



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0801480-9 A2**

(22) Data de Depósito: 16/05/2008

(43) Data da Publicação: 18/05/2010
(RPI 2054)



(51) *Int.Cl.:*

C12N 15/10 (2010.01)

C07H 21/00 (2010.01)

(54) Título: **MÉTODO PARA DETECTAR CADA UM DENTRE UMA PLURALIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVOS, MÉTODO MULTIPLEX PARA DETECTAR UMA PLURALIDADE DE DNAS ALVOS, E, COMPOSIÇÃO**

(73) Titular(es): Digene Corporation, Qiagen Gaithersburg, Inc.

(72) Inventor(es): Attila T. Lorincz, Brian Lowe, Ha Thai, Irina Nazarenko, Paul Eder, Richard Mallonee

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETECTAR CADA UM DENTRE UMA PLURALIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVOS, MÉTODO MULTIPLEX PARA DETECTAR UMA PLURALIDADE DE DNAS ALVOS, E, COMPOSIÇÃO. Captura de híbrido específico do alvo (TSHC) provê um método de detecção de ácido nucleico que não é somente rápido e sensível, mas é também altamente específico e capaz de discriminar seqUências de ácido nucleico altamente homólogas. O método produz híbridos DNA: RNA que podem ser detectados por vários métodos.

“MÉTODO PARA DETECTAR CADA UM DENTRE UMA PLURALIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVOS, MÉTODO MULTIPLEX PARA DETECTAR UMA PLURALIDADE DE DNAs ALVOS, E, COMPOSIÇÃO”

5 Este pedido é um pedido em continuação em parte do sob 35 U.S.C. parágrafo 120 de pedido de patente US no. de série 11/005 617, depositado em 6 de dezembro de 2004, intitulado "Detection of Nucleic Acides by Target Specific Hybrid Capture Method", que é uma continuação em parte do pedido de patente US no. de série 10/971 251, depositado em 20
10 de outubro de 2004, agora abandonado, que é uma continuação em parte do pedido de patente US no. de série 09/ 594 839, depositado em 15 de junho de 2000, todos sendo aqui incorporados por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

15 Esta invenção refere-se ao campo de métodos de detecção de ácidos nucleicos geralmente e mais particularmente refere-se à detecção de ácidos nucleicos por método de captura de híbrido específico do alvo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

20 A detecção de seqüências de ácido nucleico específicas presentes em uma amostra biológica é importante para a identificação e classificação de microorganismos, diagnóstico de doenças infecciosas, detecção e caracterização de anormalidades genéticas, identificação de mudanças genéticas associadas com câncer, estudo da susceptibilidade genética a doença, e medida da resposta aos vários tipos de tratamento. As técnicas comuns para detectar e quantificar seqüências de ácido nucleico
25 específicas são hibridização de ácido nucleico e amplificação do alvo.

Vários métodos de hibridização são disponíveis para a detecção e estudo de ácidos nucleicos. Em um método de hibridização tradicional, os ácidos nucleicos a serem identificados estão ou em solução ou fixados em um suporte sólido. Os ácidos nucleicos são detectados usando

sondas de ácido nucleico rotuladas que são capazes de hibridizar nos ácidos nucleicos. Recentemente, novos métodos de hibridização foram desenvolvidos para aumentar a sensibilidade e especificidade de detecção. Um exemplo é o método de Hybrid Capture ® descrito no pedido US no. de série 07/792 585 e patente US 6 228 578. Apesar de novos métodos de hibridização oferecerem melhoras significantes sobre os métodos tradicionais, eles ainda faltam a capacidade de discriminar completamente entre seqüências de ácido nucleico altamente homólogas.

A reação de cadeia polimerase (PCR) é o método de amplificação de ácido nucleico alvo mais comumente usado. No entanto, PCR é limitado em alguma extensão quando um grande número de diferentes alvos devem ser amplificados simultaneamente, isto é, reações multiplex, que podem causar não somente artefatos de PCR, como iniciadores-dímeros, mas também a amplificação espúria de alvos. Em uma tentativa para superar esta limitação, os iniciadores de consenso podem ser usados quando um número de alvos tem regiões homólogas. No entanto, a homologia entre espécies nunca é de 100%, e como resultado, os iniciadores terão vários desalinhamentos com diferentes alvos, causando amplificação não uniforme. Quando quantidades diferentes de alvos estão presentes em uma amostra, a eficiência de amplificação de diferentes PCRs também varia, levando a uma amplificação não uniforme e não específica de diferentes alvos.

Assim, é um objeto da presente invenção prover um método para detectar seqüências de ácido nucleico alvo que não somente provê uma aumentada rapidez e sensibilidade, mas também que é altamente específico e capaz de discriminar entre seqüências alvos de ácido nucleico altamente homólogas e múltiplas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê um novo método de detecção de ácido nucleico, referido aqui como HYBRID CAPTURE, específico do alvo

("TSHC"). TSHC é um método rápido, altamente específico, e sensível de discriminar entre e detectar seqüências alvos de ácido nucleico altamente homólogas.

5 Uma forma de realização da invenção refere-se a um método de detecção e/ou quantificação de um ou mais ácidos nucleicos alvos, compreendendo as etapas de enriquecer, amplificar e detectar o alvo para uma detecção rápida e sensível das seqüências de ácido nucleico alvo.

10 Em uma forma de realização do método reivindicado, um ou mais ácidos nucleicos alvo são detectados por: captura dos ácidos nucleicos alvos em um suporte sólido misturando os ácidos nucleicos alvos, sondas de ácido nucleico complementares aos ácidos nucleicos alvos, em que um é RNA e o outro é DNA, e um suporte sólido, remover os ácidos nucleicos alvos não ligados e as sondas de ácido nucleico, amplificar os ácidos nucleicos alvos capturados ou sondas de ácido nucleico, formar uma pluralidade de
15 amplicons, em que a presença dos amplicons é indicativa da presença dos ácidos nucleicos alvos, e detectar os ácidos nucleicos alvos por misturação dos ácidos nucleicos alvos com oligonucleotídeos selecionáveis e distinguíveis que hibridizam em uma porção dos ácidos nucleicos alvos, (isto é, sondas de seqüência de captura, CSPs), e sondas de ácido nucleico
20 complementares a uma porção diferente dos ácidos nucleicos alvos, (isto é, sondas de seqüência de sinal, SSPs), em que ou a sonda ou o alvo é um RNA e o outro é um DNA, onde os híbridos DNA: RNA são detectados por agentes de ligação específicos dos híbridos DNA: RNA, que são diretamente ou indiretamente rotulados, assim detectando os ácidos nucleicos alvos. Os SSPs
25 não são limitados a servir como somente um meio para produzir um sinal para detecção, mas podem ser usados na etapa de enriquecimento do alvo por hibridização do ácido nucleico alvo, permitindo a captura com um agente de ligação específico dos híbridos DNA: RNA.

Em ainda outra forma de realização, uma pluralidade de ácidos

nucleicos alvos são detectados por: hibridização de uma pluralidade de ácidos nucleicos alvos em sondas de ácido nucleico que são complementares aos ácidos nucleicos alvos, formando híbridos DNA: RNA, captura dos híbridos DNA: RNA com anticorpos específicos dos híbridos DNA: RNA, conjugados a suportes sólidos, remoção dos ácidos nucleicos alvos não ligados e sondas de ácido nucleico, amplificação dos ácidos nucleicos alvos capturados ou sondas de ácido nucleico, formando uma pluralidade de amplicons, usando iniciadores aleatórios e DNA polimerase, em que a presença da pluralidade de amplicons é indicativa da presença dos ácidos nucleicos alvos; hibridização das sondas de ácido nucleico complementares a uma porção das seqüências de ácidos nucleicos alvos, formando híbridos DNA: RNA entre alvos e sondas; hibridização dos oligonucleotídeos conjugados a um suporte sólido em uma porção diferente ácidos nucleicos alvos, em que o suporte sólido é selecionável, seleção dos complexos de oligonucleotídeos, e detecção da pluralidade de ácidos nucleicos alvos por ligação dos agentes de ligação específicos dos híbridos DNA: RNA para os híbridos DNA: RNA.

Em outra forma de realização, um ou mais DNAs são detectados por um método multiplex tendo as etapas de: hibridização de uma pluralidade de DNAs alvos em sondas de RNA que são complementares aos DNAs alvos, formar híbridos DNA: RNA, captura dos híbridos DNA: RNA com anticorpos específicos para híbridos DNA: RNA que são conjugados a contas, remover os ácidos nucleicos não ligadas e sondas de ácido nucleico por lavagem dos ácidos nucleicos e sondas em excesso, amplificação isotermicamente dos DNAs alvos usando iniciadores aleatórios e DNA polimerase, formar uma pluralidade de amplicons, hibridização de sondas de RNA complementares a uma porção dos DNAs alvos (isto é, SSPs), formação de híbridos DNA: RNA, hibridização de oligonucleotídeos de DNA específicos para uma porção diferente dos DNAs alvos, em que os oligonucleotídeos de DNA são conjugados a contas selecionáveis, e detecção

de pluralidade de DNAs alvos por ligação de anticorpos específicos para híbridos DNA: RNA rotulados detectavelmente para os híbridos DNA: RNA e seleção do DNA alvo usando contas conjugadas a oligonucleotídeos selecionáveis (isto é, CSPs), em que os anticorpos específicos para híbridos DNA: RNA são rotulados de modo detectável e distinguível. A presença de cada alvo é detectada pelo anticorpo DNA: RNA rotulado através de SSPs que forma híbridos DNA: RNA com o alvo, enquanto os vários alvos são separados ou selecionados com base em conta conjugada a oligonucleotídeo (isto é CSP). A presença de amplicon e híbridos DNA: RNA é indicativa da presença dos DNAs alvos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção provê um método para enriquecer, amplificar e detectar a presença de ácido nucleico ou uma pluralidade de ácidos nucleicos nas amostras de teste. Mais especificamente, a invenção provê um método altamente específico e sensível que é capaz de discriminar entre e detectar seqüências de ácido nucleico altamente homólogas.

Uma forma de realização da invenção é dirigida a métodos sensíveis, rápidos, para a detecção multiplex de seqüências de ácidos nucleicos alvos, em que uma pluralidade de diferentes seqüências de ácido nucleico alvo podem ser detectadas simultaneamente. Este método pode ser automatizado. O método essencialmente compreende três etapas: enriquecimento do alvo, amplificação do alvo, e detecção do alvo, que apresenta uma abordagem semiquantitativa ou qualitativa para diagnóstico de ácido nucleico. Esta forma de realização da invenção pode ser realizada em formato multiplex detectando as seqüências de ácido nucleico alvo em amostras purificadas ou não purificadas, onde uma concentração do alvo pode ser tão baixa como cerca de 50 cópias ou menos por mililitro de amostra a cerca de 100 cópias do alvo, a tão alto como 10^8 cópias por mililitro. A detecção de patógenos individuais ou alvos em amostra biológica, como mas

não limitado aos tipos HSV e HPV, pode ser realizada em multiplex, preferivelmente mas não limitado a 50 -plexes.

5 Como é benéfico, este método multiplex de detecção de uma pluralidade de seqüências de ácidos nucleicos alvos é um método relativamente rápido, sensível e preciso, tendo dois níveis de especificidade que é um aspecto vantajoso de testes clínicos. Os dois níveis de especificidade são obtidos nas etapas de enriquecimento e de detecção do alvo usando seqüências específicas para o alvo.

10 O enriquecimento do alvo é a primeira etapa que prepara a amostra para amplificação por separação de ácidos nucleicos não específicos e contaminantes do alvo específico. A presença de seqüências de ácido nucleico não específicas ou indesejáveis diminui a sensibilidade de amplificação do alvo por interferência com amplificação e detecção. A etapa do enriquecimento do alvo purifica a amostra de possíveis inibidores e
15 elimina os ácidos nucleicos não específicos assim provendo o primeiro nível de especificidade. A eliminação de ácidos nucleicos não específicos permite uma amplificação eficiente na etapa de amplificação isotérmica e assim minimiza a competição entre alvos homólogos. O enriquecimento do alvo também desnatura alvos de filamento duplo, criando DNA de filamento único
20 para uma amplificação eficiente. Vários reagentes pode ser usados na etapa de enriquecimento do alvo a fim de melhorar a captura do alvo. Por exemplo, subtilisinas podem ser usadas para melhorar a captura do alvo, especialmente em amostras clínicas que tem sangue. As subtilisinas ou carbonil hidrolases, são proteases alcalinas que são secretadas por membros do gênero *Bacillus*
25 Quando ácidos nucleicos alvos são capturados por contas, a presença de subtilisina leva as contas a formar grânulos firmes, assim melhorando a facilidade de lavar os materiais não ligados ou indesejáveis. Além disso, a etapa de enriquecimento do alvo igualmente concentra ácido nucleico alvo em um volume pequeno.

O enriquecimento do alvo é obtido por misturação de um ácido nucleico alvo, um agente de ligação específico para híbridos DNA: RNA, como sonda de ácido nucleico que é complementar ao ácido nucleico alvo, por exemplo uma sonda de seqüência sinal, e um suporte sólido, onde o ácido nucleico alvo com o agente de ligação específico dos híbridos DNA: RNA hibridiza para formar um híbrido DNA: RNA em um suporte sólido, e removendo quaisquer ácidos nucleicos que não formam um híbrido DNA: RNA ou não são capturados em um suporte sólido.

Particularmente, a separação do ácido nucleico alvo desejado e o ácido nucleico não específico é obtida pela formação de híbridos DNA: RNA que são capturados em um suporte sólido ou fase sólida, como, por exemplo, contas paramagnéticas modificadas com agentes de ligação específicos de híbridos DNA: RNA como, mas não limitados a anticorpos específicos para híbridos DNA: RNA (por exemplo anticorpo HYBRID CAPTURE, HC-Ab) anticorpos monoclonais ou policlonais, ou fragmentos dos mesmos, proteínas, RNase H cataliticamente inativo, ácidos nucleicos, aptâmeros de ácido nucleico, ou oligonucleotídeos tendo a capacidade de ligar e formar uma estrutura triplex. A afinidade de ligação de RNase H para híbridos DNA: RNA na ausência de Mg^{2+} e catálise via ressonância de plasmon de superfície é relatada por Haruki et al ["Kinetic and stoichiometric analysis for the binding of Escherichia coli ribonuclease HI to RNA-DNA hydrids using surface plasmon resonance", J. Biol. Chem. 272: 22015-22022, 1997, incorporado aqui por referência]. Esta etapa de enriquecimento do alvo pode ser realizada em qualquer suporte sólido, como placas de microtitulação, microchips, contas, contas paramagnéticas / não paramagnéticas, ou qualquer uma das fases sólidas previamente mencionadas. Por exemplo, DNA alvo, sonda de RNA, ou conjunto de diferentes sondas de RNA (se em uma reação multiplex) e contas ligadas com anticorpos - HC DNA: RNA conjugados são misturados. Os DNAs alvos e sondas de RNA forma os híbridos DNA: RNA.

Os anticorpos HC DNA: RNA são conjugados a suportes sólidos, como contas paramagnéticas. Uma vez que os híbridos DNA: RNA são capturados sobre os suportes sólidos, todas as seqüências de ácido nucleico não ligado e contaminantes são lavados, preferivelmente por lavagens repetidas usando
5 tampões que não degradam ou afetam os híbridos.

Como uma alternativa ou adição ao uso de anticorpos específicos para híbridos DNA: RNA, oligonucleotídeos ou polinucleotídeos de qualquer comprimento que são complementares para os alvos conjugados a uma fase sólida podem ser usados para capturar as seqüências de ácidos
10 nucleicos alvos. Por exemplo, os oligonucleotídeos ou sondas que reconhecem um tipo de HPV específico podem ser conjugados a uma fase sólida, como uma placa, lâmina ou conta. Várias contas conjugadas a sondas específicas e conhecidas formam um conjunto de contas. Por exemplo, cada conjunto de contas é específico para um tipo de HPV. Em um formato
15 multiplex, os conjuntos de contas múltiplas que identificam vários tipos de HPV, um tipo de HPV por conjunto de conta, pode ser usado. Os oligonucleotídeos utilizáveis na captura do ácido nucleico alvo podem ser ácidos nucleicos travados parciais ou completos (LNA), ácidos nucleicos peptídeo (PNA), ou ter outras modificações [*Current Protocols in Nucleic*
20 *Acid Chemistry*, Ed. Serge L. Beaucage, et al, John Wiley & Sons 2004]. A sonda de ácido nucleico pode ter um comprimento de até cerca de 100% do comprimento do ácido nucleico alvo, e estar na faixa de cerca de 50 bases a cerca de 10 quilobases em comprimento. O ácido nucleico alvo pode ser ou DNA ou RNA. Se o ácido nucleico alvo for RNA, então cDNA pode ser
25 gerado do RNA alvo por qualquer método bem conhecido, ou o RNA alvo pode ser capturado por uma sonda de DNA, onde a sonda de DNA hibridizado será amplificada e detectada.

A etapa de enriquecimento do alvo não é limitada pelas formas de realização descritas aqui. Um versado na técnica irá entender como

purificar um ácido nucleico alvo em uma amostra de modo que contaminantes, inibidores e outros ácidos nucleicos não específicos são removidos ou eliminados da amostra baseada nos princípios aqui descritos. As preparações de amostra são conhecidas e entendidas na técnica através de métodos comercialmente disponíveis e kits, como os kits de preparação mini ou maxi de plasmídeos, kits de extração de géis, kits de purificação de DNA e RNA. Estes podem ser usados para facilitar a etapa de enriquecimento de alvo em algumas circunstâncias onde uma sensibilidade menor é aceitável.

Após o enriquecimento do alvo, a amostra sofre amplificação de ácido nucleico. A amplificação do alvo isotérmica de ácidos nucleicos usando iniciadores de oligonucleotídeos de seqüências aleatórias e uma DNA polimerase com atividade de deslocamento do filamento se dirige a muitas limitações como, mas não inclusive, de capacidades multiplex limitadas e amplificação não uniforme de PCR multiplex. As seqüências amplificadas, ou amplicons, são identificados através de hibridização para os oligonucleotídeos específicos da seqüência. A amplificação igualmente pode ser realizada com os alvos individuais em vez de em um formato multiplex e amplicons podem ser combinados para o teste de hibridização.

DNA polimerase pode ser usada para estender os iniciadores e ativar o deslocamento do filamento. Alternativamente, se uma sonda de DNA for usada para capturar o RNA alvo, então a sonda de DNA hibridizada é amplificada e detectada. Outra forma de realização refere-se a RNA alvo de transcrição reversa para produzir cDNA, como o alvo de DNA, que pode ser capturado como descrito acima. Esta segunda etapa preferivelmente usa amplificação isotérmica de um ácido nucleico alvo. Especificamente, os iniciadores de oligonucleotídeos de seqüência aleatória e uma DNA polimerase tendo atividade de deslocamento de filamento podem ser usados na amplificação isotérmica. Em uma forma de realização, um suporte sólido ou fase como, mas não limitado a contas magnéticas, que tem um ácido

nucleico alvo capturado pode ser usado diretamente em uma mistura de amplificação. Os alvos de DNA podem ser amplificados usando quaisquer DNA polimerases (incluindo mas não limitados a phi29 DNA polimerase, Bst DNA polimerase, T4 DNA polimerase, T7 DNA polimerase, e DNA polimerase I), que são iniciadas com iniciadores aleatórios.

Os iniciadores aleatórios podem ter uma relação específica de monômeros dG, dC, dT e dA para eficiência ótima. Uma ou duas bases de nucleotídeos podem ser completamente omitidas para desempenho ótimo. A reunião de iniciadores aleatórios não precisa incluir todas as seqüências possíveis. As seqüências incluídas na reunião também não precisam estar em concentrações equimolares. De fato, as reuniões de iniciador aleatório podem incluir um subconjunto de seqüências de iniciadores seletivos para doenças particulares. O comprimento pode variar de cerca de 4 a cerca de 20 nucleotídeos, e preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 8 nucleotídeos. O comprimento pode depender da relação de monômero dentro do iniciador. Uma temperatura de amplificação ótima varia entre cerca de 25 °C e cerca de 70°C, preferivelmente cerca de 28 °C a cerca de 40°C, dependendo do comprimento dos iniciadores que podem ser determinados por um versado na técnica e sem indevida experimentação. A temperatura ótima pode ser estimada por uso de software comercialmente disponível que prevê a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. Um exemplo deste programa comercialmente disponível é OLIGO TM versão 6.0 ou 6.41 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO). Por exemplo, o DNA alvo pode ser amplificado durante 2 h com iniciadores pentâmeros em combinação com phi29 DNA polimerase.

Os iniciadores pentâmeros, por exemplo, são protegidos da degradação de exonuclease por modificações. As ligações fosforotioato ou grupos 2' -O-metila podem ser incluídos na estrutura dos iniciadores. A reação de amplificação preferivelmente ocorre durante 1-3 h dependendo da

sensibilidade requerida, que é substancialmente mais curta do que a duração dos protocolos publicados para as reações de phi29 DNA polimerase. [Gary J. Vora, et al, *Applied and Enviromental Microbiology*, 70(5), 3047- 3054, 2004, incorporado aqui por referência). Uma fórmula única de reagentes combinados com a etapa de enriquecimento de alvo selecionada e a etapa de detecção de alvo permite o tempo de amplificação relativamente curto.

A etapa de amplificação de alvo da invenção preferivelmente usa amplificação isotérmica que permite: a amplificação de um número ilimitado de alvos com uma eficiência uniforme, amplificação da seqüência completa, não um fragmento como é o caso da reação de cadeia polimerase (PCR), e permite a detecção do alvo mesmo se uma parte da seqüência alvo na amostra biológica for removida. Por exemplo, a região L1 é com freqüência deletada em HPV, no entanto, usando uma sonda de hibridização para as regiões L1 e E (MH Einstein e GN Goldberg, *Câncer Invest.* 20: 1080- 1085, 2002), as seqüências deletadas podem ser ainda detectadas com o mesmo nível de sensibilidade, assim permitindo a detecção do alvo mesmo se parte da seqüência estiver ausente. A amplificação isotérmica multiplex pode ser realizada em uma temperatura na faixa de cerca de 25 °C a cerca de 40°C com um tempo de reação na faixa de 1 a 3 h. Os exemplos não limitativos de amplificação isotérmica incluem amplificação do círculo rolante ([Lizardi P., Huang X., Zhu Z., Bray- Ward P., Thomas D., Ward D. "Mutation detection and single molecule counting using isothermal rolling circle amplification" *Nat. Genet.* 1998, 19:225-232]; amplificação com deslocamento múltiplo [Little M., et al. "Strand displacement amplification and homogenous real-time detection incorporated in a second generation probe system" *Chn. Chem.* 1999, 45:777-784]; and protein-primed DNA amplification [Blanco M., Lazaro J., de Vega M., Bonnin A., Salas M. "Terminal protein-primed DNA amplification" *Proc. Natl. Acad. ScL USA*, 1994, 91:12198-12202]. Outras formas de realização de amplificação de alvo incluem as onde o alvo é

liberado do suporte sólido antes de sua adição à mistura de amplificação. Os modos não limitativos para liberar o ácido nucleico alvo incluem tratamento alcalino, incubação em alta temperatura, e tratamento com RNaseH. A fórmula singular de reagentes combinada com a etapa de enriquecimento de alvo e a etapa de detecção de alvo selecionadas permite o uso do tempo de amplificação relativamente curto. Os reagentes para amplificação isotérmica podem ser realizadas simultaneamente com amplificação do alvo, opcionalmente incluindo RNaseH, que deveria aumentar o número de sítios de iniciação no DNA alvo. Estes métodos permitem a desnaturação assim como a liberação do suporte sólido permitindo uma amplificação do alvo mais eficiente.

A próxima etapa envolve a detecção de seqüências de ácido nucleico alvo individuais dentro do ácido nucleico amplificado. A sensibilidade e especificidade desta etapa geralmente depende da eficiência de amplificação. A detecção e elucidação do ácido nucleico alvo é realizada por hibridização de porções diferentes do produto alvo amplificado, ou amplicons, para sondas de seqüência de captura individuais que são conjugadas a um suporte sólido e sondas específicas complementares à seqüência alvo formando um complexo alvo. A hibridização de diferentes porções da seqüência de ácido nucleico de alvo com duas sondas provê dois níveis de especificidade, assegurando a detecção e a identificação de um alvo específico em uma amostra.

Os oligonucleotídeos ou sondas de seqüência de captura conjugadas a um suporte sólido, preferivelmente contas, que são selecionáveis, são utilizáveis na obtenção de um nível de especificidade. A hibridização dos CSPs para os ácidos nucleicos alvos amplificados seguido por seleção subsequente das contas, permite a separação do complexo alvo das entidades não ligadas ou parcialmente ligadas. Os CSPs são geralmente adicionados em quantidades excessivas a fim de assegurar a ligação.

Preferivelmente, os CSPs e SSPs não tem seqüências de sobreposição; no entanto, é possível realizar o método em uma forma de realização onde os CSPs e SSPs tem seqüências de sobreposição complementares à seqüência de ácido nucleico alvo.

5 As sondas de seqüência de captura (CSP) ou oligonucleotídeos podem ser conjugadas ou fixadas em uma fase sólida, suporte sólido, ou matriz sólida que inclui, por exemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno, policarbonato ou qualquer material plástico sólido na forma de placas, lâminas, discos, contas, partículas, porções, filamentos, chips, tiras,
10 microplacas, e microarranjos. Uma fase sólida igualmente inclui contas de vidro, tubos de teste de vidro, e qualquer outro produto de vidro apropriado. Uma fase sólida funcionalizada como plástico ou vidro que foi modificado de modo que a superfície contém grupos carboxila, amino, hidrazida, aldeído, ácido nucleico ou derivados de nucleotídeos, também podem ser usados.
15 Qualquer fase sólida, como plástico, metal, micropartículas magnéticas ou de vidro, contas, tiras, tubos de teste, lâminas, filamentos, chips, microchips, ou placas de microtitulação podem ser usados.

 As sondas de seqüência de captura ou oligonucleotídeos são sondas de ácido nucleico que compreendem pelo menos 8 bases,
20 preferivelmente 15 a 100 bases, e mais preferivelmente 20 a 40 bases. As sondas de seqüência de captura são preferivelmente identificáveis, ou por seus locais conhecidos em um suporte sólido, como uma placa de subcavidade, ou quando, por exemplo, conjugadas a sondas, por um corante colorido distinto. Os meios para a identificação das sondas de seqüência de captura são bem
25 conhecidos na técnica, e são exemplificados no presente relatório.

 A hibridização para as sondas específicas de seqüência que podem ser fixadas ao suporte sólido não somente permite a identificação dos alvos específicos, mas também provê um segundo nível de especificidade para o teste, tornando-o um teste clínico mais confiável. Se se requerer uma

menor sensibilidade, a amplificação do sinal não é necessária e a detecção usando oligonucleotídeos (sinal) ou polinucleotídeos fixados no repórter (biotina, fluoróforo, enzima, etc), podem ser usados. Pode-se ter mais de um oligonucleotídeo de detecção por alvo. Tanto os oligonucleotídeos de captura
5 como de detecção podem ser adicionalmente modificados, por exemplo PNA, LNA, etc. As sondas de oligonucleotídeos ou ácido nucleico podem ter um comprimento na faixa de cerca de 15 bases a cerca de 10 quilobases, ou até 100% do comprimento do alvo.

Uma sonda de sequência de sinal (SSP) pode ser um RNA não rotulado, que é usado para formar um híbrido DNA: RNA reconhecido por,
10 por exemplo, um agente de ligação específico para híbrido rotulado durante a etapa de detecção. Porque SSP não é rotulado, ele não cria um ruído de fundo quando não ligado ao alvo, assim resultando em maior especificidade. Um sinal amplificado por aproximadamente 400 vezes pode ser obtido se, por
15 exemplo, o tamanho da sonda de RNA sinal for de 8 quilobases (kb) e cada anticorpo liga a 20 bases. Como previamente descrito, geralmente, a sonda de sequência de sinal compreende pelo menos 15 bases, mas pode ser até ou maior do que cerca de 1000 bases, preferivelmente entre cerca de 15 a 100 bases. Outros exemplos não limitativos de uma sonda de sequência de sinal
20 incluem sonda de RNA rotulado e sonda de DNA rotulado. A hibridização não é limitada a regiões de não sobreposição, mas pode de fato incluir regiões de sobreposição. A detecção do complexo híbrido DNA: RNA ligado a um suporte sólido pode ser realizada em um formato multiplex usando, por exemplo, um anticorpo rotulado PE, contas distinguíveis carboxiladas, e
25 detectadas por citometria de fluxo.

Uma forma de realização para a detecção do alvo (ou amplicon) utiliza um arranjo à base de líquido. Os arranjos de contas são comercialmente disponíveis e nesta forma de realização são preferíveis os arranjos de contas de poliestireno carboxilado. Cada cavidade de uma placa

de 96 cavidades, por exemplo, tem uma mistura de conjuntos de contas. Um 13-plex tem 13 conjuntos de contas onde cada conjunto de contas tem uma "assinatura" específica e a assinatura é provida por corantes que estão dentro de cada conta. A relação destes corantes é específica para cada conjunto de conta, e permite a diferenciação entre cada conjunto de contas. As sondas de seqüência de captura (CSPs) ou oligonucleotídeos específicos para um ácido nucleico alvo são aplicados ou conjugados a um conjunto de contas particular. Quando o alvo é hibridizado para os CSPs conjugados a contas ou oligonucleotídeos, a seleção de um conjunto de contas particular e então a detecção ocorre usando a sonda de ácido nucleico complementar e o agente de ligação específico do híbrido DNA: RNA rotulado. A seleção ou separação pode ser realizada em um citômetro de fluxo onde as contas prosseguem uma a uma através de dois lasers: uma das mesmas seleciona a assinatura sobre a conta, enquanto a outra detecta o alvo como identificado pelos agentes de ligação específicos do híbrido DNA: RNA rotulado. Deste modo, os alvos múltiplos podem ser diferenciados e detectados. Adicionalmente, o reagente DNA: RNA rotulado permite uma detecção de sinal melhorada, assim aumentando tanto a especificidade como a sensibilidade do teste.

Uma outra forma de realização do arranjo de contas à base de líquido da presente invenção usa placas de subcavidade. Uma placa de subcavidade é uma placa de microtitulação, tendo, por exemplo, 96 cavidades primárias, onde cada cavidade primária individual é subdividida de em um número de subcavidades. A placa de subcavidade como uma plataforma para multiplex foi previamente descrita (A. Roda et al, *Clin Chem.* 46: 1654- 1660, 2002, incorporado aqui por referência). No entanto, a plataforma de subcavidade, como previamente usada e descrita, tem uso limitado devido ao problema de "interferência cruzada" entre diferentes subcavidades. No entanto, a plataforma de subcavidade modificada descrita aqui essencialmente elimina o problema de "interferência cruzada" entre diferentes subcavidades

pelo uso de máscaras. Cada subcavidade preferivelmente tem uma sonda de sequência de captura específica do alvo conhecida fixada à cavidade. Os ácidos nucleicos alvos podem ser adicionados à cavidade primária, onde o ácido nucleico alvo hibridiza para sua sonda de ácido nucleico complementar, isto é, sonda de sequência de sinal. Os híbridos DNA: RNA são formados entre uma porção do ácido nucleico alvo e a sonda de sequência de sinal. A sonda de sequência de captura liga a uma porção diferente do ácido nucleico alvo, assim capturando o híbrido DNA: RNA na fase sólida. A detecção do ácido nucleico alvo ocorre como previamente descrito usando sondas de ácido nucleico complementares que hibridizam para o ácido nucleico alvo, e os anticorpos específicos do híbrido DNA: RNA rotulado, por exemplo e pela sonda de sequência de captura conhecida. A amplificação de sinal e o uso de uma máscara que atua como uma tampa para eliminar a "interferência cruzada" entre as subcavidades permitem, ambos, a detecção específica e sensível de ácidos nucleicos alvos com um ruído de fundo mínimo.

Uma ampla variedade de métodos estão disponíveis que podem ser usados para a detecção e identificação da sequência alvo incluindo, mas não limitados a hibridização dot blot, hibridização de blot reverso, em membrana de náilon, hibridização de arranjos de lâminas, arranjos de chips, arranjos de contas, arranjos no fundo de placas de múltiplas cavidades, ou outros. Os exemplos não limitativos de suportes sólidos para hibridização incluem arranjos de contas (por exemplo, produtos de arranjos de contas de fontes comercialmente disponíveis), arranjos de lâminas, arranjos de placas (por exemplo arranjos no fundo de cada cavidade de uma placa de microtitulação), placas de sub- cavidades, (placa de microtitulação que tem 16-64 subcavidades pequenas dentro de cada cavidade), e arranjos de eletrodos como o sistema GenOHM (GeneHom Sciences, Inc.). Drummond et al, *Nature Biotech*, 21: 1192 - 1199 (2003). Os tipos diferentes de repórteres podem ser implementados para gerar sinais para detecção através de, por

exemplo, fluorescência, quimioluminescência, e nanopartículas de ouro. Como previamente discutido, os meios de detector podem incluir fluorescência, qualquer sinal com base em enzima, sinais quimiluminescentes ou colorimétricos, difusão de luz com partículas de ouro, e outros.

- 5 Em uma forma de realização, um repórter pode ser fixado a um agente de ligação específica de híbrido, como mas não limitado a anticorpos específicos para híbridos DNA: RNA (HC-Ab), proteínas, RNase H cataliticamente inativo, ácidos nucleicos, aptâmeros de ácido nucleico ou oligonucleotídeos tendo a capacidade de ligar e formar uma estrutura triplex.
- 10 Cada agente de ligação rotulado liga a um segmento de nucleotídeo para o híbrido DNA: RNA, por exemplo pelo menos 20 nucleotídeos em comprimento, provendo uma amplificação de sinal.

- Uma outra forma de realização da invenção para a detecção multiplex de uma pluralidade de DNA alvo em uma amostra não purificada
- 15 compreende as seguintes etapas: 1) desnaturar o DNA alvo para criar uma seqüência alvo de filamento único, 2) adicionar as sondas de RNA e contas magnéticas, onde as contas foram previamente conjugadas a anticorpos que são específicos para híbridos, 3) remover quaisquer alvos não ligados e contaminantes por lavagem, 4) realizar a amplificação isotérmica dos alvos
- 20 capturados durante um período de tempo relativamente curto, como por exemplo 1-3 h, na presença de DNA polimerase e outros reagentes para iniciar a amplificação e formação de amplicons, 4) desnaturar os amplicons para criar seqüências de filamento único, 5) hibridizar o alvo amplificado para oligonucleotídeos conjugados a um suporte sólido (sondas de captura) como
- 25 contas ou uma placa de microtitulação, e para uma sonda de seqüência de sinal, e 6) detectar a presença ou ausência de cada DNA alvo por diferenciação dos alvos com base em aspectos de sonda de captura e detectar o complexo da sonda de seqüência de sinal.

 Em uma forma de realização da invenção, a hibridização de

um alvo e sonda pode ocorrer simultaneamente com a etapa de captura por um agente de ligação de híbrido enquanto na mesma mistura e em uma temperatura elevada. A temperatura elevada durante o processo completo pode permitir um aumento na especificidade da captura do alvo, enquanto
5 diminuindo o tempo de reação. Deve-se entender que condições de hibridização / lavagem de estringência alta, moderada e elevada podem ser variadas usando uma variedade de ingredientes, tampões e temperaturas bem conhecidos e praticados pelo versado na técnica. Para condições de estringência adicionais, ver, T. Maniatis et al, Molecular Cloning, A
10 Laboratoy Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982). A hibridização e captura em uma etapa podem ser mais eficientes do que realizar a hibridização e a captura seqüencialmente, dependendo das condições globais do teste.

Um método de detecção dos ácidos nucleicos alvos de
15 interesse na presença de outros ácidos nucleico, por enriquecimento do alvo, amplificação do alvo e detecção do alvo, provê um método rápido e sensível para simultaneamente detectar os alvos múltiplos na mesma amostra de reação. Este método é utilizável em aplicações diagnósticas clínicas para a identificação, muitos estados doentios, por exemplo, seja um paciente
20 infectado com o papilomavírus humanos (HPV) e determinar qual tipo ou tipos de HPV específicos o paciente tem, a fim de melhor diagnosticar e tratar o paciente. Outras doenças relacionadas com os ácidos nucleicos específicos são prontamente bem conhecidas na técnica e podem ser identificáveis usando o método de detecção descrito na invenção.

25 Qualquer fonte de ácido nucleico, em forma purificada ou não purificada, pode ser usada como a amostra de teste. Por exemplo, a amostra de teste pode ser um alimento ou produto agrícola, ou uma amostra clínica humana ou veterinária. Tipicamente, a amostra de teste é um fluido biológico como urina, sangue, plasma, soro, esputo ou outro. Alternativamente, a

amostra de teste pode ser uma amostra de tecido que se suspeita transporte um ácido nucleico de interesse. O ácido nucleico alvo na amostra de teste pode estar presente inicialmente como uma molécula discreta de modo que a seqüência a ser detectada constitui o ácido nucleico completo, ou pode
5 somente ser um componente de uma molécula maior. Não é necessário que a seqüência de ácido nucleico seja detectada como presente inicialmente em forma pura. A amostra de teste pode conter uma mistura complexa de ácidos nucleicos, dos quais o ácido nucleico alvo pode corresponder a um gene de interesse contido em DNA ou RNA genômico humano total ou uma porção da
10 seqüência de ácido nucleico de um organismo patogênico cujo organismo é um componente menor de uma amostra clínica.

O ácido nucleico alvo em uma amostra de teste pode ser DNA ou RNA como RNA mensageiro, de qualquer fonte, incluindo bactérias, levedura, vírus e as células ou tecidos de organismos superiores como plantas
15 ou animais. O alvo também pode ser um cDNA sintetizado do RNA por transcrição reversa. Os métodos para a extração e/ou purificação destes ácidos nucleicos são bem conhecidos na técnica. Os ácidos nucleicos alvos podem ser de filamento duplo ou filamento único. Em uma forma de realização do presente método, os ácidos nucleicos alvos são de filamento único ou
20 tornados de filamento único por técnicas de desnaturação convencionais antes das etapas de hibridização e amplificação do método. Em uma forma de realização, uma técnica de desnaturação de base ou temperaturas elevadas são usadas para desnaturar o DNA alvo de filamento duplo.

O termo "oligonucleotídeo" como o termo é usado aqui refere-se a uma molécula de ácido nucleico composta de dois ou mais
25 deoxiribonucleotídeos ou ribonucleotídeos. Um oligonucleotídeo desejado pode ser preparado por qualquer método apropriado, como purificação de um ácido nucleico de ocorrência natural, por meio biológico molecular, ou por síntese de novo. Os exemplos não limitativos de oligonucleotídeos e sondas

de ácido nucleico são descritos aqui.

As sondas de ácido nucleico são seqüências de ácido nucleico que hibridizam para seqüências de DNA ou RNA complementares em uma amostra de teste. A detecção da sonda indica a presença de uma seqüência de ácido nucleico particular na amostra de teste. As sondas de ácido nucleico podem ser detectadas diretamente ou indiretamente. Em uma forma de realização, o método HYBRID CAPTURE específico de alvo emprega dois tipos de sondas de seqüência de ácido nucleico: sonda de seqüência de captura (CSP) e sonda de seqüência de sinal (SSP).

Uma sonda de seqüência de captura ou oligonucleotídeo compreende uma seqüência de ácido nucleico que é capaz de hibridizar em uma região (ões) única(s) de um ácido nucleico alvo e sendo capturada em uma fase sólida ou que permite a captura da seqüência de ácido nucleico alvo. O CSP usado no método de detecção pode ser DNA, RNA, ácidos nucleicos de peptídeo (PNAs) ou outros análogos de ácido nucleico. PNAs são oligonucleotídeos em que a estrutura dorsal do açúcar-fosfato é substituída com uma estrutura dorsal de poliamida ou "pseudopeptídeo". Em uma forma de realização preferida, o CSP é DNA. O CSP tem um comprimento mínimo de pelo menos 8 bases, preferivelmente entre 15 e 100 bases, e mais preferivelmente entre 20 e 40 bases. O CSP é substancialmente complementar a uma seqüência de ácido nucleico alvo em que CSP hibridiza. A seqüência de um CSP é preferivelmente pelo menos 75% complementar à região de hibridização alvo, mais preferivelmente 100% complementar a esta seqüência. Também prefere-se que CSP contenha menos do que ou igual a 75% de identidade de seqüência, mais preferivelmente menos que 50% de identidade de seqüência, para seqüências não alvo indesejáveis que se acredita estejam presentes em uma amostra de teste. A seqüência dentro de um ácido nucleico alvo ao qual um CSP liga é preferivelmente pelo menos cerca de 12 bases, mais preferivelmente 20-40 bases. As seqüências de ácido nucleico alvo em

que CSP hibridiza são preferivelmente seqüências únicas ou seqüências específicas de grupo. As seqüências específicas de grupo são seqüências relacionadas múltiplas que formam grupos discretos. Por exemplo, os CSPs podem conter seqüências que reconhecem tipos de papilomavírus específicos como, mas não limitados a HPV-16, HPV-18 e HPV-31.

Em uma forma de realização, o CSP usado no método de detecção pode conter uma ou mais modificações no ácido nucleico que permite a captura específica da sonda sobre uma fase sólida. Por exemplo, o CSP pode ser modificado por etiquetagem do mesmo com pelo menos um ligando por métodos bem conhecidos do versado na técnica incluindo, por exemplo, translação -nick, incorporação fotoquímica ou química. Além disso, o CSP pode ser etiquetado em posições múltiplas com um ou tipos múltiplos de rótulos. Por exemplo, o CSP pode ser etiquetado com biotina, que liga a estreptavidina; ou digoxigenina, que liga a uma anti-digoxigenina; ou 2,4-dinitrofenol (DNP), que liga a anti-DNP. Os fluorogênios podem ser também usados para modificar as sondas. Os exemplos de fluorogênios incluem fluoresceína e derivados, ficoeritrina, alo- ficocianina, ficocianina, rodamina, Vermelho Texas ou outros fluorogênios registrados. Os fluorogênios são geralmente fixados por modificação química e ligam a um anticorpo específico de fluorogênio, como anti- fluoresceína. Será entendido pelo versado na técnica que o CSP também pode ser etiquetado por incorporação de uma base modificada contendo qualquer grupo químico reconhecível por anticorpos específicos. Outras etiqueta e métodos de etiquetar seqüências de nucleotídeo para captura em uma fase sólida revestida com substrato são bem conhecidas do versado na técnica. Um estudo de rótulos de ácido nucleico pode ser encontrado em artigo por Landegren et al, "DNA Diagnostics Molecular Techniques and Automation", Science, 242: 229-237 (1988), incorporado aqui por referência. Em outra forma de realização, o CSP é etiquetado com biotina em ambas as extremidades 5' e 3' de seqüência de

nucleotídeos. Em outra forma de realização, o CSP não é modificado, mas é capturado em uma matriz sólida devido às seqüências contidas no CSP capazes de hibridização na matriz.

O SSP usado no método de detecção pode ser DNA ou RNA.

- 5 Uma sonda de seqüência de sinal compreende uma seqüência de ácido nucleico que é capaz de hibridizar em regiões de um ácido nucleico alvo que são adjacentes a regiões únicas reconhecidas pelo CSP. Em uma forma de realização particular da invenção, o SSP e o ácido nucleico alvo formam um híbrido DNA: RNA. Assim, nesta forma de realização, se o ácido nucleico
- 10 alvo for um DNA, então o SSP preferido é um RNA. Similarmente, se o ácido nucleico alvo for RNA, então o SSP preferido é um DNA. O SSP é geralmente pelo menos 15 bases de comprimento. No entanto, o SSP pode ter até ou mais do que 1000 bases de comprimento. Os SSPs mais longos são preferidos. O SSP pode compreender um fragmento de ácido nucleico único,
- 15 ou fragmentos de ácidos nucleicos menores múltiplos cada tendo preferivelmente entre 15 a 100 bases de comprimento.

- As seqüências de CSP e SSP são selecionadas de modo que não hibridizam na mesma região de um ácido nucleico alvo ou para cada uma. A seqüência de SSP e a seqüência de CSP que correspondem às regiões de
- 20 uma seqüência de ácido nucleico alvo, podem ser modificadas a fim de eliminar a competição entre CSP e SSP. Por exemplo, o SSP pode ter deleções de que o CSP não inclui. Além disso, os CSPs e os SSPs são selecionados para hibridizar em regiões do alvo dentro, por exemplo, de 50.000 bases um para o outro. A distância entre a seqüência para a qual CSP
- 25 hibridiza dentro do ácido nucleico alvo e a seqüência à qual o SSP hibridiza está preferivelmente entre cerca de 1 e 50.000 bases. Mais preferivelmente, a distância entre CSP e SSP em um ácido nucleico alvo é menor que 3000 bases, e mais preferivelmente a distância é menor que 1000 bases.

Em outra forma de realização, uma porção do SSP usado no

método de detecção forma um híbrido DNA: RNA com uma sequência de ácido nucleico alvo de filamento único, que é detectada por agentes de ligação específicos para híbrido DNA: RNA, e outra porção do SSP é capaz de hibridizar para o ácido nucleico alvo. O SSP pode ser preparado por primeiro

5 clonagem de uma sequência de DNA de filamento único complementar a sequências dentro do ácido nucleico alvo em um vetor de DNA de filamento único, então hibridizando RNA complementar à sequência de vetor de DNA para gerar um híbrido DNA: RNA. Por exemplo, se M13 for usado como o vetor de DNA, M13 RNA é hibridizado na sequência M13 DNA no vetor para

10 gerar um híbrido DNA: RNA. O SSP resultante forma uma porção de híbrido DNA: RNA assim como uma porção de filamento único capaz de hibridizar em sequências dentro do ácido nucleico alvo. O DNA de filamento único deve ter pelo menos 10 bases de comprimento, e pode ter até ou mais do que 1000 bases de comprimento. Alternativamente, a porção de híbrido DNA: RNA do SSP pode ser formada durante ou após a reação em que a porção de

15 filamento único do SSP é hibridizada no ácido nucleico alvo. O SSP pode ser linear, circular ou uma combinação de duas ou mais formas. A porção de híbrido DNA: RNA do SSP provê sinais amplificados para a detecção de híbridos capturados usando, por exemplo, anticorpos específicos de híbrido DNA: RNA, que são rotulados ou são reconhecidos por uma entidade

20 rotulada, como aqui descrito.

Em ainda outra forma de realização, o SSP usado no método de detecção é uma molécula que não contém sequências que são capaz de hibridizar para o ácido nucleico alvo. Nesta forma de realização, as sondas de

25 ponte, compreendendo sequências capazes de hibridização para o ácido nucleico alvo, assim como as sequências capazes de hibridizar para o SSP, são usadas. As sondas de ponte podem ser DNA, RNA, ácidos nucleicos peptídeo (PNAs) ou outros análogos de ácido nucleico.

Em uma outra forma de realização, uma porção do SSP e uma

sonda de ácido nucleico complementar formam um híbrido DNA: RNA e uma porção de filamento único do SSP contém seqüências complementares para seqüências dentro de uma sonda de ponte. A sonda de ponte, que é capaz de hibridizar para tanto o ácido nucleico alvo como o SSP, serve como um intermediário para conectar o SSP ao ácido nucleico alvo. O híbrido DNA: RNA é detectado por um agente de ligação específica do híbrido DNA: RNA que pode ser rotulado ou é detectado por uma entidade rotulada. O CSP hibridiza em uma porção diferente da seqüência de ácido nucleico alvo, assim capturando o alvo, sonda de ponte, e complexo de híbrido DNA: RNA em um suporte sólido ou fase. O SSP pode ser preparado como descrito acima.

Em outra forma de realização, o SSP usado em um método de detecção de ácido nucleico alvo compreende conjuntos múltiplos de seqüências de repetição que são complementares a uma seqüência de RNA de filamento único capaz de hibridizar em uma sonda de ponte. Uma sonda de oligonucleotídeo de DNA contendo seqüências complementares à seqüências de repetição pode ser usada para hibridizar no SSP para gerar o duplex DNA: RNA necessário para a amplificação do sinal.

Em ainda outra forma de realização, a sonda de ponte contém uma cauda poli(A) além das seqüências que são capazes de hibridizar no ácido nucleico alvo. O SSP usado neste exemplo compreende seqüências de DNA poli(dT). A sonda de ponte é assim capaz de hibridização em SSP via sua cauda poli(A). Uma sonda de RNA compreendendo seqüências poli(A) pode ser usada para hibridizar nas seqüências de DNA poli(dT) restantes dentro de SSP para formar um híbrido DNA: RNA. O SSP compreendendo seqüências poli (dT) e a sonda de RNA compreendendo seqüências poli (A) são preferivelmente de 100 a 5000 bases de comprimento.

O SSP usado nos métodos de detecção de seqüências de ácido nucleico alvo da presente invenção pode ser não modificado ou modificado como com o CSP usando métodos descritos acima e/ou bem conhecidos na

técnica. Em uma forma de realização preferida, o SSP é uma sonda covalentemente não modificada.

Entende-se que CSPs e/ou SSPs múltiplos podem ser empregados no método de detecção da invenção.

5 Em outra forma de realização, uma sonda de oligonucleotídeos compreendendo seqüências complementares de duas ou mais regiões distintas do ácido nucleico alvo são fusionadas juntas e usadas como a sonda de seqüência de captura no método da invenção. Alternativamente, uma única sonda pode ser projetada e produzida que contém seqüências complementares
10 a ácidos nucleicos alvos únicos ou múltiplos. Este tipo de sonda é também referido aqui com CSP fusionado". A sonda de seqüência de captura fusionada trabalha tão efetivamente como a combinação de dois CSPs não fusionados quando usados na mesma concentração.

 As sondas de ácido nucleico da invenção podem ser
15 produzidas por qualquer método apropriado bem conhecido na técnica, incluindo, por exemplo, síntese química, isolamento de uma fonte de ocorrência natural, produção recombinante e PCR assimétrico. (McCabe, 1990, in *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, CA, Academic Press, 76-83). Pode ser preferido quimicamente sintetizar as
20 sondas em um ou mais segmentos e subseqüentemente ligar os segmentos, como pode ser o caso para preparar um microarranjo de oligonucleotídeos em um microchip. Vários métodos de síntese química são descritos por Narang et al (1979 *Meth. Enzymol.* 68:90), Brown et al (1979 *Meth. Enzymol.* 68 109) e Caruthers et al (1985 *Meth. Enzymol.* 154: 287), todos incorporados aqui por
25 referência. Alternativamente, os métodos de clonagem podem prover um fragmento de ácido nucleico conveniente que pode ser isolado para uso como um iniciador de promotor. Uma sonda de DNA de filamento duplo é primeiro tornada de filamento único usando, por exemplo, métodos de desnaturação convencionais antes da hibridização para os ácidos nucleicos alvos.

A hibridização é conduzida sob condições de hibridização padrões bem conhecidas do versado na técnica. As condições de reação para hibridização de uma sonda para uma seqüência de ácido nucleico variam de sonda a sonda, dependendo de fatores como o comprimento da sonda, o número de nucleotídeos G e C na seqüência, e a composição do tampão usado na reação de hibridização. As condições de hibridização moderadamente estridentes são geralmente entendidas pelos versados na técnica como condições de aproximadamente 25 °C abaixo da temperatura de fusão de um DNA de filamento duplo de pares de bases perfeitos. Uma maior especificidade é geralmente obtida por emprego de condições de incubação tendo maiores temperaturas, em outras palavras, condições mais estridentes. O Capítulo 11 do manual de laboratório bem conhecido de Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1990), incorporado aqui por referência) descreve condições de hibridização para sondas de oligonucleotídeos em maiores detalhes, incluindo uma descrição dos fatores envolvidos e o nível de estridência necessário para garantir a hidrogênio com especificidade. A hibridização é tipicamente realizada em uma solução aquosa tamponada, para a qual condições como temperatura, concentração de sal, e pH, são selecionadas para prover estridência suficiente como que as sondas hibridizam especificamente para suas seqüências de ácido nucleico alvo respectivas mas não para qualquer outra seqüência.

Geralmente, a eficiência de hibridização entre a sonda e o alvo melhora sob condições onde a quantidade de sonda adicionada é um excesso molar para o gabarito, preferivelmente um excesso molar de 2 a 10^6 , mais preferivelmente um excesso molar de 10^3 a 10^6 . A concentração de cada CSP provida para uma captura eficiente é pelo menos 25 fmols/ ml (25 pM) na solução de hibridização final, preferivelmente entre 25 fmols para 10^4 fmols / ml (10 nM). A concentração de cada SSP é pelo menos 15 ng/ml na solução

de hibridização final, preferivelmente 150 ng/ ml. A tabela A mostra a conversão de concentrações de SSP expressas em ng/ml para a base molar.

Tabela A

Conversão de concentração SSP de ng/ml para fmoles/ml		
Concentração SSP em ng/ml	Concentração SSP em fmoles/ml (pM)	
	SSP é um 3kb RNA	SSP é um 5kb RNA
15 ng/ml	15,1	9
150 ng/ml	151	90
600 ng/ml	606	364

A hibridização do CSP e SSP para o ácido nucleico alvo na etapa de detecção pode ser realizada simultaneamente ou sequencialmente em e qualquer ordem. Em uma forma de realização, a hibridização do CSP e hibridização do SSP para o ácido nucleico alvo são realizadas simultaneamente. Em uma forma de realização, o híbrido DNA: RNA formado pode ser então capturado em uma fase sólida. A fase sólida pode ser revestida com um substrato ao qual o ligando fixado ao CSP liga com especificidade. Uma proteína da sequência de ácido nucleico alvo e o SSP formam um híbrido DNA: RNA, enquanto outra proporção da sequência de ácido nucleico alvo hibridiza a um CSP que é fixado a uma fase sólida. Em outra forma de realização, a hibridização do SSP para o ácido nucleico alvo é realizada após a hibridização do CSP para o ácido nucleico alvo. Neste caso, o CSP pode ser imobilizado em uma fase sólida antes ou após a hibridização. Tanto o CSP como a sequência de ácido nucleico alvo podem ser ligados à fase sólida durante a reação de hibridização de SSP.

Será entendido pelo versado na técnica que uma fase sólida, suporte sólido, ou matriz sólida, pode ser usado de modo interpermutável e inclui, por exemplo, vidro, silicone, metal, nitrocelulose, poliestireno, polietileno, polipropileno, policarbonato ou qualquer material plástico sólido na forma de placas, lâminas, discos, contas, microcontas, partículas, micropartículas, porções, tubos de teste, lâminas, filamentos, chips, microchips, tiras, membranas, microplacas, placas de microtitulação com subcavidades e microarranjos. Uma fase sólida também inclui contas de vidro,

tubos de teste de vidro e qualquer outro produto de vidro apropriado. Uma fase sólida funcionalizada como plástico ou vidro que pode ser modificada de modo que a superfície contém grupos carboxila, amino, hidrazida, aldeído, derivados de ácido nucleico ou de nucleotídeos também podem ser usada.

5 Em uma forma de realização, o CSP é rotulado com biotina, e fase sólida revestida com estreptavidina ou revestida com avidina é empregada para capturar o híbrido. Em outra forma de realização, as placas de microtitulação revestidas com estreptavidina ou microplacas são usadas. Estas placas podem ser revestidas de modo passivo ou covalente. Uma outra forma
10 de realização usa placas de microtitulação onde cada cavidade individual tem várias subcavidades, onde um CSP é individualmente fixado em cada subcavidade. Outra forma de realização emprega CSPs ligados a contas por qualquer um dos métodos bem conhecidos e comumente usados de ligação, como espaçadores e ligadores. Quando o CSP é conjugado a um suporte
15 sólido, o CSP pode ser usado para capturar e/ou selecionar para o ácido nucleico alvo ao qual ele é complementar.

O híbrido DNA: RNA capturado pode ser detectado por meios convencionais bem conhecidos na técnica. O híbrido DNA: RNA pode ser detectado diretamente ou indiretamente usando um agente de ligação
20 específica para híbrido DNA: RNA rotulado ou distinguível, como um anticorpo monoclonal ou policlonal rotulado, ou fragmento do mesmo, específico para o híbrido DNA: RNA, um anticorpo específico para um ou mais ligandos fixados no SSP, um anticorpo rotulado ou uma modificação detectável no próprio SSP.

25 Um método preferido detecta o híbrido capturado usando um anticorpo específico do híbrido DNA: RNA. Nesta forma de realização, o anticorpo específico do híbrido DNA: RNA é preferivelmente rotulado com uma enzima, uma molécula fluorescente, ou um conjugado biotina- avidina, e é preferivelmente não radioativo. O rótulo pode ser detectado diretamente ou

indiretamente por meios convencionais bem conhecidos na técnica como um colorímetro, um luminômetro, ou detector de fluorescência. Um rótulo preferido é, por exemplo, fosfatase alcalina. Outros rótulos bem conhecidos do versado na técnica podem ser usados como um meio de detectar o híbrido de filamento duplo ligado. A detecção é realizada por métodos convencionalmente usados na técnica, por exemplo, colorimetria ou quimioluminescência como descrito em Coutlee et al., *Clin. Microbiol.* 27: 1002- 1007 (1989), incorporado aqui por referência. Preferivelmente, o conjugado de fosfatase alcalina ligado é detectado por quimioluminescência por adição de um substrato que podem ser ativados por fosfatase alcalina. Os substratos quimioluminescentes que são ativados por fosfatase alcalina são bem conhecidos na técnica.

A detecção de híbridos DNA: RNA é preferivelmente obtida por ligação do agente de ligação específico para o híbrido DNA: RNA conjugado, como mas não limitado a anticorpo específico para híbrido DNA: RNA, para o híbrido DNA: RNA durante uma etapa de incubação. Em uma forma de realização, o anticorpo específico para híbrido DNA: RNA é conjugado a uma fase sólida, pressão uma conta paramagnética. Por colocação das contas paramagnéticas conjugadas aos anticorpos específicos do híbrido DNA: RNA sob uma força magnética, assim capturando os híbridos DNA: RNA, as superfícies podem ser então lavadas para remover quaisquer anticorpos em excesso e outros materiais não hibridizados. Esta etapa enriquece ou purifica a sequência de ácido nucleico alvo. Estas técnicas de enriquecimento de alvo são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, lavagens manuais podem ser realizadas usando ou pipetadores ou seringas de repetição, uma bomba simples regulada por um variostato, ou por fluxo por gravidade de um reservatório com uma tubulação fixada. Os sistemas de lavagem com tubos comercialmente disponíveis também podem ser usados.

Os exemplos não limitativos de sondas de sequência de

captura usadas na invenção incluem as tendo seqüências para HSV-1, seqüências para HSV-2. CSPs para HPV incluem as tendo SEQ ID NO: 1-64. Os tipos de HPV que são englobados por estas seqüências incluem HPV16, HPV18, HPV26, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, 59, HPV66, HPV68, HPV73, e HPV82, vários sendo HPVs de alto risco.

Em ainda outra forma de realização, o método emprega sondas de bloqueador além de CSP e SSP. Uma sonda de bloqueador compreende seqüências que são substancialmente complementares a seqüências de CSP. A seqüência de uma sonda de bloqueador é preferivelmente pelo menos 75% complementar à seqüência de CSP, mais preferivelmente 100% complementar à CSP. A adição de sondas de bloqueador para a mistura de reação de hibridização evita que CSP não hibridizado hibridize para seqüências de ácido nucleico reativas cruzadas presentes no alvo e assim aumenta a especificidade da detecção. A sonda de bloqueador é geralmente pelo menos cerca de 5 bases a cerca de 12 bases. Em uma forma de realização da invenção, a concentração da sonda de bloqueador na reação de hibridização está preferivelmente em excesso da de CSP e SSP. Preferivelmente, a sonda de bloqueador está presente em cerca de um excesso molar de 2 vezes, apesar de que pode estar presente em até um excesso molar de 10.000 vezes. As sondas de bloqueador podem ser DNA, RNA, peptídeo, ácidos nucleicos não específicos (PNAs), ou outros análogos de ácido nucleico.

Em uma forma de realização, as sondas de bloqueador complementares ao comprimento completo ou comprimento quase completo de CSP são usadas. Após a reação em que o híbrido entre CSP, SSP e o ácido nucleico alvo é formado, uma ou mais sondas de bloqueador pode ser adicionada à reação e a hibridização é continuada durante um tempo desejado. Os produtos de hibridização são então detectados como descrito acima.

Em outra forma de realização, as sondas de bloqueador complementares a somente uma porção do CSP e mais curtas do que CSP são usadas. Estas sondas de bloqueador têm temperaturas de fusão mais baixas do que CSPs. Preferivelmente, a temperatura de fusão da sonda de bloqueador é de 10 graus menor do que a de CSP. Nesta forma de realização, a sonda de bloqueador é preferivelmente adicionada aos ácidos nucleicos alvos simultaneamente com o CSP e SSP. Porque a sonda de bloqueador tem uma temperatura de fusão menor do que o CSP, a temperatura inicial para a hibridização é selecionada de modo que a sonda de bloqueador não interfere com a hibridização dos CSP para suas seqüências de alvo. No entanto, quando a temperatura das misturas de hibridização é ajustada abaixo da temperatura usada para a hibridização do alvo, a sonda de bloqueador hibridiza para o CSP e efetivamente bloqueia o CSP da hibridização para as seqüências de ácido nucleico reativas cruzadas. Por exemplo, quando os produtos de hibridização são incubados em temperatura ambiente em uma placa de microtitulação revestida com estreptavidina durante a captura do híbrido, as sondas de bloqueador podem ser adicionadas. Os exemplos não limitativos de sondas de bloqueador são encontrados na tabela 2.

Os seguintes exemplos ilustram o uso do presente método de amplificação e teste e kit de detecção. Estes exemplos são oferecidos a título de ilustração, e não se destinam a limitar o escopo da invenção de qualquer modo. Todas as referências descritas aqui são expressamente incorporadas *in toto* por referência.

EXEMPLO 1

25 Protocolo de teste HYBRID CAPTURE (TSHC) específico para alvo

As partículas virais de vírus de herpes simplex 1 (HSV-1) e vírus de herpes simples 2 (HSV-2) de concentração conhecida (Advanced Biotechnologies, Inc. Columbia, MD) ou amostras clínicas foram diluídas usando ou meio de controle negativo (Digene Corp. Gaithersburg, MD) ou

amostras cervicais negativas (Digene Corp.). Várias diluições foram feitas e divididas em alíquotas em tubos de microcentrífuga individuais. Um meio-volume de reagente de desnaturação 5100- 0431 (Digene Corp.) foi adicionado. As amostras de teste foram incubadas a 65 °C durante 45 min para permitir a desnaturação de ácidos nucleicos nas amostras.

Após desnaturação, uma solução de hibridização contendo sondas de seqüência de sinal (SSPs) (600 ng/ml cada) e sondas de seqüência de captura (CSPs) (2,5 pmols/ml cada) foram adicionadas à amostras, e incubadas a 74 °C durante 1 h. As sondas de bloqueador em uma solução contendo um volume de 4 x diluente de sonda (Digene Corp.), um volume de reagente de desnaturação e dois volumes de meio de controle negativo foram então adicionadas à mistura de hibridização e incubadas a 74 °C durante 15 minutos.

Em uma segunda série de experiências, após a desnaturação de ácidos nucleicos, uma mistura de hibridização contendo SSPs (600 ng/ml cada, CSPs (2,5 pmols/ ml cada) e sondas de bloqueador (250 pmols/ ml cada), foram adicionadas às amostras e incubadas a 74 °C durante 1 h.

Os tubos contendo mistura de reação foram resfriados a temperatura ambiente durante 5 min, e alíquotas foram tomadas de cada tubo e transferidas para cavidades individuais de uma placa de captura de estreptavidina de 96 cavidade (Digene Corp.) As placas foram agitadas a 1100 rpm a temperatura ambiente durante 1 h. Os sobrenadantes foram então decantados e as placas lavadas duas vezes com tampão de lavagem SNM (Digene Corp.) e invertidas brevemente para remover tampão de lavagem residual. O reagente DR-1 de anticorpo anti- RNA /DNA de fosfatase alcalina foi então adicionado a cada cavidade e incubado a temperatura ambiente durante 30 min. As cavidades foram então submetidas a etapas de lavagem múltiplas que incluem: 1) três lavagens com tampão de lavagem Sharp (Digene Corp.) em temperatura ambiente, 2) incubação da placa com o

tampão de lavagem Sharp a 60°C durante 10 min em bloco quente, 3) duas lavagens com o tampão de lavagem Sharp em temperatura ambiente e 4) uma lavagem com o tampão de lavagem SNM (Digene Corp.) em temperatura ambiente. Após a remoção do líquido residual, o substrato luminescente 5100-0350 (Digene Corp.) foi adicionado a cada cavidade e incubado a temperatura ambiente durante 15 min. As cavidades individuais foram então lidas em um luminômetro de placa para obter o sinal de unidade de luz relativa (RLU).

As soluções contendo meios de controle negativo ou amostras cervicais negativas HSV conhecidas foram usadas como controles negativos para as amostras de teste. A relação de sinal para ruído (S/N) foi calculada como a relação de RLU médio obtido de uma amostra de teste para o RLU médio do controle negativo. A relação de sinal para ruído foi usada como a base para a determinação da eficiência de captura e a detecção de ácidos nucleicos alvos. Um valor S/N de 2 ou maior foi designado arbitrariamente como um sinal positivo enquanto que um valor S/N menor do que 2 foi considerado negativo. O coeficiente de variação (CV) que é uma determinação da variabilidade da experiência dentro de um conjunto de amostra foi calculado tomando-se o desvio padrão das réplicas, dividindo o mesmo pela média e multiplicando este valor por 100 para dar um valor percentual.

As sondas de seqüência de captura e as sondas de bloqueador usadas nas experiências foram sintetizadas usando o método descrito por Cook et al (1988, *Nucl. Acid. Res.* 16: 4077- 95). Salvo indicado em contrário, as sondas de seqüência de captura usadas nas experiências descritos aqui foram rotuladas com biotinas em suas extremidades 5' e 3'.

As sondas de seqüência de sinal usadas nas experiências são sondas de RNA. Estas sondas foram preparadas usando o método descrito por Yisraeli et al (1989, *Methods in Enzymol.* 180: 42-50).

Todos os CSPs foram testados para suas capacidades

específicas de tipo em testes HYBRID CAPTURE específica de tipo, aqui descritos. Os seguintes CSPs, isto é, SEQ ID NO: 36-56, não mostram propriedades reativas cruzadas com outros tipos e foram aceitos para uso no teste.

5

Tabela 1 - Sondas de sequência de captura para HPV

Sonda	Sequência	Tamanho (bp)	Tipo de HPV e localiz. da sequência
ZL-1	GTACAGATGGTACCGGGGTTGTAGAAAGTATCTG [SEQ ID NO:1]	33	HPV16 5360-5392
ZL-4	CTGCAACAAGACATACATCGACCGGTCCACC [SEQ ID NO:2]	31	HPV16 495-525
DP-1	GAAGTAGGTAAGGCTGCATGTGAAGTGGTAG [SEQ ID NO:3]	31	HPV16 5285-5315
DP-4	CAGCTCTGTGCATAACTGTGGTAACTTTCTGGG [SEQ ID NO:4]	33	HPV16 128-160
SH-1	GAGGTCTTCTCCAACATGCTATGCAACGTCCTG [SEQ ID NO:5]	33	HPV31 505-537
SH-4	GTGTAGGTGCATGCTCTATAGGTACATCAGGCC [SEQ ID NO:6]	33	HPV31 5387-5419
VS-1	CAATGCCGAGCTTAGTTTCATGCAATTTCCGAGG [SEQ ID NO:7]	33	HPV31 132-164
VS-4	GAAGTAGTAGTTGCAGACGCCCTAAAGGTTGC [SEQ ID NO:8]	33	HPV31 5175-5207
AH-1	GAACGCGATGGTACAGGCACTGCAGGGTCC [SEQ ID NO:9]	30	HPV18 5308-5337
AH-2	GAACGCGATGGTACAGGCACTGCA [SEQ ID NO:10]	24	HPV18 5314-5337
AL-1	ACGCCCACCCAATGGAATGTACCC [SEQ ID NO:11]	24	HPV18 4451-4474
PA-4	TCTGCGTCGTTGGAGTCGTTCCGTGCTGCTC [SEQ ID NO:12]	32	HPV18 535-566
18-1AB	(TTATTATTA)CTACATACATTGCCGCCATGTTCC CCA [SEQ ID NO:13]	36	HPV18 1369-1395
18-2AB	(TTATTATTA)TGTTGCCCTCTGTGCCCCCGTTGTC	46	HPV18

Sonda	Sequência	Tamanho (bp)	Tipo de HPV e localiz. da sequência
	TATAGCCTCCGT [SEQ ID NO:14]		1406-1442
18-3AB	(TTATTATTA)GGAGCAGTGCCCAAAAGATTAAAGTTTGC [SEQ ID NO:15]	38	HPV18 7524-7552
18-4AB	(TTATTATTA)CACGGTGCTGGAATACGGTGAGGGGGTG [SEQ ID NO:16]	37	HPV18 3485-3512
18-5AB	(TTATTATTA)ACGCCACCCAATGGAATGTACCC [SEQ ID NO:17]	33	HPV18 4451-4474
18-6AB	(TTATTATTA)ATAGTATTGTGGTGTGTTTCTCACA T [SEQ ID NO:18]	35	HPV18 81-106
18-7AB	(TTATTATTA)GTTGGAGTCGTTCTCTGTCGTG [SEQ ID NO:19]	30	HPV18 538-558
18-8AB	(TTATTATTA)CGGAATTTCATTTTGGGGCTCT [SEQ ID NO:20]	31	HPV18 634-655
PE-1	GCTCGAAGGTCTGTCGCTGAGCTTTCTACTACT [SEQ ID NO:21]	33	HPV18 811-843
PZ-2	GCGCCATCCTGTAATGCACCTTTCCACAAAGC [SEQ ID NO:22]	32	HPV45 77-108
PZ-5	TAGTGCTAGGTGTAGTGGACGCAGGAGGTGG [SEQ ID NO:23]	31	HPV45 5295-5325
CS-1	GGTCACAACATGTATTACACTGCCCTCGGTAC [SEQ ID NO:24]	32	HPV45 500-531
CS-4	CCTACGTCTGCGAAGTCTTTCTTGGCGTGCC [SEQ ID NO:25]	31	HPV45 533-563
PF-1	CTGCATTGTCACTACTATCCCCACCACTACTTTG [SEQ ID NO:26]	34	HPV45 1406-1439
PF-4	CCACAAGGCACATTCATACATACACGCACGCA [SEQ ID NO:27]	32	HPV45 7243-7274
PA-1	GTCTAAGGTCTCTGCGGAGCTCTCTACTGTA [SEQ ID NO:28]	33	HPV45 811-843
45-5AB	(TTATTATTA)TGCGGTTTTGGGGGTGCACGTGGA GGC [SEQ ID NO:29]	36	HPV45 3444-3470
45-6AB	(TTATTATTA)AGACCTGCCCCCTAAGGGTACATA GCC [SEQ ID NO:30]	36	HPV45 4443-4469
45-8AB	(TTATTATTA)CAGCATTGCAGCCTTTGTGTTACTT GCTTGTAATAGCTCC [SEQ ID NO:31]	49	HPV45 1477-1516
45-9AB	(TTATTATTA)ATCCTGTAATGCACCTTTCCACAAA [SEQ ID NO:32]	34	HPV45 79-103
45-10AB	(TTATTATTA)GCCTGGTCACAACATGTATTAC [SEQ ID NO:33]	31	HPV45 514-535
45-11AB	(TTATTATTA)CAGGATCTAATTCATTCTGAGGTT [SEQ ID NO:34]	33	HPV45 633-656
ON-1	TGCGGTTTTGGGGGTGACGTGGAGGC [SEQ ID NO:35]	27	HPV45 3444-3470
ZZ-1	GGCGCAACCACATAACACACAGAACCACAAAAC [SEQ ID NO:36]	33	HPV18 5285-5315
DXA-1	GTTCTACACGGGTTTGACGACGATCAACAACG [SEQ ID NO:37]	33	HPV33 1175-1207
PRA-1	CGCTGCTTGTTGGTGGTGGTTATCGTTGTCTG	32	HPV33

Sonda	Sequência	Tamanho (bp)	Tipo de HPV e localiz. da sequência
	[SEQ ID NO:38]		3389-3420
TT-1	GACGTAGTGTGCGCCTCACATTACAAACAGGAC [SEQ ID NO:39]	32	HPV35 732-763
TT-7	CTCGCTTGGTGGGGTTGTAGGGGAGCTCGG [SEQ ID NO:40]	30	HPV35 3432-3461
NH-1	GCTGTAGTTGTGCGCAGAGTATCCCGTGAGG [SEQ ID NO:41]	30	HPV39 833-862
FT-7	GTGAGCCTGTGTTATATGTAGTGCCCGAATCCC [SEQ ID NO:42]	33	HPV39 5358-5390
SHA-4	CCACCTCCTGCGTCCACTACACCTAGCACTA [SEQ ID NO:43]	31	HPV45 5295-5325
SHA-1	TGCGTGCGTGTATGTATGAATGTGCCTTGTGG [SEQ ID NO:44]	32	HPV45 7243-7274
OCA-1	AATTAGCGCATTGCCCGTCCAACGTCCCG [SEQ ID NO:45]	30	HPV51 482-511
TAA-7	CGCCGTGCACGTGTAGCCACCATATTTAATCAC [SEQ ID NO:46]	33	HPV51 4124-4156
LFA-1	CGAATTGTGTGAGGTGCTGGAAGAATCGGTGC [SEQ ID NO:47]	32	HPV52 140-171
PTA-7	GATCGTTCACAACTTTTACCTGCACCGGATCC [SEQ ID NO:48]	32	HPV52 5066-5097
ZOA-1	CTAGGTTCTCTAGATGTTTGTCTCCAGCACCCC [SEQ ID NO:49]	33	HPV56 521-553
NAA-4	CTGTGCGTATTGTCTGTGTCGCTGATGTGTG [SEQ ID NO:50]	31	HPV56 3543-3573
LA-1	GATACACACACATTTGCAGCCCGGTCCACACA [SEQ ID NO:51]	32	HPV58 1180-1211
LA-7	GGTGGCAAAGGACGTATGTAGTGCGAGAGGAC [SEQ ID NO:52]	32	HPV58 5376-5407
ZV-4	GCGTTGCGGAGGGGTATGATAGTTGCTCAGAAO [SEQ ID NO:53]	33	HPV59 3385-3417
ZV-10	GTCTAGGCGTGTAGGAGGAAACAAGATGGGG [SEQ ID NO:54]	31	HPV59 7543-7573
PNA-1	CTGAACACAGCAGTTCTCTATACCAATGGCGCTA TTTC [SEQ ID NO:55]	38	HPV68 81-118
PNA-4	TTGGTTGCCCCCTGAGCAGTCGGACCCTATGGATA [SEQ ID NO:56]	34	HPV68 5211-5244
CDA-4	GCGCCGCATTGCTGCACCTCGTTTATATAGCAGG GCATTTTC [SEQ ID NO:57]	42	HPV82 4827-4868
CDA-11	CCTGGCGCATGTCATACACACCACATTACTC [SEQ ID NO:58]	31	HPV82 7596-7626
CTA-1	CACGAAGTGTCAGTGCACAGTATGCCTTGC [SEQ ID NO:59]	30	HPV73 6006-6045
CTA-16	GOCATGTACTTCACAACTGTTAATACTGGTGAT TGTCCTC [SEQ ID NO:60]	40	HPV73 720-749
DLA-14	CCTACACAGTACAAGTGGAGGCCATCACCCG [SEQ ID NO:61]	31	HPV26 3566-3596
RBA-16	GTCGTGACACATACTGTGTAAACCATAGTTAAAC	39	HPV26

Sonda	Sequência	Tamanho (bp)	Tipo de HPV e localiz. da sequência
BNA-1	ACAGG [SEQ ID NO:62]	41	7759-7797
	GCTGTCTCCCTGTCTTCCTGTGTATTGTTATAAG TGTATT [SEQ ID NO:63]		HPV66 1051-1092
DLA-32	GTACAGCACTAAAATGGAGTTTGGTGTGTTACTA TAGTGCATAC [SEQ ID NO:64]	44	HPV66 7420-7464

- Sequências em parêntese são sequências de "cauda" não dirigidas a HSV.

Tabela 2 Sondas de bloqueador para HPV

SONDA	SEQUÊNCIA	TAM- NHO	CSP ao qual se liga
PA-6	ACTCCAACGACGCAGA [SEQ ID NO:65]	16	PA-4
ZZ-2	TTTGTGGTTCTGTGTG [SEQ ID NO:66]	17	ZZ-1
ZZ-3	TTATGTGGTTGCCG [SEQ ID NO:67]	14	ZZ-1
DXA-2	CGTGTGTGATCGTGC [SEQ ID NO:68]	15	DXA-1
DXA-3	TGCAAACCCGTGTAG [SEQ ID NO:69]	15	DXA-1
PRA-2	CAGACAACGATAACCG [SEQ ID NO:70]	16	PRA-1
PRA-3	ACCACCACAAGCAGC [SEQ ID NO:71]	15	PRA-1
TT-2	GTCTGTGTGTAATGTG [SEQ ID NO:72]	17	TT-1
TT-3	AAGCGACACTACGTC [SEQ ID NO:73]	15	TT-1
TT-8	CGAGCTCCCTACAA [SEQ ID NO:74]	15	TT-7
TT-9	CCCCACCAAGCGA [SEQ ID NO:75]	13	TT-7
NH-2	CCTCACGGGATACTC [SEQ ID NO:76]	15	NH-1
NH-3	TGCGACAACCTACAGC [SEQ ID NO:77]	15	NH-1
FT-8	GGATTCGGGCACTA [SEQ ID NO:78]	14	FT-7
FT-9	CATATAACACAGGCTCAC [SEQ ID NO:79]	18	FT-7
SHA-5	TAGTGCTAGGTGTAGTGG [SEQ ID NO:80]	18	SHA-4
SHA-6	ACGCAGGAGGTGG [SEQ ID NO:81]	13	SHA-4
SHA-2	TACATACCGCACGCA [SEQ ID NO:82]	16	SHA-1
SHA-3	CCACAAGGCACATTCA [SEQ ID NO:83]	16	SHA-1
TAA-8	GCTACACGTGCACGGCG [SEQ ID NO:84]	17	TAA-7
TAA-9	GTGATTAAATATGGTGG [SEQ ID NO:85]	17	TAA-7
OCA-2	GGGACGTTGGACG [SEQ ID NO:86]	13	OCA-1
OCA-3	GGCAATGCGCTAAT [SEQ ID NO:87]	14	OCA-1
LFA-2	CACCGATTCTTCCAG [SEQ ID NO:88]	15	LFA-1
LFA-3	CACCTCACACAATTCC [SEQ ID NO:89]	16	LFA-1
PTA-8	GGATCCGGTGACG [SEQ ID NO:90]	13	PTA-7
PTA-9	GTAAAAGTTGTGAACGATC [SEQ ID NO:91]	19	PTA-7
ZOA-2	GCTGCTGGAGACAA [SEQ ID NO:92]	14	ZOA-1
ZOA-3	ACATCTAGAGAACCTAG [SEQ ID NO:93]	17	ZOA-1
NAA-5	CACACATCAGCGACA [SEQ ID NO:94]	15	NAA-4
NAA-6	CAGACAATACCGACAG [SEQ ID NO:95]	16	NAA-4
LA-2	TGTGTGGACCGGG [SEQ ID NO:96]	13	LA-1
LA-3	CTGCAAATGTGTGTGTAT [SEQ ID NO:97]	18	LA-1
LA-8	GTCTCTGCACTCACAT [SEQ ID NO:98]	17	LA-7
LA-9	ACGTCCTTTGCCAC [SEQ ID NO:99]	14	LA-7
ZV-5	TTCTGAGCAACTATCATAC [SEQ ID NO:100]	19	ZV-4

Tabela 2 Sondas de bloqueador para HPV

SONDA	SEQÜÊNCIA	TAMA- NHO	CSP ao qual se liga
ZV-6	CCCTCCGCAACG [SEQ ID NO:101]	12	ZV-4
ZV-11	CCCCATCTTGTITTC [SEQ ID NO:102]	15	ZV-10
ZV-12	TCCTACACGCCTAGAC [SEQ ID NO:103]	16	ZV-10
PNA-2	TATAGAGAACTGCTGTGTTG [SEQ ID NO:104]	20	PNA-1
PNA-3	GAAATAGCGCCATTG [SEQ ID NO:105]	15	PNA-1
PNA-5	CTCAGGGGCAACCA [SEQ ID NO:106]	14	PNA-4
PNA-6	ATCCATAGGGTCCGAC [SEQ ID NO:107]	16	PNA-4
CDA-5	CAATGCGGCGC [SEQ ID NO:108]	11	CDA-4
CDA-6	TATAAACGAGGTGCAG [SEQ ID NO:109]	16	CDA-4
CDA-7	GAAAAATGCCCTGCTA [SEQ ID NO:110]	15	CDA-4
CDA-12	ACATGCGCCAGG [SEQ ID NO:111]	12	CDA-11
CDA-13	GAGTAATGTGGTGTGTATG [SEQ ID NO:112]	19	CDA-11
CTA-2	GCAAGGCATACTGTG [SEQ ID NO:113]	15	CTA-1
CTA-3	CACTGACACTTCGTG [SEQ ID NO:114]	15	CTA-1
CTA-17	GGACAATCACCAGTATTA [SEQ ID NO:115]	18	CTA-16
CTA-18	AGTTTGTGAAGTACATGG [SEQ ID NO:116]	18	CTA-16
DLA-15	CGGGTGATGGCC [SEQ ID NO:117]	12	DLA-14
DLA-16	CCACTTGTACTGTGTAGG [SEQ ID NO:118]	18	DLA-14
RBA-17	CTGTGTTTAACTATGGGT [SEQ ID NO:119]	18	RBA-16
RBA-18	TACAACAGTATGTGTCAGAC [SEQ ID NO:120]	20	RBA-16
BNA-2	AAGACAGGGAGACAGC [SEQ ID NO:121]	16	BNA-1
BNA-3	CTTATAAACAATACACAGG [SEQ ID NO:122]	19	BNA-1
DLA-33	ATGCACTATAGTAACACACC [SEQ ID NO:123]	20	DLA-32
DLA-34	ACTCCATTTAGTGCTGTA [SEQ ID NO:124]	19	DLA-32

EXEMPLO 2

Efeito da distância entre o CSP e os sítios de alvo de SSP em eficiência de captura

- O efeito da distância entre os sítios de hibridização de sonda de sequência de captura (CSP) e a sonda de sequência de sinal (SSP) em um ácido nucleico de alvo de HSV-1 em eficiência de captura foi avaliado. CSPs que hibridizam para sequências de ácido nucleico de HSV-1 que estão localizadas 0,2 kb, 3 kb, 18 kb, 36 kb e 46 kb do sítio de hibridização de SSP foram testados. O método TSHC geral descrito no exemplo 1 foi empregado.
- As eficiências de captura foram 100%, 50%, 30%, 19% e 7%, respectivamente (tabela 3). Um declínio uniforme nas eficiências de captura relativas foi observado como a distância aumentou de 0,2 Kb a 46 Kb.

Tabela 3: Efeito de distância entre sítios alvos em eficiência de captura

CSP	SSP	Distância entre sítio alvo	Eficiência de captura relativa
BRH19	H19	0,2 Kb	100%
F15R	H19	3 Kb	50%
F6R	RH5B	18 Kb	30%
F15R	RH5B	36 Kb	19%
F6R	H19	46 Kb	7%

EXEMPLO 3

Eficiência de captura de vários CSPs e SSPs em detecção de TSHC de HSV-1

A eficiência de captura de sondas de sequência de captura (CSPs) para cada uma das quatro sondas de sequência de sinal específicas para HSV-1 (SSPs), H19, RH5B, RH3 e R10, na detecção de HSV-1 por TSHC foram avaliados. Os critérios usados para projetar as sondas de sequência de captura foram: 1) sítio de hibridização de CSP está em 1 kb ou 5' ou 3' do sítio de hibridização de SSP na sequência de ácido nucleico de HSV-1, preferivelmente em 0,5 kb, e 2) os CSPs contém sequências que são singulares para HSV-1, sem extensões de homologia de sequência para HSV-2 maiores do que 10 bases. Os CSPs foram projetados para marcar as regiões 5' e 3' adjacentes ao sítio de hibridização de SSP, preferivelmente com um 5' CSP e um 3' CSP para cada SSP. O software OMIGA comercialmente disponível (Oxford Molecular Group; Campbell, CA) foi útil na identificação de tais sítios. A temperatura de fusão (T_m) do CSPs foi projetada para estar entre 70°C a 85 °C. O método TSHC geral descrito no exemplo 1 foi empregado. Onze CSPs (que ligam a 6 sítios diferentes) para H19, seis CSPs (que ligam a três sítios singulares) para RH5B, seis CSPs (que ligam a seis sítios singulares) para RH3, e dois CSPs para R10 foram testados. Como mostrado na tabela 4, as sondas de sequência de captura eficientes foram encontrada para as sondas de sequência de sinal H19, RH5B e R10.

Tabela 4: CSPs e SSPs para detecção de TSHC de HSV-1

SSP	CSP	Cap%	SSP	CSP	Cap%	SSP	CSP	Cap%
R10	ON-3	100%	RH5B	TS-1	50%	H19	HZ-1	30%
R10	ON-3	80%	RH5B	NC-1	75%	H19	HZ-2	20%
			RH5B	VH-4	130%	H19	ZD-1	40%
			RH5B	TS-2	25%	H19	ZD-2	20%
			RH5B	VH-3	50%	H19	BRH19	70%
						H19	VH-2	70%
						H19	F15R	25%

EXEMPLO 4

25 Testes de amostras clínicas

Um painel de amostra clínica de 64 membros foi testado para HSV-1 e HSV-2 usando ambos TSHC e métodos de captura de híbridos (hc2™; Digene Corp.). O painel incluía 15 amostras contendo quantidades conhecidas de HSV-1 ou HSV-2, e 49 amostras conhecidas para serem negativas para HSV-1 e HSV-2 por teste PCR. Conseqüentemente, as 15 amostras positivas foram "esperadas" para testar positivo em ambos os testes HC2 e TSHC, e as 49 amostras negativas foram "esperadas" para testar negativo em ambos os testes HC2 e TSHC.

O método TSHC geral descrito no exemplo 1 foi empregado. Os resultados usando o método HC2 e o método TSHC são mostrados nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Dentre as 49 amostras "esperadas" para dar resultado negativo, 5 amostras testaram positivo e 44 amostras testaram positivo usando o método HC2. Em comparação, todas as 49 amostras testaram negativo usando o método TSHC. Assim, o método TSHC é superior em especificidade ao método HC2 na detecção de HSV-1 e HSV-2.

Tabela 5: Resultados observados versus esperados para detecção de HC2 de HSV1 e HSV2

Resultado HC2	Resultado esperado	
	Positivo	Negativo
Positivo	15	5
Negativo	0	44
Total	15	49

Tabela 6: Resultados observados versus esperados para detecção TSHC de HSV1 e HSV2

Resultado TSHC	Resultado esperado	
	Positivo	Negativo
Positivo	14	0
Negativo	1	49
Total	15	49

EXEMPLO 5

Efeito de combinar sondas em detecção de TSHC de HSV

O efeito de combinar sonda de sinal específica para HSV-1 e conjuntos de sonda de sequência de captura em detecção de HSV-1 foi

avaliado. A detecção de TSHC de reatividade cruzada de HSV-1 e HSV-2 foi realizada em separado com dois conjuntos diferentes de sonda de combinações de seqüência de sinal de RNA / sonda de seqüência de captura biotinilada (conjunto 1: H19 mais HZ-1; e conjunto 2: RH5b mais o TS-1 e TS-2). TSHC também foi realizado com ambos os conjuntos de seqüência de sinal de RNA / sonda de seqüência de captura biotinilada combinados para avaliar o efeito de combinar os dois conjuntos de sondas em sensibilidade e reatividade cruzada. O método TSHC geral descrito no exemplo 1 foi empregado. Os resultados mostrados na tabela 7 claramente demonstram um efeito aditivo de combinar os dois conjuntos de sonda para detecção de HSV-1 sem aumento aparente na reatividade cruzada de HSV-2.

Tabela 7: A sensibilidade é melhorada por combinação de CSPs específicos para HSV-1 e SSPs

Sondas de seqüência de captura	Sondas de seqüência de sinal	VP/ml	RLU	CV	S/N
HZ-1	H19	0	60	3%	1,0
HZ-1	H19	10 ⁵ HSV-1	267	4%	4,5
HZ-1	H19	10 ⁶ HSV-1	2316	6%	38,9
HZ-1	H19	10 ⁷ HSV2	49	2%	0,8
TS-1, TS-2	RH5B	0	78	6%	1,0
TS-1, TS-2	RH5B	10 ⁵ HSV-1	291	6%	3,8
TS-1, TS-2	RH5B	10 ⁶ HSV-1	2368	11%	30,6
TS-1, TS-2	RH5B	10 ⁷ HSV2	75	11%	1,0
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	0	70	12%	1,0
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 ⁵ HSV-1	457	10%	6,5
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 ⁶ HSV-1	4263	1%	60,9
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 ⁷ HSV2	67	6%	1,0

EXEMPLO 6

15 Detecção de tipos de HPV em formato multiplex

A detecção rápida, sensível e específica de 13 seqüências representando diferentes tipos de papilomavírus humano (HPV) em uma amostra biológica única foi realizada em formato multiplex. Este teste pode analisar até 96 amostras em um formato de microplaca de 96 cavidades em um período de tempo de 5 h. Pelo menos 500 cópias de um tipo de vírus podem ser detectadas em 5 após começar o teste.

As contas paramagnéticas de proteína G (Dynal Corp.; Brown

Deer, WI) e contas de carboxilato de Luminex® 100™ (Luminex Corp., Austin, TX) foram usadas como suportes sólido. RNA de HPV foi preparado por transcrição *in vitro* de plasmídeos de HPV como comumente entendido na técnica e descritos por Ausubel, et al. [*Current Protocols in Molecular Biology*, New York, Wiley Publishing, 1993, incorporado aqui por referência]. O teste novo tem três etapas incluindo 1) enriquecimento de alvo; 2) amplificação de alvo; e 3) detecção de alvo.

Enriquecimento de alvo:

Uma amostra foi preparada para amplificação por separação de DNA indesejado ou não específico e contaminantes de alvos específicos pré-selecionados. Esta etapa remove o DNA não desejado, cuja presença substancialmente diminui a sensibilidade de amplificação do alvo. O enriquecimento do alvo foi realizada por captura de híbridos DNA: RNA específicos da seqüência sobre contas paramagnéticas. As contas foram inicialmente modificadas com anticorpos específicos para híbridos RNA:DNA ou anticorpos HYBRID CAPTURE (Digene, Corp.). Mais especificamente, as contas paramagnéticas HC-Ab foram preparadas por misturar 1 mL de contas magnéticas Protein G ($2,7 \times 10^9$ contas/mL; Dynal, Corp.) com 375 µg de HC-Ab e incubando em temperatura ambiente em PBS durante 40 minutos formando complexos conta- anticorpo (conta-Ab). Os complexos conta-Ab foram acumulados no fundo da cavidade por colocação da placa sobre uma grade magnética (Dynal, Corp.) e lavados uma vez com 0,2 M de trietanolamina, pH 8,2. Os anticorpos foram reticulados em Protein G em um reagente de 20 mM de DMP/0,2 M de trietanolamina, pH 8,2 durante 30 minutos. Os complexos conta-Ab foram lavados 3X com 1 mL de PBS-0,05% de Tween 20. As contas foram então recolocadas em suspensão em 1 mL de PBS-Tween e armazenadas a 4 °C.

A amostra foi diluída em série com vários plasmídeos de HPV (10 kb) preparados em uma solução composta de 100 µg/ml DNA de esperma

de arenque, 1 M de guanidina - HCl, 10 mM de Tris - HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio em água deionizada. Cada uma das amostras diluídas (50 µl) foi misturada em uma microplaca de 96 cavidades contendo 25 µl de 1,75 M de NaOH por cavidade e incubada a 50°C durante 5 15 minutos para desnaturar a amostra. Um coquetel de 13 tipos de RNA de HPV selecionado dentre a tabela 1 (15 ng cada por teste) foi adicionado nas amostras desnaturadas em solução neutralizante: 25 µL de 0,125 M de citrato de sódio, 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 BES, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% 10 de azida de sódio, e 0,4% de Tween-20 (pH 3,6 - 4,1). As contas paramagnéticas conjugadas ao anticorpo HYBRID CAPTURE (HC-ab) ($5,4 \times 10^6$ contas por teste) foram então imediatamente adicionadas na amostra neutralizada. O RNA de HPV e os conjugados de contas paramagnéticas - anticorpo foram hibridizados nas seqüências alvo de amostra durante 30 15 minutos a 65 °C com agitação a 1100 rpm. Os complexos de contas paramagnéticas - alvo foram acumulados no fundo da cavidade por colocação da placa sobre uma grade magnética (Dynal, Corp.). O sobrenadante foi aspirado por pipeta e as contas foram lavadas três vezes usando um tampão de lavagem (40 mM de Tris pH 8,2, 100 mM de cloreto de sódio, 0,05% de azida 20 de sódio e 0,05% de Tween-20), assim removendo quaisquer contaminantes.

Amplificação de alvo:

Amplificação isotérmica do DNA alvo de amostra foi realizada usando iniciadores aleatórios e DNA polimerase tendo atividade de deslocamento de filamento. Os alvos de DNA foram amplificados usando 25 phi29 DNA polimerase iniciadas com pentâmeros aleatórios. Os iniciadores pentâmeros foram sintetizados com duas ligações de fosforotioato na extremidade 3' para evitar a degradação por nuclease. Outras modificações podem incluir, mas não são limitadas para, grupos 2'O-metila que são incorporados na estrutura dos iniciadores. O DNA alvo foi amplificado

durante 2 horas. contas paramagnéticas com ácido nucleico alvo capturado, obtido na etapa de enriquecimento do alvo, foram recolocadas em suspensão em 20 µl de reação composta de 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂ SO₄, 4 mM de DTT, 200 µg/ml BSA acetilado, 400 µM de cada dNTP, 125 µM de pentâmeros aleatórios e 1U de phi29 DNA polimerase (New England Biolabs, Inc) e incubadas durante 2 horas a 30°C.

Iniciadores que podem ser utilizáveis na etapa de amplificação são listados abaixo.

Sonda HPV16 5'-FAM TCAGGACCCACAGGAGCGACCCAG-3'-BHQ
(SEQ ID NO: 125)

Iniciador dianteiro 5'-GCACCAAAGAGAACTGCAATGT-3' (SEQ ID NO: 126)

Iniciador reverso 5'-CATATACCTCACGTCGCAGTAACT-3' (SEQ ID NO: 127)

* sonda de rótulo duplo e iniciadores (Integrated DNA Technologies, Inc.; Salt Lake City, UT)

* repórter FAM- fluorescente, BHQ- "black hole quencher"

Deteção de alvo:

Sequências amplificadas foram detectadas usando um sistema de arranjo de contas à base de líquido que integra o processamento óptico, de fluidos, e sinal permitindo as capacidades multiplex. tecnologia Luminex). A tecnologia Luminex usa um sistema de teste altamente sensível com base em microcontas fluorescentes e moléculas de repórter que pode detectar alvos múltiplos na mesma cavidade de teste (ver, patente U.S. números 5.981.180; 6.524.793; 5.736.330; 6.449.562; 6.592.822; 6.632.526; 6.514.295; 6.599.331; 6.046.807?; e 6.366.354). O instrumento de detecção Luminex usa dois lasers: um para a detecção da própria conta fluorescente e a outra para o repórter fluorescente. As contas fluorescentes bi-coloridas permitindo a detecção multiplex de até cerca de 100 diferentes alvos. A tecnologia

Luminex foi aplicada a tipificação de HPV neste exemplo. Este método aumentou a sensibilidade e a robustez da plataforma.

5 Duas seqüências de oligonucleotídeos complementares às regiões tardia (L) e prematura (E) [MH Einstein and GN Goldberg, *Cancer Invest.* 20: 1080 - 1085, 2002, incorporado por referência] sobre o tipo de HPV específico foram conjugadas nas contas carboxiladas Luminex, coloridas de modo diferente, comercialmente disponíveis, usando o protocolo do fabricante. As seqüências de oligonucleotídeos de captura foram apresentadas na tabela 1. Dois oligonucleotídeos de um tipo de HPV
10 específico foram fixados ao mesmo conjunto de contas, assim eliminando os resultados falsos negativos causados pela deleção da região L do HPV que pode ocorrer em células de câncer. Uma etapa de purificação de amplicon não foi requerida antes da etapa de detecção porque a hibridização pode ser realizada no mesmo tubo que mantém as contas paramagnéticas introduzidas
15 durante a primeira etapa de enriquecimento do alvo.

A etapa de detecção do teste começa com a desnaturação do amplicon em 75 µl de 438 mM de NaOH a 70°C durante 15 minutos. Um coquetel de 13 tipos diferentes de HPV RNA (15 ng cada por teste) foi adicionado na amostra desnaturada em 25 µl de 0,125 M de citrato de sódio,
20 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 BES, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio e 0,4% de Tween-20 (pH 3,6 - 4,1). Então, os 13 tipos de oligonucleotídeos são cada conjugados a contas de poliestireno Luminex carboxiladas (5×10^3 contas por teste) e imediatamente adicionados na
25 amostra neutralizada. O RNA e os conjugados de contas - oligonucleotídeos foram hibridizados no alvo durante 30 minutos a 65°C enquanto agitando a 1100 rpm. As amostras foram então filtradas através de uma placa de filtro de 96 cavidades (Whatman) e as contas foram recolocadas em suspensão em 100 µl de 1x solução salina tamponada com fosfato (PBS), 0,05% de Tween-20,

10% soro de cabra e 10 ng de anticorpos monoclonais de camundongo específicos de híbrido DNA: RNA rotulados com ficoeritrina (PE-HC-Ab). As amostras foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente (18 -25 °C) enquanto agitando a 1100 rpm. O anticorpo em excesso foi removido por
5 filtração a vácuo e as contas com os complexos de alvo foram recolocadas em suspensão em 100 µL PBS com 0,05% Tween -20. As amostras foram então analisadas por citômetro de fluxo Luminex após ajustar o ganho do tubo fotomultiplicador a 700 volts.

A sensibilidade melhorada desta etapa resultou de sondas de
10 seqüência de sinal de RNA longas (6500 bp, comprimento aproximado) que permitem a ligação de anticorpos de ficoeritrina múltiplos (PE-Ab), que assim resultaram em uma amplificação de cerca de 500 vezes de sinal comparado com outras técnicas de detecção, como as que usam fluoróforos conjugados a sondas de hibridização curtas. As sondas de seqüência de sinal de RNA
15 podem ter um comprimento na faixa de cerca de 500 bases a cerca de 10 quilobases, ou até apenas menos que 100% do comprimento do ácido nucleico alvo.

Os resultados mostrados na tabela 8 demonstram a sensibilidade da detecção de HPV16 na presença de todos os 13 conjuntos de
20 contas de tipo de HPV. A sensibilidade de detecção para plasmídeos foi maior do que 500 cópias por teste como indicado pela relação robusta de sinal para ruído. O volume de amostra inicial foi de 50 µl, mas pode ser aumentado a 500 µl ou mesmo a amostra completa (para uso em teste à base de tubos, não mostrados), que irão aumentar a sensibilidade do teste a um grau ainda maior.
25 Os resultados também demonstraram a especificidade para detecção de HPV 16. Não foi detectado essencialmente nenhum sinal em conjuntos de contas específicos para os alvos de HPV em vez de HPV 16. Os sinais da tabela 8 (média, n = 4 réplicas, % CV entre 3 e 31%) são as intensidades fluorescentes medianas (MFI) para 100 contas (eventos) por amostra contada pelo citômetro

de fluxo. O valor dos antecedentes ou ruído é o MFI das amostras não contendo alvo.

A tabela 9 demonstra a sensibilidade e especificidade de detecção de todos os 13 tipos de HPV. Os tipos de HPV alvo são listados ao longo do eixo x e as sondas de ácido nucleico são listadas ao longo do eixo y. O mesmo alvo de HPV e sonda de HPV para cada tipo é destacado diagonalmente através da tabela (resultado positivo). Estas caixas demonstram o nível elevado de especificidade da sonda para seu alvo de HPV. Esta experiência confirma que as sondas são específicas para alvos de tipo de HPV correspondentes. Os resultados na tabela 9 mostram que, por exemplo, o alvo de HPV 16 se liga somente à sonda de HPV 16 correspondente (resultado positivo) e não liga as sondas para outros tipos de HPV (resultado negativo).

Tabela 8- Sensibilidade da detecção de HPV 16

Entrada de alvo (cópias/teste)	Relação de sinal/ ruído média para cada conjunto de contas específico para o tipo de HPV individual												
	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	68
5×10^2	194	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
5×10^3	419	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1
5×10^4	553	2	1	1	1	3	1	2	1	1	1	2	1

Tabela 9: Especificidade de tipos de HPV

		LMX-MFI (n=2) Médio para cada sonda/conta de captura de HPV específico, NB0793, pg.68-69 (013004)												
Alvo	cópias Rxn (ds-plasmídeo)	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	68
15	0,E+00	69	31	22	33	25	91	50	36	22	46	33	66	34
	1,E+02	3945	28	29	39	25	94	53	48	34	46	40	77	38
18	0,E+00	50	16	25	17	25	50	26	31	15	33	18	43	28
	1,E+02	80	3093	18	26	21	90	47	33	26	39	25	69	27
31	0,E+00	62	29	22	35	30	65	43	42	28	42	32	70	35
	1,E+02	76	25	4121	42	28	79	62	42	27	40	34	87	42
33	0,E+00	67	32	26	28	23	71	43	34	24	37	31	65	36
	1,E+02	91	29	23	8389	26	105	54	40	32	56	31	109	38
35	0,E+00	37	20	16	23	15	36	24	25	21	22	20	35	23
	1,E+02	62	31	16	28	3858	51	33	23	21	39	25	57	27
39	0,E+00	63	32	26	24	23	66	44	39	27	47	26	60	38
	1,E+02	104	34	35	39	25	3881	63	52	39	56	40	108	35
45	0,E+00	41	30	21	22	24	48	28	28	16	29	26	43	21
	1,E+02	46	24	23	18	27	53	4859	34	24	35	26	53	18
51	0,E+00	31	17	17	27	26	33	25	24	22	26	20	35	23
	1,E+02	45	23	24	21	17	46	28	4500	12	26	23	46	18
52	0,E+00	21	25	19	21	16	32	18	19	14	19	19	41	16
	1,E+02	44	38	14	25	23	42	36	24	3500	31	24	51	25
56	0,E+00	44	23	18	25	19	40	27	29	23	24	23	42	29
	1,E+02	52	28	19	39	30	50	37	27	15	5154	26	50	18
58	0,E+00	30	19	16	17	26	34	18	27	17	19	19	36	15
	1,E+02	47	26	11	22	11	30	28	22	14	30	8631	54	22
59	0,E+00	18	22	16	16	19	26	18	17	18	21	14	26	19
	1,E+02	45	24	17	16	22	42	26	28	18	24	19	3045	20
68	0,E+00	22	26	23	13	19	26	12	20	14	20	17	20	15
	1,E+02	37	23	18	19	18	34	30	21	19	22	20	28	5083

EXEMPLO 7

Deteccção de HPV16, HPV58 e HPV33

Amostras cervicais infectadas com tipos múltiplos de HPV foram modeladas por misturação de três plasmídeos cada inserido com um tipo diferente de sequência de HPV (10 kb) no tampão da amostra indicado no exemplo 6. Este exemplo demonstra a capacidade do teste de detectar infecções múltiplas, quando mais do que um tipo de HPV está presente na amostra.

O teste de amostras de alvos múltiplos foi realizado como ilustrado no exemplo 21. As amostras consistiram de 1×10^2 cópias de HPV 16, 1×10^4 cópias de HPV 58 e 1×10^6 cópias de HPV 33. Resultados na figura 7 demonstraram que o alvo de HPV 16 em baixa abundância foi detectado mesmo na presença altamente abundante de outros tipos de HPV. Figura 7 demonstra que HPV 16 tem uma relação de sinal para ruído baixa, onde os sinais (médio, n=4 replica, % CV (coeficiente de variação) entre 3% e 31%) são as intensidades fluorescentes medianas (MFI) para 100 contas (eventos) por amostra contados pelo citômetro de fluxo. O valor de ruído é o MFI de amostras não contendo os plasmídeos alvos.

EXEMPLO 8

Deteccção de HPV em amostras clínicas

HPV foi detectado em amostras cervicais, onde as amostras cervicais foram coletadas em meios de transporte de amostras (STM; Digene Corp., Gaithersburg, MD) e inicialmente triadas para os tipos de HPV de alto risco usando o teste HC2 High-Risk HPV DNA Test TM (Digene Corp.). Os resultados de teste HC2 foram comparados com os do teste de tipificação de HPV descrito na invenção.

Amostras cervicais foram coletadas usando uma escova e mantidas em um meio de armazenamento (1 M de guanidina - HCl, 10 mM de Tris - HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA, e 0,05% de azida de sódio e água

deionizada) até uso. Alíquotas (50 µl) de amostras cervicais foram analisadas por HC2 (Digene Corp) de acordo com as instruções do fabricante ou pelo método descrito no exemplo 6. A fim de comparar a sensibilidade dos dois testes, a amostra positiva foi serialmente diluída em uma amostra cervical sem infecção de HPV.

Tabela 10: Comparação de sensibilidade detecção de amostras clínicas

Diluições de amostra positiva	HC2, sinal/ corte	Teste tipificação, S/N
sem diluição	187,2	585,1
1:10	21,2	310,4
1:100	2,3	199,2
1:1000	<1	113,4
1:10.000	<1	43,1

A sensibilidade de HC2 em amostras clínicas é registrada na tabela 10 e mostra um sinal/ corte de 2,3 (100 vezes de amostra diluída) que corresponde aproximadamente a 10.000 HPV alvos por teste. Conseqüentemente, quando comparada com a sensibilidade do teste de tipificação de HPV da invenção, a invenção é pelo menos 100 vezes maior e igual a 100 cópias por teste com uma relação de sinal para ruído (S/N) de cerca de 43.

EXEMPLO 9

Detecção de formas circular, linear e integrada de DNA de HPV

O teste da invenção pode detectar seqüências de DNA que são lineares, assim como, circulares. Assim, a amplificação que ocorre no teste inventivo não ocorre necessariamente pelo fenômeno de "círculo rolante". Assim, os alvos do teste inventivo não precisam ser circulares. Eles podem ser lineares, ou porque o DNA patogênico circular sofre uma incisão por desnaturação, ou porque os alvos de DNA patogênico (viral) são integrados no genoma hospedeiro linear (humano), ou porque o DNA patogênico é um genoma linear.

Amostras incluindo diluições em série de plasmídeo de HPV que são ou diluições lineares ou circulares ou em série de DNA purificado de células CaSki foram diluídas em tampão de TE. Plasmídeos lineares foram

criados por digestão de endonuclease de restrição dos plasmídeos circulares usando técnicas padrões. DNA de células CaSki é DNA genômico humano que contém 500 cópias de genomas virais de HPV 16 integradas por genoma humano. A concentração de cópias HPV 16 por teste para o DNA das células CaSki foi calculada a partir dos tamanhos e relações dos dois genomas, humano e HPV, e as medidas de densidade óptica do DNA de CaSki purificado.

Alvos foram desnaturados por calor a 95 °C durante 3 minutos na presença de iniciadores aleatórios imediatamente antes da amplificação em 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM de EDTA e 50 µM de iniciador de hexâmero (fosforotioado em ligações 3' finais). Os alvos de filamento único foram então amplificados durante 120 minutos a 30°C em 20 µl de reações compostas de 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 4 mM de DTT, 0,2 mg/ml de BSA acetilado, 400 µM de cada dNTPs, 0,13 mM de hexâmeros aleatórios e 10 U de phi29 DNA polimerase (Epicentre, Inc).

Os alvos amplificados foram detectados como descrito no exemplo 6 com a seguinte exceção. Os complexos híbridos de RNA:DNA foram etiquetados primeiro com um anticorpo primário anti-RNA: DNA monoclonal de camundongo (10 µg/teste) e então com um anticorpo secundário IgG anti-camundongo de cabra conjugado com ficoeritrina (1,6 µg/teste).

Os resultados na tabela 11 demonstram que o teste da invenção detectou DNA circular, linear e integrado com relações robustas sinal/ ruído, assim demonstrando que a eficácia do teste não foi dependente do mecanismo de "círculo rolante". No entanto, o mecanismo de "círculo rolante" pode ter acelerado a reação, porque o alvo circular foi amplificado mais eficientemente do que o alvo linear.

Tabela 11: Detecção de alvos lineares, circulares e integrados com o método

proposto

Alvo (cópias/teste)	Sinal/ruído		
	DNA linear	DNA circular	DNA integrado
1X10 ²	71	123	21
1X10 ⁴	96	130	83
1X10 ⁶	89	142	77

Os sinais foram médias (n=2) das intensidades fluorescentes medianas (MFI) para 100 contas (eventos) por amostra contados pelo citômetro de fluxo. O valor do ruído é o MFI médio de amostras não contendo plasmídeos alvos.

EXEMPLO 10

Amplificação isotérmica catalisada por phi29 DNA polimerase usando oligonucleotídeos aleatórios

Outra forma de realização da etapa de amplificação do alvo utiliza oligonucleotídeos modificados otimizado no comprimento dos iniciadores aleatórios. Os pentâmeros aleatórios, 5'-NpNpNpsNpsN-3' foram feitos por IDT, Inc. Para os dados gerados neste exemplo o plasmídeo de HPV 16 foi amplificado em um volume de reação total de 20 µL com amplificação isotérmica durante 2 horas a 30°C. O alvo de DNA foi desnaturado com calor durante 3 minutos a 95 °C em 10 µl de 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM de EDTA, 50 µM de iniciadores. A amplificação isotérmica foi realizada em 20 µl de 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂ SO₄, 4 mM de DTT, 200 µg/ml de BSA acetilado, 400 µM de cada dNTP, 125 µM de pentâmeros aleatórios e 1 U de phi29 DNA polimerase (New England Biolabs, Inc) durante 2 horas a 30°C. Seguindo a amplificação, metade dos volumes (10 µL) dos amplicons foi detectada no sistema de citometria de fluxo Luminex usando o protocolo de detecção de anticorpo "primário/ secundário" como descrito no exemplo 11.

Tabela 12: Pentâmeros de DNA aleatórios são o comprimento de iniciador ótimo. Todos os iniciadores tem duas modificações de fosforotioato na extremidade 3'

Cópias/teste	5-meros	6-meros	7-meros	8-meros	9-meros	10-meros
0	10	9	7	13	9	14
1×10^2	5873	990	16	10	17	12
1×10^4	9864	5766	1469	176	36	26
1×10^6	12257	7567	7187	5444	2421	1621

* Valores = MFI médio Luminex

Tabela 13: Comparação de diferentes comprimentos e modificações de iniciador aleatório

Cópias/teste	ligação 1-tio		ligação 2-tio	
	5-meros	6-meros	5-meros	6-meros
0	11	10	12	7
1×10^2	851	4765	6972	922
1×10^4	10972	15250	15793	10758
1×10^6	22420	21097	19734	22313

* Valores = MFI médio Luminex

5 Tabelas 12 e 13 mostram que iniciadores de hexâmero de DNA aleatório foram ótimos com uma modificação de fosforotioato e iniciadores que foram pentâmeros de DNA aleatório foram ótimos com duas modificações de fosforotioato.

EXEMPLO 11

10 Métodos diferentes de detecção de alvo amplificado

Três protocolos diferentes de detecção de alvos amplificados foram comparados. Um meio utilizou sondas biotiniladas que são oligodeoxinucleotídeos rotulados com biotina na extremidade 5'. Estes oligonucleotídeos foram preparados pela síntese química por Integrated DNA Technology, Inc.; Salt Lake City, UT. As duas outras abordagens usaram HC-Ab primário rotulado (Digene Corp.) e seqüencialmente usaram HC-Ab primário e anticorpo secundário rotulado (Digene Corp.), representando duas formas de realização da invenção. A combinação de detecção de citometria de fluxo de contas rotuladas com anticorpo ou coloridas, e a amplificação do sinal resultou em um sinal aumentado e, assim, a sensibilidade do teste aumentou mais do que 10 vezes. A amplificação do sinal deve normalmente aumentar o fundo do teste como seria a presença de um complexo grande sobre as contas, assim diminuindo ou eliminando a sensibilidade. No entanto, o método da invenção descrito provê um aumento no sinal e sensibilidade. O

complexo grande nas contas pode interferir com o modo de detecção que se baseia em um determinado tamanho das contas no sistema de citometria de fluxo Luminex. Ambos os problemas citados são superados pelo método da invenção.

5 A. Em um método, uma sonda biotinilada complementar ao ácido nucleico alvo foi aplicada a estreptavidina conjugada a ficoetitrina (SA-PE; Pierce). O plasmídeo de HPV 16 amplificado foi desnaturado em 75 µl de 438 mM de NaOH a 70°C durante 15 minutos. Dois nanogramas cada de duas sondas 5'-biotiniladas (5'- Biotina-TATTTTATATGACACAATGT-3' (SEQ ID NO: 128); 5'- Biotina- GGTTCGTGCTAACAATAAATGTATCCATAG- 10 3' (SEQ ID NO: 129)) foram adicionados à amostra de ácido nucleico alvo desnaturada em 25 µl de 0,125 M de citrato de sódio, 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 BES, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio e 0,4% de Tween-20 (pH 3,6 - 4,1). Aproximadamente 1000 contas de poliestireno 15 foram conjugadas para oligonucleotídeos específicos para regiões de HPV 16 L- e E- (ver tabela 1) e imediatamente adicionadas na amostra neutralizada. A hibridização foi realizada durante 30 minutos a 50°C enquanto agitando a 1100 rpm. SA-PE (100 ng) em 100 µl de 438 mM de NaOH, 0,125 M de citrato de sódio, 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 20 BES, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio e 0,4% de Tween-20 foram adicionados em cada reação e incubados em temperatura ambiente durante 5 minutos. As amostras foram então transferidas para uma placa de filtro onde os materiais 25 não ligados foram removidos por filtração a vácuo. As contas foram recolocadas em suspensão em 100 µl de PBS-0,05% de Tween-20 e analisadas por citometria de fluxo Luminex após ajustar o ganho do tubo fotomultiplicador a 700 volts.

B. No segundo método, o plasmídeo de HPV 16 amplificado

foi desnaturado em 75 µl de 438 mM de NaOH a 70°C durante 15 minutos. Um coquetel de 13 tipos diferentes de RNA de HPV (cada 15 ng por teste, obtidos como descrito no exemplo 6) foi adicionado na amostra desnaturada em 25 µl de 0,125 M de citrato de sódio, 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 BES, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio e 0,4% de Tween-20 (pH 3,6 - 4,1). Treze conjuntos de contas de poliestireno conjugadas a oligonucleotídeos (5×10^3 contas por teste) foram imediatamente adicionados na amostra neutralizada. Cada conjunto de conta tem duas seqüências de oligonucleotídeo complementares às regiões tardia (L) e prematura (E) sobre o tipo de HPV específico. As seqüências de oligonucleotídeos de captura foram apresentadas na tabela 1. O RNA e o conjugados de contas-oligonucleotídeos foram hibridizados no ácido nucleico alvo durante 30 minutos a 65 °C com agitação a 1100 rpm. As amostras foram então filtradas em uma placa de filtro de 96 cavidades (Whatman) e 1 µg de HC-Ab primário em 100 µl de PBS- 0,05% de Tween-20 foi adicionado. Após agitar em temperatura ambiente durante 5 minutos, as reações foram filtradas e 8 µg de anticorpo secundário rotulado PE (anti-camundongo de cabra) em 100 µl de PBS, 0,05% de Tween-20, e 10% de soro de cabra foram adicionados. A incubação continuou durante 20 minutos enquanto agitando em temperatura ambiente. O anticorpo em excesso foi removido por filtração a vácuo e as contas com complexos de alvos foram recolocadas em suspensão em 100 µl de PBS com 0,05% de Tween-20. As amostras foram então analisadas por citometria de fluxo Luminex após ajustar o ganho do tubo do fotomultiplicador a 700 volts.

C. No terceiro método, o plasmídeo de HPV 16 amplificado foi desnaturado em 75 µl de 438 mM de NaOH a 70°C durante 15 minutos. Um coquetel de 13 tipos diferentes de HPV RNA (cada 15 ng por teste, obtido como descrito no exemplo 6) foi adicionado na amostra desnaturada

em 25 µl de 0,125 M de citrato de sódio, 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 BES, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio e 0,4% de Tween-20 (pH 3,6 - 4,1). Treze conjuntos de contas de poliestireno conjugadas a oligonucleotídeos (5×10^3 contas por teste) foram imediatamente adicionados na amostra neutralizada. Cada conjunto de conta tem duas seqüências de oligonucleotídeo complementares para as regiões tardia (L) e prematura (E) do tipo de HPV específico. As seqüências de oligonucleotídeos de captura foram apresentadas na tabela 1. Os conjugados de RNA e conta-oligo foram hibridizados para o alvo durante 30 min a 65 °C com agitação a 1100 rpm. As amostras foram então filtradas através de uma placa de filtro de 96 cavidades (Whatman) e as contas foram recolocadas em suspensão em 100 µl de PBS, 0,05% de Tween-20, 10% de soro de cabra e 10 ng de anticorpos específicos para RNA: DNA monoclonais de camundongo rotulados com ficoeritrina (PE-HC-Ab). As amostras foram então incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente (18°-25°C) enquanto agitando a 1100 rpm. O excesso de anticorpo foi removido por filtração a vácuo e as contas com complexos alvos foram recolocadas em suspensão em 100 µl de PBS com 0,05% de Tween-20. As amostras foram então analisadas por citometria de fluxo Luminex após ajustar o ganho do tubo do fotomultiplicador a 700 volts.

A amplificação isotérmica de alvo de HPV 16 foi realizada como descrito no exemplo 6. O alvo amplificado foi detectado usando um de três protocolos como descrito nos protocolos A, B ou C acima. Os resultados são apresentados na tabela 14. Dentre estes três protocolos descritos, a detecção das sondas biotiniladas (protocolo A) envolveu a menor quantidade de tempo para realizar o método. No entanto, este método de detecção também produziu a menor intensidade de sinal. A maior intensidade de sinal e a relação S/N foi obtida usando o esquema de detecção de anticorpo primário rotulado (tabela 14) que implementou a amplificação de sinal HC-AB

(protocolos B e C). Protocolo C utiliza uma etapa a menos do que o protocolo B e será assim preferível.

Tabela 14: Comparação de detecção de HPV 16 após amplificação isotérmica

Entrada de alvo (cópias/teste)	Média de 3 intensidades fluorescentes medianas (MFI)		
	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C
5×10^2	174	4165	2506
5×10^3	517	7466	4715
5×10^4	776	9310	7001

EXEMPLO 12

5 Tipificação de HPV em uma placa Nucleolink de 96 cavidades

Em uma forma de realização alternativa, uma placa de microtitulação pode ser usada em vez de contas como um suporte sólido para a detecção da sequência. Os oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV individuais foram conjugados no fundo das cavidades. O ácido nucleico alvo
10 foi hibridizado para os oligonucleotídeos de captura e então detectado por quimioluminescência.

Na preparação da placa de múltiplas cavidades NucleoLink™ (Nalge Nunc International; New York), duas seqüências de oligonucleotídeo complementares para as regiões tardia (L) e prematura (E) sobre o tipo de
15 HPV específico foram conjugadas para a placa Nucleolink usando o protocolo descrito abaixo. Seqüências de oligonucleotídeos de captura são apresentadas na tabela 1. Ao substituir os dois oligonucleotídeos em cada cavidade, resultados negativos falsos causados pela deleção da região L de HPV comum em células de câncer podem ser eliminados. Os oligonucleotídeos de captura
20 específicos para o tipo (dois por cada tipo de HPV) contendo um ligador 5'-C12-amino foram preparados em uma concentração final 100 nM de (0,1 pmole/ μ L) em uma solução recentemente preparada de 10 mM de cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodimida contendo 10 mM de 1-metilimidazol, pH 7. Esta solução foi adicionada em 100 μ L por cavidade (um
25 tipo por cavidade) para uma placa de 96 cavidades Nucleolink, selada com fita termoestável e incubada a 50°C durante 4 horas. A solução foi então

decantada e as cavidades foram lavadas três vezes, embebidas durante 5 minutos e lavadas três vezes, todas com 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de cloreto de sódio, e 0,1% de Tween-20 em temperatura ambiente. As cavidades foram então lavadas três vezes, embebidas durante 5 minutos e lavadas três vezes com água de tipo biologia molecular. As placas foram então deixadas secar durante 30 minutos em temperatura ambiente. As placas foram armazenadas a 4 °C em um saco de etileno com dessecante até necessário.

A placa NucleoLink com oligonucleotídeos covalentemente ligados foi levada a temperatura ambiente após armazenagem. A placa foi bloqueada com 290 µL por cavidade de 6% de caseína em 100 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 0,05% de azida de sódio, durante 30 minutos em temperatura ambiente. Amostras de modelo (100 pg/mL) de diluições de plasmídeos de HPV (10 kb) preparadas em uma solução composta de 100 µg/mL DNA de esperma de arenque, 1 M de guanidina-HCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio em água deionizada. As amostras (50 µl) foram misturadas em uma microplaca de 96 cavidades com 25 µL de 1,75M de NaOH e incubadas a 70°C durante 30 minutos. Sonda de RNA não rotulado (15 ng por teste) em 0,125 M de citrato de sódio, 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 de ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfônico, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio e 0,4% de Tween-20 (pH 3,6 - 4,1) foi adicionada em cada cavidade na placa de hibridização. A solução se tornou límpida ou levemente amarela. Os conteúdos de cada cavidade foram transferidos em suas respectivas cavidades na placa Nucleolink. A placa foi incubada a 65 °C enquanto agitando a 1150 rpm durante 1 hora. A placa foi resfriada em temperatura ambiente e a solução foi decantada. Uma solução (100 µL/cavidade) de anticorpo monoclonal anti-RNA - DNA de camundongo conjugado a fosfatase alcalina em 0,1 mM de

Tris-pH 7,4, 0,6 M de cloreto de sódio, 0,1 mM de cloreto de zinco, 1 mM de cloreto de magnésio, 0,05% de azida de sódio, 0,25% de tween-20, 0,2 mg/mL RNase, 4% de hidroxipropil- β -ciclodextrina, 0,05% IgG de cabra, 0,0008% de sulforhodamina B, com 30% de solução de bloqueio (6% de caseína em 100 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 0,05% de azida de sódio) foi adicionada em cada cavidade e a placa foi incubada a 37 °C durante 30 minutos. A solução foi decantada e a placa foi lavada duas vezes com 128 mM de Tris pH 7,2; 0,6 M de cloreto de sódio; 0,05% de azida de sódio; 0,24% de Tween e então 250 μ L de 128 mM de Tris pH 7,2; 0,6 M de cloreto de sódio; 0,05% de azida de sódio; 0,24% de Tween foi adicionado em cada cavidade. A placa foi vedada com fita termoestável e incubada a 60°C durante 10 minutos. A solução foi decantada e a placa foi lavada duas vezes mais com 128 mM de Tris pH 7,2; 0,6 M de cloreto de sódio; 0,05% de azida de sódio. A placa foi então lavada duas vezes com 40 mM de Tris pH 8,2, 100 mM de cloreto de sódio, 0,05% de azida de sódio. A solução foi decantada e 100 μ L de substrato CPD-Star foram adicionados em cada cavidade. A placa foi incubada durante 20 minutos no escuro e lida no luminômetro DML. Tabela 15 mostra as relações de sinal para ruído resultantes de 100 pg/mL de 7 alvos clonados de HPV diferentes como detectado pelo método descrito acima.

Tabela 15: Tipificação de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e 52 em uma placa de 96 cavidades

Sondas captura	Alvos HPV, sinal/ ruído							
	16	18	31	33	35	45	52	sem alvo
16	30,6	1,2	1,1	0,7	0,3	0,6	0,8	1,0
18	0,5	21,9	1,1	0,5	1,1	1,5	0,7	1,0
31	0,6	0,5	264,4	0,6	0,6	1,7	1,8	1,0
33	0,4	1,2	1,8	91,7	0,5	1,2	0,4	1,0
35	0,4	0,3	1,7	0,4	103,6	0,7	0,4	1,0
45	1,1	1,9	0,8	0,8	1,0	34,3	0,5	1,0
52	0,7	0,5	0,5	0,5	0,7	0,5	44,4	1,0

EXEMPLO 13

Efeitos de usar uma máscara em conjunto com uma placa de subcavidades

Uma solução de fosfatase alcalina foi adicionada no substrato

CPD-Star. Esta solução (20 µL) foi adicionada nas subcavidades indicadas de uma placa de 384 cavidades (Digene Corp.) e incubada durante 20 minutos. A placa foi então lida no luminômetro de placa de 384 cavidades a cerca de 450 nm com e sem a adição de uma máscara (Digene Corp.). Tabela 16 mostra que uma máscara que cobre cada cavidade / sub- cavidade aumenta a relação S/N por mais que 100 vezes. A placa de subcavidade com a máscara é vantajosa para superar a interferência cruzada previamente conhecida entre as subcavidades. Cada caixa de tabela 16 representa uma subcavidade única. Somente duas subcavidades tem substrato quimiluminescente, que são representadas em tipo de face negrito

Tabela 16: Interferência cruzada entre subcavidades vizinhas

UNIDADES DE LUZ RELATIVA SEM DE MÁSCARA			
1712	5598	2192	1210
4076	21986	5181	1262
1594	5024	2830	6046
1004	1051	4844	30128
1712	5598	2192	1210

UNIDADES DE LUZ RELATIVA COM DE MÁSCARA			
15	48	15	8
33	56548	40	26
18	24	12	16
31	16	23	64942
15	48	15	8

* Subcavidades com substrato quimiluminescente adicionado são mostradas em negrito.

EXEMPLO 14

Tipificação de HPV em uma placa de 384 subcavidades

A detecção de tipos individuais assim como de tipos múltiplos de HPV em um formato de placa de subcavidade foi realizada. Neste exemplo, amostra foi adicionada em cada cavidade e os alvos individuais migraram e hibridizaram nas sondas de seqüência de captura correspondentes. O reagente de detecção foi adicionado na cavidade, onde é

ligado no alvo nas subcavidades positivas. A quimiluminescência foi usada para detecção.

Os oligonucleotídeos de captura específicos para tipo (dois oligonucleotídeos por cada tipo de HPV) contendo um ligador 5'-C12-amino foram preparados em uma concentração final de 5 μ M de (5 pmole/ μ L) em uma solução de 500 mM de fosfato de hidrogênio de sódio, pH 8,5 contendo 1 mM de sal dissódico de ácido etilenodiaminatetraacético. Esta solução foi adicionada a 20 μ L por cavidade em cada subcavidade na placa de subcavidade (um tipo por subcavidade), vedada com fita termoestável e incubada a 42 °C durante 4 horas. A solução foi decantada e as cavidades foram lavadas três vezes com TBS. A placa foi então imediatamente usada no teste de tipificação de HPV.

A placa foi bloqueada com 6% de caseína em 100 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 0,05% de azida de sódio (1 mL por cavidade grande), durante 30 minutos em temperatura ambiente. Amostras de modelo (100 pg/mL) consistem de diluição de plasmídeos de HPV (10 kb) preparadas em uma solução composta de 100 μ g/mL de DNA de esperma de arenque, 1 M de guanidina-HCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio em água deionizada. As amostras (500 μ l) são misturadas em um tubo eppendorf com 250 μ L de 1,75M de NaOH e incubadas a 70°C durante 30 minutos. A seguir, a sonda de RNA (15 ng por teste) em 0,125 M de citrato de sódio, 0,125 M de fosfato de sódio, 0,6 M de trietanolamina, 0,6 de ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfônico, 0,83 M de ácido acético glacial, 3% de ácido poliacrílico, 5 mM de EDTA, 0,05% de azida de sódio e 0,4% de Tween-20 (pH 3,6 - 4,1) foi adicionada em cada tubo. A solução está agora límpida ou de tom amarelo claro. Os conteúdos de cada tubo (1 mL) foram transferidos para a respectiva cavidade na placa de subcavidade. A placa foi incubada a 65 °C com agitação a 1150 rpm durante 1 hora. A placa foi resfriada em temperatura ambiente e a solução foi

decantada. Uma solução (1 mL por cavidade grande) de anticorpo monoclonal anti- RNA: DNA de camundongo conjugado a fosfatase alcalina em 100 mM de Tris-pH 7,4, 0,6 M de cloreto de sódio, 0,1 mM de cloreto de zinco, 1 mM de cloreto de magnésio, 0,05% de azida de sódio, 0,25% de tween-20, 0,2 mg/mL RNase, 4% de hidroxipropil- β -ciclodextrina, 0,05% IgG de cabra, 0,0008% de sulforhodamina B, com 30% de solução de bloqueio (6% de caseína em 100 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 0,05% de azida de sódio) foi adicionado em cada cavidade e a placa foi incubada a 37 °C durante 30 minutos. A solução foi decantada e a placa foi lavada duas vezes com 128 mM de Tris pH 7,2; 0,6 M de cloreto de sódio; 0,05% de azida de sódio; 0,24% de Tween e então 1 mL de 128 mM de Tris pH 7,2; 0,6 M de cloreto de sódio; 0,05% de azida de sódio; 0,24% de Tween foi adicionado em cada cavidade. A placa foi vedada com fita termoestável e incubada a 60°C durante 10 minutos. A solução foi decantada e a placa foi lavada duas vezes mais com 128 mM de Tris pH 7,2; 0,6 M de cloreto de sódio; 0,05% de azida de sódio; 0,24% de Tween. A placa foi então lavada duas vezes com 40 mM de Tris pH 8,2, 100 mM de cloreto de sódio, 0,05% de azida de sódio. A solução foi decantada e 20 μ L de substrato CPD-Star (Applera Corp.) foi adicionado em cada cavidade. A placa foi incubada durante 20 minutos no escuro e lida no 384-luminômetro com uma máscara a cerca de 450 nm como descrito no exemplo 13.

Os resultados na tabela 17 demonstram a especificidade da detecção de tipos de HPV individual e múltiplo na placa de subcavidade. Sinais mostrados em tipo de face negrito demonstram a especificidade da detecção. Por exemplo, alvo de HPV16 deu um sinal positivo quando apresentado com sonda de HPV16 somente e não dá nenhum sinal com sondas para outros tipos de HPV. No entanto, infecções múltiplas deram sinais múltiplos.

Tabela 17: Tipificação de HPV usando ligação passiva na placa de 384

subcavidades

Alvo	Sondas de captura							
	16	18	31	33	35	45	52	0
Sem HPV	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
16	22,3	1,7	1,0	0,9	0,7	1,2	1,1	1,1
18	1,7	4,9	0,8	1,0	1,0	1,0	0,8	0,9
31	1,5	1,6	2,6	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9
33	2,6	2,2	1,2	30,7	0,8	1,1	0,9	1,3
35	2,2	2,1	1,0	1,1	11,0	1,1	0,8	1,1
45	1,7	1,8	0,9	0,9	1,1	8,4	0,7	1,2
52	1,9	2,1	1,1	1,1	1,0	1,1	6,8	1,1
16,18,31,33,35,45,52	35,7	8,2	4,4	28,4	11,1	9,9	5,1	1,2
16,18,31,33,35,45	19,9	6,9	5,7	21,0	21,6	9,4	1,0	1,4
16,18,31,33,35	27,8	5,9	5,4	16,9	18,4	1,4	1,0	1,0
16,18,31,33	25,4	5,7	6,2	17,9	0,9	1,0	1,1	1,5
16,18,31	27,5	5,3	4,7	1,3	1,2	1,2	1,1	1,6
16,18	24,1	5,5	1,1	1,2	1,1	1,2	0,8	1,7
Amostra de STM positiva	78,8	11,3	5,3	2,0	2,1	1,4	1,3	1,9

EXEMPLO 15

Comparação de método de detecção de HPV usando uma placa de microtitulação e contas

5 Dois formatos de teste da invenção foram comparados onde a etapa de detecção é realizada em uma placa de microtitulação (como detectado por quimiluminescência) ou nas contas carboxiladas Luminex (como detectado por fluorescência).

10 As etapas de enriquecimento do alvo e amplificação do alvo foram realizadas como descrito no exemplo 6. A terceira etapa, envolvendo hibridização e detecção, foi realizada em dois formatos: uma em contas carboxiladas Luminex como descrito no exemplo 6, e a outra em uma placa de microtitulação como descrito no exemplo 14.

15 Os resultados na tabela 18 mostram que o teste de placa pode detectar 500 cópias de entrada em 30 minutos de amplificação com uma relação S/N de 9. A 1 hora de amplificação, o teste de placa é pelo menos de uma ordem de grandeza mais sensível do que o formato Luminex.

Tabela 18. Detecção de HPV usando contas e formato de detecção de placa.

Entrada de alvo cópias/teste	Contas (fluorescência)					
	30 min amplificação		60 min amplificação		120 min amplificação	
	S/N	%CV	S/N	%CV	S/N	%CV
0	1	20%	1	21%	1	16%
5X10 ²	1	8%	24	3%	1009	13%
5X10 ³	2	8%	281	21%	1548	5%
5X10 ⁴	18	14%	1288	9%	1520	19%
Entrada de alvo cópias/teste	Placa (quimiluminescência)					
	30 min amplificação		60 min amplificação		120 min amplificação	
	S/N	%CV	S/N	%CV	S/N	%CV
0	1	42%	1	81%	1	57%
5X10 ²	9	8%	1046	29%	12320	7%
5X10 ³	102	15%	9054	6%	11715	15%
5X10 ⁴	929	8%	13019	5%	12649	2%

EXEMPLO 16

Efeito de relação nucleotídeo em iniciadores aleatórios sobre a eficiência de amplificação isotérmica

5 Os iniciadores aleatórios foram quimicamente sintetizados usando combinações e relações diferentes de nucleotídeos na etapa de amplificação de alvo do método descrito no exemplo 6. Os resultados na tabela 19 mostram que dG e T desempenham um papel principal na obtenção de uma amplificação eficiente. A omissão de dA tem um efeito menos pronunciado e a omissão de dC não tem efeito de todo. A

10 amplificação isotérmica foi realizada durante 2 horas com iniciadores de pentâmeros. O teste completo foi realizado como descrito no exemplo 6. A eficiência relativa foi calculada como sinal para ruído, onde a eficiência da composição de iniciador padrão foi de (1,0).

Tabela 19: Eficiência relativa de detecção de alvo dependendo da composição de iniciadores aleatórios

Composição de iniciador	Entrada de alvo (cópias/teste)	Eficiência de teste relativo
dA:T:dG:dC 1: 1: 1: 1	100	(1,0)
	1000	(1,0)
dA:T:dG 1: 1: 1	100	0,95
	1000	1,0
T:dG:dC 1: 1: 1	100	0,4
	1000	0,6
dA:dG:dC 1: 1: 1	100	0,10
	1000	0,12
dA:T:dC 1: 1: 1	100	<0,1
	1000	<0,1
dA:T:dG:dC 1: 1: 3: 1	100	0,7
	1000	0,6
dA:T:dG:dC 2,5:2,5:4: 1	100	0,95
	1000	1,0
dA:T:dG 1: 1: 2	100	1,5
	1000	1,2

EXEMPLO 17

Tipificação de HPV em um arranjo de microchip

Detecção de tipos de HPV, individual assim como tipos múltiplos de HPV, em um arranjo de microchip pode ser realizada. A captura de ácido nucleico alvo e amplificação foram realizadas de acordo com o exemplo 6. Reagentes e protocolos de lavagem são realizados de acordo com os produtos comercialmente disponíveis e instruções para a lavagem das lâminas, membranas, chips, etc. A etapa de detecção de alvo compreende desnaturação de alvo e hibridização para as sondas de RNA, ou sondas de sequência de sinal, ambas de acordo com o exemplo 6.

Neste exemplo, a hibridização de alvo para a sonda de oligonucleotídeo de sequência de captura específica para a sequência ocorre em um arranjo de oligonucleotídeos com pontos em vez de em contas, como descrito no exemplo 6. O termo "arranjo com pontos" se refere a uma série bi-dimensional de elementos na superfície de um suporte sólido, onde cada elemento é uma alíquota de oligonucleotídeo depositado em um local específico. Suportes sólidos para este formato incluem: uma lâmina de vidro, membro de náilon, ou um microchip (vidro ou silício). Outros exemplos e descrição são encontrados em "Microarrays And Cancer Research" Ed. J. Warrington, Eaton Publishing, 2002.

As sondas de oligonucleotídeos de sequência de captura específicas para tipo (dois oligonucleotídeos por cada tipo de HPV) modificado com um ligador 5'-C12-amino é colocadas em pontos em um suporte sólido, como um microarranjo, cada ponto correspondendo a um tipo de HPV específico. Os oligonucleotídeos são fixados através de, por exemplo, o grupo amino primário. O suporte sólido é equilibrado com tampão 2X SSC (cloreto de sódio e citrato de sódio) em temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido por 30 minutos de incubação a 37 °C em tampão de pré-hibridização (2X SSC/0,05% reagente de bloqueio /5% sulfato dextrano/0,1%

SDS) com 50 microgramas por mL de DNA de esperma de salmão desnaturado. A hibridização é então realizada no mesmo tampão de pré-hibridização com a adição de ácidos nucleicos alvos amplificados e sondas de seqüência de sinal de RNA. A hibridização dos ácidos nucleicos alvos, sondas de seqüência de sinal de RNA, e sondas de oligonucleotídeos de seqüência de captura específicos do tipo ocorre enquanto incubando a 37 °C com agitação durante 3 horas em solução de re-hibridização.

Detecção dos pontos contendo amplicon pode ser realizada em dois modos: a) usando anticorpos HYBRID CAPTURE (HC-Ab) rotulados com corante Cy-fluorescente com subsequente varredura usando aparelhos comercialmente disponíveis, ou b) usando HC-Ab rotulado com fosfatase alcalina com aplicação subsequente de substrato de precipitação (por exemplo, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e tetrazólio de nitroazul: NBT / BCIP). No último caso, o sinal é detectável sem auxílio instrumental.

A descrição acima de várias formas de realização foi apresentada para fins de ilustração e descrição. Não se pretende que ela seja exhaustiva ou limitada às formas precisas descritas. Modificações ou variações óbvias são possíveis à luz dos ensinamentos acima. As formas de realização discutidas foram selecionadas e descritas para prover ilustrações de sua aplicação prática para assim permitir ao versado na técnica utilizar as várias formas de realização e com várias modificações como são apropriadas para o uso particular contemplado. Todas estas modificações e variações estão dentro do sistema como determinado pelas reivindicações anexas quando interpretadas de acordo com o escopo para o qual elas foram designadas de modo satisfatório, legal e imparcial.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

```

<110>  Nazarenko, Irina
      Lorincz, Attila
      Eder, Paul
      Lowe, Brian
      Mallonee, Richard
      Thai, Ha
<120>  DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR MÉTODO DE CAPTURA DE HÍBRIDOS
      ESPECÍFICOS DA MARCAÇÃO.
<130>  2629-4066
<140>  TBD
<141>  2005-11-07
<150>  US 11/005,617
<151>  2004-12-06
<150>  US 10/971,251
<151>  2004-10-20
<150>  US 09/594,839
<151>  2000-06-15
<160>  129
<170>  PatentIn versão 3.3
<210>  1
<211>  33
<212>  DNA
<213>  HPV
<400>  1
gtacagatgg taccgggggtt gtagaagtat ctg                                     33
<210>  2
<211>  31
<212>  DNA
<213>  HPV
<400>  2
ctgcaacaag acatacatcg accggtccac c                                       31
<210>  3
<211>  31
<212>  DNA
<213>  HPV
<400>  3
gaagtaggtg aggctgcatg tgaagtggta g                                       31
<210>  4
<211>  33
<212>  DNA
<213>  HPV
<400>  4
cagctctgtg cataactgtg gtaactttct ggg                                     33
<210>  5
<211>  33
<212>  DNA
<213>  HPV
<400>  5
gaggtcttct ccaacatgct atgcaacgctc ctg                                     33
<210>  6
<211>  33
<212>  DNA
<213>  HPV
<400>  6
gtgtaggtgc atgctctata ggtacatcag gcc                                     33
<210>  7
<211>  33
<212>  DNA
<213>  HPV
<400>  7

```

caatgccgag cttagtccat gcaatttccg agg	33
<210> 8	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 8	
gaagtagtag ttgcagacgc ccctaaaggt tgc	33
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 9	
gaacgcgatg gtacaggcac tgcagggtcc	30
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 10	
gaacgcgatg gtacaggcac tgca	24
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 11	
acgcccaccc aatggaatgt accc	24
<210> 12	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 12	
tctgcgtcgt tggagtcgtt cctgtcgtgc tc	32
<210> 13	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 13	
ttattattac tacatacatt gccgccatgt tcgcca	36
<210> 14	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 14	
ttattattat gttgccctct gtgccccgt tgtctatagc ctccgt	46
<210> 15	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 15	
ttattattag gagcagtgcc caaaagatta aagtttgc	38
<210> 16	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 16	
ttattattac acggtgctgg aatacggatga ggggggtg	37
<210> 17	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 17	
ttattattaa cgcccaccca atggaatgta ccc	33
<210> 18	
<211> 35	

<212> DNA
 <213> HPV
 <400> 18
 ttattattaa tagtattgtg gtgtgtttct cacat 35
 <210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 19
 ttattattag ttggagtcgt tcctgtcgtg 30
 <210> 20
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 20
 ttattattac ggaatttcac tttggggctc t 31
 <210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 21
 gctcgaaggt cgtctgctga gctttctact act 33
 <210> 22
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 22
 gcgccatcct gtaatgcact tttccacaaa gc 32
 <210> 23
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 23
 tagtgctagg tgtagtggac gcaggaggtg g 31
 <210> 24
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 24
 ggtcacaaca tgtattacac tgccctcggc ac 32
 <210> 25
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 25
 cctacgtctg cgaagtcttt cttgccgtgc c 31
 <210> 26
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 26
 ctgcattgtc actactatcc ccaccactac ttg 34
 <210> 27
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 27
 ccacaaggca cattcataca tacacgcacg ca 32
 <210> 28
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> HPV
 <400> 28

gttctaaggt cctctgccga gctctctact gta	33
<210> 29	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 29	
ttattattat gcggttttgg gggtcgacgt ggagggc	36
<210> 30	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 30	
ttattattaa gacctgcccc ctaagggtac atagcc	36
<210> 31	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 31	
ttattattac agcattgcag cctttttgtt acttgcttgt aatagctcc	49
<210> 32	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 32	
ttattattaa tcctgtaatg cacttttcca caaa	34
<210> 33	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 33	
ttattattag cctggtcaca acatgtatta c	31
<210> 34	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 34	
ttattattac aggatctaatt tcattctgag gtt	33
<210> 35	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 35	
tgcggttttg ggggtcgacg tggagggc	27
<210> 36	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 36	
ggcgcaacca cataacacac agaaccacaa aac	33
<210> 37	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 37	
gttctacacg ggtttgcagc acgatcaaca acg	33
<210> 38	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 38	
cgctgcttgt ggtggtcggt tategttgtc tg	32
<210> 39	
<211> 32	

```

<212> DNA
<213> HPV
<400> 39
gacgtagtgt cgcctcacat ttacaacagg ac 32
<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> HPV
<400> 40
ctcgcttggt ggggtttagt gggagctcgg 30
<210> 41
<211> 30
<212> DNA
<213> HPV
<400> 41
gctgtagttg tcgcagagta tcccgtgagg 30
<210> 42
<211> 33
<212> DNA
<213> HPV
<400> 42
gtgagcctgt gttatatgta gtgcccgaat ccc 33
<210> 43
<211> 31
<212> DNA
<213> HPV
<400> 43
ccacctcctg cgtccactac acctagcact a 31
<210> 44
<211> 32
<212> DNA
<213> HPV
<400> 44
tgcgtgcgtg tatgtatgaa tgtgccttgt gg 32
<210> 45
<211> 30
<212> DNA
<213> HPV
<400> 45
aattagcgca ttgccccgtc caacgtccccg 30
<210> 46
<211> 33
<212> DNA
<213> HPV
<400> 46
cgccgtgcac gtgtagccac catatttaat cac 33
<210> 47
<211> 32
<212> DNA
<213> HPV
<400> 47
cgaattgtgt gaggtgctgg aagaatcggg gc 32
<210> 48
<211> 32
<212> DNA
<213> HPV
<400> 48
gatcgttcac aacttttacc tgcaccggat cc 32
<210> 49
<211> 33
<212> DNA
<213> HPV
<400> 49

```

ctaggttctc tagatgtttg tctccagcac ccc	33
<210> 50	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 50	
ctgtcgggtat tgtctgtgtc gctgatgtgt g	31
<210> 51	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 51	
gatacacaca catttgcagc ccggtccaca ca	32
<210> 52	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 52	
ggtggcaaag gacgtatgtg agtgcagagg ac	32
<210> 53	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 53	
gcgttgccga ggggtatgat agttgctcag aag	33
<210> 54	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 54	
gtctaggcgt gtaggaggaa acaagatggg g	31
<210> 55	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 55	
ctgaacacag cagttctcta taccaatggc gctatttc	38
<210> 56	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 56	
ttggttgccc ctgagcagtc ggaccctatg gata	34
<210> 57	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 57	
gcgccgcatt gctgcacctc gtttatatag cagggcattt tc	42
<210> 58	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 58	
cctggcgcac gtcatacaca ccacattact c	31
<210> 59	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 59	
cacgaagtgt cagtgcacag tatgccttgc	30
<210> 60	
<211> 40	

```

<212> DNA
<213> HPV
<400> 60
gccatgtact tcacaaactg ttaatactgg tgattgtccc 40
<210> 61
<211> 31
<212> DNA
<213> HPV
<400> 61
cctacacagt acaagtggag gccatcaccc g 31
<210> 62
<211> 39
<212> DNA
<213> HPV
<400> 62
gtctgacaca tactgttgta acccatagtt aaacacagg 39
<210> 63
<211> 41
<212> DNA
<213> HPV
<400> 63
gctgtctccc tgtcttcctg tgtattgttt ataagtgtat t 41
<210> 64
<211> 44
<212> DNA
<213> HPV
<400> 64
gtacagcact aaaatggagt ttggtgtggt actatagtgc atac 44
<210> 65
<211> 16
<212> DNA
<213> HPV
<400> 65
actccaacga cgcaga 16
<210> 66
<211> 17
<212> DNA
<213> HPV
<400> 66
ttttgtgggt ctgtgtg 17
<210> 67
<211> 14
<212> DNA
<213> HPV
<400> 67
ttatgtgggt gcgc 14
<210> 68
<211> 15
<212> DNA
<213> HPV
<400> 68
cgttgttgat cgtgc 15
<210> 69
<211> 15
<212> DNA
<213> HPV
<400> 69
tgcaaaccg tgtag 15
<210> 70
<211> 16
<212> DNA
<213> HPV
<400> 70

```

cagacaacga taaccg	16
<210> 71	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 71	
accaccacaa gcagc	15
<210> 72	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 72	
gtcctgttgt aaatgtg	17
<210> 73	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 73	
aggcgacact acgtc	15
<210> 74	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 74	
cgagctcccc taaaa	15
<210> 75	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 75	
ccccaccaag cga	13
<210> 76	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 76	
cctcacggga tactc	15
<210> 77	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 77	
tgcgacaact acagc	15
<210> 78	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 78	
ggattcgggc acta	14
<210> 79	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 79	
catataacac aggctcac	18
<210> 80	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 80	
tagtgctagg tgtagtgg	18
<210> 81	
<211> 13	

<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	81	
acgcaggagg	tgg	13
<210>	82	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	82	
tacatacacg	cacgca	16
<210>	83	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	83	
ccacaaggca	cattca	16
<210>	84	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	84	
gctacacgtg	cacggcg	17
<210>	85	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	85	
gtgattaaat	atggtgg	17
<210>	86	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	86	
gggacgttgg	acg	13
<210>	87	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	87	
ggcaatgcgc	taat	14
<210>	88	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	88	
caccgattct	tccag	15
<210>	89	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	89	
cacctcacac	aattcg	16
<210>	90	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	90	
ggatccggtg	cag	13
<210>	91	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	91	

gtaaaagttg tgaacgatc	19
<210> 92	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 92	
ggtgctggag acaa	14
<210> 93	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 93	
acatctagag aacctag	17
<210> 94	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 94	
cacacatcag cgaca	15
<210> 95	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 95	
cagacaatac cgacag	16
<210> 96	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 96	
tgtgtggacc ggg	13
<210> 97	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 97	
ctgcaaatgt gtgtgtat	18
<210> 98	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 98	
gtcctctgca ctcacat	17
<210> 99	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 99	
acgtcctttg ccac	14
<210> 100	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 100	
ttctgagcaa ctatcatac	19
<210> 101	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 101	
ccctccgcaa cg	12
<210> 102	
<211> 15	

<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	102	
cccatctttg	tttcc	15
<210>	103	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	103	
tcctacacgc	ctagac	16
<210>	104	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	104	
tatagagaac	tgctgtgttc	20
<210>	105	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	105	
gaaatagcgc	cattg	15
<210>	106	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	106	
ctcaggggca	acca	14
<210>	107	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	107	
atccataggg	tccgac	16
<210>	108	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	108	
caatgcggcg	c	11
<210>	109	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	109	
tataaacgag	gtgcag	16
<210>	110	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	110	
gaaaatgccc	tgcta	15
<210>	111	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	111	
acatgcgcca	gg	12
<210>	112	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	112	

gagtaatgtg gtgtgtatg	19
<210> 113	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 113	
gcaaggcata ctgtg	15
<210> 114	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 114	
cactgacact tcgtg	15
<210> 115	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 115	
ggacaatcac cagtatta	18
<210> 116	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 116	
agtttgtgaa gtacatgg	18
<210> 117	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 117	
cggggtgatgg cc	12
<210> 118	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 118	
ccacttgtac tgtgtagg	18
<210> 119	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 119	
ctgtgttttaa ctatgggt	18
<210> 120	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 120	
tacaacagta tgtgtcagac	20
<210> 121	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 121	
aagacaggga gacagc	16
<210> 122	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> HPV	
<400> 122	
cttataaaca atacacagg	19
<210> 123	
<211> 20	

<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	123	
	atgcactata gtaacacacc	20
<210>	124	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	124	
	actccatttt agtgctgta	19
<210>	125	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	125	
	tcaggaccca caggagcgac ccag	24
<210>	126	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	Iniciador sintético	
<400>	126	
	gcaccaaaaag agaactgcaa tgt	23
<210>	127	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	Iniciador sintético	
<400>	127	
	catatacctc acgtcgcagt aact	24
<210>	128	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	128	
	tattttatat gacacaatgt	20
<210>	129	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	HPV	
<400>	129	
	ggtttgctgct aacaataaat gtatccatag	30

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar cada um dentre uma pluralidade de ácidos nucleicos alvos, caracterizado pelo fato de compreender:

a) capturar uma pluralidade de ácidos nucleicos alvos em um suporte sólido por misturação: referida pluralidade de ácidos nucleicos alvos, sondas de ácido nucleico complementares a pelo menos uma porção dos ácidos nucleicos alvos, em que um é RNA e o outro é DNA, e um suporte sólido, formando uma pluralidade de ácidos nucleicos alvos enriquecidos;

b) amplificar os ácidos nucleicos ou sondas de ácido nucleico enriquecidos, formando uma pluralidade de alvos amplificados; e

c) detectar os ácidos nucleicos alvos por detecção da pluralidade de alvos amplificados por misturação de: a pluralidade de alvos amplificados; oligonucleotídeos selecionáveis que hibridizam em uma primeira porção dos alvos amplificados; e sondas de ácido nucleico complementares a uma segunda porção dos alvos amplificados, formando um complexo de oligonucleotídeo híbrido DNA: RNA, em que os híbridos DNA: RNA são detectáveis pelos agentes de ligação específicos para híbrido DNA: RNA, e selecionáveis pela separação do complexo de oligonucleotídeos, assim detectando cada um dentre a pluralidade de ácidos nucleicos alvos.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, na etapa de captura, o suporte sólido é conjugado a um agente de ligação específico de híbrido DNA: RNA, assim capturando os ácidos nucleicos alvos a um suporte sólido.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação específico do híbrido DNA: RNA é selecionado dentre o grupo consistindo de: anticorpos específicos para híbrido DNA: RNA, anticorpos monoclonais ou policlonais, ou fragmentos dos mesmos, proteínas, RNase H cataliticamente inativa, e ácidos nucleicos, aptâmeros de ácido nucleico ou oligonucleotídeos que ligam e formam uma

estrutura triplex.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação específico do híbrido DNA: RNA é um anticorpo específico do híbrido DNA: RNA.

5 5. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação específico do híbrido DNA: RNA é uma sonda de ácido nucleico complementar ao ácido nucleico alvo.

10 6. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o agente de ligação específico do híbrido DNA: RNA é rotulado de modo detectável.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o rótulo é detectado por: métodos de colorimetria, quimioluminescência, fluorescência, e de difusão de luz.

15 8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os ácidos nucleicos alvos capturados ou sondas de ácido nucleico são amplificados por amplificação isotérmica.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a DNA polimerase é usada na amplificação isotérmica.

20 10. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que os iniciadores aleatórios são usados em amplificação isotérmica.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que os iniciadores aleatórios são pentâmeros.

25 12. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que os iniciadores aleatórios contém um subconjunto de seqüências de iniciador específicas para uma doença.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os oligonucleotídeos selecionáveis são ligados a um suporte sólido.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido é selecionado dentre o grupo consistindo de: placas, microplacas, placas de microtitulação, lâminas, discos, contas, chips, micropartículas, porções, filamentos, chips, microchips, tiras, membranas, microarranjos, e tubos de teste.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido é feito de um material selecionado dentre o grupo consistindo de: vidro, silicone, plástico, poliestireno, polietileno, polipropileno e policarbonato.

16. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido é modificado para conter: foi modificado de modo que a superfície contém grupos carboxila, amino, hidrazida, aldeído, derivados de ácido nucleico ou nucleotídeo, grupos amino primário, e corantes.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ainda compreender adicionar sondas de bloqueador.

18. Método para detectar cada um dentre uma pluralidade de ácidos nucleicos alvos caracterizado pelo fato de compreender:

a) hibridizar uma pluralidade de ácidos nucleicos alvos em sondas de ácido nucleico que são complementares a pelo menos uma porção dos ácidos nucleicos alvos, formando híbridos DNA: RNA;

b) capturar os híbridos DNA: RNA com anticorpos específicos para híbrido DNA: RNA conjugados a suportes sólidos;

c) separar os ácidos nucleicos alvos não ligados dos híbridos DNA: RNA;

d) amplificar os ácidos nucleicos alvos capturados ou sondas de ácido nucleico, formando uma pluralidade de alvos amplificados, usando iniciadores aleatórios e DNA polimerase;

e) hibridizar as sondas de ácido nucleico complementares a

uma primeira porção dos alvos amplificados, formando híbridos DNA: RNA;

f) hibridizar oligonucleotídeos conjugados a uma pluralidade de suportes sólidos para uma segunda porção dos alvos amplificados, em que o suporte sólido é selecionável; e

5 g) selecionar cada um dentre uma pluralidade de alvos amplificados pelo suporte sólido selecionável; e

h) detectar cada um dentre uma pluralidade de alvos amplificados por ligação dos agentes de ligação específicos de híbrido DNA: RNA para os híbridos DNA: RNA, em que a presença de uma pluralidade de
10 apícons é indicativa da presença de ácidos nucleicos alvos.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o suporte sólido conjugado a oligonucleotídeos são contas distinguíveis.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que as contas distinguíveis são selecionadas dentre o grupo
15 consistindo de rótulos detectáveis: um rótulo fluorescente, um rótulo de ouro, e um rótulo de enzima.

21. Método multiplex para detectar uma pluralidade de DNAs alvos, caracterizado pelo fato de compreender:

20 a) hibridizar uma pluralidade de DNAs alvos em sondas de RNA que são complementares a pelo menos uma porção dos DNAs alvos, formar híbridos DNA: RNA;

b) capturar os híbridos DNA: RNA com anticorpos específicos para híbrido DNA: RNA conjugados a contas;

25 c) separar os ácidos nucleicos não ligados a partir dos híbridos DNA: RNA, formando alvos enriquecidos;

d) amplificar os DNAs alvos enriquecidos, formando uma pluralidade de alvos amplificados, usando iniciadores aleatórios e DNA polimerase;

e) hibridizar as sondas de RNA complementares a uma primeira porção dos DNAs alvos amplificados, formando híbridos DNA: RNA;

5 f) hibridizar os oligonucleotídeos de DNA em uma segunda porção dos DNAs alvos, em que os oligonucleotídeos de DNA são conjugados a uma pluralidade de contas selecionáveis; e

10 g) detectar a pluralidade DNAs alvos amplificados por ligação de anticorpos específicos de híbridos DNA: RNA para os híbridos DNA: RNA e selecionar cada um dos alvos amplificados com base na conta selecionável particular.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as sondas de ácido nucleico complementares a pelo menos uma porção dos ácidos nucleicos alvos e seqüências de oligonucleotídeos são selecionadas dentre o grupo consistindo de

15 GTACAGATGGTACCGGGTTGTAGAAGTATCTG [SEQ ID NO: 1];
 CTGCAACAAGACATACATCGACCGGTCCACC [SEQ ID NO: 2];
 GAAGTAGGTGAGGCTGCATGTGAAGTGGTAG [SEQ ID NO: 3];
 CAGCTCTGTGCATAACTGTGGTAACTTTCTGGG [SEQ ID NO: 4];
 GAGGTCTTCTCCAACATGCTATGCAACGTCCTG [SEQ ID NO: 5];
 20 GTGTAGGTGCATGCTCTATAGGTACATCAGGCC [SEQ ID NO: 6];
 CAATGCCGAGCTTAGTTCATGCAATTTCCGAGG [SEQ ID NO: 7];
 GAAGTAGTAGTTGCAGACGCCCCCTAAAGGTTGC [SEQ ID NO: 8];
 GAACGCGATGGTACAGGCACTGCAGGGTCC [SEQ ID NO: 9];
 GAACGCGATGGTACAGGCACTGCA [SEQ ID NO: 10];
 25 ACGCCCAACCAATGGAATGTACCC [SEQ ID NO: 11];
 TCTGCGTCGTTGGAGTCGTTCTGTCGTGCTC [SEQ ID NO: 12];
 *(TTATTATTA)CTACATACATTGCCGCCATGTTCGCCA [SEQ ID NO: 13];
 (TTATTATTA)TGTTGCCCTCTGTGCCCCCGTTGTCTATAGCCTCCGT
 [SEQ ID NO: 14];

- (TTATTATTA)GGAGCAGTGCCCCAAAAGATTAAAGTTTGC [SEQ ID NO: 15];
 (TTATTATTA)CACGGTGCTGGAATACGGTGAGGGGGTG [SEQ ID NO: 16];
 (TTATTATTA)ACGCCACCCAATGGAATGTACCC [SEQ ID NO: 17];
 (TTATTATTA)ATAGTATTGTGGTGTGTTTCTCACAT [SEQ ID NO: 18];
- 5 (TTATTATTA)GTTGGAGTCGTTCTGTCGTG [SEQ ID NO: 19];
 (TTATTATTA)CGGAATTTCAATTTTGGGGCTCT [SEQ ID NO: 20];
 GCTCGAAGGTCGTCTGCTGAGCTTTCTACTACT [SEQ ID NO: 21];
 GCGCCATCCTGTAATGCACTTTTCCACAAAGC [SEQ ID NO: 22];
 TAGTGCTAGGTGTAGTGGACGCAGGAGGTGG [SEQ ID NO: 23];
- 10 GGTCAACAACATGTATTACACTGCCCTCGGTAC [SEQ ID NO: 24];
 CCTACGTCTGCGAAGTCTTTCTTGCCGTGCC [SEQ ID NO: 25];
 CTGCATTGTCACTACTATCCCCACCACTACTTTG [SEQ ID NO: 26];
 CCACAAGGCACATTCATACATACACGCACGCA [SEQ ID NO: 27];
 GTTCTAAGGTCCTCTGCCGAGCTCTCTACTGTA [SEQ ID NO: 28];
- 15 (TTATTATTA)TGCGGTTTTGGGGGTCGACGTGGAGGC [SEQ ID NO: 29];
 (TTATTATTA)AGACCTGCCCCCTAAGGGTACATAGCC [SEQ ID NO: 30];
 (TTATTATTA)CAGCATTGCAGCCTTTTTGTTACTTGCTTGTAATAGCTCC
 [SEQ ID NO: 31];
 (TTATTATTA)ATCCTGTAATGCACTTTTCCACAAA [SEQ ID NO: 32];
- 20 (TTATTATTA)GCCTGGTCACAACATGTATTAC [SEQ ID NO: 33];
 (TTATTATTA)CAGGATCTAATTCATTCTGAGGTT [SEQ ID NO: 34];
 TGCGGTTTTGGGGGTCGACGTGGAGGC [SEQ ID NO: 35];
 GGCGCAACCACATAACACACAGAACCACAAAAC [SEQ ID NO: 36];
 GTTCTACACGGGTTTGCAGCACGATCAACAACG [SEQ ID NO: 37];
- 25 CGCTGCTTGTGGTGGTCGGTTATCGTTGTCTG [SEQ ID NO: 38];
 GACGTAGTGTCGCCTCACATTTACAACAGGAC [SEQ ID NO: 39];
 CTCGCTTGGTGGGGTTGTAGGGGAGCTCGG [SEQ ID NO: 40];
 GCTGTAGTTGTGCGCAGAGTATCCCGTGAGG [SEQ ID NO: 41];
 GTGAGCCTGTGTTATATGTAGTGCCCGAATCCC [SEQ ID NO: 42];

CCACCTCCTGCGTCCACTACACCTAGCACTA [SEQ ID NO: 43];
 TCGTGCGTGTATGTATGAATGTGCCTTGTGG [SEQ ID NO: 44];
 AATTAGCGCATTGCCCCGTCCAACGTCCCG [SEQ ID NO: 45];
 CGCCGTGCACGTGTAGCCACCATATTTAATCAC [SEQ ID NO: 46];
 5 CGAATTGTGTGAGGTGCTGGAAGAATCGGTGC [SEQ DD NO: 47];
 GATCGTTCACAACCTTTTACCTGCACCGGATCC [SEQ ED NO: 48];
 CTAGGTTCTCTAGATGTTTGTCTCCAGCACCCC [SEQ ID NO: 49];
 CTGTCGGTATTGTCTGTGTCGCTGATGTGTG [SEQ ID NO: 50];
 GATACACACACATTTGCAGCCCGGTCCACACA [SEQ ID NO: 51];
 10 GGTGGCAAAGGACGTATGTGAGTGCAGAGGAC [SEQ ID NO: 52];
 GCGTTGCGGAGGGGTATGATAGTTGCTCAGAAG [SEQ ID NO: 53];
 GTCTAGGCGTGTAGGAGGAAACAAGATGGGG [SEQ ID NO: 54];
 CTGAACACAGCAGTTCTCTATACCAATGGCGCTATTTC [SEQ ID NO: 55];
 TTGGTTGCCCCTGAGCAGTCGGACCCTATGGATA [SEQ ID NO: 56];
 15 GCGCCGCATTGCTGCACCTCGTTTATATAGCAGGGCATTTC [SEQ ID NO: 57];
 CCTGGCGCATGTCATACACACCACATTACTC [SEQ ID NO: 58];
 CACGAAGTGTGAGTGCACAGTATGCCTTGC [SEQ ID NO: 59];
 GCCATGTACTTCACAACTGTTAATACTGGTGATTGTCCC [SEQ ID NO: 60];
 CCTACACAGTACAAGTGGAGGCCATCACCCG [SEQ DD NO: 61];
 20 GTCTGACACATACTGTTGTAACCCATAGTTAAACACAGG [SEQ ID NO: 62];
 GCTGTCTCCCTGTCTTCTGTGTATTGTTTAT AAGTGTATT [SEQ ID NO: 63]; e
 GTACAGCACTAAAATGGAGTTTGGTGTGTTACTATAGTGCATAC
 [SEQ ID NO: 64].

23. Composição, caracterizada pelo fato de ser para uso no
 25 método definido na reivindicação 17, em que as sondas de ácido nucleico
 complementares a pelo menos uma porção dos ácidos nucleicos alvos,
 seqüências de oligonucleotídeos, e sondas de bloqueador são selecionados
 dentre o grupo consistindo de:
 GTACAGATGGTACCGGGGTTGTAGAAGTATCTG [SEQ ID NO: 1];

- CTGCAACAAGACATACATCGACCGGTCCACC [SEQ ID NO: 2];
 GAAGTAGGTGAGGCTGCATGTGAAGTGGTAG [SEQ ID NO: 3];
 CAGCTCTGTGCATAACTGTGGTAACTTTCTGGG [SEQ ID NO: 4];
 GAGGTCTTCTCCAACATGCTATGCAACGTCCTG [SEQ ID NO: 5];
 5 GTGTAGGTGCATGCTCTATAGGTACATCAGGCC [SEQ ID NO: 6];
 CAATGCCGAGCTTAGTTCATGCAATTTCCGAGG [SEQ ID NO: 7];
 GAAGTAGTAGTTGCAGACGCCCCCTAAAGGTTGC [SEQ ID NO: 8];
 GAACGCGATGGTACAGGCACTGCAGGGTCC [SEQ ID NO: 9];
 GAACGCGATGGTACAGGCACTGCA [SEQ ID NO: 10];
 10 ACGCCCAACCAATGGAATGTACCC [SEQ ID NO: 11];
 TCTGCGTCGTTGGAGTCGTTCTGTCGTGCTC [SEQ ID NO: 12];
 *(TTATTATTA)CTACATACATTGCCGCCATGTTGCGCA [SEQ ID NO: 13];
 (TTATTATTA)TGTTGCCCTCTGTGCCCCCGTTGTCTATAGCCTCCGT
 [SEQ ID NO: 14];
 15 (TTATTATTA)GGAGCAGTGCCCCAAAAGATTAAAGTTTGC [SEQ ID NO: 15];
 (TTATTATTA)CACGGTGCTGGAATACGGTGAGGGGGTG [SEQ ID NO: 16];
 (TTATTATTA)ACGCCCAACCAATGGAATGTACCC [SEQ ID NO: 17];
 (TTATTATTA)ATAGTATTGTGGTGTGTTTCTCACAT [SEQ ID NO: 18];
 (TTATTATTA)GTTGGAGTCGTTCTGTCGTG [SEQ ID NO: 19];
 20 (TTATTATTA)CGGAATTTCAATTTTGGGGCTCT [SEQ ID NO: 20];
 GCTCGAAGGTCGTCTGCTGAGCTTTCTACTACT [SEQ ID NO: 21];
 GCGCCATCCTGTAATGCACTTTTCCACAAAGC [SEQ ID NO: 22];
 TAGTGCTAGGTGTAGTGGACGCAGGAGGTGG [SEQ ID NO: 23];
 GGTCACAACATGTATTACACTGCCCTCGGTAC [SEQ ID NO: 24];
 25 CCTACGTCTGCGAAGTCTTTCTTGCCGTGCC [SEQ ID NO: 25];
 CTGCATTGTCACTACTATCCCCACCACTACTTTG [SEQ ID NO: 26];
 CCACAAGGCACATTCATACATACACGCACGCA [SEQ ID NO: 27];
 GTTCTAAGGTCCTCTGCCGAGCTCTCTACTGTA [SEQ ID NO: 28];
 (TTATTATTA)TGCGGTTTTGGGGGTCGACGTGGAGGC [SEQ ID NO: 29];

- (TTATTATTA)AGACCTGCCCCCTAAGGGTACATAGCC [SEQ ID NO: 30];
 (TTATTATTA)CAGCATTGCAGCCTTTTTGTTACTTGCTTGTAATAGCTCC
 [SEQ ID NO: 31];
 (TTATTATTA)ATCCTGTAATGCACTTTTCCACAAA [SEQ ID NO: 32];
- 5 (TTATTATTA)GCCTGGTCACAACATGTATTAC [SEQ ID NO: 33];
 (TTATTATTA)CAGGATCTAATTCATTCTGAGGTT [SEQ ID NO: 34];
 TGCGGTTTTGGGGGTCGACGTGGAGGC [SEQ ID NO: 35];
 GGCGCAACCACATAACACACAGAACCACAAAAC [SEQ ID NO: 36];
 GTTCTACACGGGTTTGCAGCACGATCAACAACG [SEQ ID NO: 37];
- 10 CGCTGCTTGTGGTGGTCGGTTATCGTTGTCTG [SEQ ID NO: 38];
 GACGTAGTGTGCGCTCACATTTACAACAGGAC [SEQ ID NO: 39];
 CTCGCTTGGTGGGGTTGTAGGGGAGCTCGG [SEQ ID NO: 40];
 GCTGTAGTTGTGCGCAGAGTATCCCGTGAGG [SEQ ID NO: 41];
 GTGAGCCTGTGTTATATGTAGTGCCCGAATCCC [SEQ ID NO: 42];
- 15 CCACCTCCTGCGTCCACTACACCTAGCACTA [SEQ ID NO: 43];
 TGCGTGCGTGTATGTATGAATGTGCCTTGTGG [SEQ ID NO: 44];
 AATTAGCGCATTGCCCCGTCCAACGTCCCG [SEQ ID NO: 45];
 CGCCGTGCACGTGTAGCCACCATATTTAATCAC [SEQ ID NO: 46];
 CGAATTGTGTGAGGTGCTGGAAGAATCGGTGC [SEQ ID NO: 47];
- 20 GATCGTTCACAACCTTTTACCTGCACCGGATCC [SEQ ID NO: 48];
 CTAGGTTCTCTAGATGTTTGTCTCCAGCACCCC [SEQ ID NO: 49];
 CTGTCGGTATTGTCTGTGTCGCTGATGTGTG [SEQ ID NO: 50];
 GATACACACACATTTGCAGCCCGGTCCACACA [SEQ ID NO: 51];
 GGTGGCAAAGGACGTATGTGAGTGCAGAGGAC [SEQ ID NO: 52];
- 25 GCGTTGCGGAGGGGTATGATAGTTGCTCAGAAG [SEQ ID NO: 53];
 GTCTAGGCGTGTAGGAGGAAACAAGATGGGG [SEQ ID NO: 54];
 CTGAACACAGCAGTTCTCTATACCAATGGCGCTATTTC [SEQ ID NO: 55];
 TTGGTTGCCCTGAGCAGTCGGACCCTATGGATA [SEQ ID NO: 56];
 GCGCCGCATTGCTGCACCTCGTTTATATAGCAGGGCATTTC [SEQ ID NO: 57];

CCTGGCGCATGTCATACACACCACATTACTC [SEQ ID NO: 58];
CACGAAGTGTCAAGTGCACAGTATGCCTTGC [SEQ ID NO: 59];
GCCATGTACTTCACAACTGTTAATACTGGTGATTGTCCC [SEQ ID NO: 60];
CCTACACAGTACAAGTGGAGGCCATCACCCG [SEQ ID NO: 61];
5 GTCTGACACATACTGTTGTAACCCATAGTTAAACACAGG [SEQ ID NO: 62];
GCTGTCTCCCTGTCTTCCTGTGTATTGTTTATAAGTGTATT [SEQ ID NO: 63];
GTACAGCACTAAAATGGAGTTTGGTGTGTTACTATAGTGCATAC
[SEQ ID NO: 64];
e ACTCCAACGACGCAGA [SEQ ID NO: 65];
10 TTTTGTGGTTCTGTGTG [SEQ ID NO: 66];
TTATGTGGTTGCGC [SEQ ID NO: 67];
CGTTGTTGATCGTGC [SEQ ID NO: 68];
TGCAAACCCGTGTAG [SEQ ID NO: 69];
CAGACAACGATAACCG [SEQ ID NO: 70];
15 ACCACCACAAGCAGC [SEQ ID NO: 71];
GTCCTGTTGTAAATGTG [SEQ ID NO: 72];
AGGCGACACTACGTC [SEQ ID NO: 73];
CGAGCTCCCCTACAA [SEQ ID NO: 74];
CCCCACCAAGCGA [SEQ ID NO: 75];
20 CCTCACGGGATACTC [SEQ ID NO: 76];
TGCGACAACTACAGC [SEQ ID NO: 77];
GGATTCGGGCACTA [SEQ ID NO: 78];
CATATAACACAGGCTCAC [SEQ ID NO: 79];
TAGTGCTAGGTGTAGTGG [SEQ ID NO: 80];
25 ACGCAGGAGGTGG [SEQ ID NO: 81];
TACATACACGCACGCA [SEQ ID NO: 82];
CCACAAGGCACATTCA [SEQ ID NO: 83];
GCTACACGTGCACGGCG [SEQ ID NO: 84];
GTGATTAAATATGGTGG [SEQ ID NO: 85];

- GGGACGTTGGACG [SEQ ID NO: 86];
GGCAATGCGCTAAT [SEQ ID NO: 87];
CACCGATTCTTCCAG [SEQ ID NO: 88];
CACCTCACACAATTCG [SEQ ID NO: 89];
5 GGATCCGGTGCAG [SEQ ID NO: 90];
GTAAAAGTTGTGAACGATC [SEQ ID NO: 91];
GGTGCTGGAGACAA [SEQ ID NO: 92];
ACATCTAGAGAACCTAG [SEQ ID NO: 93];
CACACATCAGCGACA [SEQ ID NO: 94];
10 CAGACAATACCGACAG [SEQ ID NO: 95];
TGTGTGGACCGGG [SEQ ID NO: 96];
CTGCAAATGTGTGTGTAT [SEQ ID NO: 97];
GTCCTCTGCACTCACAT [SEQ ID NO: 98];
ACGTCCTTTGCCAC [SEQ ID NO: 99];
15 TTCTGAGCAACTATCATAC [SEQ ID NO: 100];
CCCTCCGCAACG [SEQ ID NO: 101];
CCCCATCTTGTTTCC [SEQ ID NO: 102];
TCCTACACGCCTAGAC [SEQ ID NO: 103];
TATAGAGAACTGCTGTGTTC [SEQ ID NO: 104];
20 GAAATAGCGCCATTG [SEQ ID NO: 105];
CTCAGGGGCAACCA [SEQ ID NO: 106];
ATCCATAGGGTCCGAC [SEQ ID NO: 107];
CAATGCGGCGC [SEQ ID NO: 108];
TATAAAC GAGGTGCAG [SEQ ID NO: 109];
25 GAAAATGCCCTGCTA [SEQ ID NO: 110];
ACATGCGCCAGG [SEQ ID NO: 111];
GAGTAATGTGGTGTGTATG [SEQ ID NO: 112];
GCAAGGCATACTGTG [SEQ ID NO: 113];
CACTGACACTTCGTG [SEQ ID NO: 114];

GGACAATCACCAGTATTA [SEQ ID NO: 115];
AGTTTGTGAAGTACATGG [SEQ ID NO: 116];
CGGGTGATGGCC [SEQ ID NO: 117];
CCACTTGTACTGTGTAGG [SEQ ID NO: 118];
5 CTGTGTTTAACT ATGGGT [SEQ ID NO: 119];
TACAACAGTATGTGTCAGAC [SEQ ID NO: 120];
AAGACAGGGAGACAGC [SEQ ID NO: 121];
CTTATAAACAATACACAGG [SEQ ID NO: 122];
ATGCACTATAGTAACACACC [SEQ ID NO: 123];
10 e ACTCCATTTTAGTGCTGTA [SEQ ID NO: 124].

24. Composição de matéria, caracterizada pelo fato de compreender uma seqüência de ácido nucleico selecionada dentre o grupo consistindo de: SEQ ID NOs: 1-124.

RESUMO

“MÉTODO PARA DETECTAR CADA UM DENTRE UMA PLURALIDADE DE ÁCIDOS NUCLEICOS ALVOS, MÉTODO MULTIPLEX PARA DETECTAR UMA PLURALIDADE DE DNAS ALVOS, E, COMPOSIÇÃO”

Captura de híbrido específico do alvo (TSHC) provê um método de detecção de ácido nucleico que não é somente rápido e sensível, mas é também altamente específico e capaz de discriminar seqüências de ácido nucleico altamente homólogas. O método produz híbridos DNA: RNA que podem ser detectados por vários métodos.