Misturar os conteúdos e girar o tubo ligeiramente em uma microcentrifuga.

3. Colocar o tubo no ciclador térmico pré aquecido a 94° C.

15 4. Adicionar 0,5 μ l de Taq polimerase (5 unidades/ μ l; Roche) na reação enquanto se mantém o tubo na temperatura de 94° C.

20 5. Conduzir a reação de PCR sob as seguintes condições: um ciclo de 94° C durante 1 minuto, 52° C durante 3 minutos e 72° C durante 1 minuto; seguidos por 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 65° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; e seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % e detectados tingindo-se com brometo de etídio. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Muitas faixas diferencialmente expressas em um estágio específico foram obtidas, subclonadas no vetor pGEM-T Easy (Promega) e seqüenciadas. A análise de seqüência revela que alguns dos clones contém seqüências de homeobox. As análises de Northern blot ou RT-PCR mostram

5 que os clones são idênticos aos resultados dos padrões de expressão observados pela eletroforese. Estes resultados indicam que o método usando o ACP da presente invenção para isolar segmentos de homologia conservada em famílias de multigene produz apenas produtos de PCR reais. A independência de positivos falsos, que é um gargalo principal que permanece

10 nas técnicas com base na PCR anteriores para isolar segmentos de homologia conservada em famílias de multigene, permite evitar o trabalho intensivo subsequente requerido para a verificação dos fragmentos de cDNA amplificados.

EXEMPLO 10: Genotipagem de Polimorfismo de Nucleotídeo Único Usando a PCR com Base no ACP

15

Para demonstrar a aplicação do ACP na genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único, uma porção contendo um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene p53 humano (TP53) foi amplificada com iniciador convencional ou ACP. O processo e os resultados para a

20 genotipagem SNP usando ACPs são aqui descritos. Padrões de DNA foram obtidos a partir de amostras de sangue humano que têm um SNP no exon 4 do gene TP53. Este polimorfismo é expresso como uma substituição Arg → Pro na posição de aminoácido 72 pela substituição de G com C. Uma seqüência de 349 nt entre os nucleotídeos 11991 e 12339 do gene TP53 foi amplificada

25 a partir de cada tipo de padrão por um conjunto dos seguintes iniciadores:

P53N 5' - CCTCTGACTGCTCTTTTCAC - 3' (SEQ ID NO: 86) e

P53C-ACP 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCT
CATGGAAGCC - 3' (SEQ ID NO: 87).

Os produtos amplificados contendo o SNP entre as suas

extremidades foram usados como padrão para detectar o SNP usando ACP específico de alelos como segue:

- P53N1A-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCCCGCG TGG
- 3' (SEQ ID NO: 88),
- 5 P53N1B-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCCCCCG TGG
- 3' (SEQ ID NO: 89),
- P53N2A-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCCCGC GTG
- 3' (SEQ ID NO: 90),
- P53N2B-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCCCCC GTG
10 - 3' (SEQ ID NO: 91),
- P53N3A-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCCCG CGT
- 3' (SEQ ID NO: 92),
- P53N3B-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCCCC CGT
- 3' (SEQ ID NO: 93),
- 15 P53N4A-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC GCG
- 3' (SEQ ID NO: 94),
- P53N4B-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC CCG
- 3' (SEQ ID NO: 95),
- P53N5A-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC G -
20 3' (SEQ ID NO: 96), e
- P53N5B-ACP 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC C - 3'
(SEQ ID NO: 97).

A base polimórfica está sublinhada na porção de extremidade 3' de cada ACP específico de alelo e a posição da base polimórfica é
25 considerada uma posição de interrogação. A posição de interrogação é colocada em diversas posições diferentes a partir da extremidade 3' dos ACPs específicos de alelo de modo a determinar a posição mais crítica na especificidade de anelamento para detectar o SNP.

Os ACPs específicos de alelo foram usados como iniciadores

5'. P53C-ACP e um de P53N1A-ACP, P53N2A-ACP, P53N3A-ACP, P53N4A-ACP e P53N5A-ACP foram usados para a genotipagem A do tipo selvagem. P53C-ACP e um de P53N1B-ACP, P53N2B-ACP, P53N3B-ACP, P53N4B-ACP e P53N5B-ACP foram usados para a genotipagem B do tipo variante. A sequência da porção de extremidade 5' dos ACPs foram servidos como sequências iniciadoras pré selecionadas arbitrárias para a amplificação pela PCR de segundo estágio:

JYC3 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGA - 3' (SEQ ID NO: 11) e

JYC4 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT - 3' (SEQ ID NO: 12).

10 (a) Amplificação pela PCR de primeiro estágio

A amplificação pela PCR de primeiro estágio foi conduzida por um ciclo de PCR que consiste de reação de anelamento, extensão e desnaturação; a mistura de reação em um volume final de 49,5 µl contendo 1 µl do segmento genômico alvo amplificado contendo o SNP no exon 4 do gene TP53, 5 µl de tampão de reação de PCR 10 x (Promega), 5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 5 µl de dNTP (2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 1 µl de um dos ACPs específicos de alelo (10 µM) é pré aquecida a 94° C, enquanto se mantém o tubo contendo a mistura de reação a 94° C, 0,5 µl de Taq polimerase (5 unidades/µl; Promega) é adicionado à mistura de reação; para os ACPs específicos de alelo tendo 10 nucleotídeos na sua porção de extremidade 3', as reações de PCR são como segue: um ciclo de 94° C durante 40 segundos, 55° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; seguida pela desnaturação do produto de amplificação a 94° C; para os ACPs específicos de alelo tendo 8 nucleotídeos na sua porção de extremidade 3', as reações de PCR são como segue: um ciclo de 94° C durante 40 segundos, 50° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; seguida pela desnaturação do produto de amplificação a 94° C. O produto resultante é um primeiro filamento de DNA complementar ao segmento genômico alvo.

(B) Amplificação pela PCR de Segundo estágio

O produto resultante gerado pela amplificação pela PCR de primeiro estágio foi depois amplificado pela seguinte amplificação pela PCR de segundo estágio a uma temperatura de anelamento mais alta do que a primeira temperatura de anelamento. Depois da conclusão da amplificação pela PCR de primeiro estágio, 1 µl de iniciador pré selecionado arbitrário a 10 µM, JYC3, foi adicionado à mistura de reação obtida da amplificação pela PCR de primeiro estágio, sob temperatura desnaturante tal como a 94° C. A reação de PCR do segundo estágio foi realizada como segue: 30 ciclos de 94° C durante 40 segundos, 68° C durante 40 segundos e 72° C durante 40 segundos; seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72° C.

Os produtos amplificados foram analisados pela eletroforese em um gel de agarose a 2 % e detectados tingindo-se com brometo de etídio. Os produtos de PCR resultantes também podem ser detectados em um gel de poliacrilamida desnaturante pela autorradiografia ou métodos de detecção não radioativos tais como tingimento com prata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), pelo uso de oligonucleotídeos fluorescentemente rotulados (Bauer *et al.* 1993; Ito *et al.* 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) e pelo uso de iniciadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

A FIG. 22 mostra os resultados da amplificação específica de alelo usando ACP. O par de ACPs específicos de A do tipo selvagem (P53N2A-ACP e P53C-ACP) gerou um produto alvo específico apenas das amostras tendo genotipagem homozigótica do tipo selvagem A (linha 1) ou heterozigótica (linha 3), mas não das amostras tendo genotipagem homozigótica do tipo variante B (linha 5). O par de ACPs específicos de B do tipo variante (P53N2B-ACP e P53C-ACP) gerou um produto alvo específico apenas das amostras tendo genotipagem homozigótica do tipo variante B (linha 6) ou heterozigótica (linha 4), mas não das amostras tendo genotipagem homozigótica do tipo selvagem A (linha 2). Estes resultados indicam que o

ACP da invenção objeto pode ser aplicado como um método fácil e econômico para detectar o genótipo de SNPs visto que o uso de sonda de DNA fluorescente nem o processamento pós PCR não são requeridos neste método. Os ACPs específicos de alelo cada um tendo uma posição de
 5 interrogação na sua porção de extremidade 3' mostraram melhora de especificidade de anelamento. Além disso, quando o ACP específico de alelo tem uma posição de interrogação na posição 5 a partir da extremidade 3' (por exemplo, P53N2A-ACP e P53N2B-ACP), a especificidade de anelamento é a mais criticamente realizada.

10 De modo a verificar se a posição 5 da extremidade 3' real do ACP específico de alelo é a mais apropriado para a posição de interrogação, seis experimentos adicionais foram conduzidos usando o mesmo processo como usado na FIG. 22. Padrões de DNA foram obtidos a partir de amostras de sangue humano que têm um SNP. Seis fragmentos genômicos curtos
 15 contendo SNPs foram amplificados usando cada conjunto de iniciador diferente como segue:

703N 5' - ATTCTGATGGTGTGGATTGTG - 3' (SEQ ID NO: 98) e
 SM703C 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIACCCTGGAGT
 AGACGAAGA - 3' (SEQ ID NO: 99) para o receptor adrenérgico Beta-2
 20 (ADRB2),

028N 5' - CCTTCTGTGCTTGATGCTTTT - 3' (SEQ ID NO: 102) e
 SM028C 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICAGGAAGGAT
 GAGCATTTAG - 3'

(SEQ ID NO: 103) para o receptor 5 da Quimiocina (motivo c-c) (CCR5),

25 695N: 5' - AGAAAAACCAGAGGCAGCTT - 3' (SEQ ID NO: 106) e
 SM695C 5' - TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIAGCACAAACC
 AAAGACACAGT - 3' (SEQ ID NO: 107) para o receptor da Interleucina 13,

679N 5' - CTAGCTGCAAGTGACATCTCT - 3' (SEQ ID NO: 110) e
 SM679C 5' - TCACAGAGTATCCAAGCGIIIIITCAGTAAGAAGCCA

GGAGAG - 3'

(SEQ ID NO: 111) para a molécula de adesão de leucócito - 1 (LAM-1),

832N 5' - TTTTGGGTGGAGGCTAACAT - 3' (SEQ ID NO: 114) e

SM832C: 5' - TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIAACGATGCAGA

5 CACCACCA - 3' (SEQ ID NO: 115) para o receptor 3 de Taquicinina (TACR3), e

880N 5' - CTTCCACCAATACTCTTTTCC - 3' (SEQ ID NO: 118) e

SM880C: 5' - TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIIGCATACACACA
AGAGGCAGA - 3' (SEQ ID NO: 119) para a Interleucina 1, beta (IL1B).

10 Os produtos amplificados contendo o SNP entre as suas extremidades foram usados como padrão para detectar os SNPs em que os ACPs específicos de alelo foram aplicados como segue:

SM703-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGTACAGGGC-3'
(SEQ ID NO: 100) e

15 SM703-B 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGTACCGGGC - 3'
(SEQ ID NO: 101) para o receptor Beta-2 adrenérgico (ADRB2),

SM028-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCAAACCAA-3'
(SEQ ID NO: 104) e

SM028-B 5' -

20 GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCAACCCAA - 3' (SEQ ID NO: 105) para receptor 5 da Quimiocina (motivo c-c) (CCR5),

SM695-A 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCATTTTAGG -3'
(SEQ ID NO: 108) e

SM695-B 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCATTGTAGG - 3'
25 (SEQ ID NO: 109) para o receptor da Interleucina 13,

SM679-A 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAGAACTTT -3'
(SEQ ID NO: 112) e

SM679-B 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAGACCTTT - 3'
(SEQ ID NO: 113) para a molécula de adesão de Leucócito - 1 (LAM-1),

SM832-A 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGGTAAA -3'
(SEQ ID NO: 116) e

SM832-B 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGATAAA - 3'
(SEQ ID NO: 117) para o receptor 3 da Taquicinina (TACR3), e

5 SM880-A 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAGCCATAA -3'
(SEQ ID NO: 120) e

SM880-B 5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAGCTATAA - 3'
(SEQ ID NO: 121) para a Interleucina 1, beta (IL1B).

A FIG. 23 mostra os resultados de amplificações específicas
10 de alelo para seis SNPs adicionais cada uma presente em gene diferente tal
como o receptor Beta-2 adrenérgico (ADRB2) (A), receptor 5 da Quimiocina
(motivo c-c) (CCR5) (B), receptor da Interleucina 13 (C), moléculas de
adesão de Leucócito - 1 (LAM-1) (D), receptor 3 da Taquicinina (TACR3)
(E) e Interleucina 1, beta (IL1B) (F). Compatível com os resultados da FIG.
15 22, a especificidade de anelamento é criticamente realizada quando o ACP
específico de alelo tem uma posição de interrogação na posição 5 da
extremidade 3'. O par de ACPs específico de A do tipo selvagem gerou um
produto alvo específico apenas a partir das amostras tendo genotipagem
homozigótica do tipo selvagem A (linha 1) ou heterozigótica (linha 3), mas
20 não a partir das amostras tendo genotipagem homozigótica do tipo B variante
(linha 5). O par de ACPs específicos de B do tipo variante gerou um produto
alvo específico apenas das amostras tendo genotipagem homozigótica tipo B
variante (linha 6) ou heterozigótica (linha 4), mas não das amostras tendo
genotipagem homozigótica do tipo selvagem A (linha 2).

25 Tendo descrito uma forma de realização preferida da presente
invenção, deve ser entendido que variantes e modificações destas que caem
dentro do espírito da invenção pode tornar-se evidente para aqueles
habilitados nesta técnica e o escopo desta invenção deve ser determinado
pelas reivindicações anexas e seus equivalentes.

TABELA 1

SEQ		
ID NO	Designação	Sequência Informação
5	1	ACP1 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICAGGAGTGG-3'
	2	ACP2 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGCGACGATS-3'
	3	ACP3 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACS-3'
	4	ACP4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGATGCCCGW-3'
	5	ACP5 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCS-3'
10	6	ACP6 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCTCCCGGTS-3'
	7	ACP7 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGTGGCGGS-3'
	8	ACP8 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCGATGCS-3'
	9	ACP9 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCTGCGGGTW-3'
	10	JYC2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGA-3'
15	11	JYC3 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3'
	12	JYC4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3'
	13	ACP10 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3'
	14	ACP11 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACG-3'
	15	ACP12 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCC-3'
20	16	ACP13 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCG-3'
	17	ACP14 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCGATGCC-3'
	18	ACP15 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCGATGCG-3'
	19	CRP2I0 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATGCCATCGACC-3'
	20	ACP16 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIGCCATCGACC-3'
25	21	ACP17 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3'
	22	ACP18 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3'
	23	ACP19 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIIIGCCATCGACC-3'
	24	dT-JYC3 5'-CACAGAAGTATGCCAAGCGACTCGAGTTTTTTTTTTTTTTT-3'

TABELA 1 - continuação

25	dT-JYC2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'
26	JYC2-T13C	5'-CTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTC-3'
27	JYC2-T13G	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTG-3'
28	JYC2-T13A	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTA-3'
5	29	dT ₁₀ -JYC2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTT-3'
	30	dT ₁₀ -ACP1 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTT-3'
	31	DEG 2 GCCATCGACCCGTTTCTCTAGCCCCATCTTCATGTGT TTTAATGAGATGATATTAATTCATTACATTCATGGAT AATATGTCCCTGAGTACATTCTAATCTAGATTAACT
10		TCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	32	DEG 5 AGGCGATGCGGGCTGTACTCTGGGTGGCTGCCACAGT CTCATGAGAAACCAAGGGCAAAGGACCAAGGAAAAG GGTCTCAGGCCCTAAAGCAGTGGCTTTCAACCATCCTAAT GTTGTGACCTTTTAATACAGTTCCTCATGTTGTG
15		TGACCCCCCAACCATAAAATGATTTTTGTTTCTACTTC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	33	SMART IV 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACG GCCr(GGG)-3'
	34	Iniciador 5' PCR 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
20	35	CDS III/3' 5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-(dT) ₃₀ VN-3'
	36	rG3-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGr(GGG)-3'
	37	rG2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGr(GG)d(G)-3'
	38	dG3-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGd(GGG)-3'
		TABELA 1-continuação
25	39	Oligo dT ₁₈ -ACP 5'- GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
	40	PLP-C α 5'-GAGAGGATAGTTTCAGGGAC-3'
	41	JunB3 5'-CTCCGTGGTACGCCTGCTTTCTC-3'
	42	β -actina 1 5'-TCGTCACCCACATAGGAGTC-3'

43	β -actina 2	5'-CTAAGAGGAGGATGGTCGC-3'
44	EsxN7	5'-GCCGGTTGCAGAGCACC-3'
45	EsxC6	5'-GAACCATGTTTCTGAATGCC-3'
46	EsxN7-ACP	5'-
5		GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCGGTTGCAGAGCACC-3'
47	EsxC6-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGAACCAT GTTTCTGAATGCC-3'
48	EsxN1	5'-GAATCTGAAACAACCTTTCTA-3'
49	EsxC2	5'-GATGCATGGGACGAGGCACC-3'
10	50	EsxN1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGAATCT GAAACAACCTTTCTA-3'
51	EsxN3	5'-CGCCGCACCCCTGCCCGCA-3'
52	EsxC5	5'-GATGCATGGGACGAGGCA-3'
53	EsxN3-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICGCCGC
15		ACCCCTGCCCGCA-3'
54	Oligo-dT ₁₅	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'
55	EsxC2-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCA TGGGACGAGGCACC-3'
56	EsxC5-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCA
20		TGGGACGAGGCA-3'
57	OligoVdT ₁₅ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTT TTTTTTTTTV-3'
TABELA 1 - continuação		
58	dN ₆ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIINNNNNN-3'
25	59	rG1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(G)d(GG)-3'
60	JYC5	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGAT-3'
61	JYC5-T ₁₅ -ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTT TTTTTTTTT-3'
62	JYC5-T ₁₅ V-ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTTT

TTTTTTTTV-3'

63 JYC5-T₁₅VN-ACP 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATTTTTTTTT

TTTTTTTTTVN-3'

64 ACP101 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATTTTCCGGAGGATC-3'

5 65 ACP109 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATTTTCTGCAGGACG-3'

66 ACP116 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATTTTCCGAGCATCC-3'

67 ELAM1N1 5'-TTGCACACTGTTGATTCTAA-3'

68 ELAM1C1 5'-TTATTGATGGTCTCTACACA-3'

69 ELAM1N2 5'-CCACTGAGTCCAACATTC-3'

10 70 ELAM1C2 5'-CTGAAACACTTCCCACAC-3'

71 P53N1 5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3'

72 P53C1 5'-ATTGAAGTCTCATGGAAGCC-3'

73 P53N2 5'-TGCTTGCCACAGGTCTC-3'

74 P53C2 5'-GCAGTGCTAGGAAAGAGG-3'

15 75 ELAM1N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATTTTGCACACTGT
TGATTCTAA-3'

76 ELAM1C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGATTTTATTGATGGT
CTCTACACA-3'

TABELA 1 - continuação

20 77 ELAM1N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATTTTCCACTGAGTCC
AACATTC-3'

78 ELAM1C2-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGATTTTCTGAAACACTT
CCCACAC-3'

25 79 P53N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATTTTCTCTGACTGC
TCTTTTCAC-3'

80 P53C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGATTTTATTGAAGTCTC
ATGGAAGCC-3'

81 P53N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATTTTGTCTTGCCACA
GGTCTC-3'

	82	P53C2-ACP	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIIGCAGTGCTAGG AAAGAGG-3'
	83	JYC2-HD1	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTGTG GTT-3'
5	84	JYC2-HD2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTCTG GTT-3'
	85	JYC2-HD3	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTTTG GTT-3'
	86	P53N	5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3'
10	87	P53C-ACP	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTC ATGGAAGCC-3'
	88	P53N1A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCCCGCGTGG-3'
	89	P53N1B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCCCCGCGTGG-3'
	90	P53N2A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCCCGCGTG-3'
15	91	P53N2B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCCCCGTG-3'
	TABELA 1 - continuação		
	92	P53N3A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCCCGCGT-3'
	93	P53N3B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTCCCCCGT-3'
	94	P53N4A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCCGCG-3'
20	95	P53N4B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCCCG-3'
	96	P53N5A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCCG-3'
	97	P53N5B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC-3'
	98	703N	5'-ATTCTGATGGTGTGGATTGTG-3'
	99	SM703C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIACCCTGGAGTAG ACGAAGA-3'
25	100	SM703-A	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGTACAGGGC-3'
	101	SM703-B	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGTACCGGGC-3'
	102	028N	5'-CCTTCTGTGCTTGATGCTTTT-3'
	103	SM028C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICAGGAAGGATGA

GCATTTAG-3'

104 SM028-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCAAACCAA-3'

105 SM028-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITCCAACCCAA-3'

106 695N 5'-AGAAAAACCAGAGGCAGCTT-3'

5 107 SM695C 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIAGCACAAACCAA
AGACACAGT-3'

108 SM695-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIII CCATTTTAGG-3'

109 SM695-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIII CCATTGTAGG-3'

110 679N 5'-CTAGCTGCAAGTGACATCTCT-3'

10 111 SM679C 5'-TCACAGAGTATCCAAGCGIIIIITCAGTAAGAAG
CCAGGAGAG-3'

112 SM679-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAGAACTTT-3'

TABELA 1 - continuação

113 SM679-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAGACCTTT-3'

15 114 832N 5'-TTTTGGGTGGAGGCTAACAT-3'

115 SM832C 5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIAACGATGCAG
ACACCACCA-3'

116 SM832-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGGTAAA-3'

117 SM832-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGATAAA-3'

20 118 880N 5'-CTTCCACCAATACTCTTTTCC-3'

119 SM880C 5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIIGCATAACACACA
AGAGGCAGA-3'

120 SM880-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAGCCATAA-3'

121 SM880-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAGCTATA

25 S = G ou C

W = A ou T

V = A, G ou C

N = A, G, C ou T

I é desoxiinosina

r é ribose

d é desoxirribose

TABELA 2

Fragmentos de cDNA Diferencialmente Expressos Clonados pelo ACP da Presente Invenção

5	Nomenclatura	Identidade	Homologia
	DEG 1	Tropomiosina 2 (beta)	Camundongo 92 %
	DEG 2	Novo	Novo
	DEG 3	Proteína Hipotética (gene Tes)	Camundongo 99 %
	DEG 4	Protease-6	Camundongo 92 %
10	DEG 5	Novo	Novo
	DEG 6	Citocromo c oxidase, subunidade Vb	Camundongo 99 %
	DEG 7	Hidroxilacil-Coenzima A desidrogense (Hadh)	Camundongo 98 %
	DEG 8	Troponina T2, cardíaca (Tnnt2)	Camundongo 94 %
	DEG 9	Proteína do motivo de ligação de RNA, cromossoma X	
15		Camundongo 96 %	
	DEG 10	Peroxiredoxina 6 (Prdx6)	Camundongo 89 %
	DEG 11	cDNA de embrião de 11 dias ou 13 dias	Camundongo 98 %

Referências

20 Anônimo (1992) Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. A multicenter study. JAMA 267, 2609 a 2615.

25 Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M. (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). Nucleic Acids Res. 21, 4272 a 4280.

Bauer, D., Warthoe, P., Rohde, M., Struss, M. (1994) PCR Methods & App: Manual Supplement., pp. S97 a S108. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Carninci, P., Westover, A., Nishiyama, Y., Ohsumi, T., Itoh,

M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y. (1997) High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated cap trapper. *DNA Res.* 4, 61 a 66.

Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N.,
5 Caskey, C. T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141 a 11156.

Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J., Siebert, P. (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of
10 total RNA by SmartTM PCR. In Siebert, P. e Larrick, J. (eds), *Gene Cloning and analysis by RT-PCR*. Biotechniques Books, Natick, MA, pp. 305 a 319.

Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Siebert, P. Methods and compositions for generating full-length cDNA having arbitrary nucleotide sequence at the 3'-end. U.S. Pat. N° 5.962.271. Data da Patente: 5 de outubro
15 de 1999.

Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Siebert, P. Methods and compositions for full-length cDNA cloning using a template-switching oligonucleotide. Patente U.S. N° 5.962.272. Data da Patente: 5 de outubro de 1999.

20 Chun, J. Y., Han, Y. J., Ahn, K. Y. (1999) Pso homeobox gene is X-linked and specifically expressed in trophoblast cells o mouse placenta. *Dev. Dyn.* 216, 257 a 266

Clark, J. M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic
25 Acids Res.* 16, 9677 a 9686.

Combates, N., Pardinas, J. R., Parimoo, S., Prouty, S. M., Stenn, K. S. Technique for differential display. Patente U.S. N° 6.045.998. Data da Patente: 4 de abril de 2000.

D'Aquila, R. T., Bechtel, L. J., Videler, J. A., Eron, J. J.,

Gorczyca, P., Kaplan, J. C. (1991) Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.*, 19, 3749.

Diachenko, L. B., Ledesma, J., Chenchik, A. A., Siebert, P. D. (1996) Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 824 a 828.

Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J, Dveksler, G. S. (1995) General concepts for PCR primer design. *PCR primer: a Laboratory Manual*, pp. 133 a 142, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. NY.

Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., Mattick, J. S. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 19, 4008.

Franz, O., Bruchhaus, I., Roeder, T. (1999) Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res.*, 27, 1 a 3.

Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998 a 9002.

Fromont-Racine, M., Bertrand, E., Pictet, R., Grange, T. (1993) A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1683 a 1684.

Gottschlich, S., Goeoegh, t., Folz, B. J., Lippert, B. M., Werner, J. A. (1997) Optimized differential display and reamplification parameters for silver staining. *Res. Commun. Mol. Path. Pharm.* 97, 237 a 240.

Gromova, I., Gromov, P., Celis, J. E. (1999) Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional

cell carcinomas sing an improved differential display procedure. Electrophoresis 20, 241 a 248.

Guegler, K., Tan, R., Rose, M. J. Methods and compositions for producing 5' enriched cDNA libraries. Patente U.S. Nº 6.083.727. Data da Patente: 4 de julho de 2000.

Guegler, K., Tan, R., Rose, M. J. Methods and compositions for producing full length cDNA libraries. Patente U.S. Nº 6.326.175. Data da Patente: 4 de dezembro de 2001.

Hogan, B., Bedding, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Hwang, I. T., Lee, Y. H., Moon, B. C., Ahn, K. Y., Lee, S. W., Chun, J. Y. (2000) Identification and characterization of a new member of the placental prolactin-like protein-C (PLP-C) subfamily, PLP-C β . Endocrinology 141, 3343 a 3352.

Hayashizaki, Y. Method for forming full length cDNA libraries. Patente U.S. Nº 6.143.528. Data da Patente: 7 de novembro de 2000.

Henegariu, O., Hirschmann, P., Killian, K., Kirch, S., Lengauer, C., Maiwald, R., Mielke, K., Vogt, P. (1994) Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. Andrologia, 26, 97 a 106.

Ito, T., Kito, K., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H., Sakaki, Y. (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. FEBS Lett. 351, 231 a 236.

Jefferies, D., Botman, M. F., Lester, D., Whitehead, C. C., Thorp, B. H. (1998) Cloning differentially regulate genes from chondrocytes using agarose gel differential display. Biochim. Biophys. Acta 1396, 237 a 241.

Kociok, N., Unfried, K., Eser, P., Krott, R., Schraermeyer, U., Heimann, K. (1998) The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display. *Mol. Biotechnol.* 9, 25 a 33.

5 Korn, B., Sedlacek, Z., Manca, A., Kioschis, P., Konecki, D., Lehrach, H., Poutska, A. (1992) A strategy for the selection of transcribed sequences in the Xq28 region. *Hum. Mol. Genet.* 1, 235 a 242.

Kulpa, D., Topping, R., Telesnitski, A. (1997) Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors. *EMBO J.* 16, 856 a 865.

Landegren, U., Nilsson, M., Kwok, P. Y. (1998) reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8, 769 a 776.

15 Liang, P., Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967 a 971.

Ledbetter, S. A., Nelson, D. L., Warren, S. T., Ledbetter, D. H. (1990) Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction. *Genomics* 6, 475 a 481.

Loakes, D., Brown, D. M. (1994) 5-Nitroindole as an universal base analog. *Nucleic Acids Res.* 22, 4039 a 4043.

Loakes, D. The applications of universal DNA base analogues. *Nucleic Acids Res.* 29, 2437 a 2447.

25 Luehrsen, K. R., Marr, L. L., Van Der Knaap, E., Cumberland, S. (1997) Analysis of differential display RT-PCR products using fluorescent primers and genescan software. *BioTechniques* 22, 168 a 174.

Matz, M. V., Lukyanov, S. A. (1998) Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.* 26, 5537 a 5543.

Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L., Chenchik., A. (1999) Amplification of cDNA
5 ends based on templates witching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* 27, 1558 a 1560.

McClelland, M., Chada, K., Welsh, J., Ralph, D. (1993). Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA applied to mapping differentially expressed genes. In *Symposium on DNA fingerprinting: State of the science*, Novembro, 1992 (ed. S. D. Pena *et al.*). Birkhauser Verlag, Basel, Suíça.
10

McPherson, M. J., Moller, S. G. (2000) PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, NY.

Meunier, J. R., Grimont, P.A.D. (1993) Factors affecting
15 reproducibility of amplified polymorphic DNA fingerprints. *Res. Microbiol.* 144, 373 a 379.

Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335 a 350.

20 Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K., Scharf, S. J. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. Patente U.S. Nº 4.683.195. Data da Patente: 28 de julho de 1987.

Mullis, K. B. Process for amplifying nucleic acid sequences. Patente U.S. Nº 4.683.202. Data da Patente: 28 de julho de 1987.

25 Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K., Scharf, S. J. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. Patente U.S. Nº 4.800.159. Data da Patente: 24 de Janeiro de 1989.

Mutirangura, A., Greenberg, F., Butler, M. G., Malcolm, S.,

Nicholls, R. D., Chakravarti, A., Ledbetter, D. H. (1993) Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 143 a 151.

5 Nichols, R., Andrews, P. C., Ahang, P., Bergstrom, D. E. (1994) A universal nucleoside for use at ambiguous sites in DNA primers. *Nature* 369, 492 a 493.

 Ohtsuka, E., Matsuka, S., Ikehara M., Takahashi, Y., Matsubara K. (1985) An alternative approach to deoxyoligonucleotides as
10 hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *J. Biol. Chem.* 260, 2605 a 2608.

 Ralph, D., Welsh, J., McClelland, M. (1993) RNA fingerprinting using arbitrary primed PCR identifies differentially regulated RNAs in Mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by TGF- β . *Proc. Natl.*
15 *Acad. Sci.* 90, 10710 a 10714.

 Rompf, R., Kahl, G. (1997) mRNA differential display in agarose gels. *BioTechniques* 23, 28 a 32.

 Roses, A. D. (2000) Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature*, 405, 857 a 865.

20 Rosok, O., Odeberg, J., Rode, M., Stokke, T., Funderud, S., Smeland, E. (1996) solid-phase method for differentially display of genes expressed in hematopoietic stem cells. *BioTechniques* 21, 114 a 121.

 Ruano, G., Fenton, W., Kidd, K. K. (1989) Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster PCR". *Nucleic Acids*
25 *Res.* 17, 5407.

 Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350 a 1354.

Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S. (1989) Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 4863 a 4867.

5 Schaefer, B. C. (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* 227, 255 a 273.

 Schmidt W. M., Mueller, M. W. (1999) CapSelect: A highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in
10 PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 27, e31.

 Schramm, G., Bruchhaus, I., Roeder, T. (2000) A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Res.* 28, e96.

 Shuber, A. P., Skoletsky, J., Stern, R., Handelin, B. L. (1993) Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex
15 mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 153 a 158.

 Smith, N. R., Aldersley, M., Li, A., High, A. S., Moynihan, T. P., Markham, A. F., Robinson. P. A. (1997) Automated differential display using a fluorescently labeled universal primer. *BioTechniques* 23, 274 a 279.

 Sompayrac, L., Jane, S., Burn, T. C., Tene, D. G., Danna, K. J.
20 (1995) Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res.* 23, 4738 a 4739.

 Stone, B., Wharton, W. (1994) Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially-expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family. *Nucleic Acids Res.* 22, 2612 a 2618.

25 Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A., Sugano, S. (1997) Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200, 149 a 156.

 Tagle, D. A., Swaroop, M., Lovett, M., Collins, F. S. (1993) Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large genomic

segments. *Nature* 361. 751 a 753.

Villeponteau, B., Feng, J., Funk, W., Linskens, M. H. K.
Method and kit for enhanced differential display. Patente U.S. Nº 5.580.726.
Data da Patente: 3 de dezembro de 1996.

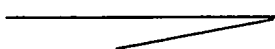
5 Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes
using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213 a 7218.

Welsh, J., McClelland, M. (1991) Genomic fingerprinting
using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of
primers. *Nucleic Acids Res.* 19, 5275 a 5279.

10 Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalki, J. A.,
Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are
useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531 a 6535.

 Zimmermann, K., Schogl, D., Plaimauer, B., Mannhalter, J.
W. (1996) Quantitative multiplex competitive PCR of HIV-1 DNA in a single
15 reaction tube. *BioTechniques* 21, 480 a 484.

Zou, S., Stanfield, C., Bridge, J. (1998) Identification of new
influenza B virus variants by multiplex reverse transcription-PCR and the
heteroduplex mobility assay. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1544 a 1548.



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

Código de Controle

Campo 1



A5D6514A0170CBA1

Campo 2



D1B249637C04D889

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 082993e003.txt
- Data de Geração do Código: 30-04-2014
- Hora de Geração do Código: 16:51:11
- Código de Controle:
 - Campo 1: A5D6514A0170CBA1
 - Campo 2: D1B249637C04D889

REIVINDICAÇÕES

1. Iniciador de controle de anelamento para melhorar a especificidade de anelamento na amplificação de ácido nucléico, caracterizado pelo fato de que compreende: (a) uma porção de extremidade 3' tendo uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a um sítio em um ácido nucléico padrão para hibridizar com ela; (b) uma porção de extremidade 5' tendo uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária; e (c) uma porção reguladora posicionada entre a dita porção de extremidade 3' e a dita porção de extremidade 5' que compreende pelo menos duas bases universais ou bases não discriminatórias análogas, por meio da qual a dita porção reguladora é capaz de regular uma porção de anelamento do dito iniciador em associação com a temperatura de anelamento, em que os ditos iniciadores de controle de anelamento tem uma fórmula geral de $5' - X_p - Y_q - Z_r - 3'$, em que X_p representa a dita porção de extremidade 5' tendo a dita seqüência de nucleotídeo arbitrária pré selecionada substancialmente não complementar a nenhum sítio no ácido nucleico padrão; Y_q representa a dita porção reguladora que compreende pelo menos duas bases universais ou bases não discriminatórias análogas; Z_r representa a dita porção de extremidade 3' tendo uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a um sítio no ácido nucléico padrão para hibridizar com ela; em que p, q e r representam o número de nucleotídeos; e em que X, Y e Z são desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos.

2. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita seqüência de nucleotídeo arbitrária pré selecionada da dita porção de extremidade 5' é substancialmente não complementar a nenhum sítio no dito ácido nucléico padrão.

3. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a

reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito ácido nucléico padrão é gDNA, cDNA ou mRNA.

4. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que os ditos gDNA ou cDNA são DNA de filamento único ou duplo.

5. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita amplificação de ácido nucléico é realizada sob uma primeira e uma segunda temperaturas de anelamento.

6. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita primeira temperatura de anelamento na dita amplificação de ácido nucléico é idêntica ou mais baixa do que a dita segunda temperatura de anelamento.

7. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita porção de extremidade 3' está envolvida no anelamento na dita primeira temperatura de anelamento e a dita porção de extremidade 5' serve como um sítio de iniciação na dita segunda temperatura de anelamento.

8. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita porção reguladora é capaz de restringir a dita porção de anelamento do dito iniciador à dita porção de extremidade 3' na dita primeira temperatura de anelamento.

9. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita primeira temperatura de anelamento está entre cerca de 30° C e 68° C.

10. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita segunda temperatura de anelamento está entre cerca de 50° C e 72° C.

11. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita base universal ou a dita base não discriminatória análoga são capazes de formar pares de base com cada uma das bases de DNA/RNA naturais com pouca discriminação entre as ditas bases de DNA/RNA naturais.

12. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita base universal ou a dita base não discriminatória análoga são selecionadas do grupo que consiste de desoxiinosina, inosina, 7-desaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, desóxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3-nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, 1-(2'-desóxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desóxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe 5-nitroindol, 2'-F 5-nitroindol, desóxi 4-nitrobenzimidazol, 4-nitrobenzimidazol, desóxi 4-amino-benzimidazol, 4-aminobenzimidazol, desóxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobenzimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobenzimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobenzimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4-nitrobenzimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietil inosina, 2'-O-metoxietil nebularina, 2'-O-metoxietil 5-nitroindol, 2'-O-metoxietil 4-nitro-benzimidazol, 2'-O-metoxietil 3-nitropirrol e combinações destas.

13. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita base universal ou a dita base não discriminatória análoga é desoxiinosina, 1-(2'-desóxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ou 5-nitroindol.

14. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita porção reguladora

compreende nucleotídeos contíguos tendo a base universal ou a base não discriminatória análoga.

15 15. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os ditos desoxirribonucleotídeos são dNMPs que ocorrem naturalmente, nucleotídeos modificados e nucleotídeos não naturais.

16. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que p representa um número inteiro de 15 a 60.

10 17. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que q é pelo menos 3.

18. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que q é pelo menos 4.

15 19. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que q representa um número inteiro de 2 a 15.

20. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que r representa um número inteiro de 6 a 50.

20 21. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que p é um número inteiro de 15 a 60, q é um número inteiro de 2 a 15 e r é um número inteiro de 6 a 30.

25 22. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que X_p compreende uma sequência iniciadora universal.

23. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que X_p inclui uma sequência ou sequências reconhecidas por uma endonuclease de restrição ou endonucleases

de restrição.

24. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que X_p compreende pelo menos um nucleotídeo com um rótulo para a detecção ou isolamento.

5 25. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Z_r é uma sequência de nucleotídeo que hibridiza com a cauda de poliadenosina (poliA) de um mRNA.

26. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que Z_r compreende pelo menos 10 nucleotídeos contíguos de desoxitimidina.

27. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que Z_r compreende pelo menos 10 nucleotídeos contíguos de desoxitimidina tendo 3'-V na sua extremidade 3'; em que V é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxicitidina e desoxiguanosina.

28. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que Z_r compreende pelo menos 10 nucleotídeos contíguos de desoxitimidina tendo 3'-NV na sua extremidade 3'; em que V é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxicitidina e desoxiguanosina e N é um selecionado do grupo que consiste de desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxicitidina e desoxiguanosina.

29. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Z_r é uma sequência de nucleotídeo substancialmente complementar a uma sequência alvo no ácido nucléico padrão.

30. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Z_r é uma sequência aleatória

de nucleotídeo.

31. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Z_r é uma sequência de nucleotídeo substancialmente complementar a uma sequência de consenso encontrada em uma família de gene.

32. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Z_r é uma sequência degenerada de nucleotídeo selecionada de uma pluralidade de combinações de nucleotídeos que codificam uma sequência de aminoácido predeterminada.

33. Iniciador de controle de anelamento de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que Z_r compreende pelo menos um ribonucleotídeo.

34. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o iniciador ou o conjunto de iniciadores como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 33.

35. Kit de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o kit ainda compreende um iniciador ou um par de iniciadores tendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde à dita porção de extremidade 5' do dito iniciador de controle de anelamento como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 33.

36. Método para amplificar uma sequência de ácido nucléico de um DNA ou uma mistura de ácidos nucléicos, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreendem:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita sequência de ácido nucléico em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o par de iniciadores como definidos qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 cada um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da dita sequência de ácido nucléico para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela à dita região da dita sequência de ácido nucléico, por meio das quais o produto de amplificação da dita sequência de ácido nucléico é gerado; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito produto de amplificação gerado a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa (a) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do dito produto de amplificação, respectivamente, por meio das quais o dito produto de amplificação é re-amplificado.

38. Método para amplificar seletivamente uma sequência de ácido nucléico alvo de um DNA ou uma mistura de ácidos nucléicos, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado

pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita sequência de ácido nucléico alvo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o par de iniciadores de qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 cada um tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da dita sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela à sua sequência de nucleotídeo alvo, por meio das quais o produto de amplificação da dita sequência de nucleotídeo alvo é gerado; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito produto de amplificação gerado a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa (a) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do dito produto de amplificação, respectivamente, por meio das quais o dito produto de amplificação é re-amplificado.

40. Método para amplificar seletivamente uma sequência de ácido nucléico alvo a partir de um mRNA, caracterizado pelo fato de que compreende transcrever de modo reverso o dito mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador que tem pelo menos a mesma estrutura como o iniciador como definido em

qualquer uma das reivindicações 1 a 24.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

5 (a) contactar o dito mRNA com um iniciador de oligonucleotídeo dT que é hibridizado à cauda poliA do dito mRNA sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

10 (b) transcrever de modo reverso o dito mRNA ao qual o dito iniciador de oligonucleotídeo dT hibridiza para produzir um primeiro filamento de DNA que é complementar ao dito mRNA ao qual o dito iniciador de oligonucleotídeo dT hibridiza;

15 (c) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita seqüência de ácido nucléico alvo a partir do dito primeiro filamento de DNA obtido a partir da etapa (b) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o par de iniciadores como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 cada um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar
20 a uma região da dita seqüência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela à sua seqüência de nucleotídeo alvo, por meio das quais o produto de amplificação da dita seqüência de nucleotídeo alvo é gerado; e

25 (d) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito produto de amplificação gerado a partir da etapa (c) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa

(c) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos iniciadores usados na etapa (c), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do dito produto de amplificação, respectivamente, por meio das quais o dito produto de amplificação é re-amplificado.

42. Método para detectar a complementaridade de DNA ao mRNA diferencialmente expresso em duas ou mais amostras de ácido nucléico, caracterizado pelo fato de que compreende transcrever de modo reverso o dito mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

(a) fornecer uma primeira amostra de ácidos nucléicos que representem uma primeira população de transcritos de mRNA e uma segunda amostra de ácidos nucléicos que representam uma segunda população de transcritos de mRNA;

(b) separadamente contactar cada uma da dita primeira amostra de ácido nucléico e da dita segunda amostra de ácido nucléico com um primeiro iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, em que a porção de extremidade 3' do dito primeiro iniciador compreende uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a um primeiro sítio no dito mRNA diferencialmente expresso para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

(c) transcrever de modo reverso o dito mRNA diferencialmente expresso ao qual o dito primeiro iniciador hibridiza para produzir uma primeira população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares ao dito mRNA diferencialmente expresso na dita primeira amostra de ácido nucléico à qual o dito primeiro iniciador hibridiza e uma
5 segunda população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares ao dito mRNA diferencialmente expresso na dita segunda amostra de ácido nucléico à qual o dito primeiro iniciador hibridiza;

(d) purificar e quantificar cada um das ditas primeira e
10 segunda populações de primeiros filamentos de cDNA;

(e) realizar uma amplificação de primeiro estágio de cada uma das ditas primeira e segunda populações dos primeiros filamentos de DNA obtidos a partir da etapa (d) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e
15 desnaturar o iniciador, usando um segundo iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a um segundo sítio nas ditas primeira e segunda populações de primeiros filamentos de cDNA, sob condições em que o dito segundo iniciador anela ao
20 dito segundo sítio em cada população dos ditos primeiros filamentos de cDNA, por meio das quais a primeira e segunda populações de segundos filamentos de DNA são geradas;

(f) realizar uma amplificação de segundo estágio de cada segundo filamento de DNA gerado a partir da etapa (e) a uma segunda
25 temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (b) e (e), respectivamente ou um par de iniciadores

cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (b) e (e), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' de cada segundo filamento de DNA, respectivamente, por meio da qual os produtos de amplificação dos ditos segundos filamentos de cDNA são gerados, e

(g) comparar a presença ou o nível de produtos de amplificação individuais nas ditas primeira e segunda populações de produtos de amplificação obtidos a partir da etapa (f).

44. Método para amplificar rapidamente um fragmento de cDNA alvo que compreende uma região de cDNA que corresponde à região da extremidade 3' de um mRNA, caracterizado pelo fato de que compreende transcrever de modo reverso o dito mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

45. Método de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

(a) contactar mRNAs com um primeiro iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, em que a porção de extremidade 3' do dito iniciador compreende uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às caudas poliA dos ditos mRNAs para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

(b) transcrever de modo reverso os ditos mRNAs aos quais o dito primeiro iniciador hibridiza para produzir uma população de primeiros

filamentos de cDNA que são complementares aos ditos mRNAs aos quais o dito primeiro iniciador hibridiza;

(c) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos ditos primeiros filamentos de cDNA em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um segundo iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência de nucleotídeo hibridizadora específica de gene substancialmente complementar a um sítio em um dos ditos primeiros filamentos de cDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o dito segundo iniciador anela a um sítio específico de gene em um dos ditos primeiros filamentos de cDNA, por meio das quais uma síntese do segundo cDNA de filamento específico de gene é gerado; e

(d) realizar uma amplificação de segundo estágio da dita síntese do segundo filamento de cDNA específico de gene gerado a partir da etapa (c) em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (a) e (c), respectivamente, ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma seqüência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (a) e (c), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anele às seqüências de extremidades 3' e 5' de uma síntese do segundo filamento de cDNA específico de gene, respectivamente, por meio das quais um produto de amplificação de um filamento de cDNA específico de gene é gerado.

46. Método para amplificar rapidamente um fragmento de cDNA alvo, que compreende uma região de cDNA que corresponde à região

de extremidade 5' de um mRNA, caracterizado pelo fato de que compreende transcrever de modo reverso o dito mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

(a) contactar mRNAs com um iniciador de oligonucleotídeo dT ou iniciador aleatório como um iniciador de síntese de cDNA sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucleico enzimática direcionada pelo padrão ocorra, em que o dito iniciador de síntese de cDNA compreende uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a uma região de um mRNA para hibridizar com ela;

(b) transcrever de modo reverso os ditos mRNAs, usando uma transcriptase reversa, à qual o dito iniciador de síntese de cDNA hibridiza para produzir uma população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares aos ditos mRNAs aos quais o dito iniciador de síntese de cDNA hibridiza, por meio das quais os intermediários de mRNA-cDNA são gerados;

(c) permitir que resíduos de citosina sejam formados em terminação nas extremidades 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA na forma dos ditos intermediários de mRNA-cDNA pela reação de transferase terminal de transcriptase reversa;

(d) contactar as caudas de citosina nas extremidades 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA gerados a partir da etapa (c) com um oligonucleotídeo que compreende uma porção de extremidade 3' e uma

porção de extremidade 5' separadas por um grupo de base universal ou base não discriminatória análoga, em que a porção de extremidade 3' compreende pelo menos três resíduos de guanina na sua extremidade 3' para hibridizar com as ditas caudas de citosina nas extremidades 3' dos ditos primeiros
5 filamentos de cDNA e a porção de extremidade 5' compreende uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária, sob condições em que a dita porção de extremidade 3' do dito oligonucleotídeo é hibridizada às ditas caudas de citosina;

(e) estender as extremidades 3' formadas em terminação dos
10 ditos primeiros filamentos de cDNA para gerar uma sequência adicional complementar ao dito oligonucleotídeo usando transcriptase reversa, em que o dito oligonucleotídeo serve como um padrão na reação de extensão, por meio da qual os primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo são prolongados;

15 (f) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos ditos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo obtidos a partir da etapa (e) em uma primeira temperatura de anelamento, que compreende as etapas de:

(i) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e
20 desnaturar o iniciador usando um primeiro iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeo substancialmente complementar às sequências da extremidade 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, sob condições em que o dito primeiro iniciador anela às extremidades 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA de comprimento
25 completo, por meio das quais segundos filamentos de cDNA de comprimento completo são gerados;

(ii) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um segundo iniciador como definido em

qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora específica de gene substancialmente complementar a uma região em um dos ditos segundos filamentos de cDNA de comprimento completo para hibridizar com ela, sob condições em que o dito segundo iniciador anela a um sítio específico de gene em um dos ditos segundos filamentos de cDNA de comprimento completo, por meio das quais um filamento de cDNA específico de gene é gerado; e

(g) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito filamento de cDNA específico de gene em uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (f)-(i) e (f)-(ii), respectivamente, ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (f)-(i) e (f)-(ii), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às sequências de extremidades 3' e 5' de um filamento de cDNA específico de gene, respectivamente, por meio das quais um produto de amplificação de um filamento de cDNA específico de gene é gerado.

48. Método para amplificar uma população de cDNAs de filamento duplo de comprimento completo complementar aos mRNAs, caracterizado pelo fato de que compreende transcrever de modo reverso o dito mRNA e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

49. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende:

(a) contactar os ditos mRNAs com um primeiro iniciador

como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, em que a porção de extremidade 3' do dito primeiro iniciador tem uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar às caudas poliA dos ditos mRNAs para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucleico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

(b) transcrever de modo reverso os ditos mRNAs, usando uma transcriptase reversa, à qual o dito primeiro iniciador hibridiza para produzir a dita população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares aos ditos mRNAs aos quais o dito iniciador hibridiza, por meio da qual intermediários de mRNA-cDNA são gerados;

(c) permitir que resíduos de citosina sejam formados em terminação nas extremidades 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA na forma dos ditos intermediários de mRNA-cDNA pela reação de transferase terminal de transcriptase reversa;

(d) contactar as caudas de citosina nas extremidades 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA gerados a partir da etapa (c) com um oligonucleotídeo que compreende uma porção de extremidade 3' e uma porção de extremidade 5' separadas por um grupo de base universal ou base não discriminatória análoga, em que a porção de extremidade 3' compreende pelo menos três resíduos de guanina na sua extremidade 3' para hibridizar com as ditas caudas de citosina nas extremidades 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA e a porção de extremidade 5' compreende uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária, sob condições em que a dita porção de extremidade 3' do dito oligonucleotídeo é hibridizada às ditas caudas de citosina;

(e) estender as extremidades 3' formadas em terminação dos ditos primeiros filamentos de cDNA para gerar uma sequência adicional

complementar ao dito oligonucleotídeo usando transcriptase reversa, em que o dito oligonucleotídeo serve como um padrão na reação de extensão, por meio da qual os primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo são prolongados; e

- 5 (f) realizar uma amplificação dos ditos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo gerados a partir da etapa (e) que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde ao mesmo primeiro iniciador e
- 10 oligonucleotídeo como usados nas etapas (a) e (d), respectivamente, ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do dito primeiro iniciador e oligonucleotídeo usados nas etapas (a) e (d), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às sequências de extremidades 3' e 5' dos ditos
- 15 primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, respectivamente, por meio das quais os produtos de amplificação de filamentos de cDNA de comprimento completo complementares aos ditos mRNAs são gerados.

50. Método para amplificar cDNAs de filamento duplo enriquecidos em 5' complementares aos mRNAs, caracterizado pelo fato de

20 que compreende transcrever de modo reverso os ditos mRNAs e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado

25 pelo fato de que o dito método compreende:

(a) contactar os ditos mRNAs com um primeiro iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática

direcionada pelo padrão ocorra, em que a porção de extremidade 3' do dito primeiro iniciador tem pelo menos seis seqüências de nucleotídeo aleatórias;

(b) realizar as etapas (b)-(e) de acordo com a reivindicação 49, por meio das quais primeiros filamentos de cDNA enriquecidos em 5' são
5 prolongados;

(c) realizar uma amplificação dos ditos primeiros filamentos de cDNA enriquecidos em 5' gerados a partir da etapa (b) que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores cada um compreendendo uma
10 seqüência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do dito iniciador e oligonucleotídeo usados nas etapas (a) e (b), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anele às seqüências de extremidades 3' e 5' dos ditos primeiros filamentos de cDNA enriquecidos em 5', respectivamente, por meio das quais os produtos de amplificação de
15 filamentos de cDNA enriquecido em 5' são gerados.

52. Método para amplificar mais do que uma seqüência de nucleotídeo alvo simultaneamente usando mais do que um par de iniciadores na mesma reação, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um
20 iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

53. Método de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

25 (a) realizar uma amplificação de primeiro estágio de mais do que uma seqüência de nucleotídeo alvo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os pares de iniciadores

como definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 em que a sua porção de extremidade 3' cada uma de cada par de iniciadores tem uma sequência de nucleotídeo hibridizadora substancialmente complementar a uma região da dita sequência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, sob condições em que cada um dos ditos pares de iniciadores anela à sua sequência de nucleotídeo alvo, por meio das quais os produtos de amplificação de sequências de nucleotídeo alvo são gerados; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio dos ditos produtos de amplificação gerados a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo par de iniciadores como usados na etapa (a) ou par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeos pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos pares de iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada um de cada par de iniciadores anela às sequências de extremidades 3' e 5' dos ditos produtos de amplificação gerados a partir da etapa (a), respectivamente, por meio das quais os ditos produtos de amplificação são re-amplificados na mesma reação.

54. Método para produzir uma impressão digital de DNA de gDNA, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita

impressão digital do DNA, que é um conjunto de segmentos de DNA separados característicos de genoma, a partir do dito gDNA em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o iniciador ou o par de iniciadores como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24, em que cada iniciador tem na sua porção de extremidade 3' uma sequência arbitrária de nucleotídeo substancialmente complementar aos sítios no dito gDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o dito iniciador ou o dito par de iniciadores anela ao dito gDNA, por meio das quais o dito conjunto de segmentos de DNA separados caracterizados como uma impressão digital de DNA é produzido; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito conjunto de segmentos de DNA separados gerado a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo iniciador ou par de iniciadores como usados na etapa (a) ou um iniciador ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do dito iniciador ou par de iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que o dito iniciador ou cada um do dito par de iniciadores anela às sequências de extremidades 3' e 5' do dito conjunto de segmentos de DNA separados gerado a partir da etapa (a), respectivamente, por meio das quais o dito conjunto de segmentos de DNA separados é re-amplificado.

56. Método para produzir uma impressão digital de RNA de uma amostra de mRNA, caracterizado pelo fato de que compreende transcrever de modo reverso e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura

como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 24.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

5 (a) contactar a dita amostra de mRNA com um primeiro iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, em que o dito primeiro iniciador tem uma sequência de nucleotídeos hibridizadora substancialmente complementar às caudas poliA da dita amostra de mRNA para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a
10 síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

 (b) transcrever de modo reverso a dita amostra de mRNA à qual o dito primeiro iniciador hibridiza para produzir uma população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares à dita amostra de
15 mRNA à qual o dito primeiro iniciador hibridiza;

 (c) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita população de primeiros filamentos de cDNA gerada a partir da etapa (b) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando
20 um segundo iniciador ou par de iniciadores como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24, em que cada iniciador tem na sua porção de extremidade 3' uma sequência arbitrária de nucleotídeo substancialmente complementar aos sítios nos ditos primeiros filamentos de cDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o dito iniciador ou par de
25 iniciadores anelam à dita amostra de mRNA, por meio da qual um conjunto de segmentos de cDNA separados caracterizados como uma impressão digital de RNA é produzido; e

 (d) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito

conjunto de segmentos de cDNA separados gerado a partir da etapa (c) a uma segunda temperatura de anelamento que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo iniciador ou par de iniciadores como
5 usados na etapa (c) ou um iniciador ou par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeos que corresponde a cada porção de extremidade 5' do dito iniciador ou par de iniciadores usados na etapa (c), sob condições em que o dito iniciador ou cada um do dito par de iniciadores anela às sequências de extremidades 3' e 5' do dito conjunto de
10 segmentos de cDNA separados gerado a partir da etapa (c), respectivamente, por meio das quais o dito conjunto de segmentos de cDNA separados é re-amplificado.

58. Método para identificar segmentos de homologia conservada em uma família de multigene a partir de uma amostra de mRNA,
15 caracterizado pelo fato de que compreende transcrever de modo reverso e realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

59. Método de acordo com a reivindicação 58, caracterizado
20 pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

(a) contactar a dita amostra de mRNA com um primeiro iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, em que o dito primeiro iniciador tem uma sequência de nucleotídeo hibridizadora
25 substancialmente complementar às caudas poliA da dita amostra de mRNA para hibridizar com ela, sob condições suficientes para que a síntese de ácido desoxirribonucléico enzimática direcionada pelo padrão ocorra;

(b) transcrever de modo reverso a dita amostra de mRNA à

qual o dito primeiro iniciador hibridiza para produzir uma população de primeiros filamentos de cDNA que são complementares à dita amostra de mRNA à qual o dito primeiro iniciador hibridiza;

(c) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita população de primeiros filamentos de cDNA gerada a partir da etapa (b) em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um segundo iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso ou uma sequência degenerada que codifica a sequência de aminoácidos de um segmento de homologia conservada nos ditos primeiros filamentos de cDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o dito segundo iniciador anela à dita sequência de consenso ou sequência degenerada de primeiros filamentos de cDNA, por meio das quais segmentos de cDNA da extremidade 3' tendo a dita sequência de consenso ou sequência degenerada são gerados; e

(d) realizar uma amplificação de segundo estágio dos ditos segmentos de cDNA da extremidade 3' gerados a partir da etapa (c) a uma segunda temperatura de anelamento que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (a) e (c) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (a) e (c), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às sequências de extremidades 3' e 5' dos ditos segmentos de cDNA da extremidade 3', respectivamente, por meio das quais os ditos segmentos de cDNA de homologia conservada da extremidade 3' são amplificados.

60. Método de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

5 (a) realizar as etapas de (a)-(e) como definidas na reivindicação 49, por meio das quais os filamentos de cDNA de comprimento completo são gerados;

(b) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos ditos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo obtidos a partir da etapa (a) em uma primeira temperatura de anelamento, que compreende as
10 etapas de:

(i) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um primeiro iniciador que compreende uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar às sequências da extremidade 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA de comprimento
15 completo, sob condições em que o dito primeiro iniciador anela às extremidades 3' dos ditos primeiros filamentos de cDNA de comprimento completo, por meio das quais os segundos filamentos de cDNA de comprimento completo são gerados; e

(ii) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender
20 e desnaturar o iniciador usando um segundo iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso ou uma sequência degenerada que codifica a sequência de aminoácidos de um segmento de homologia conservada nos
25 ditos segundos filamentos de cDNA de comprimento completo para hibridizar com ela, sob condições em que o dito segundo iniciador anela à dita sequência de consenso ou sequência degenerada de segundos filamentos de cDNA de comprimento completo, por meio das quais os segmentos de cDNA da

extremidade 5' tendo a dita sequência de consenso ou sequência degenerada são gerados; e

(c) realizar uma amplificação de segundo estágio dos ditos segmentos de cDNA da extremidade 5' gerados a partir da etapa (b) a uma
5 segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (b)-(i) e (b)-(ii), respectivamente, ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de
10 nucleotídeos que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos primeiro e segundo iniciadores usados nas etapas (b)-(i) e (b)-(ii), respectivamente, sob condições em que cada iniciador anela às sequências de extremidades 3' e 5' dos ditos segmentos de cDNA da extremidade 5', respectivamente, por meio das quais os ditos segmentos de cDNA de
15 homologia conservada da extremidade 5' são amplificados.

61. Método para identificar segmentos de homologia conservada em uma família de multigene a partir de gDNA, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura
20 como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

62. Método de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de dois estágios, que compreende:

25 (a) realizar uma amplificação de primeiro estágio dos ditos segmentos de homologia conservada a partir do dito gDNA em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o iniciador

ou o par de iniciadores como definido nas reivindicações de 1 a 24, em que cada iniciador tem na sua porção de extremidade 3' uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência de consenso ou uma sequência degenerada que codificam a sequência de aminoácido de um segmento de homologia conservada no dito gDNA para hibridizar com ela, sob condições em que o dito iniciador ou o dito par de iniciadores anelam à dita sequência de consenso ou sequência degenerada de gDNA, por meio da qual os segmentos de DNA genômico tendo a dita sequência de consenso ou sequência degenerada são gerados; e

10 (b) realizar uma amplificação de segundo estágio dos ditos segmentos de DNA genômico gerados a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando o mesmo iniciador ou par de iniciadores como
15 usados na etapa (a) ou um iniciador ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo que corresponde a cada porção de extremidade 5' do dito iniciador ou par de iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que o dito iniciador ou cada um do dito par de iniciadores anela às sequências de extremidades 3' e 5' dos ditos segmentos de DNA
20 genômico gerados a partir da etapa (a), respectivamente, por meio das quais os ditos segmentos genômicos de homologia conservada são amplificados.

63. Método para identificar uma variação de nucleotídeo em um ácido nucléico alvo, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação de amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos
25 um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

64. Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando amplificações de estágio

duplo, que compreende:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio para produzir um primeiro filamento de DNA complementar ao dito ácido nucléico alvo incluindo a dita variação de nucleotídeo em uma primeira temperatura de
5 anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um primeiro iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré selecionada a um primeiro sítio do dito
10 ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, em que cada um do dito primeiro iniciador e do dito primeiro sítio compreende uma posição de interrogação que corresponde à dita variação de nucleotídeo, por meio da qual o dito primeiro filamento de DNA complementar ao dito ácido nucléico alvo incluindo a dita variação de nucleotídeo é gerado quando a dita posição de
15 interrogação é ocupada pelos nucleotídeos complementares do dito primeiro iniciador aos seus nucleotídeos correspondentes do dito primeiro sítio; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito primeiro filamento de DNA gerado a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que
20 compreende as etapas:

(i) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um segundo iniciador de qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré
25 selecionada a um segundo sítio do dito ácido nucléico alvo para hibridizar com ela sob condições em que o dito segundo iniciador anela ao dito segundo sítio do ácido nucléico alvo, por meio da qual um segundo filamento de DNA complementar ao dito primeiro filamento de DNA incluindo a dita variação

de nucleotídeo é gerado; e

(ii) pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando os mesmos primeiro e segundo iniciadores como usados nas etapas (a) e (b)-(i), respectivamente, ou um par de iniciadores cada um tendo uma sequência hibridizadora complementar ou que corresponde às extremidades 3' e 5' do dito segundo filamento de DNA gerado a partir da etapa (b)-(i) para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela às sequências de extremidades 3' e 5' do dito segundo filamento de DNA, respectivamente, por meio da qual o dito segundo filamento de DNA que compreende o dito primeiro e segundo sítios do dito ácido nucléico alvo às suas extremidades 3' e 5' é amplificado de modo que um segmento de nucleotídeo alvo curto que corresponde ao dito segundo filamento de DNA contendo a dita variação de nucleotídeo é gerado.

65. Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado usando duas amplificações individuais de uma primeira e uma segunda amplificações em que a dita segunda amplificação é realizada usando amplificações de dois estágios, que compreende:

(a) realizar a dita primeira amplificação para produzir um fragmento de filamento de DNA curto contendo a dita variação de nucleotídeo entre as suas extremidades que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores cada iniciador compreendendo uma sequência hibridizadora substancialmente complementar a uma sequência pré selecionada a um sítio do dito ácido nucléico alvo sob condições em que a dita variação de nucleotídeo seja posicionada entre as ditas sequências pré selecionadas, em que pelo menos um iniciador do dito conjunto de iniciadores é como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua

porção de extremidade 3' a dita seqüência hibridizadora, por meio da qual o dito fragmento de filamento de DNA curto contendo a dita variação de nucleotídeo entre as suas extremidades é amplificado;

5 (b) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita segunda amplificação para produzir um primeiro filamento de DNA complementar ao dito fragmento de filamento de DNA curto incluindo a dita variação de nucleotídeo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um primeiro iniciador como definido em
10 qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma seqüência pré selecionada a um primeiro sítio do dito ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, em que cada um do dito primeiro iniciador e do dito primeiro sítio compreende uma posição de interrogação que corresponde
15 a dita variação de nucleotídeo, por meio da qual o dito primeiro filamento de DNA complementar ao dito ácido nucléico alvo incluindo a dita variação de nucleotídeo é gerado quando a dita posição de interrogação é ocupada pelos nucleotídeos complementares do dito primeiro iniciador aos seus nucleotídeos correspondentes do dito primeiro sítio; e

20 (c) realizar uma amplificação de segundo estágio da dita segunda amplificação do dito primeiro filamento de DNA gerado a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador usando um par de iniciadores em
25 que entre o dito par de iniciadores um é o mesmo que o dito iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 usado na etapa (a) e o outro é o mesmo que o dito primeiro iniciador usado na etapa (b) ou um par de iniciadores cada um tendo uma seqüência hibridizadora complementar ou

que corresponde às extremidades 3' e 5' do dito primeiro filamento de DNA gerado a partir da etapa (b) para hibridizar com ela, sob condições em que cada iniciador anela às seqüências de extremidades 3' e 5' do dito primeiro filamento de DNA, respectivamente, por meio das quais o dito primeiro
5 filamento de DNA é amplificado de modo que um segmento de nucleotídeo alvo curto que corresponde ao dito primeiro filamento de DNA contendo a dita variação de nucleotídeo é gerado.

66. Método para a mutagênese em um ácido nucléico alvo, caracterizado pelo fato de que compreende realizar uma reação de
10 amplificação usando iniciadores, distinguidos por pelo menos um iniciador ter a mesma estrutura como o iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 24.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que a dita mutagênese é direcionada a sítio e usa amplificações de
15 dois estágios, que compreende as etapas de:

(a) realizar uma amplificação de primeiro estágio da dita seqüência de ácido nucléico alvo em uma primeira temperatura de anelamento que compreende pelo menos dois ciclos de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando um par de iniciadores como definido em
20 qualquer uma das reivindicações de 1 a 24 cada um tendo na sua porção de extremidade 3' uma seqüência hibridizadora substancialmente complementar a uma região da dita seqüência de ácido nucléico alvo para hibridizar com ela, em que uma das ditas seqüências de hibridização tem pelo menos um nucleotídeo de ligação inespecífica para gerar a mutação direcionada a sítio,
25 sob condições em que o dito iniciador ou par de iniciadores anela à sua seqüência de nucleotídeo alvo, por meio das quais um produto de amplificação contendo o sítio da mutação direcionada a sítio é gerado; e

(b) realizar uma amplificação de segundo estágio do dito

produto de amplificação gerado a partir da etapa (a) a uma segunda temperatura de anelamento, que está em condições de alta severidade, que compreende pelo menos um ciclo de anelamento do iniciador, estender e desnaturar o iniciador, usando os mesmos iniciadores como usados na etapa (a) ou um par de iniciadores cada um compreendendo uma sequência de nucleotídeo pré selecionada arbitrária que corresponde a cada porção de extremidade 5' dos ditos iniciadores usados na etapa (a), sob condições em que cada iniciador anela às extremidades 3' e 5' do dito produto de amplificação, respectivamente, por meio das quais o dito produto de amplificação contendo o sítio da mutação direcionada a sítio é re-amplificado.

68. Método de acordo com as reivindicações 37, 39, 41, 45, 47, 53, 55, 57, 59, 60 ou 62, caracterizado pelo fato de que o dito par de iniciadores usado na dita amplificação do primeiro estágio é uma combinação de um iniciador de controle de anelamento selecionado dos iniciadores como definidos em as reivindicações de 1 a 24 e um iniciador convencional.

69. Uso do iniciador como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 33, caracterizado pelo fato de ser em um processo que envolve a amplificação de ácido nucléico.

FIG. 1A

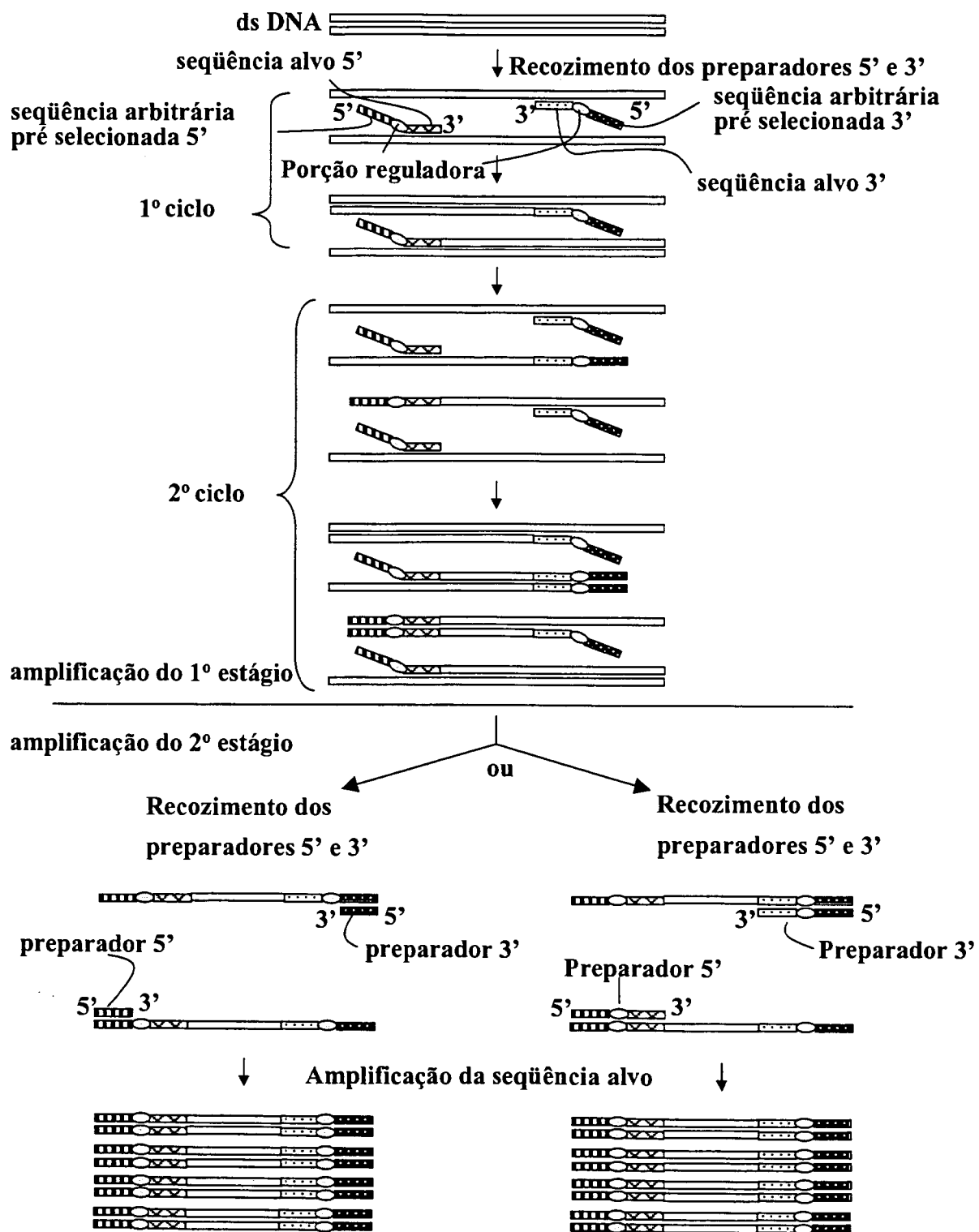
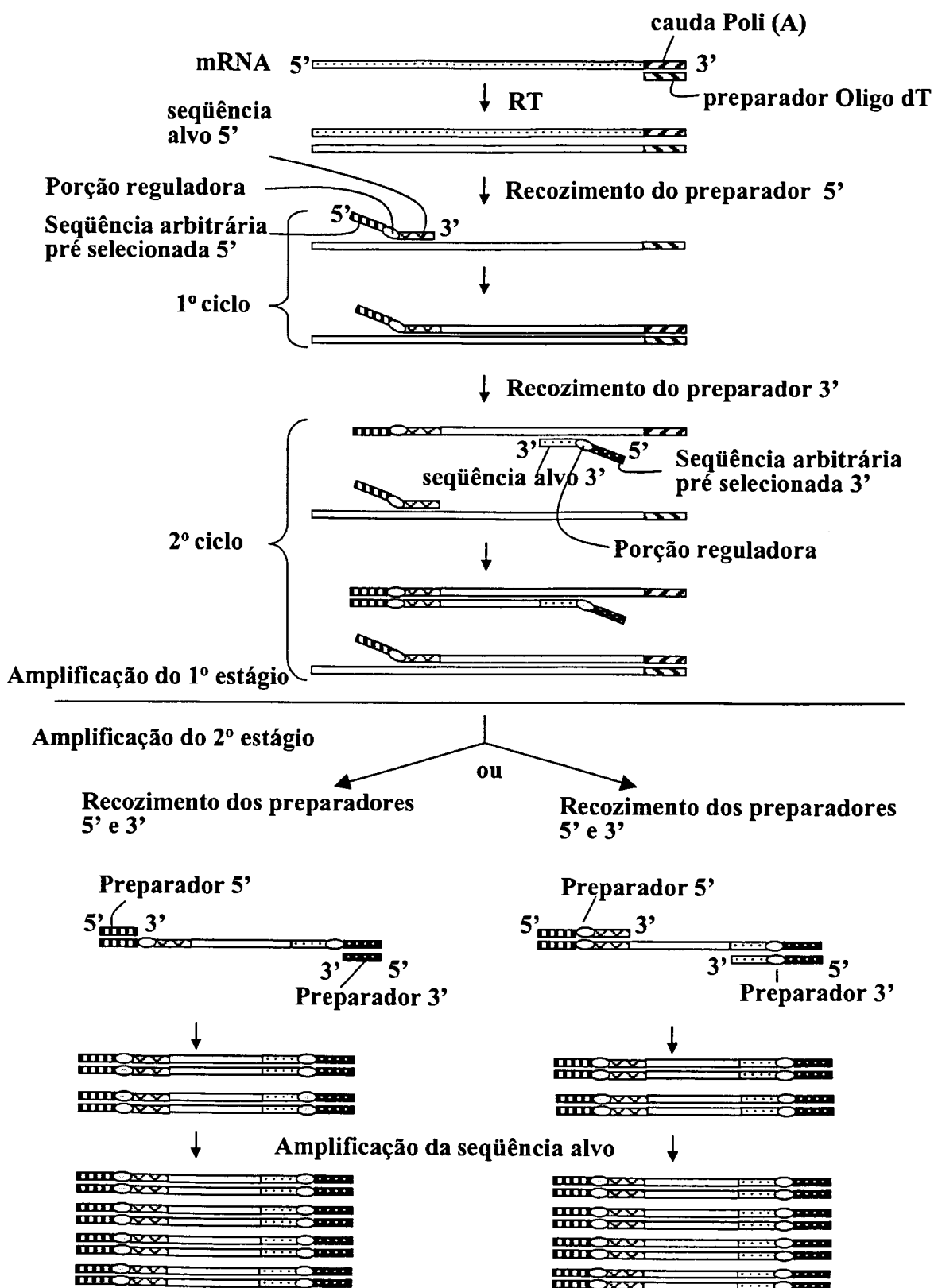


FIG. 1B



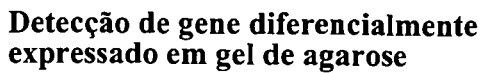


FIG. 2B

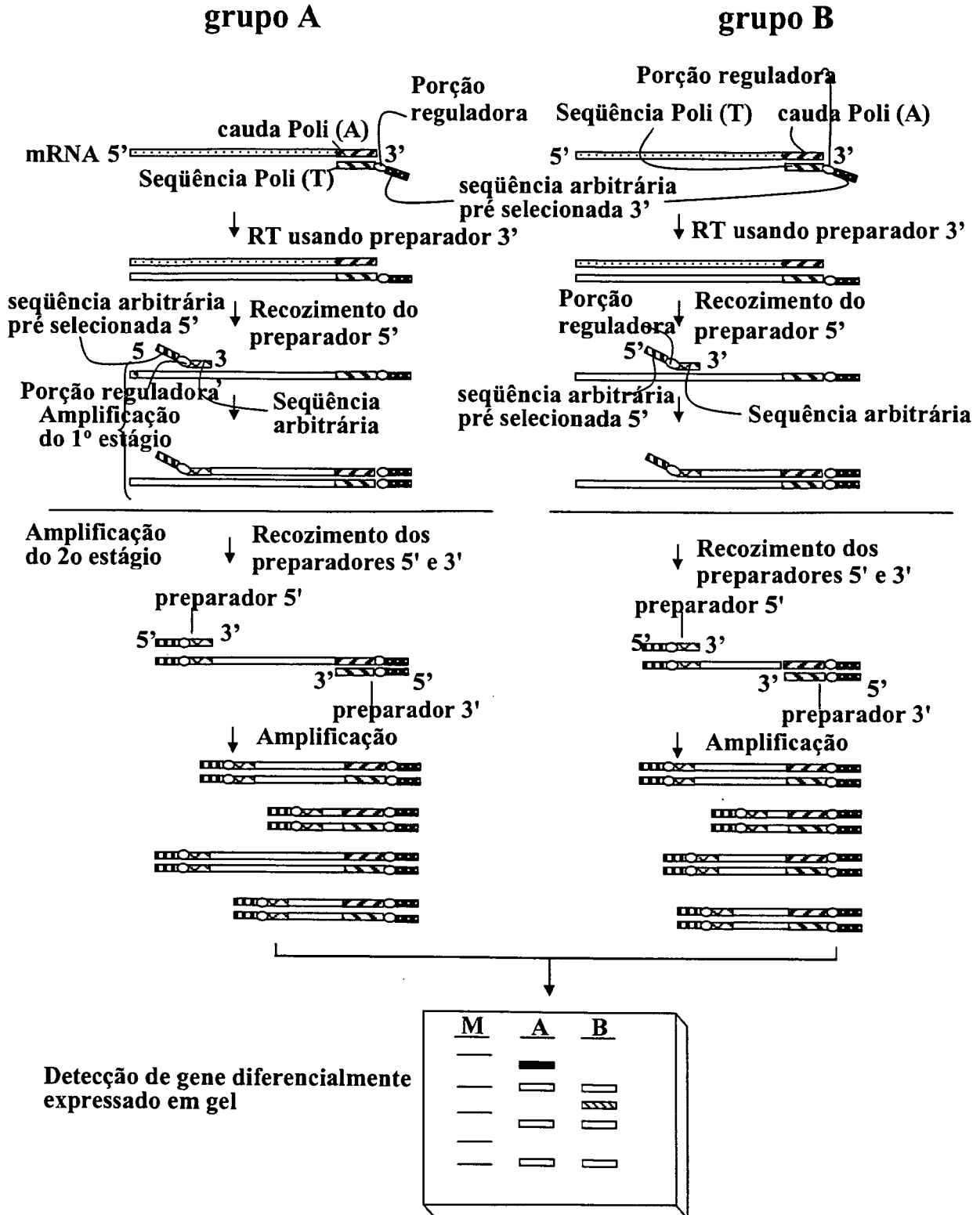


FIG. 3

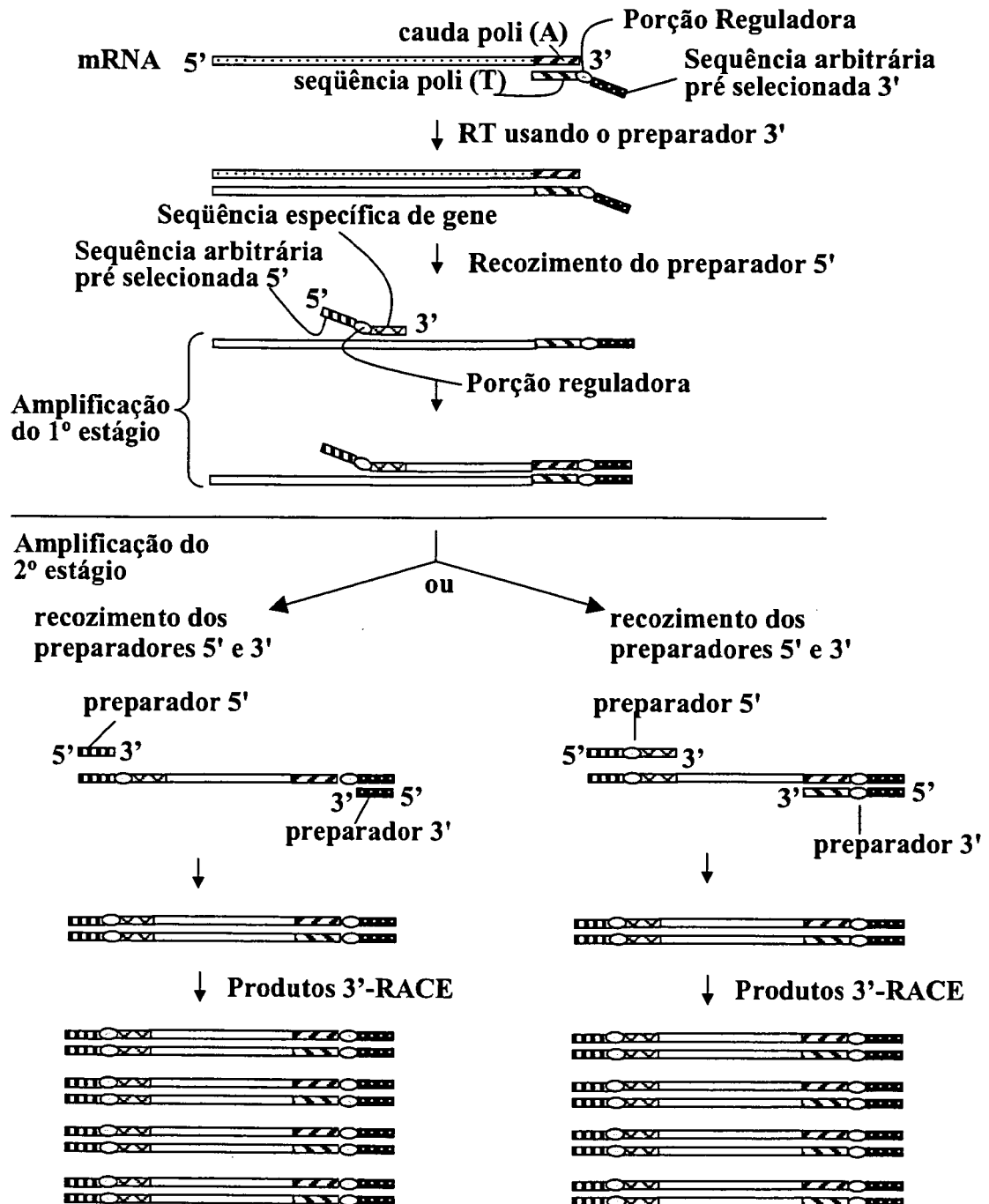


FIG. 4A

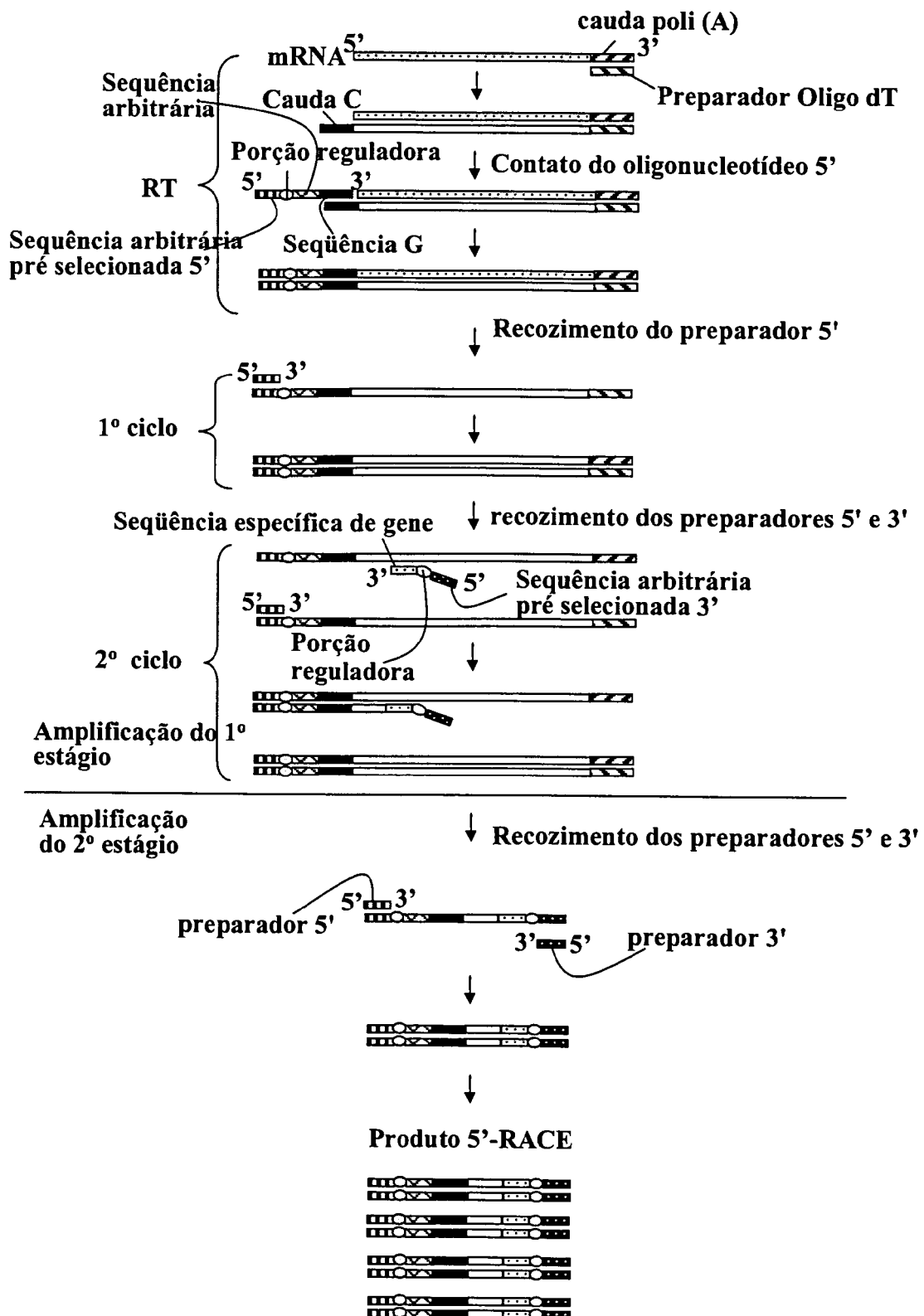


FIG. 4B

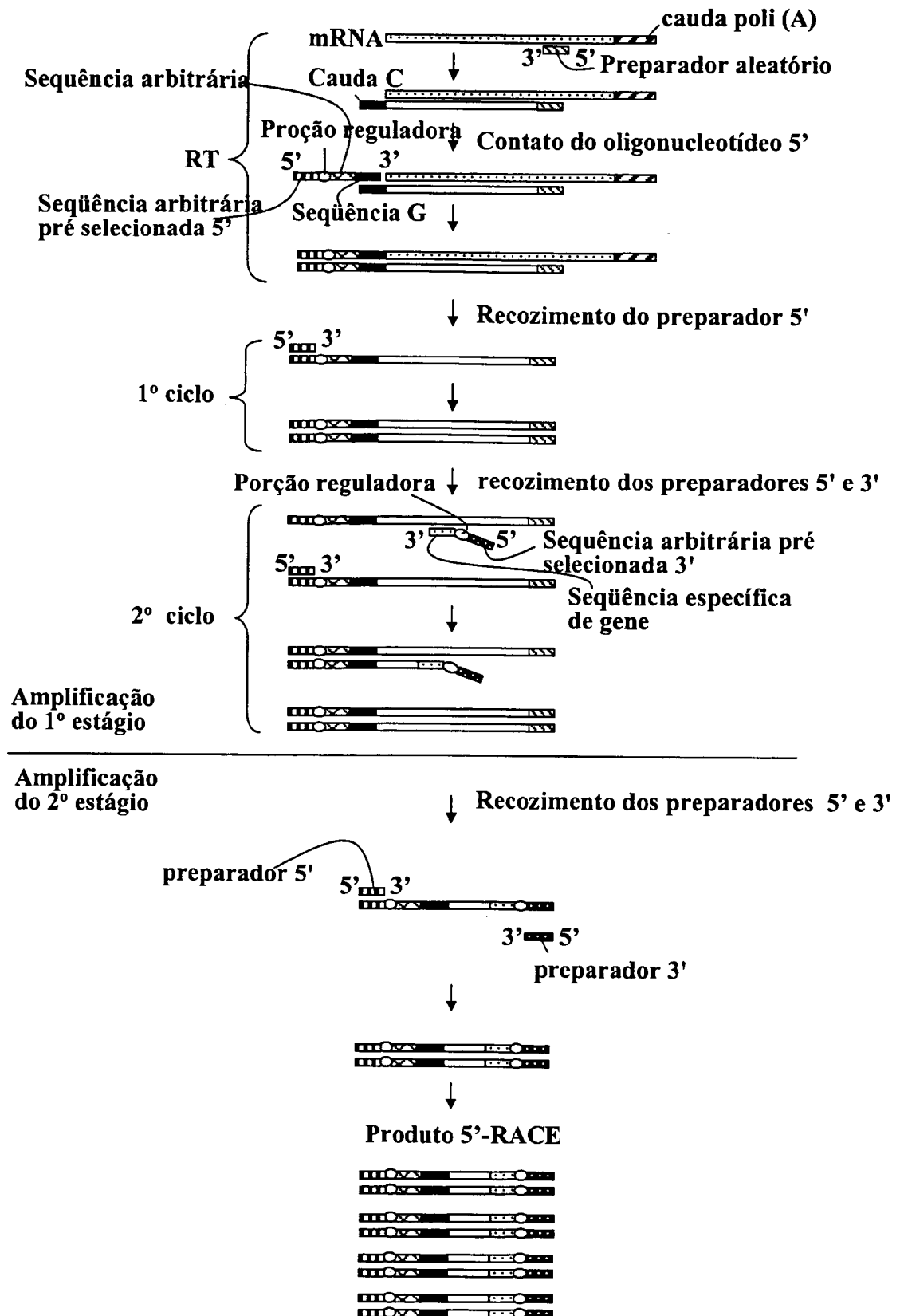


FIG. 5

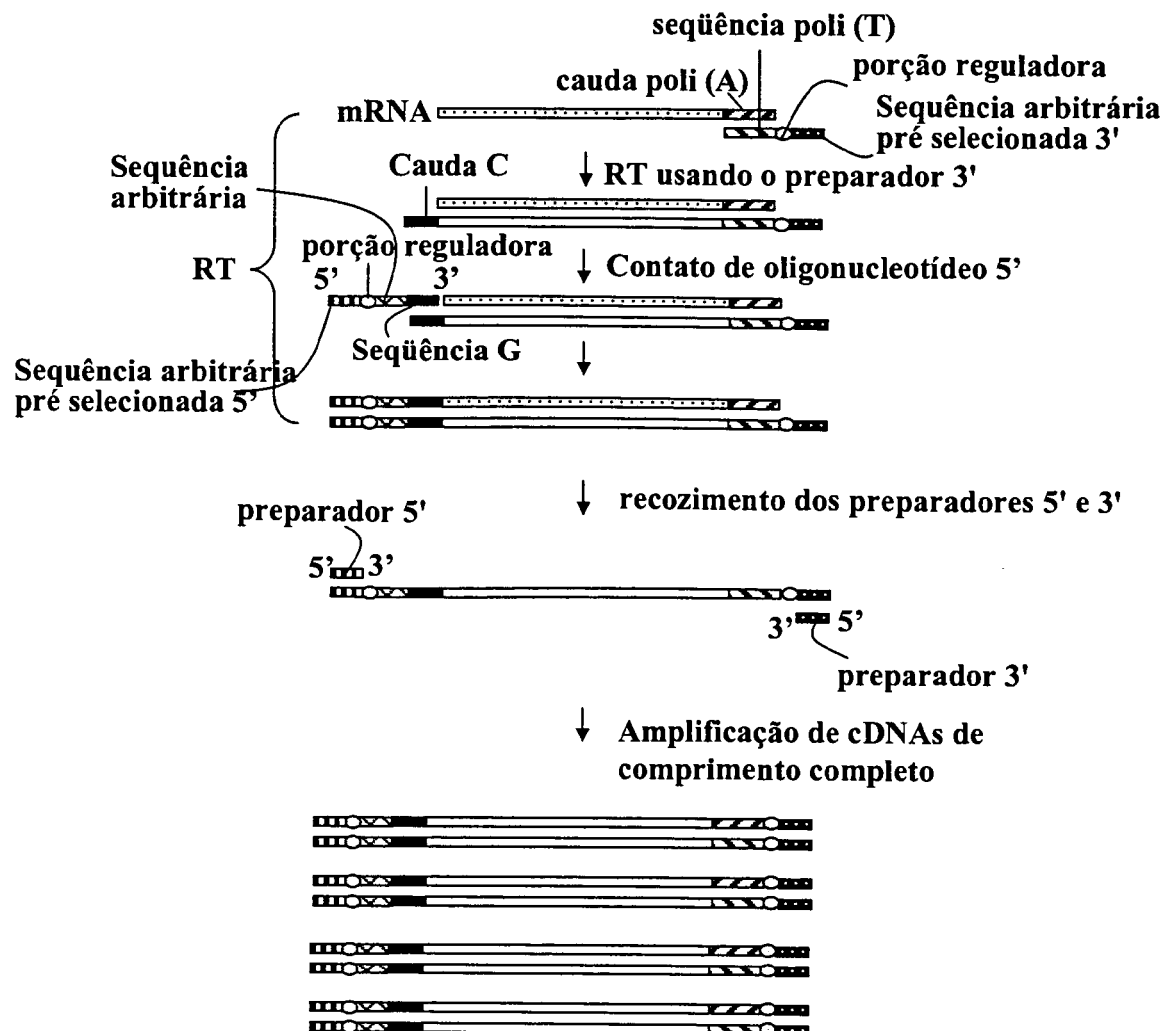


FIG. 6

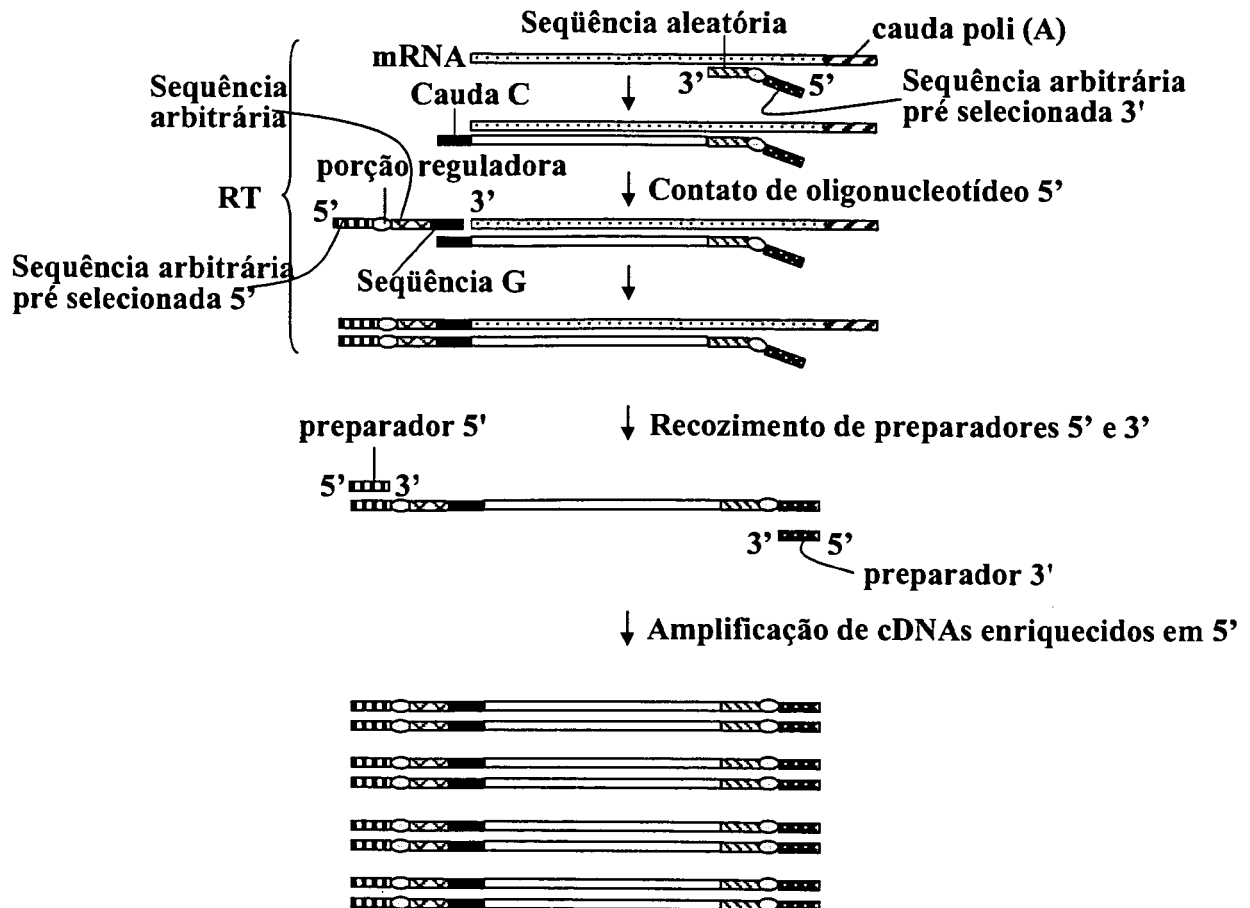


FIG. 7A

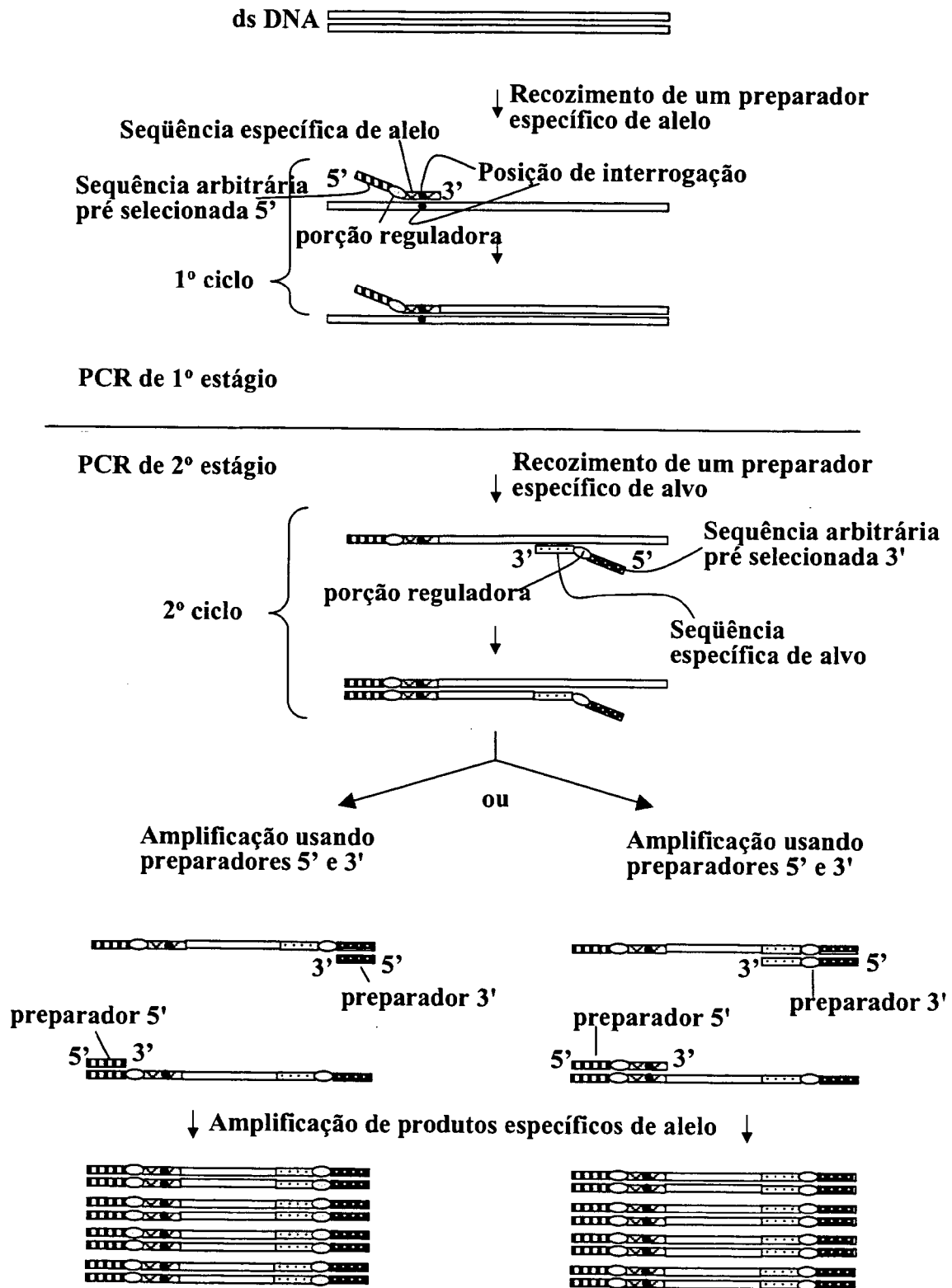


FIG. 7B

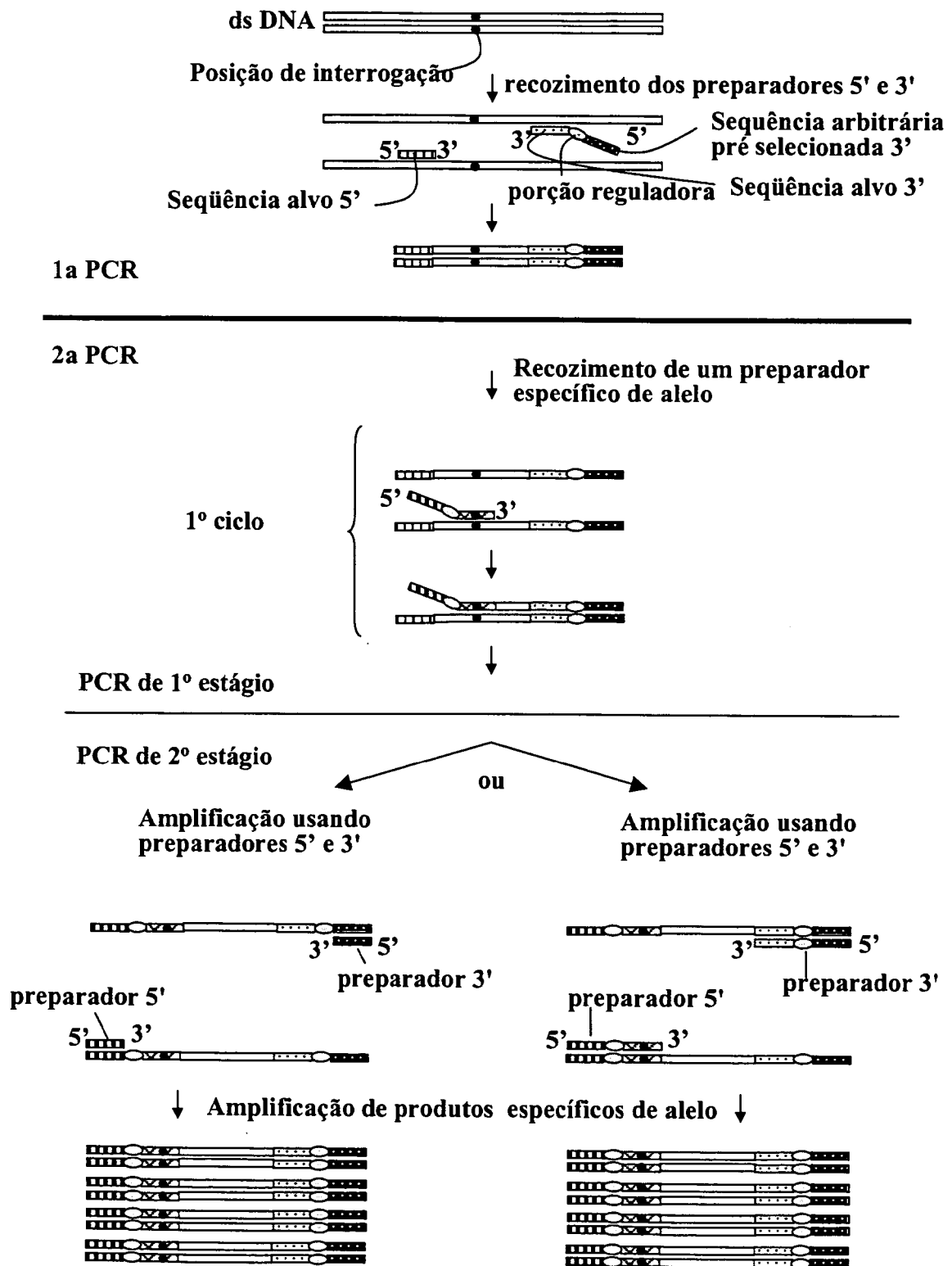


FIG. 8

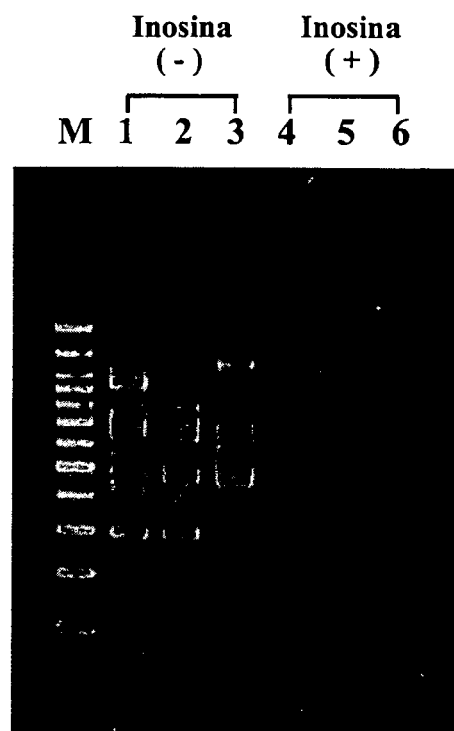


FIG. 9

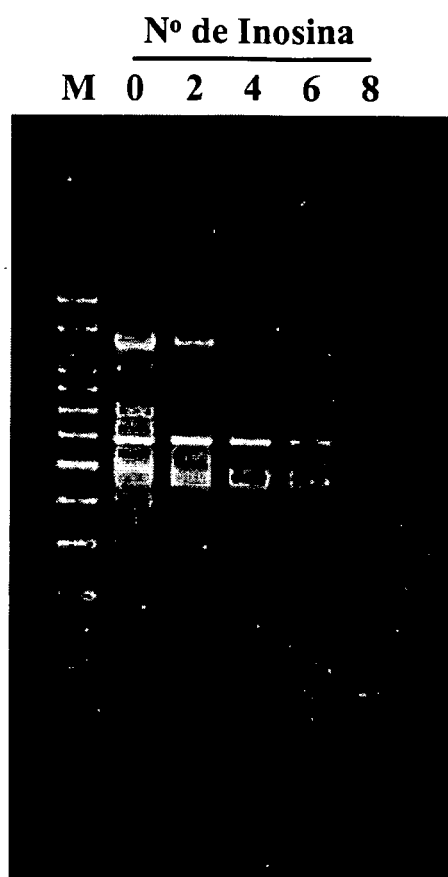


FIG. 10A

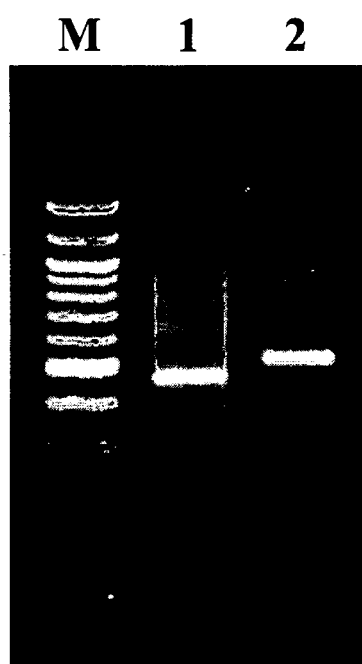


FIG. 10B

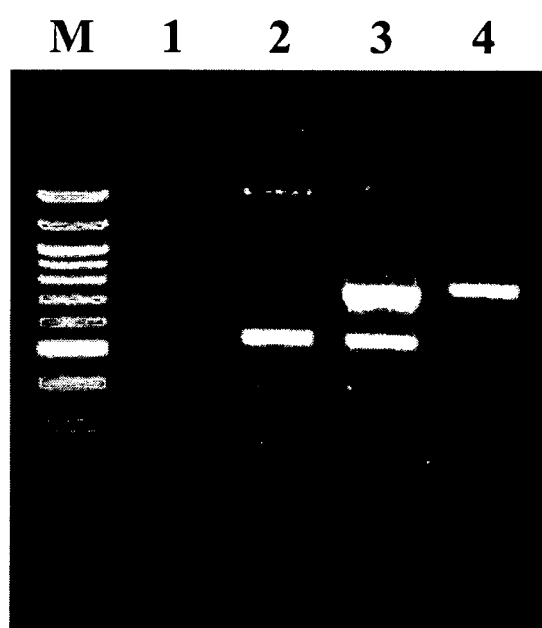


FIG. 10C

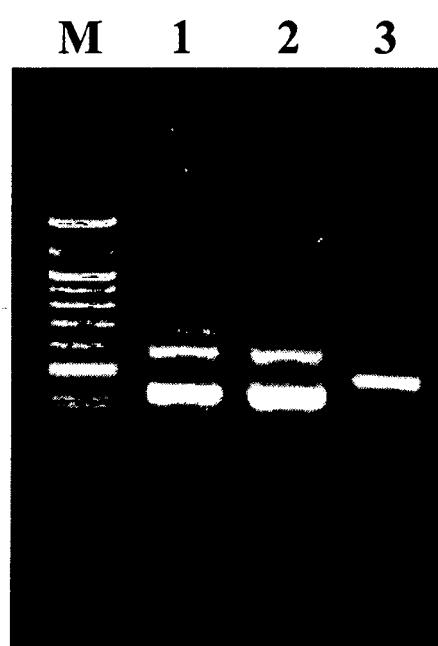


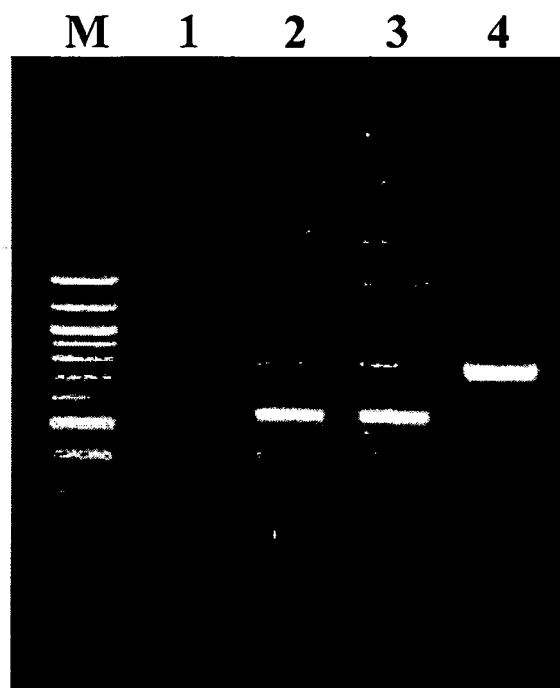
FIG. 10D

FIG. 11A

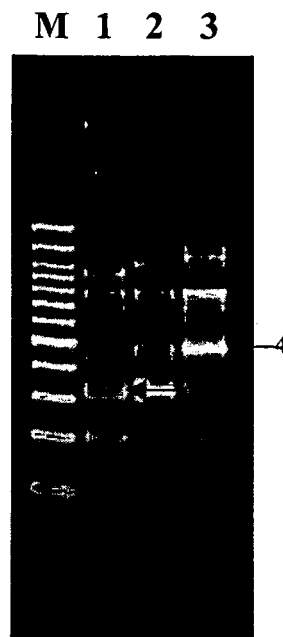


FIG. 11B

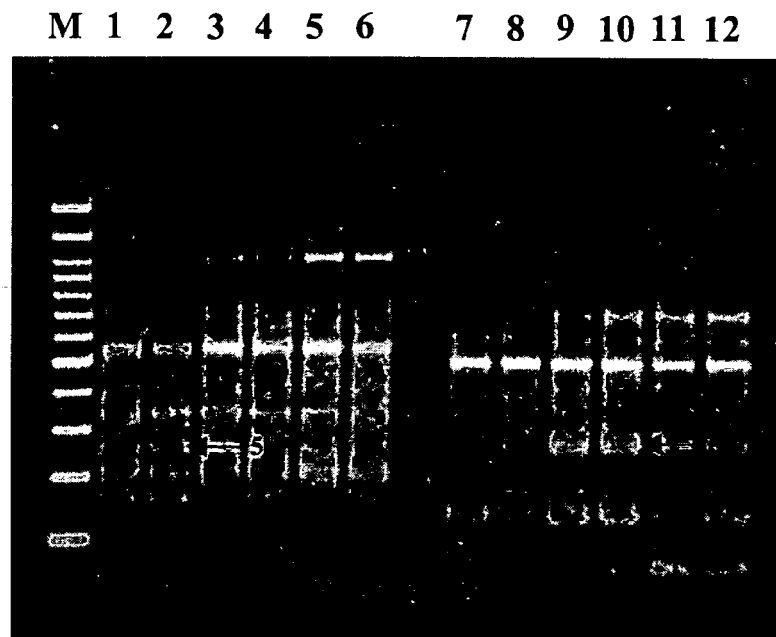


FIG. 11C

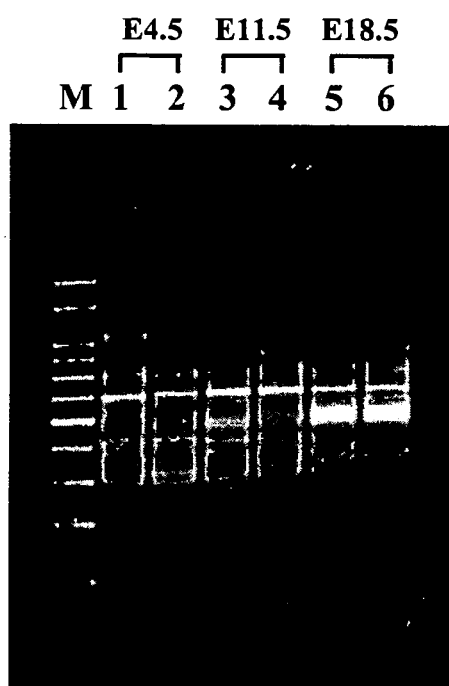


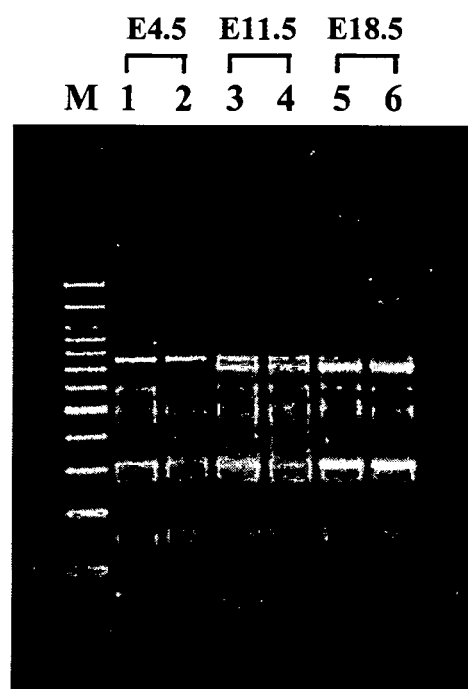
FIG. 11D

FIG. 12A

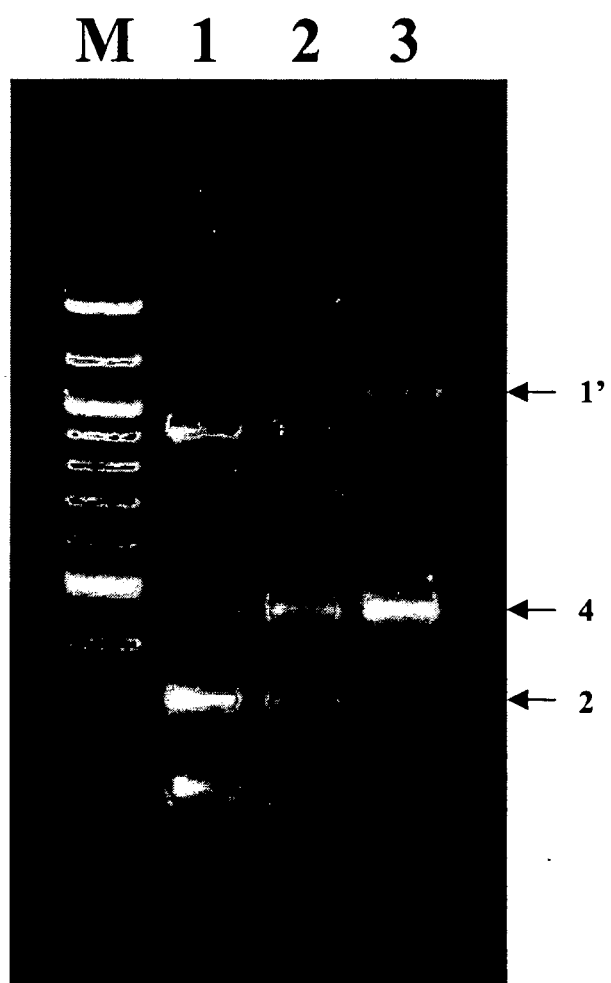


FIG. 12B

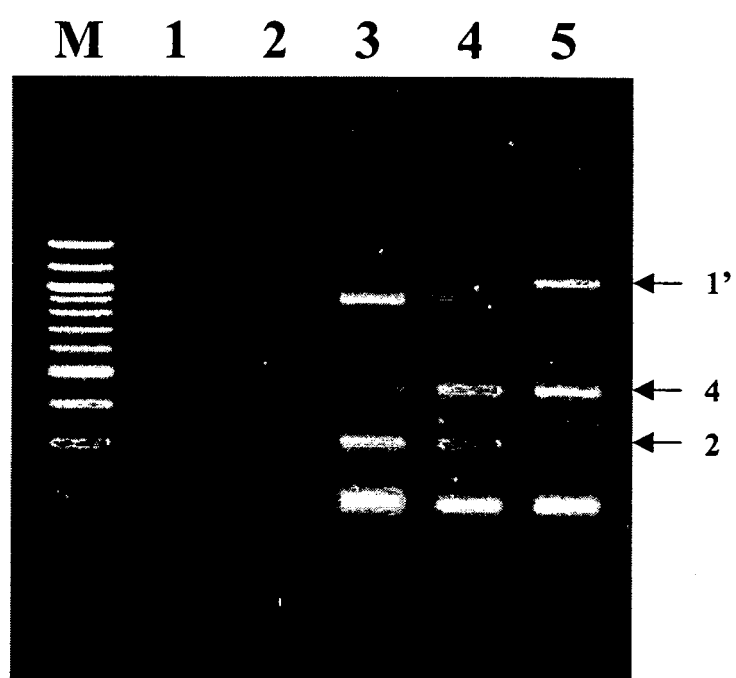


FIG. 13

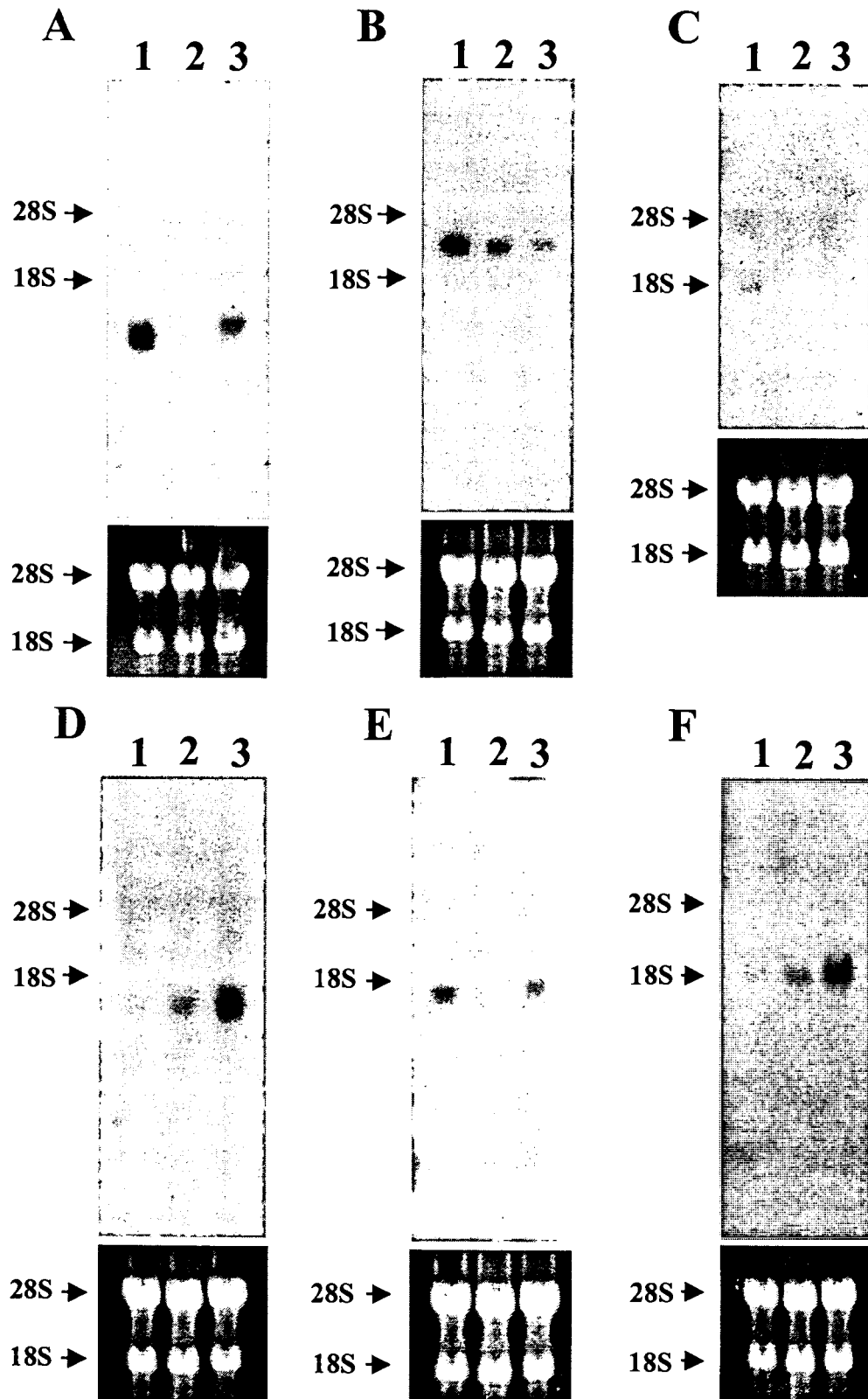


FIG. 14

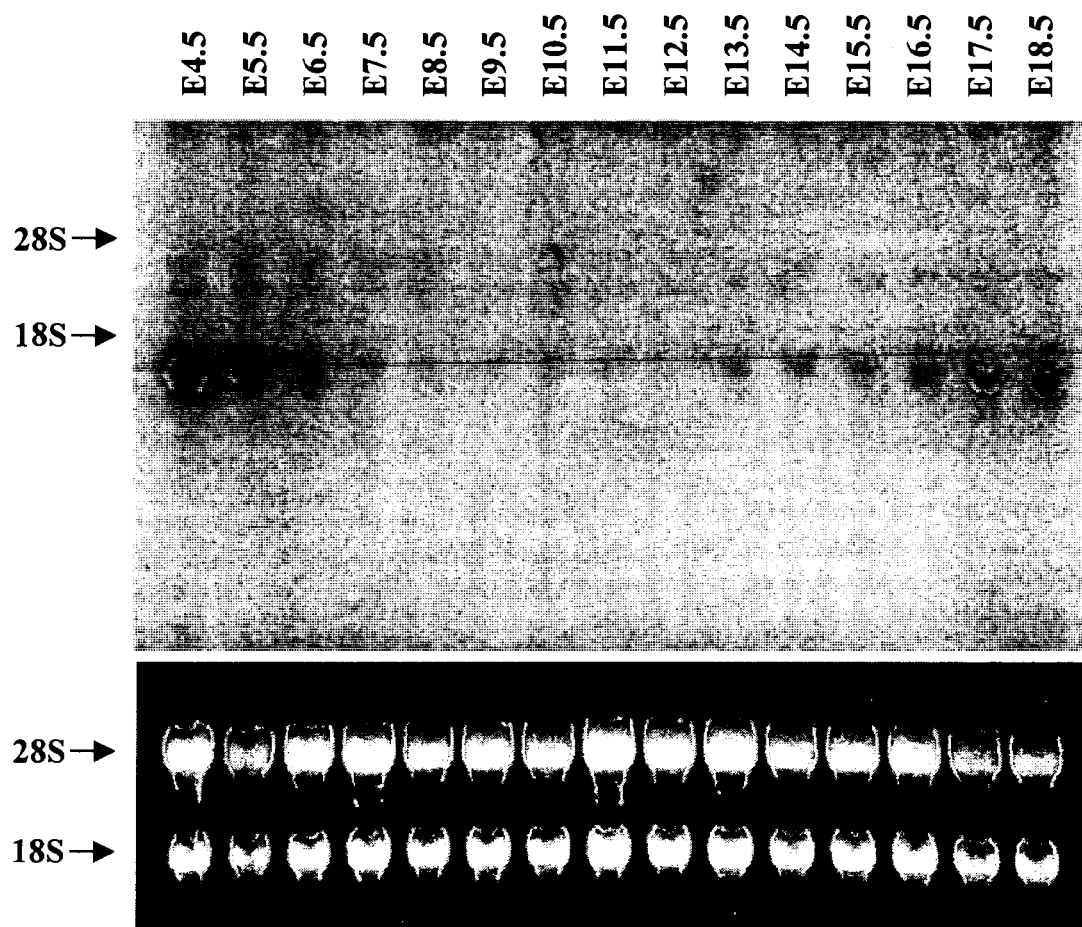


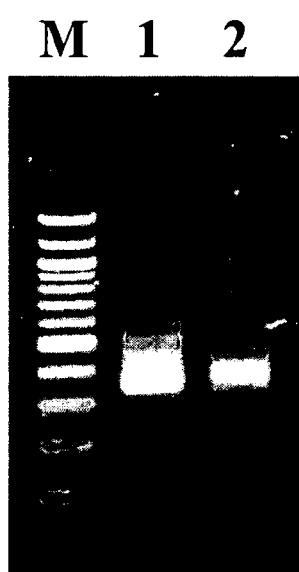
FIG. 15

FIG. 16

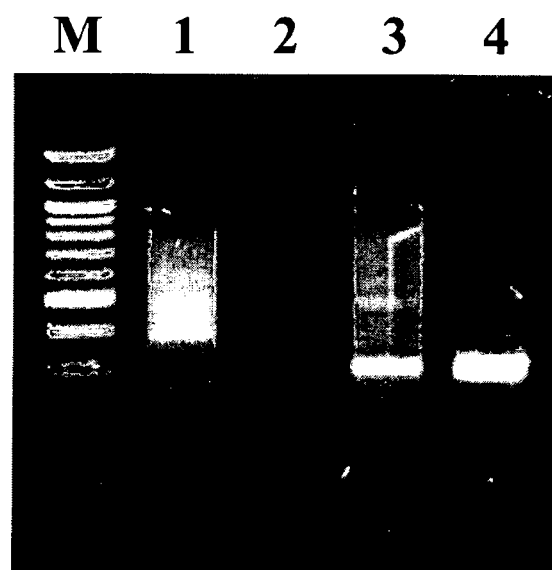


FIG. 17

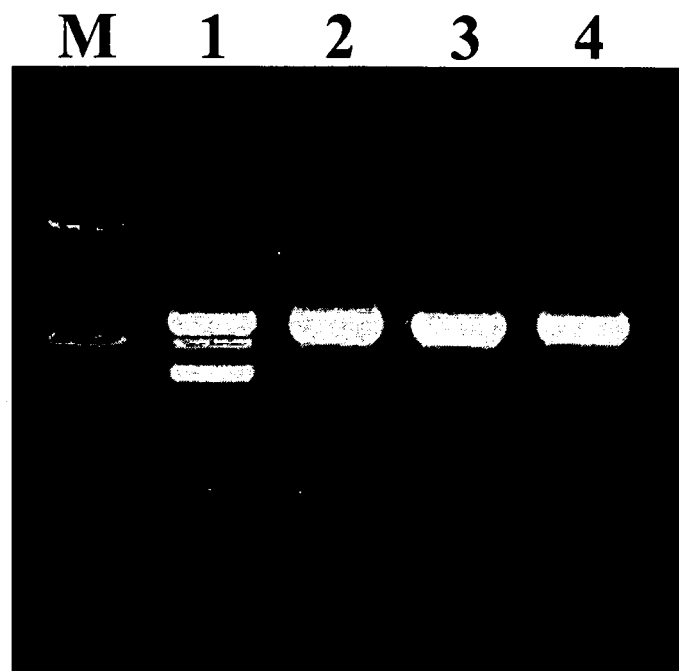


FIG. 18



FIG. 19

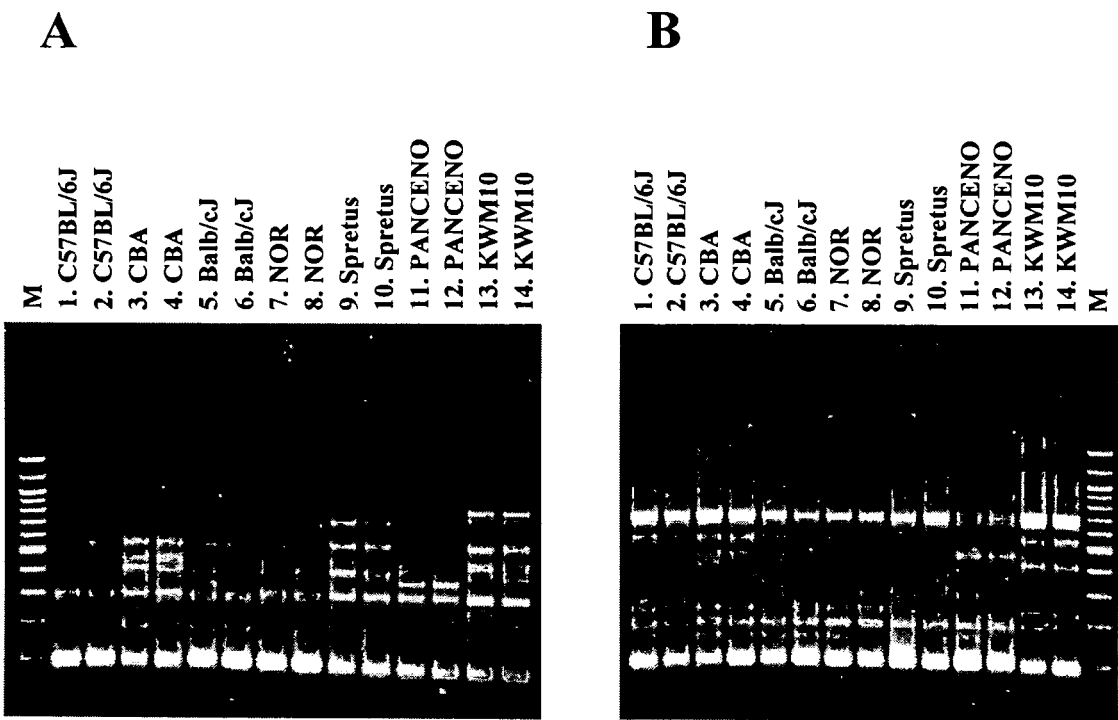


FIG. 20

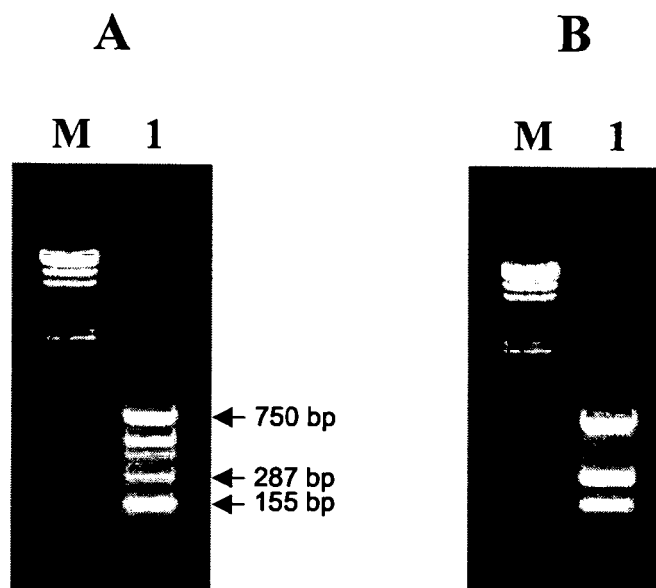


FIG. 21

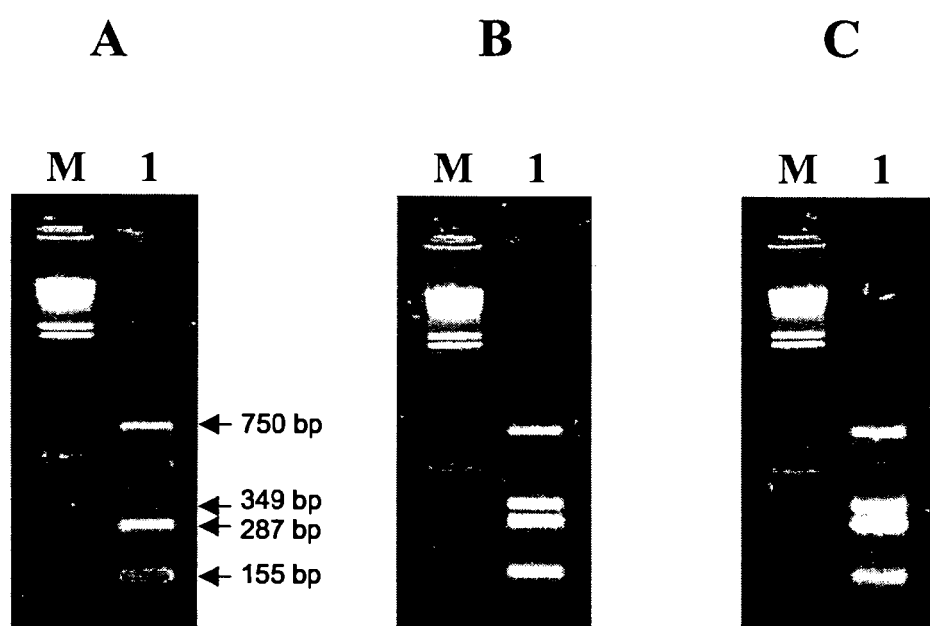


FIG. 22

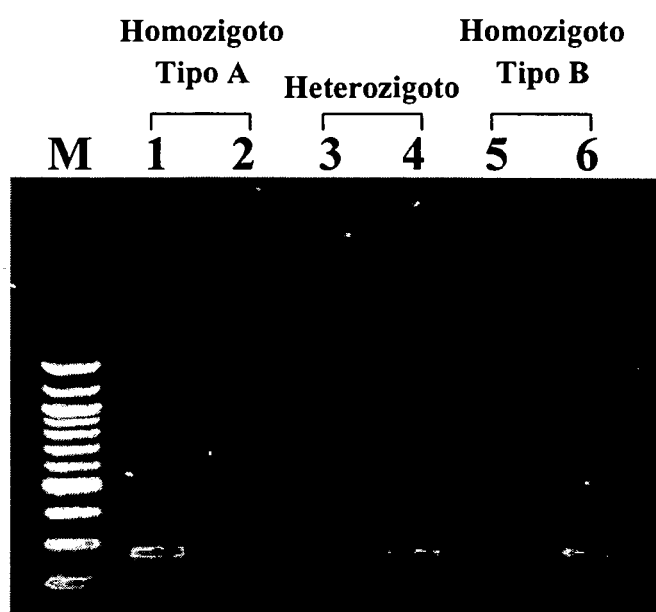
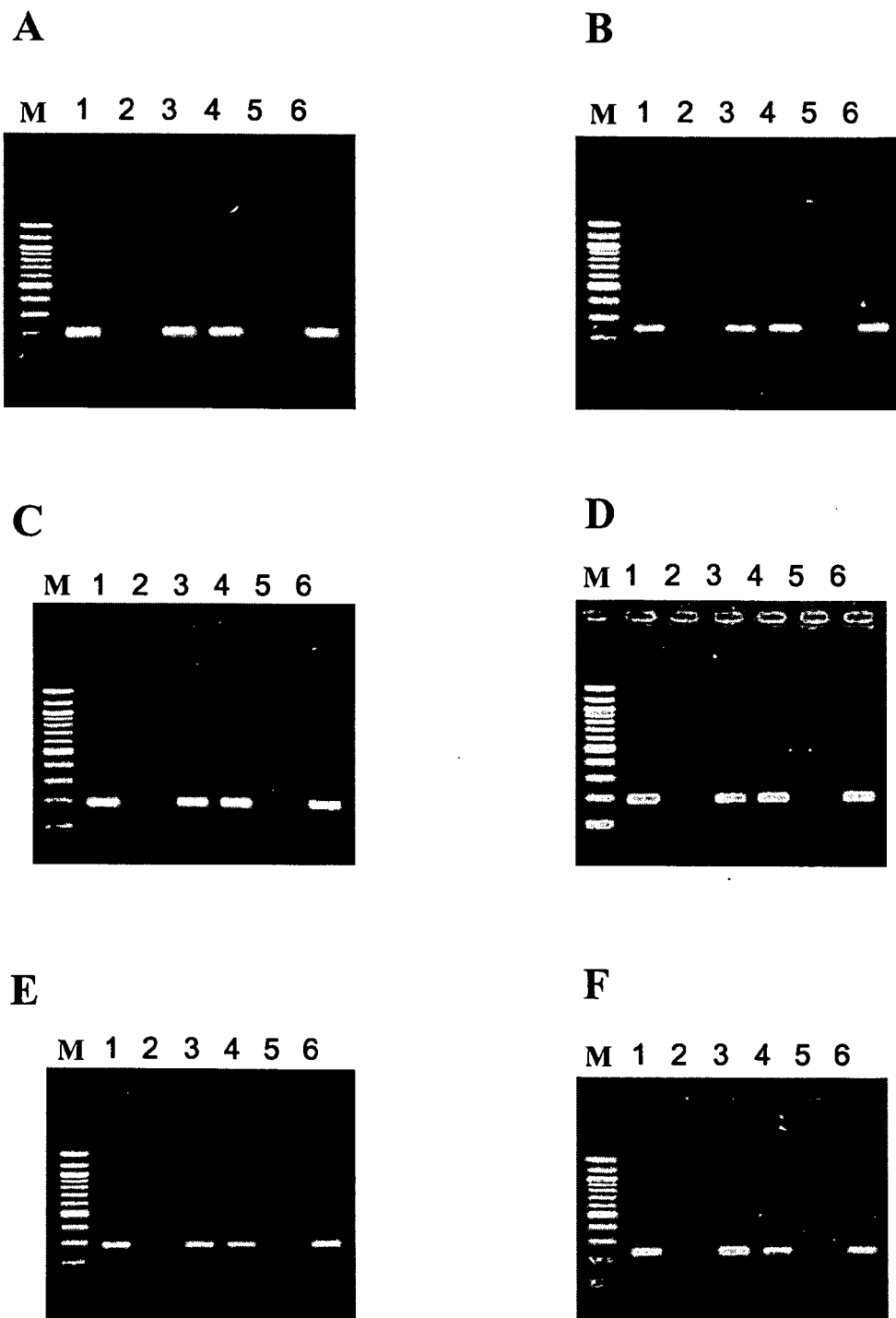


FIG. 23



RESUMO

“INICIADOR DE CONTROLE DE ANELAMENTO PARA MELHORAR A ESPECIFICIDADE DE ANELAMENTO NA AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO, KIT, MÉTODOS PARA AMPLIFICAR UMA SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEÍCO DE UM DNA OU UMA MISTURA DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS, E PARA AMPLIFICAR SELETIVAMENTE UMA SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ALVO DE UM DNA OU UMA MISTURA DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS, E UMA SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ALVO A PARTIR DE UM mRNA, MÉTODO PARA DETECTAR A COMPLEMENTARIDADE DE DNA AO mRNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSO EM DUAS OU MAIS AMOSTRAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO, MÉTODOS PARA AMPLIFICAR RAPIDAMENTE UM FRAGMENTO DE cDNA e DNA ALVO, E PARA AMPLIFICAR UMA POPULAÇÃO DE cDNAs DE FILAMENTO DUPLO DE COMPRIMENTO COMPLETO COMPLEMENTAR AOS mRNAs, E cDNAs DE FILAMENTO DUPLO ENRIQUECIDOS EM 5’ COMPLEMENTARES AOS mRNAs, MÉTODO PARA AMPLIFICAR MAIS DO QUE UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO ALVO SIMULTANEAMENTE, MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA IMPRESSÃO DIGITAL DE DNA DE GDNA, E DE RNA DE UMA AMOSTRA DE mRNA, MÉTODO PARA IDENTIFICAR SEGMENTOS DE HOMOLOGIA CONSERVADA EM UMA FAMÍLIA DE MULTIGENE A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE mRNA, MÉTODO PARA A MUTAGÊNESE EM UM ÁCIDO NUCLEÍCO ALVO, E, USO DO INICIADOR”

25 A presente invenção diz respeito a um iniciador de controle de anelamento para melhorar a especificidade de anelamento na amplificação de ácido nucleico e suas aplicações a todos os campos da tecnologia envolvida na amplificação de ácido nucleico. O presente iniciador compreende (a) uma porção da extremidade 3’ tendo uma sequência de nucleotídeo hibridizadora

substancialmente complementar a um sítio em um ácido nucléico padrão para hibridizar com o mesmo; (b) uma porção da extremidade 5' tendo uma seqüência de nucleotídeo arbitrária pré selecionada; e (c) uma porção reguladora posicionada entre a dita porção de extremidade 3' e a dita porção de extremidade 5' compreendendo pelo menos uma base universal ou análogo de base não discriminatória, por meio da qual a dita porção reguladora é capaz de regular uma porção de anelamento do dito iniciador em associação com a temperatura de anelamento.