

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.10.03	(73) Titular(es): GIANNOULA SOUFLA	
(30) Prioridade(s): 2001.10.16 GR 2001100478	84 ANAKREONTOS STR 15771 ZOGRFOU	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.07.14	ATTIKIS, ATHENS	GR
(45) Data e BPI da concessão: 2007.04.25 078/2007	(72) Inventor(es): GIANNOULA SOUFLA	GR
	(74) Mandatário: JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES AV. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 131, 7º - C 1700-173 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **SISTEMA DE ENSAIO DE TIRA DE TESTE E MÉTODO PARA A DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO ESPECÍFICAS.**

(57) Resumo:
SISTEMA DE ENSAIO DE TIRA DE TESTE E MÉTODO PARA A DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO ESPECÍFICAS.

RESUMO**SISTEMA DE ENSAIO DE TIRA DE TESTE E MÉTODO PARA A
DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO ESPECÍFICAS**

A presente invenção refere-se a um sistema de ensaio de tira de teste para imersão, método para a construção do referido sistema de tira de teste e método para a detecção e/ou determinação de sequências de ácido nucleico específicas utilizando os protocolos de ensaio de hibridação desenvolvidos no referido sistema de tira de teste. Faz-se a secagem de partículas de ouro coloidal conjugadas com oligonucleótidos na tira e imobiliza-se a proteína estreptavidina, bem como um oligonucleótido, na área de membrana da tira. É detectada uma sequência de ácido nucleico específica quando se desenvolve um sinal visível, indicativo da presença ou ausência do analito, na região de imobilização da estreptavidina, verificando-se ao mesmo tempo se o teste está completo pelo desenvolvimento de um sinal visível na região de imobilização do oligonucleótido. O sistema de ensaio de tira de teste para imersão é útil para a detecção ou determinação rápida de sequências de ácido nucleico específicas numa amostra, tais como sequências de ácido nucleico virais ou bacterianas, específicas, bem como sequências de ADN mutadas de significado clínico, após a amplificação da sequência de ácido nucleico específica na amostra, através de uma reacção de PCR.

DESCRIÇÃO

SISTEMA DE ENSAIO DE TIRA DE TESTE E MÉTODO PARA A DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO ESPECÍFICAS

A presente invenção refere-se a um dispositivo analítico, especificamente a um sistema de ensaio de tira de teste para imersão, com reagentes secos, assim como a um método de ensaio para a detecção e/ou determinação de sequências de ácido nucleico específicas de significado clínico, que utiliza a referida tira de teste.

Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um sistema de ensaio de um passo que é particularmente útil para dispositivos de diagnóstico de teste rápido e sensível: um sistema de ensaio de tira de teste para imersão com reagentes secos, bem como o desenvolvimento de ensaios de hibridação na referida tira de teste para imersão, com os quais é possível detectar a presença ou ausência de uma sequência de ácido nucleico específica numa amostra biológica, com grande facilidade e rapidez.

As tiras de teste para imersão são sistemas que consistem em diferentes tipos de materiais e reagentes, secos ou imobilizados nestes materiais, suportados por uma película de poliestireno flexível que é na realidade utilizada como base para construção do sistema. O sistema consiste em, pelo menos, quatro áreas distintas/discerníveis: a) a área ou parte da tira de teste que fica em contacto com a amostra, ou com a solução de desenvolvimento do ensaio, na tira, b) a área

ou parte da tira de teste na qual é seco o reagente que possui, ou é responsável pelo sinal visível, c) a área ou parte da tira de teste na qual se desenvolve o sinal (área da membrana), d) área ou parte da tira de teste com a função de reter o excesso da amostra líquida, ou líquido contendo o analito. Nalguns casos, as áreas a) e b) ou b) e c) podem não ser discerníveis. O sistema de ensaio de tira de teste para imersão da presente invenção consiste nas quatro áreas distintas acima mencionadas e possui na área b): microesferas de cor e na área c): reagentes imobilizados em duas zonas discerníveis (linhas ou pontos) que indicam a presença ou ausência do ácido nucleico detectado e confirmam se o ensaio está completo [bem como a utilização correcta e o bom estado da tira de teste para imersão], respectivamente.

A presença ou ausência e a determinação da quantidade de uma sequência de ácido nucleico específica dão respostas de grande importância a questões investigadas pela microbiologia, virologia, genética e pesquisa biomédica em geral. A grande evolução das técnicas de biologia molecular e as muitas aplicações específicas da reacção em cadeia com polimerase (PCR), levou à necessidade de desenvolver muitas técnicas para a detecção e determinação dos produtos específicos da reacção de PCR.

As técnicas que compreendem electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, por exemplo, SSCP, DGGE, RFLP, são muito sensíveis, mas têm algumas desvantagens, tais como a necessidade de pessoal treinado, tempo de análise

total longo e utilização de reagentes prejudiciais ou irritantes.

As técnicas que tiram vantagem da hibridação de ADN/ADN, ARN/ARN ou ARN/ADN para a detecção de sequências de ácido nucleico específicas são amplamente utilizadas. A substituição das sondas radiomarcadas originalmente utilizadas para a detecção dos híbridos por sondas sem isótopos, permitiu superar desvantagens anteriores, tais como a utilização de reagentes radiomarcados prejudiciais, com tempo de vida limitado, sem compromisso no que respeita à sensibilidade ou especificidade do ensaio. As técnicas do tipo acima referido compreendendo a imobilização de oligonucleótidos em suportes sólidos, tais como membranas de nylon ou nitrocelulose (conhecidas como *dot-blot* ou *dot-blot* inversa) são sensíveis e robustas, mas não são satisfatórias no que se refere à rapidez e facilidade da análise. As técnicas de hibridação compreendendo a imobilização directa ou indirecta de oligonucleótidos a placas de microtítulo ELISA de poliestireno, têm todas as vantagens anteriormente referidas de sensibilidade, especificidade e robustez e adicionalmente a possibilidade de automatização e capacidade de análise simultânea de múltiplas amostras, mas têm a desvantagem de ser heterogéneas o que efectivamente significa que a análise requer múltiplos passos.

O tempo de análise total é comparável ao da técnica de *dot-blot* e *dot-blot* inversa.

A utilização de um sistema de teste rápido, de um passo (testes de tira para imersão ou de fluxo lateral) durante os anos 80 foi revolucionária no campo dos imunoensaios clínicos, oferecendo vantagens atraentes, tais como robustez, especificidade, simplicidade e facilidade de análise, rapidez e baixo custo. As aplicações dos sistemas acima referem-se a testes de gravidez, doenças sexualmente transmissíveis, teste de alimentos, toxinas, infecções bacterianas, controlo ambiental, agentes biológicos, detecção de alérgenos, etc. No entanto, nalguns casos os sinais dos testes rápidos actuais de tira para imersão ou de fluxo lateral não são suficientemente sensíveis para proporcionar um resultado qualitativo ou quantitativo, especialmente quando a concentração da substância a ser detectada já é extremamente baixa na amostra, tal como por exemplo na detecção de anticorpos HIV na saliva ou sangue, ou outras infecções virais ou bacterianas na urina ou sangue, que indicam o início de uma doença particular. No último caso, a detecção de vírus ou bactérias ao nível do ADN ou ARN tem muitas vantagens em relação à determinação da resposta imunológica do sistema imunitário do paciente, tal como o diagnóstico numa fase precoce de uma infecção viral/bacteriana (mesmo antes da resposta do sistema imunitário), detecção de ADN viral/bacteriano a baixas concentrações (limite de detecção baixo) com a sensibilidade e especificidade que caracterizam as técnicas de biologia molecular, capacidade para monitorizar a eficácia de uma terapia ou tratamento de um paciente. As técnicas de biologia molecular, no entanto, que também são actualmente utilizadas nos laboratórios

clínicos em todo o mundo para detecção de mutações, para o diagnóstico molecular de doenças genéticas, bem como para o diagnóstico molecular de cancro (cancro da mama, cancro da próstata, etc.) são inferiores aos testes de tira para imersão e de fluxo lateral, no que se refere à rapidez e facilidade de utilização.

A presente invenção proporciona um sistema de ensaio de um passo (uma tira de teste para imersão) que utiliza métodos e técnicas de biologia molecular, especificamente a hibridação de sequências de ácido nucleico complementares e combina as vantagens da análise molecular com a simplicidade, rapidez de análise e o baixo custo dos testes rápidos.

De acordo com a presente invenção, isto é conseguido por meio de um sistema de ensaio de tira de teste para imersão com reagentes secos, que consiste nas quatro áreas distintas: a), b), c) e d) acima mencionadas, caracterizado por a área b) possuir partículas de ouro coloidal secas, conjugadas com um oligonucleótido e por a área c) possuir a proteína estreptavidina e um oligonucleótido de sequência complementar ao oligo conjugado com as partículas de ouro da área b) que estão imobilizados em duas zonas discerníveis (linhas e pontos). A presente invenção também proporciona um método para a construção do referido sistema de tira de teste para imersão, bem como um método de ensaio para a detecção e/ou determinação de sequências de ácido nucleico específicas, por meio do desenvolvimento de testes de hibridação particulares no referido sistema de

tira de teste, caracterizado por se utilizar uma sonda de oligonucleótidos em que uma parte é complementar à sequência de ácido nucleico a ser detectada e outra parte tem uma sequência complementar ao oligo conjugado com as partículas de ouro, bem como por se produzir um sinal visível, com base na hibridação de sequências de ácido nucleico complementares, indicativa da presença ou ausência da referida sequência de ácido nucleico específica num sítio de detecção num suporte (área c) em que a proteína estreptavidina está imobilizada, produzindo-se um sinal visível (com base na hibridação) indicativo de que o teste está completo (a amostra juntamente com as partículas de ouro coloidal atingiu o ponto de detecção) num sítio de controlo num suporte (área c), caracterizado por no referido sítio estar imobilizado um oligonucleótido.

O sistema de ensaio de tira de teste para imersão com reagentes secos da presente invenção tem muitas vantagens. O facto de a proteína estreptavidina estar imobilizada no sítio de detecção na área c) significa efectivamente que ou se utiliza um oligonucleótido biotinilado como sonda para a sequência de ácido nucleico específica a ser detectada, ou o ácido nucleico específico a ser detectado é biotinilado; depende do protocolo de hibridação particular que é desenvolvido na tira. Deste modo, tira-se vantagem da ponte biotina-estreptavidina que é muito estável ($K = 10^{15}$ l/mol), resultando uma sensibilidade aumentada no ensaio em que está a ser utilizada, em comparação com a sensibilidade de sondas radiomarcadas. Utilizando esta tecnologia, o

ensaio é também caracterizado por especificidade, uma vez que a detecção se baseia na hibridação de sequências de ácido nucleico específicas. Além disso, o tempo de análise é drasticamente reduzido, das duas ou três horas necessárias para as técnicas de biologia molecular mais rápidas, actualmente utilizadas, para dez ou vinte minutos, a análise é muito simples e evita-se a utilização anterior de muitos materiais e reagentes prejudiciais.

Os custos de produção de uma tira de teste para imersão deste tipo são significativamente baixos.

Por fim, uma vantagem igualmente importante do sistema de ensaio de tira de teste para imersão é a sua capacidade para uma utilização universal para a detecção de muitas sequências de ácido nucleico diferentes, tendo também a flexibilidade de se desenvolverem nela protocolos de hibridação alternativos, por uma modificação simples relativa à utilização da sonda específica adequada para cada ácido nucleico a ser detectado, o que é descrito a seguir.

A invenção será agora descrita em particular a título de exemplo, com referência às Figuras diagramáticas anexas, em que:

A figura 1 é um desenho esquemático de um dispositivo de teste analítico que ilustra o arranjo das quatro áreas distintas/discerníveis que

constituem o sistema de tira de teste para imersão de acordo com a presente invenção.

A figura 2 mostra um desenho esquemático que ilustra as configurações de ensaio de hibridação desenvolvidas no referido sistema de tira de teste que são responsáveis por proporcionar um sinal visível indicativo da presença ou ausência de uma sequência de ácido nucleico específica numa amostra, de acordo com a presente invenção.

Para conveniência do leitor, utilizam-se nos exemplos seguintes os mesmos números de referência que os das figuras.

A figura 1 mostra um desenho esquemático que ilustra o sistema de tira de teste para imersão com reagentes secos (10) que é suportado por uma película de poliestireno flexível (1) que é na realidade utilizada como base para a construção do sistema. O sistema (10) consiste, pelo menos, em quatro áreas distintas de materiais diferentes e com uma função específica: a) a área ou parte da tira de teste que entra em contacto com a amostra, ou com a solução de desenvolvimento do ensaio, na tira (2), b) a área ou parte da tira de teste na qual é seco o reagente de detecção que possui, ou é responsável pelo sinal óptico (3), c) a área ou parte da tira de teste onde se desenvolve o sinal (área de membrana) (6), d) a área ou parte da tira de teste com a função de reter o excesso da amostra líquida, ou líquido contendo o analito (7). A área ou parte a) da tira de

teste que fica em contacto com a amostra, ou com a solução de desenvolvimento do ensaio, na tira (2), é constituída por um elemento poroso, normalmente fibra de algodão e tem a propriedade de absorver rapidamente uma grande quantidade da solução de desenvolvimento do ensaio, permitindo, no entanto, a sua transferência quantitativa para a área b) (3) da tira. A área (3) é constituída por fibra de vidro elaborada de um modo que é capaz de reter o reagente de detecção seco sobre ela, mas permite ao mesmo tempo a sua libertação em direcção à área de membrana quando esta está a ser re-hidratada pela solução de desenvolvimento do ensaio, móvel. A área de membrana (6) compreende uma membrana de nitrocelulose, ou uma membrana modificada de forma adequada para possuir uma funcionalidade de nitrocelulose (grupos azoto na sua superfície). As membranas típicas que podem ser utilizadas no sistema da presente invenção são membranas de nitrocelulose com tamanhos de poro na gama de 5 μm a 8 μm , ou 12 μm , dependendo da aplicação particular (e.g. Schleicher & Schuell AE 98, AE 99, AE 100), bem como a membrana de poliétersulfona modificada para ter uma funcionalidade de nitrocelulose: Predator (Pall & Gelman) com um tamanho de poro de 0,45 μm . A área (7) (parte superior do sistema) consiste de um material fortemente absorvente que compreende essencialmente fibra de algodão.

De acordo com a presente invenção, inicialmente a proteína estreptavidina (8) é imobilizada na membrana, numa quantidade de pelo menos 0,5 μg (8333 fmol) diluídas num tampão fosfato 15 mM, pH 7,2 (solução de aplicação de

estreptavidina) e também um oligonucleótido (9) com um comprimento de pelo menos 60 (sessenta) bases e de preferência entre 60 e 100 bases no máximo, está imobilizado na membrana de um modo que forma ou um ponto, ou uma linha e numa quantidade de pelo menos 500 fmol. O comprimento do oligonucleótido a ser imobilizado é de importância substancial para o sucesso da imobilização. A imobilização da proteína estreptavidina na membrana ocorre a uma distância de 1 cm (8) da extremidade da membrana que fica em contacto com a parte (3) da tira, enquanto que o oligonucleótido é imobilizado a uma distância de 1,5 cm da mesma extremidade da membrana. A imobilização é realizada por aplicação do reagente na área da membrana seleccionada, seguido de cozedura num forno de temperatura e humidade controladas, a 70-80°C, durante um período de tempo que varia entre 30 a 120 minutos, dependendo do tipo de membrana a ser utilizada. A montagem do sistema da tira na película de poliestireno flexível ocorre a seguir à referida imobilização.

De acordo com a presente invenção, aplicam-se partículas de ouro coloidal e secam-se na área (3) do sistema de ensaio de tiras e mais concretamente na metade inferior (5) da área (3) [em direcção à parte da tira que fica em contacto com a solução de desenvolvimento do ensaio], em que as referidas partículas de ouro coloidal estão conjugadas com um oligonucleótido de determinado comprimento e tendo concretamente o comprimento de 60 (sessenta) a 100 (uma centena) bases e com uma sequência complementar ao oligo anteriormente imobilizado (9) na membrana. O oligonucleótido a ser conjugado com as

partículas de ouro coloidal é modificado para possuir um grupo SH na sua extremidade 5' e a conjugação é realizada pelo método descrito por Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., e Storhoff J.J., *in Nature* **382**, 607-609 (1996). De acordo com o referido método de conjugação, o oligonucleótido é adicionado a uma quantidade de partículas de ouro coloidal e incubado a 4°C durante 56 horas. A razão (moles de partículas de ouro coloidal)/(moles de oligonucleótido) mantida no procedimento de conjugação é de pelo menos 1/500 e de preferência entre 1/500 e 1/1000. As referidas partículas de ouro coloidal conjugadas são secas na área (3) cozendo a 40°C durante duas horas, ou preferencialmente permitindo que a solução de aplicação das partículas seque ao ar numa área de humidade confinada. O tampão de aplicação das referidas partículas conjugadas prestes a ser secas na área (3) da tira de teste contém albumina de soro bovino (BSA) a 5% p/v, sacarose a 5% p/v e Tween 20 numa quantidade entre 0,01% e 0,1% p/v e, de preferência, 0,05% p/v. As partículas de ouro utilizadas na presente invenção para conjugação com oligonucleótidos podem ter um diâmetro de 20 nm ou 30 nm, ou 40 nm.

Na metade superior (4) da área (3) da tira de teste para imersão da presente invenção, aplica-se a amostra que se suspeita que contém o analito (ADN), o referido ADN é previamente desnaturado por aquecimento a 95°C durante 5 minutos e pré-hibridado durante pelo menos 15-20 minutos com uma ou duas sondas de oligonucleótidos, a uma temperatura que depende da T_m das sondas e em condições adequadas de força iónica, pH e tampão adequado

(J.Mol.Biol. **98**, 503 (1975), Proc.Natl.Acad Sci. USA **76**, 3683 (1979)). A pré-hibridação referida é altamente recomendada pois aumenta a sensibilidade do teste de hibridação na tira e, portanto, a sensibilidade da detecção com a utilização da presente invenção. Para cada ensaio de hibridação para a detecção de um ácido nucleico específico com a tira de teste para imersão da presente invenção, é necessário utilizar pelo menos 5 µl do produto de PCR.

A figura 2 mostra um desenho esquemático que ilustra as configurações do ensaio de hibridação relacionadas com protocolos de hibridação adequados, desenvolvidos no referido sistema de tira de teste, que são responsáveis por proporcionar um sinal visível indicativo da presença ou ausência de uma sequência de ácido nucleico específica numa amostra, de acordo com a presente invenção.

De acordo com o protocolo de hibridação (11) da presente invenção, imobilizam-se 500 fmol de um oligonucleótido (12) com o comprimento de 60 a 100 bases de timina (T) na área (9) da membrana, e também 0,5 µg, pelo menos, da proteína estreptavidina (SA) (13) num tampão fosfato 15 mM, pH 7,2 são imobilizadas na área (8) da membrana. O oligonucleótido que está imobilizado na membrana pode consistir alternativamente de uma sequência ao acaso de pelo menos 20 bases de nucleótido, seguido de uma sequência de 40-80 bases de timina (T) que é adicionada como cauda na extremidade 3' do oligo de sequência aleatória, utilizando a enzima transferase terminal. Um oligo de 80-100 adeninas (A) (15) é

conjugado na superfície de partículas de ouro coloidal (14). O ADN alvo (16) é o produto de uma reacção de PCR em que um dos iniciadores é biotinilado, de modo que uma cadeia do produto de PCR está biotinilada na sua extremidade 5'. Também é necessária uma sonda de oligo (17) que consiste de 20-24 bases de sequência complementar a uma região específica do produto de PCR biotinilado, em que a referida sonda tem adicionalmente 80-100 bases de timina (T) na sua extremidade 5' ou 3'. A sonda (17) pode ter este número de timinas (T) (80-100) sintetizando-a desse modo, ou o 20-24mero pode ser adicionado como uma cauda na sua extremidade 3', utilizando a enzima transferase terminal. Aquecendo a 95°C durante 5 minutos, desnatura-se a amostra que contém o produto de PCR a ser detectado que é em seguida pré-hibridado com a sonda de ácido nucleico específica (17), durante pelo menos 15-20 minutos a uma temperatura que depende da T_m (ponto de fusão) da sonda e a condições adequadas de força iónica, pH e tampão (J.Mol.Biol. **98**, 503 (1975), Proc.Natl.Acad. Sci. USA **76**, 3683 (1979)). Utilizam-se pelo menos 1500-2000 fmol e de preferência 1500-5000 fmol de sonda (17), para hibridação com 5 µL (100-200 fmol/µL) de produto de PCR biotinilado.

De acordo com o protocolo de hibridação II da presente invenção, imobilizam-se 500 fmol de um oligonucleótido (12) com um comprimento de 60 a 100 bases de timina (T) na área (9) da membrana, e 0,5 µg, pelo menos, da proteína estreptavidina (SA) (13) num tampão fosfato 15 mM, pH 7,2 são também imobilizadas na área (8) da membrana. O oligonucleótido que está imobilizado na

membrana pode em alternativa consistir de uma sequência aleatória de pelo menos 20 bases de nucleótido, seguido de uma sequência de 40-80 bases de timinas (T) que são adicionadas como uma cauda na extremidade 3' do oligo de sequência aleatória, utilizando a enzima transferase terminal. Um oligo de 80-100 adeninas (A) (15) é conjugado na superfície de partículas de ouro coloidal (14). O ADN alvo (19) é o produto de uma reacção de PCR em que os iniciadores específicos utilizados não são marcados, de modo que a reacção origina um produto de PCR que não é marcado.

Também são necessárias duas sondas de oligonucleótido que consistem de 20-24 bases de sequência complementar a duas áreas discerníveis da mesma cadeia do produto de PCR. Uma das referidas sondas de oligo é marcada com biotina (20) na sua extremidade 3' ou 5', enquanto que a outra sonda de oligo (21) transporta adicionalmente 80-100 bases de timina (T) na sua extremidade 5' ou 3'. A marcação da sonda (20) com biotina pode ser ou na sua extremidade 5', ou na sua extremidade 3', a referida sonda marcada pode ser sintetizada desse modo particular, ou a marcação pode ocorrer na extremidade 3' do 20-24 mero, utilizando a enzima transferase terminal e um nucleótido marcado com biotina, tal como biotina-14-dATP. O ADN-alvo (19) de cadeia dupla é desnaturado por aquecimento a 95°C durante 5 minutos e em seguida pré-hibridado com as duas sondas de ácido nucleico específicas (20, 21) durante pelo menos 15-20 minutos, a uma temperatura que depende do ponto de fusão (T_m) das duas sondas e em condições adequadas de

força iônica, pH e tampão (J.Mol.Biol. **98**, 503 (1975), Proc.Natl.Acad Sci. USA **76**, 3683 (1979)). Para a hibridação de 5 µl de produto de PCR (100-200 fmol/µl), utilizam-se pelo menos 1500-2000 fmol de cada uma das duas sondas (20, 21) e de preferência no máximo 1500-5000 fmol de cada sonda.

Os protocolos I e II também podem ser desenvolvidos no sistema de ensaio de tira da presente invenção por troca mútua dos oligonucleótidos imobilizados na membrana e na superfície das partículas de ouro coloidal, respectivamente. Especificamente, pode-se imobilizar um oligonucleótido de 60-100 adeninas (A) na membrana, enquanto que um oligonucleótido de sequência complementar de 80-100 timinas (T) é conjugado na superfície das partículas de ouro coloidal. Neste caso, as sondas de oligonucleótidos 20-24meros utilizadas nos ensaios de hibridação de ambos os protocolos I e II deverão ter adicionalmente 80-100 bases de adenina (A) em vez de timina (T), na sua extremidade 5' ou 3'.

Após a aplicação da amostra que se suspeita que contem a sequência de ácido nucleico específica, na metade superior (4) da área (3) da tira de teste para imersão da presente invenção, a tira é imersa num tubo ou recipiente contendo a solução de hibridação que se desloca ao longo da tira movida por forças capilares e encontra as partículas de ouro coloidal secas, as quais re-hidrata e induz para a área de membrana no início e em seguida para a parte superior da tira de teste que tem a função de reter o excesso da amostra líquida.

A constituição da solução de hibridação é tal que permite a hibridação de sequências de ácido nucleico complementares, bem como a formação da ligação biotina-estreptavidina. Especificamente, a solução de hibridação contém um tampão de pH 7,5-7,6, albumina de soro bovino (BSA) a pelo menos 5% p/v e de preferência 5%-7% p/v, NaCl 150 mM, glicerol a pelo menos 15% v/v e de preferência 15%-30% v/v, e um tensioactivo não iónico ou detergente numa quantidade de pelo menos 0,1% v/v e de preferência 0,1%-5% v/v. Um tampão adequado é PBS pH 7,5 ou tampão de ácido maleico pH 7,6 e um tensioactivo não iónico adequado é Tween 20, ou Triton X-100, ou qualquer outro detergente não iónico da mesma categoria. O glicerol na solução de hibridação tem uma função dupla: aumenta a viscosidade da solução que então se desloca ao longo da tira de teste, movida por forças capilares, mais lentamente, permitindo que a hibridação ocorra de modo mais eficaz, afectando assim o sucesso do ensaio e, em segundo lugar, tem a capacidade de aumentar a eficiência da hibridação. Outras substâncias que aumentam a eficiência da hibridação e podem ser utilizadas na solução de hibridação em vez do glicerol, ou em adição ao glicerol são polímeros como PVP (polivinilpirrolidona), Ficoll, sulfato de dextrano, etc. (Wahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 3683-3687, USA, 1979). O sistema de ensaio da tira de teste é depositado num recipiente que contém a solução de hibridação ou solução de desenvolvimento do ensaio à temperatura ambiente e após 15 a 20 minutos no máximo, é produzido e lido um sinal visível na área de membrana. O desenvolvimento de duas linhas ou pontos vermelhos ou roxo-vermelho [posições (8)

e (9) na tira] indica um ensaio de detecção positiva do ADN alvo na amostra e que o teste foi completado com sucesso na tira, enquanto que o desenvolvimento de apenas uma linha ou ponto [posição (9) na tira] indica um ensaio de detecção negativo do ADN alvo e que o teste foi completado com sucesso na tira de teste.

O sistema de ensaio de tira de teste para imersão da presente invenção pode ser convertido num sistema de teste de fluxo lateral com uma ligeira modificação da forma e do material absorvente da área (2) da tira que fica em contacto com a amostra, ou com a solução de desenvolvimento do ensaio, na tira.

Com o sistema de ensaio da tira de teste para imersão da presente invenção, e os protocolos de ensaio de hibridação desenvolvidos na tira da presente invenção, é possível detectar uma sequência de ácido nucleico específica de pelo menos 50 pares de bases.

A utilização do sistema de teste de tira da presente invenção deve ocorrer com um volume de pelo menos 5 µl de produto de PCR e de preferência entre 5 µl-15 µl.

Os exemplos seguintes são proporcionados apenas a título ilustrativo.

EXEMPLO 1

Desenvolvimento do ensaio de hibridação na tira de teste para imersão de acordo com o protocolo I, para a

detecção dos produtos específicos da reacção de PCR de ARMS que é utilizado para o diagnóstico genético da mutação pontual IVS-n110 no gene de b-globina que causa a beta-talassémia, em que a referida PCR é realizada utilizando ADN genómico como um modelo. O método ARMS (sistema de amplificação de mutação refractária) é uma variação da reacção de PCR que permite a amplificação específica de um segmento de um alelo de um ADN genómico de um indivíduo. O método de ARMS baseia-se no atributo do iniciador de PCR, de acordo com o qual quando os iniciadores de oligonucleótido têm um desemparelhamento na sua extremidade 3', eles não se podem fundir com o modelo, de modo que o fragmento de ADN seleccionado pode ser amplificado para se obter um produto de PCR. Os iniciadores são concebidos para se fundir com a sequência de ADN normal e mutada. Preparam-se duas reacções de amplificação para cada amostra. Em cada reacção utiliza-se um iniciador comum marcado com biotina na sua extremidade 5' e outro iniciador complementar à região que se suspeita que transporta a mutação. O segundo iniciador difere no que se refere à extremidade 3', em cada reacção respeitante à mesma amostra: na primeira funde-se com a sequência normal, enquanto que na segunda, com a mutada. De modo a que a hibridação dos dois últimos iniciadores seja mais específica para a sua sequência complementar no modelo de ADN, ambos, o iniciador normal e o mutado, têm um desemparelhamento de bases adicional, 3 ou 4 nucleótidos a contar da sua extremidade 3'. Quando um indivíduo é homozigótico em relação à mutação, a reacção de PCR com os iniciadores específicos para a amplificação da sequência normal não irá originar um

produto de PCR. Pelo contrário, a reacção de PCR com os iniciadores específicos para a amplificação da sequência mutada irá proporcionar um produto de PCR. Para a detecção dos produtos das duas reacções de PCR realizadas para cada amostra, são necessárias duas tiras de teste para imersão. Quando o resultado do ensaio de hibridação em ambas as tiras para a mesma amostra é positivo, então o indivíduo é heterozigótico para a mutação. Quando o resultado do ensaio de hibridação é positivo em apenas uma das duas tiras para a mesma amostra e, em particular, quando a detecção é positiva apenas para o produto da reacção de PCR que amplifica a sequência normal, então o indivíduo não transporta a mutação. Por fim, quando o teste de detecção é positivo apenas numa tira de teste para a mesma amostra e, especificamente, na tira utilizada para o produto da reacção de PCR que amplifica a sequência mutada, então o indivíduo é homozigótico para a referida mutação.

Utiliza-se uma sonda de oligonucleótidos 20mero (17) de sequência complementar a uma região da cadeia biotinilada do produto de PCR específico. A referida sonda transporta adicionalmente 80-100 timinas (T) na sua extremidade 3' ou 5'.

Para a construção do sistema de ensaio de tira de teste para imersão é necessário o seguinte procedimento:

Imobilizam-se 0,5 µg da proteína estreptavidina (8) num tampão fosfato 15 mM, pH 7,2 numa membrana laminada Predator (Pall & Gelman, USA), bem como 500 fmol de um

oligonucleótido (9) que consiste de pelo menos 80 timinas (T), tendo ambos a forma de um ponto, a uma distância de 1 cm e 1,5 cm da extremidade inferior da membrana, respectivamente. A imobilização ocorre por aplicação de cada reagente na região seleccionada da membrana, seguido de cozedura a 70°C, durante 30 minutos num forno de temperatura estável, com humidade limitada. Em seguida, o sistema da tira para imersão é montado numa película de poliestireno flexível. Um oligonucleótido que consiste de 100 adeninas (A), modificado com um grupo SH na sua extremidade 5' é conjugado na superfície de partículas de ouro coloidal com um diâmetro de 40 nm, adicionando-o a uma quantidade das partículas numa razão de: (moles de partículas de ouro)/(moles de oligonucleótido)=1/500, seguido de incubação a 4°C durante 56 horas. Consequentemente, a solução de partículas de ouro coloidal conjugadas é concentrada dez vezes e as partículas são colocadas numa solução contendo albumina de soro bovino (BSA) a 5% p/v, sacarose a 5% p/v, Tween 20 a 0,05% v/v e deixam-se secar ao ar após serem depositadas na área (5) do sistema da tira de teste. Aproximadamente 9×10^9 - $1,1 \times 10^{10}$ partículas de ouro conjugadas são secas em cada sistema de tira de teste para imersão.

O aquecimento a 95°C durante 5 minutos desnatura o produto de PCR biotinilado da reacção de ARMS particular (435 pb) que é então pré-hibridado a sonda de oligonucleótidos de sequência complementar (17) por incubação durante pelo menos 15-20 minutos a uma temperatura que depende do ponto de fusão (T_m) da sonda,

que era de 42°C para este caso particular, e num tampão de ácido maleico contendo sal 100 mM, pH 7,5. Para a pré-hibridação de 5 µl de produto de PCR (100-200 fmol/µl), utilizam-se 2000 fmol da sonda e o volume total da solução de pré-hibridação é de 15 µl (de preferência 15-20 µl). Em seguida, o produto de PCR pré-hibridado é depositado na área (4) da tira de teste para imersão que é imersa em 300 µl da solução de hibridação (ou solução de desenvolvimento do ensaio) que contem tampão PBS, pH 7,5-7,6, albumina de soro bovino (BSA) a 5%, NaCl 150 mM, glicerol a 20% e Tween 20 a 0,5%. O sistema de ensaio da tira de teste é depositado num recipiente contendo a solução de hibridação ou a solução de desenvolvimento do ensaio, à temperatura ambiente e após 15 a 20 minutos no máximo, é produzido e lido um sinal visível na área de membrana. O desenvolvimento de duas linhas ou pontos vermelhos ou roxo-vermelho [posições (8) e (9) na tira] indica um ensaio de detecção positivo do ADN alvo na amostra e que o teste se completou com sucesso na tira, enquanto que o desenvolvimento de apenas uma linha ou ponto [posição (9) na tira] indica um ensaio de detecção negativo do ADN alvo e que o teste se completou com sucesso na tira.

EXEMPLO 2

Desenvolvimento de um ensaio de hibridação na tira de teste para imersão de acordo com o protocolo II, para a detecção dos produtos específicos da reacção de PCR interna que é utilizada para a amplificação da sequência de ADN específica do citomegalovírus (CMV) a partir do

ADN genómico de um indivíduo. A reacção de PCR interna é utilizada para aumentar significativamente a sensibilidade e especificidade da PCR, em particular quando se pretende a amplificação de uma sequência rara (modelo de ácido nucleico com um baixo número de cópias) e quando se utiliza um número de ciclos elevado há um risco aumentado de amplificação de produtos não específicos.

Ocorrem duas reacções de amplificação consecutivas, utilizando-se um par de iniciadores diferente em cada reacção. A primeira PCR contém um par de iniciadores externo, utilizado para amplificar um fragmento de cerca de 300 pb. A segunda PCR contém um par de iniciadores interno que hibrida com o fragmento de 300 pb amplificado pelo primeiro conjunto de iniciadores (iniciadores externos) e é utilizado para amplificar um fragmento de 163 pb. São seleccionadas duas sondas de oligonucleótidos que consistem de 20-24 bases de sequência complementar a duas áreas discerníveis da mesma cadeia do produto de PCR de 163 pb. Uma das referidas sondas de oligo é marcada com biotina (20) na sua extremidade 3', utilizando a enzima transferase terminal, enquanto que na outra sonda de oligo (21) se adiciona uma cauda de 80-100 timinas (T) adicionais na sua extremidade 3', utilizando a referida enzima. O procedimento de adição da cauda é descrito a seguir: a) marcação com biotina: num *epENDORF* prepara-se uma mistura contendo 4 µl de 5 x tampão TdT (tampão de marcação contendo cacodilato de potássio 200 mmol/l, Tris-HCl 50 mmol/l, albumina de soro bovino 0,4 mg/ml, pH 7,2), 1 µl de CoCl₂ 25 mmol/l, 1 µl de sonda (19) (100

pmol/ μ l), 1 μ l de mistura de dNTPs (sem dATP) 10mM, 2,5 μ l de Biotina-14-dATP 0,4 mM, 1,2 μ l de transferase terminal (30 Unidades) e água destilada para um volume final de 20 μ L. A mistura é incubada a 37°C durante uma hora. A reacção é terminada por adição de 2,5 μ l de EDTA 0,4 M, e a sonda de oligo com cauda adicionada é purificada a partir do excesso de reagentes utilizados, utilizando uma coluna de Sephadex G-25 (CPG, USA). b) adição de uma cauda de várias timinas (T): num *eppendorf* prepara-se uma mistura contendo 4 μ l de 5x tampão TdT (tampão de marcação contendo: cacodilato de potássio 200 mmol/l, Tris-HCl 50 mmol/l, albumina de soro bovino 0,4 mg/ml, pH 7,2), 1 μ l de CoCl₂ 25 mmol/l, 1 μ l de sonda (20) (100 pmol/ μ l), 1 μ l dATP 10 mM, 1,2 μ l de transferase terminal (30 unidades) e água destilada para um volume final de 20 μ l. A mistura é incubada a 37°C durante uma hora. A reacção é terminada por adição de 2,5 μ l de EDTA 0,4 M.

O procedimento para a montagem do sistema de ensaio da tira de teste para imersão é o mesmo que o descrito no EXEMPLO 1.

O aquecimento a 95°C durante 5 minutos desnatura o produto de PCR de 163 pb da reacção de PCR particular que é então pré-hibridado com as sondas de oligonucleótidos de sequência complementar (20, 21), por incubação durante pelo menos 15-20 minutos a uma temperatura que depende do ponto de fusão (T_m) das sondas, que era de 37°C para este caso particular, e num tampão de PCR contendo sal 50 mM de sal, pH 7,5. Para a pré-hibridação de 5 μ l de produto de PCR (100-200 fmol/ μ l), utilizam-se 2000 fmol da sonda

e o volume total da solução de pré-hibridação é de 15 µl (de preferência 15-20 µl). Em seguida, o produto de PCR pré-hibridado é depositado na área (4) da tira de teste para imersão em 300 µl da solução de hibridação (ou solução de desenvolvimento do ensaio) que contem tampão PBS pH 7,5-7,6, albumina de soro bovino (BSA) a 5%, NaCl 150 m;, glicerol a 20% e Tween 20 a 0,5%. O sistema de ensaio da tira de teste é depositado num recipiente que contem a solução de hibridação ou solução de desenvolvimento do ensaio à temperatura ambiente e após 15 a 20 minutos no máximo, é produzido e lido um sinal visível na área de membrana. O desenvolvimento de duas linhas ou pontos vermelhos ou roxo-vermelho [posições (8) e (9) na tira] indica um ensaio de detecção positivo do ADN alvo na amostra e que o teste se completou com sucesso na tira, enquanto que o desenvolvimento de apenas uma linha ou ponto [posição (9) na tira] indica um ensaio de detecção negativa do ADN alvo e que o teste se completou com sucesso na tira.

Lisboa, 31 de Agosto de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão, para a determinação qualitativa e/ou quantitativa, num passo, de uma sequência de ácido nucleico específica (16, 19) numa amostra líquida, que compreende:

A) uma tira de teste, em que a referida tira de teste (1) tem quatro áreas distintas:

a) uma primeira área (2) que contacta com a referida amostra ou solução de desenvolvimento do ensaio;

b) uma segunda área (3) sobre a qual é seca uma substância que produz um sinal visível;

c) uma terceira área (6) para controlo do desenvolvimento do sinal e conclusão do ensaio, compreendendo uma primeira zona (8) que contém estreptavidina imobilizada e uma segunda zona (9) que contém um oligonucleótido imobilizado;
e

d) uma quarta área (7) para reter o excesso da referida amostra líquida;

caracterizado por

a referida substância que produz um sinal visível consistir de partículas de ouro

coloidal (14) conjugadas com um oligonucleótido (15) com um determinado comprimento e com uma sequência de nucleótidos definida e poder ser solubilizada pela amostra líquida, ou solução de desenvolvimento do ensaio; o referido oligonucleótido imobilizado (12) na segunda zona (9) da terceira área referida (6) da tira de teste (1) ter uma sequência de nucleótidos complementar à sequência de nucleótidos do referido oligonucleótido (15) conjugado com as referidas partículas de ouro coloidal (14);

e por

o referido sistema de ensaio de tira de teste para imersão compreender ainda:

B) um reagente distinto (17; 20, 21) que consiste de um ou mais oligonucleótidos que hibridam especificamente com o referido ácido nucleico e que confere ao referido ácido nucleico hibridado a capacidade de hibridar simultaneamente com o referido oligonucleótido (15) que está conjugado com as referidas partículas de ouro coloidal (14) e de se ligar à referida estreptavidina imobilizada na primeira zona (8) da referida terceira área (6).

2. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado também por a referida substância que produz um sinal visível ser seca na metade inferior (5) da referida segunda área (3) da referida tira de teste (1).

3. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido ácido nucleico a ser testado ser biotinilado e o referido reagente (17; 20, 21) consistir de um oligonucleótido (17) que compreende uma primeira parte que tem uma sequência complementar a uma região da sequência de nucleótidos do referido ácido nucleico biotinilado (16) e uma segunda parte que possui uma sequência de nucleótidos complementar à sequência de nucleótidos definida do referido oligonucleótido (15) conjugada com as referidas partículas de ouro coloidal (14).

4. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido ácido nucleico a ser testado não ser biotinilado e o referido reagente (17; 20, 21) compreender:

um primeiro oligonucleótido (20) com uma sequência complementar a uma região da sequência de nucleótidos do referido ácido nucleico (19) e estar ligado numa das suas extremidades a uma molécula de biotina; e um segundo oligonucleótido (21) que compreende uma primeira parte que tem uma sequência complementar a uma região da sequência de nucleótidos do referido ácido nucleico (19) e uma segunda parte que tem uma sequência de nucleótidos complementar à sequência de nucleótidos definida do referido oligonucleótido (15) conjugado com as referidas partículas de ouro coloidal (14).

5. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a referida sequência de nucleótidos definida que está conjugada com as referidas partículas de ouro coloidal (14) ter um comprimento entre 60 e 100 bases.

6. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a referida sequência de nucleótidos definida que está conjugada com as referidas partículas de ouro coloidal (14) consistir de 20 nucleótidos aleatórios seguidos de 40-80 bases de timina.

7. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, caracterizado por a referida sequência de nucleótidos definida que está conjugada com as referidas partículas de ouro coloidal (14) consistir de 20 nucleótidos aleatórios seguidos de 40-80 bases de adenina.

8. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a referida substância que produz um sinal visível (14, 15) ser seca na referida segunda área (3) da referida tira de teste (1) por (i) modificação da extremidade 5' do referido oligonucleótido (15) com uma sequência de nucleótidos definida com um grupo SH, (ii) adição do referido oligonucleótido numa solução de conjugação que contem as referidas partículas de ouro coloidal numa razão molar (partículas de ouro

coloidal)/(oligonucleótido) de pelo menos 1/500 e incubação durante um tempo suficiente para que ocorra a conjugação entre o referido oligonucleótido e as referidas partículas de ouro coloidal, (iii) dispersão das referidas partículas conjugadas numa solução e aplicação da referida solução à referida tira de teste, na referida segunda área (3) e (iv) secagem da referida solução de partículas conjugadas aplicada na referida segunda área (3) da referida tira de teste (1), por cozedura ou secagem ao ar.

9. Sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com a reivindicação 8, caracterizado também por a referida solução aplicada à referida tira de teste, na referida segunda área (3) no passo (iii) conter albumina de soro bovino (BSA) a 5% p/v, sacarose a 5%, 0,001%-0,1% v/v de um tensioactivo não iónico ou detergente, tal como Tween-20.

10. Método para a determinação qualitativa e/ou quantitativa, num passo, de uma sequência de ácido nucleico específica (16, 19), numa amostra líquida, utilizando um sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido método compreende:

diluir a referida amostra líquida numa solução de pré-hibridação que tem nela dissolvido o referido reagente diferente (17; 20, 21);

aquecer a referida solução de pré-hibridação e deixar ocorrer a hibridação;

aplicar a referida solução de pré-hibridação na referida tira de teste (1);

imersão a referida primeira área (2) da referida tira de teste (1) numa solução de hibridação, ou solução de desenvolvimento do ensaio, e

deixar decorrer um tempo suficiente para que a segunda zona (9) da referida terceira área (6) da tira de teste fique corada, altura em que a presença e/ou a intensidade, ou a ausência de cor na referida primeira zona (8) da referida terceira área (6) da tira de teste indica a presença e/ou a quantidade, ou a ausência da referida sequência de ácido nucleico (16, 19) na amostra líquida.

11. Método de acordo com a reivindicação 10 e que utiliza um sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, também caracterizado por a referida solução de pré-hibridação ser aplicada na metade superior (4) da referida segunda área (3) da referida tira de teste (1).

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10, 11 e que utiliza um sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido ácido nucleico (16) a ser testado ter sido previamente biotinilado.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-12, caracterizado também por a referida solução de hibridação ou desenvolvimento do ensaio conter tampão PBS pH 7,5-7,6; albumina de soro bovino (BSA) a 5%, NaCl pelo menos 150 mM, glicerol pelo menos a 15% e pelo menos 0,1% de um tensioactivo não iónico ou detergente, tal como Tween-20.

14. Utilização do sistema de ensaio de tira de teste para imersão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, ou do método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10-13, para a detecção e/ou determinação de sequências de ácido nucleico específicas numa amostra, que são indicativas de uma doença.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por as referidas sequências de ácido nucleico específicas serem ADN viral ou bacteriano e a sua detecção ser indicativa de uma doença infecciosa.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por as referidas sequências de ácido nucleico específicas serem sequências de ADN mutadas e a sua detecção ser indicativa de uma doença transmitida geneticamente.

Lisboa, 31 de Agosto de 2007

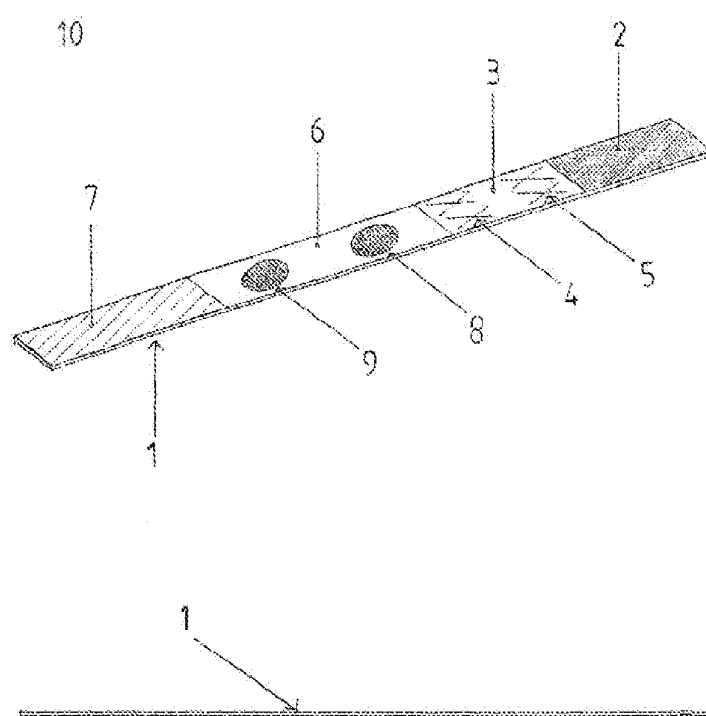


Fig. 1

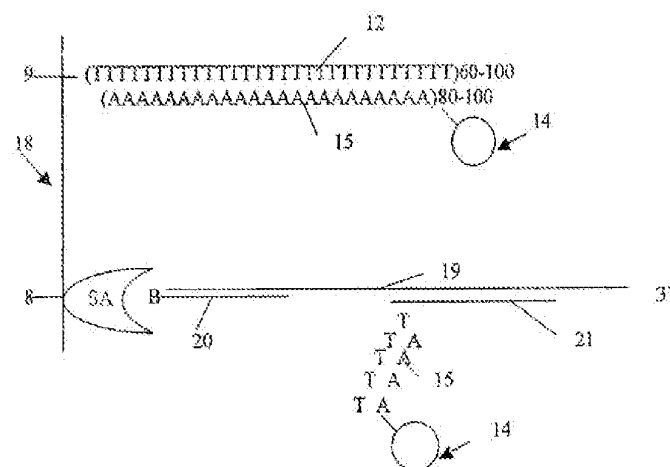
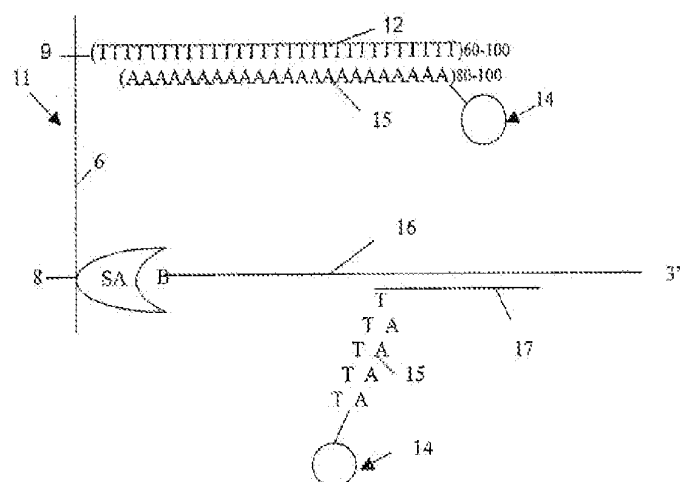


Fig. 2