



(I) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 87769 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C12N015/00 A

C12Q001/68 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1988.06.17</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1987.06.06 US 102978 1987.06.19 US 064141</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.05.31</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 04/92 1992.04.14</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> SISKA DIAGNOSTICS, INC. 10280 N.TORREY PINES RD.270 LA JOLLA CALIFÓRNIA 92037 US</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> THOMAS RAYMOND GINGERAS US DEBORAH YANTIS KWOH US ULRICH MERTEN US</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT</p>
---	---

(54) *Epígrafe:* PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM ÁCIDO NUCLEICO DE CADEIA DUPLA E PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE UM SEGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 87 769

REQUERENTE: SISKA DIAGNOSTICS, INC., norte-americana (Estado da Califórnia), com sede em 10280 North Torrey Pines Road, 270 La Jolla, Califórnia 92037, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: " PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM ÁCIDO NUCLEICO DE CADEIA DUPLA E PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DE UM SEGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO".

INVENTORES: Thomas Raymond Gingeras, Ulrich Merten e Deborah Yantis Kwoh.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Estados Unidos da América, em 19 de Junho de 1987 sob o n.º 064.141 e em 6 de Junho de 1988 sob o n.º 202 978.

67 879

File Nº. 47 104

PATENTE Nº. 87 769

"Processo de preparação de um ácido nucleico de cadeia dupla e processo de amplificação de um segmento de ácido nucleico"

para que

SISKA DIAGNOSTICS, INC., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de um ácido nucleico de cadeia dupla que compreende proporcionar, hibridar e prolongar ácidos nucleicos. O invento refere-se ainda a um processo de amplificação de um segmento de ácido nucleico.

MEMÓRIA DESCRITIVA

Este pedido é uma continuação do Pedido, de acordo com a 35 U.S.C. 120/121 dos E.U. 07/064141 depositado a 19 de Junho de 1987, cujo conteúdo é aqui incorporado para referência.

Âmbito do Invento

O presente invento relaciona-se, na generalidade, com progressos em biologia molecular e em genética molecular.

Mais particularmente, o presente invento refere-se a novos métodos e conjuntos contendo reagentes e meios necessários para aumentar o número de cópias in vitro ou x-vivo, isto é, amplificação, de, pelo menos, um segmento seleccionado (sequência) de ácido nucleico ou do seu complemento, ou para hibridação de segmentos homólogos, numa amostra incluindo um ou mais ácidos nucleicos, que podem incluir ARN, ADN ou ambos.

Entre as aplicações nas quais os métodos e conjuntos deste invento são úteis estão: (1) em análise de tecidos e fluidos do organismo para detecção de sequências de ácido nucleico específicas, características duma dada doença ou condição, genética ou patogénica, por ensaios de hibridação de sondas de ácido nucleico in vitro ou x-vitro; (2) na clonação selectiva de genes de cópia única ou de rara ou reduzida expressão.

Antecedentes do Invento

Muito do trabalho em biologia molecular, genética molecular e suas aplicações, como por exemplo, ensaios de hibridação de sondas de ácido nucleico para patogénios do sangue (blood-borne) ou genes defeituosos, envolve a detecção ou isolamento duma sequência particular de ácido nucleico. Um problema fundamental em tal trabalho é detectar ou isolar e depois quantificar uma sequência de ácido nucleico de interesse. O problema tem sido difícil de resolver porque os materiais biológicos, como culturas de células, espécimes de tecidos e amostras de sangue, contêm, tipicamente, uma mistura complexa de ARN e ADN, dos quais, no máximo, apenas uma fracção minúscula apresenta uma sequência com interesse.

Na verdade, as aplicações práticas de ensaios de hibrida-

-3-

ção de sondas de ácido nucleico têm sido limitadas porque a sensibilidade dos ensaios, quando realizados com reagentes adequados para uso de rotina e durante períodos de tempo aceitavelmente curtos, é demasiado baixa para detectar sequências de interesse à baixa concentração com que elas surgem nas amostras reais.

Duas abordagens fundamentalmente diferentes foram feitas para tratar o problema da detecção de uma sequência de ácido nucleico de interesse ("segmento alvo") presente num baixo nível numa mistura complexa de ácidos nucleicos.

Na primeira abordagem, a quantidade de ácido nucleico (incluindo o segmento alvo) numa amostra não é alterada; em vez disso, um sistema gerador de sinal é associado com o segmento alvo e produz um sinal detectável representativo do número de moléculas do segmento alvo. Por exemplo, uma sonda de ácido nucleico com a sequência complementar à de um subsegmento do segmento alvo é ligada a uma enzima como a fosfatase alcalina e misturada com a amostra sob condições de hibridação que vão produzir a hibridação entre a sonda e o segmento alvo (mas não apreciavelmente entre a sonda e outras sequências de ácido nucleico da amostra). Após remoção da sonda ligada à enzima que não hibridou, um substrato cromogénico para a fosfatase alcalina é adicionado sob condições apropriadas e, em princípio, um grande número de moléculas coradas e detectáveis é rapidamente produzido para cada molécula de sonda hibridada com o segmento alvo.

São também conhecidos na técnica numerosos outros sistemas para detecção de sequências de ácido nucleico sem alteração da quantidade de ácido nucleico alvo da amostra. Outro exemplo é a vulgar marcação numa sonda de ácido nucleico com átomos radioactivos como ^{32}P , seguida de detecção da sonda hibridada com o alvo por meio do sinal amplificado iniciado pela desintegração dos núcleos radioactivos. Ainda outro exemplo envolve a ligação à sonda para o segmento alvo de um outro ácido nucleico que é capaz de replicação de tal modo que possa ser prontamente detectada por técnicas conhecidas. São conhecidos alguns ARN que são susceptíveis de replicação induzida por replicase (auto cataliticamente) por meio de certas polimerases, tal como ARN polimerase dependente de ARN de bacteriófago, tal como Q β replicase e a re

-4-

plicase do vírus do mosaico da cevadinha (Bromus) (BMV). Nesse sistema, tanto um ARN como o ARN da sequência complementar são moldes para replicação pela ARN polimerase; conseqüentemente, a quantidade de ARN replicado aumenta exponencialmente com o tempo (enquanto o número de moléculas molde de ARN não exceder o número de moléculas de ARN polimerase num sistema). Ver Miele e colab., J. Mol. Biol. 177, 281 (1983). Um sistema no qual a sonda para um segmento alvo está ligada a um ARN capaz de ser replicado pela $Q\beta$ replicase é descrito por Chu e colab., Nucl. Acids Res. 14, 5591 (1986) e pela BMV replicase é descrito por Marsh e colab., Positive Strand RNA Viruses, Alan R. Liss (edit., Nova Iorque) (1987; actas do Simpósio da UCLA, 1986).

A primeira abordagem apresenta duas desvantagens sérias. Em primeiro lugar, em muitos casos, o número de cópias do segmento alvo numa amostra de tamanho prático é tão baixo que, até para sistemas geradores de sinais razoavelmente rápidos, o tempo necessário para produzir um sinal detectável que esteja significativamente acima do "fundo" é impraticavelmente longo. Em segundo lugar, a geração de sinal a partir das moléculas geradoras de sinal do "fundo" e a partir das moléculas geradoras de sinal associadas com o alvo, ocorre essencialmente à mesma velocidade. Em qualquer ensaio para um segmento alvo, um sinal proveniente do "fundo" é inevitável"; isto é, invariavelmente aparece algum sinal proveniente da sonda que adere, não especificamente, a filtros ou outros suportes sólidos ou híbrida com segmentos de sequências muito semelhantes à do segmento alvo. Se o número de cópias do alvo é demasiado baixo, a razão constante no tempo, entre o sinal proveniente do alvo mais o "fundo" (isto é "sinal") e o sinal proveniente do "fundo" (isto é "ruído") será muito baixa para ser significativamente detectável acima do fundo. Estas e outras desvantagens conduziram os especialistas da técnica a uma segunda abordagem para tratar o problema da detecção dum segmento alvo presente com um nível baixo numa mistura complexa de ácidos nucleicos.

Esta segunda abordagem é fundamentalmente diferente e implica o aumento do número de cópias do próprio segmento alvo, preferencialmente numa extensão maior que a de outras sequências

da amostra, particularmente daquelas que possam erroneamente ser detectadas como segmento alvo devido à similaridade na sequência. Exemplos desta segunda abordagem incluem várias técnicas de cultura nas quais as células que albergam o segmento alvo são aumentadas em número, por vezes mais rapidamente do que várias outras células, ou em que certos ácidos nucleicos (por exemplo, plasmídeos, ARN) tendo neles o segmento alvo são aumentados em número.

Tais técnicas de cultura têm os inconvenientes de serem incómodas, problemáticas e demoradas e manifestam o inevitável: ácidos nucleicos diferentes dos que incluem o segmento alvo são simultaneamente aumentados em número de cópias, e portanto é potencialmente aumentado o "fundo". Outro inconveniente é o crescimento de organismos potencialmente perigosos como um passo necessário para alcançar a amplificação.

Outro exemplo desta segunda abordagem é a amplificação de um segmento alvo de ADN numa denominada "reação em cadeia de polimerase" ("RCP"). Esta técnica é uma adaptação de processos conhecidos que ocorrem naturalmente no processo de replicação de, por exemplo, genomas de ADN de cadeia simples de certas entidades virais, e em todos os casos representa um aplicação semelhante para preparação de ADNc por Hong, Bioscience Reports 1, 243 (1981); Cooke e colab., J. Biol. Chem. 255, 6502 (1980); e Zoller e colab., Methods in Enzymology 100, 468-500 (1983). Por esta técnica, um segmento particular aumenta exponencialmente o número de cópias com vários ciclos, cada um dos quais compreende: (1) hibridar um primário de ADN a um subsegmento terminal 3' de cada segmento alvo e seu complemento (isto é, o segmento de sequência complementar à do segmento alvo); (2) prolongar cada um dos primários com uma ADN polimerase; e (3) transformar em cadeias simples, por desnaturação térmica, os duplex resultantes do passo (2). Esta técnica é descrita por Saiki e colab., Science 230, 1350 (1985), e Mullis e colab., Publicação do Pedido de Patente Europeia nºs. 200362 e 201184. Ver também Patentes dos EUA 4683195 e 4683202. Como reportado, na aplicação da técnica durante 20 ciclos por cerca de 3 horas, o número de cópias de um segmento alvo pode ser aumentado num factor de cerca de 10^5 . Em consequência, apenas aqueles segmentos com os quais hibrida um

primário específico com uma estabilidade suficiente para iniciar o prolongamento da cadeia pela polimerase para formar o complemento e que têm um complemento com o qual hibrida outro primário específico de modo semelhante para produzir segmento alvo por prolongamento da cadeia, aumentam exponencialmente em número de cópias enquanto outros segmentos não alvo que não hibridaram erroneamente com o primário empregue aumentam, se assim for, no máximo, linearmente em número de cópias em função do número de ciclos. A técnica da reacção em cadeia com polimerase pode aumentar muito numa amostra não só o número de cópias do segmento alvo mas também a proporção da quantidade de segmento alvo em relação aos segmentos originando o "fundo".

Claro que esta segunda abordagem pode ser aplicada a uma amostra em conjunção com o uso da primeira abordagem aplicada com o segmento alvo amplificado para originar um sinal de detecção ainda mais forte.

É objectivo do presente invento resolver os problemas apontados pelas técnicas anteriores e ultrapassar as desvantagens enumeradas em anteriores objectivos de pesquisa orientados para a resolução de tais problemas. É ainda objectivo do presente invento fornecer uma técnica simples que possa ser utilizada num intervalo de tempo aceitavelmente curto, empregando comodamente reagentes conhecidos e tendo a precisão necessária para alcançar resultados científicos consistentes; uma técnica que possa ser utilizada num meio de ensaio reproduzível e que seja adaptável para uso em conjuntos para análises clínicas/laboratoriais.

É portanto um objectivo do presente invento aumentar a detectabilidade de certas sequências de ácido nucleico (segmentos alvo) por amplificação das referidas sequências alvo num sistema in vitro ou x-vivo destituído das desvantagens enumeradas até aqui das tentativas da técnica anterior.

O presente invento refere-se a uma nova técnica para realizar a segunda abordagem a fim de detectar um segmento alvo presente, a um nível baixo, numa mistura complexa de ácidos nucleicos. Utiliza um novo passo de produção do transcrito de ARN em

-7-

conjunção e derivado de uma cópia de ADN de cadeia dupla sintetizada a partir da sequência alvo como ciclo completo.

Podem ser empregues vários ciclos. Em virtude do passo de transcrição ser o aspecto dominante da novidade, é convenientemente referido aqui como sistema de amplificação baseado na transcrição (TAS). A nova técnica do presente invento, TAS, resulta num aumento rápido do número de cópias de um segmento alvo seleccionado utilizando duas propriedades da ARN polimerase dependente de ADN: (1) apreciável iniciação de transcrição a partir somente de um pequeno número de sequências específicas para cada polimerase (ver, por exemplo, Brown e colab., Nucl. Acids Res. 14, 3521 (1986); e (2) rápida produção de um grande número de transcritos a partir de cada cópia de um promotor (geralmente 10^2 - 10^4 por hora) reconhecido por uma ARN polimerase. Ver, Milligan e colab., Nucl. Acids. Res. 15, 8783 (1987). A técnica do invento pode também utilizar a capacidade dos ARN com certas sequências de serem rapidamente (auto cataliticamente) replicados por ARN replicases dependentes de ARN. Ver também Miele e colab., acima. Em adição, fornece uma técnica padronizada que torna possíveis medições não ambíguas da quantidade de ADN alvo presente numa amostra.

O presente invento (a menos que se empregue a replicação (autocataliticamente) induzida origina um transcrito de ARN de cadeia simples ou um duplex ARN-ADN, formados a partir dele quando não são tomadas medidas para evitar a sua formação, que tem um subsegmento que tem a sequência do segmento alvo ou a sequência complementar à do segmento alvo e que está presente em grande excesso relativamente ao ácido nucleico com um subsegmento de sequência complementar.

Este excesso, inicialmente, de transcrito de ARN de cadeia simples é vantajoso em certos métodos para detectar o produto amplificado com sonda de ácido nucleico marcada devido a estar presente um pequeno segmento de sequência complementar para competir com a sonda na hibridação com o produto amplificado. Também o produto do transcrito do ARN de cadeia simples está dividido mais ou menos continuamente e leva à detecção directa do segmento alvo sem a necessidade de ciclos RCP repetidos propensos a er

-8-

ros e separação de cadeias inconvenientes. Estas vantagens não são fornecidas pela técnica RCP que produz ADN de cadeias duplas (uma cadeia que contém o segmento alvo e outra cadeia que contém o complemento do segmento alvo) que necessitam de ser separadas antes da detecção, e só depois de um grande número de ciclos repetidos, necessários para alcançar níveis de amplificação aceitáveis.

As técnicas do presente invento proporcionam amplificação de um segmento alvo seleccionado numa extensão pelo menos tão grande como na técnica RCP, no mesmo período de tempo, mas de uma maneira muito mais simples e reproduzível, e distinta de processos naturais ou de outras técnicas.

Sumário do Invento

Verificámos como a ADN polimerase dependente de ADN de bacteriófago pode ser utilizada para rapidamente amplificar (isto é, aumentar o número de cópias) uma sequência de ácidos nucleicos alvo seleccionada (sequência ou segmento alvo) presente numa amostra de ácidos nucleicos. Além disso, verificámos como a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago pode ser utilizada em conjunto com a ARN polimerase dependente de ARN de bacteriófago para obter o mesmo resultado. Até agora ainda não tinha sido avaliado que a ARN polimerase podia ser utilizada para este fim.

O invento refere métodos baseados nestas verificações e conjuntos para realizar os métodos.

Estes métodos e conjuntos são particularmente úteis aplicados em conjunção com ensaios de hibridação de sonda de ácido nucleico para um ácido nucleico que inclui um segmento alvo amplificado de acordo com o invento. Assim, o invento também refere métodos, e conjuntos para aplicar os métodos, para detectar a presença ou ausência de um segmento numa amostra de um ácido nucleico que inclui um segmento particular, por intermédio de uma sonda hibridada com o segmento após amplificação de acordo com o invento.

O presente invento é baseado na novidade de certos transcritos de ARN, sua produção, replicação facultativa, e uso, para

-9-

realizar a amplificação desejada e detecção da sequência de ácido nucleico alvo correspondente (em sequência). O invento é usado em meios quer in vitro quer x-vivo, e é empregue conjuntamente com a síntese de uma cópia de ADNc de cadeia dupla de sequência alvo, de maneira a produzir um molde de ácido nucleico de cadeia dupla, usado por sua vez para produção dos referidos transcritos de ARN. Este processo de síntese de ADNc de cadeia dupla e transcrição de ARN constitui um ciclo simples do presente sistema de amplificação baseado na transcrição (TAS). Se desejado, este ciclo pode ser repetido de maneira a alcançar ainda maiores níveis de amplificação. Em virtude do método pelo qual eles são produzidos (e reproduzidos), os transcritos correspondem (identicamente ou complementarmente) em sequência a uma sequência de ácido nucleico alvo contida numa amostra original de entre uma mistura de ácidos nucleicos, e, portanto, a presença de transcritos em forma amplificada leva à sua detecção, e daí, por correspondência, à detecção in vitro ou x-vivo da presença da sequência de ácido nucleico na referida amostra.

Assim, o presente invento envolve a detecção in vitro ou x-vivo de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico específica (sequência ou segmento alvo) numa amostra contendo ácido nucleico. O presente invento reduz-se a um método que compreende a preparação de um ácido nucleico de cadeia dupla contendo uma sequência correspondente a uma sequência alvo operacionalmente ligada a um promotor para tal, empregaram o referido ácido nucleico de cadeia dupla como um molde de ácido nucleico de cadeia dupla para a preparação de uma pluralidade de transcritos de ARN, cada um destes contendo uma sequência de ARN correspondendo à referida sequência alvo e detectar a presença da referida sequência de ARN e por analogia a presença de sequência alvo.

O presente invento é dirigido a todos os métodos e meios associados com a preparação e uso destes transcritos de ARN. Logo, o presente invento é dirigido ao método, facultativamente repetitivo, de preparação do referido molde de ácido nucleico de cadeia dupla definido acima, compreendendo proporcionar um primeiro primário de ácido nucleico contendo uma sequência promotora, operacionalmente ligada a uma sequência correspondendo a um

-10-

segmento de uma sequência alvo, como definida acima, hibridar sob condições adequadas, o referido primeiro primário de ácido nucleico com a sequência alvo numa amostra contendo ácido nucleico prolongar o hibridado do referido primeiro ácido nucleico numa reacção de prolongamento com polimerase complementarmente à sequência alvo para formar o correspondente ácido nucleico duplex, separar as cadeias do referido duplex, hibridar com o promotor separado, contendo a cadeia de sequência, sob condições adequadas, um segundo primário de ácido nucleico na extremidade oposta à referida sequência promotora, e prolongar o referido segundo primário de ácido nucleico hibridado numa reacção de prolongamento com polimerase, complementarmente à referida sequência, contendo o promotor.

O presente invento é ainda dirigido a outros métodos e meios alternativos de preparação do referido molde de ácido nucleico de cadeia dupla (acima), por exemplo, uma reacção essencialmente em recipiente único compreendendo proporcionar um primeiro primário de ácido nucleico que contém uma sequência promotora operacionalmente ligada a uma sequência complementar a um segmento de uma sequência alvo, e um segundo primário de ácido nucleico tendo uma sequência idêntica a um segmento de uma sequência alvo, correspondendo os ditos primários a diferentes regiões da referida sequência alvo, mas não se sobrepondo ou não se sobrepondo substancialmente na sua correspondência ao alvo e sendo seleccionados de modo que um produto de prolongamento de um, quando separado do seu complemento, pode servir como molde para um produto de prolongamento do outro, fazer contactar uma amostra contendo ácido nucleico que inclui a sequência alvo, com os referidos primários sob condições de hibridação sequencial e de separação de cadeias, de modo a produzir, por sua vez, produtos de prolongamentos dos primários referidos.

O presente invento é também dirigido a métodos e meios de emprego do referido ácido nucleico de cadeia dupla (acima) como molde para a preparação, a partir dele, de uma pluralidade de transcritos de ARN, numa reacção catalisada por uma ARN polimerase dependente de ADN que reconhece o seu promotor, e detectar e medir a presença dos referidos transcritos de ARN.

-11-

O presente invento é ainda dirigido a métodos e meios para padronizar a quantidade de sequência alvo detectada (por correspondência com a quantidade de transcritos de ARN detectados) por correlação adicional com a presença de ácido nucleico conhecido, utilizado como padrão interno. O número de cópias do padrão é predeterminado e o padrão experimentara as mesmas condições (é para isso destinado) que a sequência alvo, durante a prática deste invento, e deverá servir portanto como meio de avaliação na determinação de quantidades relativas de transcritos preparados em paralelo, para ela e para a sequência alvo.

O presente invento é ainda dirigido à replicação adicional dos transcritos obtidos de ARN acima referidos por intermédio da presença de sítios de reconhecimento da replicase. Isto é convenientemente realizado fornecendo o referido primeiro primário de ácido nucleico, definido acima, tendo adicionalmente uma sequência de sítio de reconhecimento da replicase, preferencialmente entre a sequência promotora e a sequência correspondente à sequência alvo, e/ou contendo adicionalmente um sítio de reconhecimento da replicase no segundo primário de ácido nucleico, acima referido. Na subsequente transcrição, os transcritos consequentes contêm os sítios de reconhecimento da replicase; de tal modo que a presença de uma replicase (no locus da reação ou no conjunto, por exemplo) (autocataliticamente) induz replicação dos transcritos produzindo cópias adicionais para maior facilidade de detecção.

O presente invento é principalmente dirigido a conjuntos compreendendo os reagentes indispensáveis e meios úteis associados na detecção in vitro ou x-vivo de, pelo menos, uma sequência de ácido nucleico específica (sequência alvo), numa amostra contendo ácido nucleico, empregando os métodos e meios acima definidos.

Descrição Detalhada do Invento

1. Breve descrição dos desenhos

Figuras 1A, 1B e 1C ilustram um método de acordo com o invento para amplificação de um segmento alvo de um ácido nucleico (Ácido Nucleico A), o qual é um ADN ou ARN, no qual são feitas muitas cópias de um primeiro ARN (ARN I) com um segmento com uma sequência complementar à do segmento alvo.

Figuras 2A, 2B e 2C ilustram a outra amplificação, de acordo com o invento, de um segmento dum ARN I, feito como ilustrado nas figuras 1A, 1B e 1C, para produzir muitas cópias dum segundo ARN (ARN II) com um segmento com uma sequência igual à de um subsegmento do segmento alvo, o qual foi amplificado para produzir o ARN I.

Figura 3 representa auto-radiogramas mostrando várias concentrações de ARN de HIV amplificado por TAS simultaneamente com uma concentração fixa do ácido nucleico de β -globina humana.

Figura 4 mostra uma estratégia geral por meio da qual o ARN produzido por uma ARN polimerase dependente de ADN origina uma molécula de ARN que pode servir como um molde para uma replicase dependente de ARN.

2. Métodos Gerais e Definições

É feita referência a livros de texto clássicos da biologia molecular que contêm definições, métodos e meios para realizar as técnicas básicas do presente invento tais como: preparação da sonda de ADN ou de ADN primário, incluindo síntese de ADN; metodologia de hibridação incluindo variações nas condições de rigor para produzir maior ou menor certeza de hibridação dependendo do grau de homologia do primário para uma sequência de ADN alvo; identificação, isolamento ou preparação de promotores, ou mais especificamente de promotores ou sítios reconhecidos pela ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago e ARN polimerase dependente de ARN de bacteriófago, ou pelo emprego de sistemas eucarióticos, de polimerases dependente de ADN e ARN virais, por exemplo, ARN polimerase codificada por adenovirus, ARN polimerase de vírus do mosaico da cevadinha; condições conducentes à produção de transcritos de ARN, incluindo as denominadas sequências melhorado

ras da transcrição; o mecanismo e metodologia para replicação induzida; métodos de reacção em cadeia de polimerase incluindo os reagentes nela utilizados; e assim por diante. Ver, por exemplo, Maniatis e colab., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1982) e as várias referências aí citadas; Patente dos EUA 4683195; Patente dos EUA 4683202; Hong, Bioscience Reports 1, 243 (1981); Cooke e colab., J. Biol. Chem. 255 6502 (1980); Zoller e colab., Methods in Enzymology 100, 468-500 (1983); Crea e colab., Nucleic Acids Res. 8, 2331 (1980); Narang e colab., Meth. Enzym. 68, 90 (1979); Beai-cage e colab., Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981); Brown e colab., Meth. Enzym. 68, 109 (1979); Caruthers e colab., Meth. Enzym. 154, 287 (1985); Hitzeman e colab., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980); Lee e colab., Science 239, 1288 (1988); Milligan e colab., Nucleic Acids Res. 15, 8783 (1987); Miller e colab., Virology 125, 236 (1983); Ahlquist e colab., J. Mol. Biol. 153, 23 (1981); Miller e colab., Nature 313, 68 (1985); Ahlquist e colab., J. Mol. Biol. 172, 369 (1984); Ahlquist e colab., Plant Mol. Biol. 3, 37 (1984); Ou e colab., PNAS 79, 5235 (1982); Chu e colab., Nucl. Acids Res. 14, 5591 (1986); Publicação do Pedido de Patente Europeia No. (EPA) 194809; Marsh e colab., Positive Strand RNA Viruses, p. 327-336, Alan R. Liss (publ.; New York) (1987; Actas do Simpósio da UCLA, 1986); Miller e colab., J. Mol. Biol. 187, 537 (1986); Stoflet e colab., Science 239, 491 (1988); e Murakawa e colab., ADN 7, 287 (1988).

Todas as publicações supracitadas são por este motivo incorporadas por referência inclusa.

Pelo termo "promotor" pretende-se significar uma sequência de ácido nucleico (ocorrendo naturalmente ou produzida sinteticamente ou um produto de digestão de restrição) que é especificamente reconhecida por uma ARN polimerase que se liga a uma sequência reconhecida e inicia o processo de transcrição pelo qual um transcrito de ARN é produzido. Pode, facultativamente, conter bases do nucleótido prolongando-se para além do verdadeiro sítio de reconhecimento, para proporcionar estabilidade adicional para os processos de degradação. Em princípio, pode ser empregue qualquer sequência promotora para a qual exista uma polimerase conhe-

-14-

cida e disponível que seja capaz de reconhecer a sequência de iniciação. Promotores conhecidos e úteis, típicos, são aqueles que são reconhecidos por certas polimerases de bacteriófago como bacteriófago T3, T7 ou SP6. Ver Siebenlist e colab., Cell 20, 269 (1980). Estas são só exemplos das polimerases que podem ser utilizadas na prática do presente invento em conjunto com as sequências promotoras associadas.

O transcrito de ARN referido é a sequência de ácido ribonucleico produzida após iniciação da transcrição após o reconhecimento da sequência promotora pela ARN polimerase (ver acima). A produção de tais transcritos é mais ou menos contínua, dependendo em parte da quantidade de polimerase presente.

O termo "primário" no presente contexto significa uma sequência de ácido nucleico (ocorrendo naturalmente ou produzida sinteticamente ou um produto de digestão de restrição) que tem homologia suficiente com a sequência alvo de modo que, sob condições de hibridação adequada, é capaz de hibridação, isto é ligação à sequência alvo. Um primário típico tem, pelo menos, cerca de 10 nucleotídeos de comprimento, e preferencialmente tem aproximadamente 35 ou mais bases de nucleótidos, de comprimento, e nas concretizações mais preferidas, apresenta identidade ou tem homologia muito elevada com a sequência alvo. Ver, por exemplo, EPA 128042 (public. 12 Dez. 84).

O termo "ligado operacionalmente", em particular em relação à ligação de uma sequência promotora dentro de uma sequência primária, refere-se à funcionalidade do "molde de ácido nucleico de cadeia dupla" básico do presente invento, de modo que ele, o molde, é capaz de produzir transcritos de ARN correspondentes quando o promotor é reconhecido pela polimerase adequada (ver acima).

A reacção de prolongamento do primário para produzir um duplex é conhecida "per se". Ver referências acima. Polimerases úteis para este propósito incluem ADN polimerase I de E. coli, fragmento de Klenow de ADN polimerase I de E. coli, ADN polimerase de T4, transcriptase inversa e assim por diante.

As técnicas para formar um sinal de detecção, tais como por meio de marcação radioactiva ou meios cromogénicos usando uma

-15-

enzima cromogénica susceptível, são também bem conhecidas e documentadas. Ver discussão acima.

A utilização de uma "replicase" para indução (autocataliticamente) de replicação de transcritos de ARN do presente invento é, na generalidade, conhecida dos especialistas no assunto. Exemplos adequados de tais replicases que são úteis no presente invento incluem a denominada replicase de vírus Q/ β , que reconhece certos sítios da sequência de ácido nucleico em ambas extremidades 3'- e 5'- de um dado transcrito de ARN e as denominadas replicases do vírus do mosaico de cevadinho (BMV) e dos vírus α , que se pensa reconhecerem sítios da sequência de ácido nucleico, na extremidade 3'-, de um dado transcrito de ARN. Estas replicases servem para replicar, isto é reproduzir, os transcritos e complementos de ARN, bem como para multiplicar as suas cópias. Quando tal enzima está presente no lugar da reacção durante o processo de transcrição, pode-se prever que os múltiplos transcritos que são produzidos durante a transcrição podem ser eles próprios submetidos a replicação de maneira a aumentarem exponencialmente a quantidade de produto de transcrito de ARN.

A padronização interna é definida como o processo que é utilizado para: a) assegurar que o processo de amplificação de TAS não falhou devido a um erro operacional, e, b) medir os níveis de ácido nucleico alvo em relação a uma quantidade predeterminada de ácido nucleico o qual está sempre associado com a amostra de interesse. Tal padronização interna ocorre por co-amplificação de uma porção da sequência alvo, bem como de uma sequência endógena, na mesma reacção. Por exemplo, conhecendo a contagem de células presentes numa amostra biológica, um gene de cópia única (por exemplo, β -globina) podia ser utilizado como um padrão interno e, dado que não é expresso sob a forma de ARN, o seu número de cópias inicial é igual a duas vezes o número total de células na amostra. Por co-amplificação de porções das sequências de β -globina e alvo, de interesse, as proporções dos sinais amplificados podem ser comparadas para quantificar os níveis da sequência alvo de interesse. Dado que cada célula tem duas cópias (nas células diplóides) deste padrão interno, independentemente de a amostra biológica conter sequências alvo separadas (por ex., HIV),

-16-

cada amostra deverá produzir um sinal de amplificação positivo, resultante do padrão interno. Ver Groudine e colab., Nucleic Acids Research 12, 1427 (1984), e McKnight, Cell 31, 355 (1982). Ver também Public. do Pedido de Patente Britânico nº. 2187283 A (public. 3 Set. 87).

3. Descrição detalhada dos aspectos preferidos

Num dos seus aspectos, o invento é um método para amplificação dum segmento de ácido nucleico alvo de fórmula I:

$$3'-(\text{primeiro subsegmento})_t-(\text{segundo subsegmento})_t-(\text{terceiro subsegmento})_t-5'$$

I

na qual o $(\text{primeiro subsegmento})_t$ é um segmento de ácido nucleico de sequência conhecida com pelo menos 10 nucleótidos contíguo ao terminal 3'- do $(\text{segundo subsegmento})_t$, o $(\text{segundo subsegmento})_t$ é um segmento de ácido nucleico com 0 ou mais nucleótidos, e o $(\text{terceiro subsegmento})_t$ é um segmento de ácido nucleico de sequência conhecida com pelo menos 10 nucleótidos, contíguo ao terminal 5' do $(\text{segundo subsegmento})_t$, método que abrange:

(1) hibridação do $(\text{primeiro subsegmento})_t$ do referido segmento alvo com o primeiro primário, que é um ADN de cadeia simples que compreende um subsegmento do terminal 3', de fórmula II:

$$5'-(\text{promotor})_1-(\text{subsegmento variável})_1-(3'\text{-subsegmento primário})_1-3'$$

II

na qual o $(\text{promotor})_1$ é um segmento de ADN de cadeia simples com a sequência da cadeia mais de um promotor específico da ARN polimerase dependente de ADN do bacteriófago, o $(\text{subsegmento variável})_1$ é um segmento de ADN de cadeia simples com 0 a 100 nucleótidos contíguo ao nucleótido do terminal 3' do $(\text{promotor})_1$ e ao nucleótido do terminal 5' do $(3'\text{-subsegmento primário})_1$, e o $(3'\text{-subsegmento primário})_1$ é um segmento de ADN de cadeia simples com pelo menos 10 nucleótidos com uma sequência que é complementar da sequência de um subsegmento do $(\text{primeiro subsegmento})_t$ que termina com o nucleótido do terminal 3' do $(\text{primeiro subsegmento})_t$;

-17-

o referido (promotor)₁ é contíguo ao terminal 5' do referido (3'-subsegmento primário)₁, se o referido (subsegmento variável)₁ tem 0 nucleótidos;

(2) extensão do referido primeiro primário, hibridado de acordo com o passo (1), numa reacção catalisada com uma primeira ADN polimerase para originar um primeiro segmento complementar de ADN, que compreende um subsegmento de fórmula III:

$$5'-(\text{promotor})_1-(\text{subsegmento variável})_1-(\text{primeiro subsegmento})_{t_c}-$$

$$-(\text{segundo subsegmento})_{t_c}-(\text{terceiro subsegmento})_{t_c}-3'$$

III

na qual o (primeiro subsegmento)_{t_c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_t, o (segundo subsegmento)_{t_c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (segundo subsegmento)_t, e o (terceiro subsegmento)_{t_c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (terceiro subsegmento)_t, sob a condição de, se o segmento alvo é um segmento de ARN, a referida primeira ADN polimerase é uma transcriptase inversa;

(3) transformar em cadeias simples o duplex formado na reacção do passo (2);

(4) hibridação do (terceiro subsegmento)_{t_c} do referido primeiro ADN complementar de fórmula III com um segundo primário, que é um ADN de cadeia simples com pelo menos 10 nucleótidos de fórmula IV:

$$3'-(5'\text{-subsegmento primário})_2-(\text{subsegmento variável})_2-5'$$

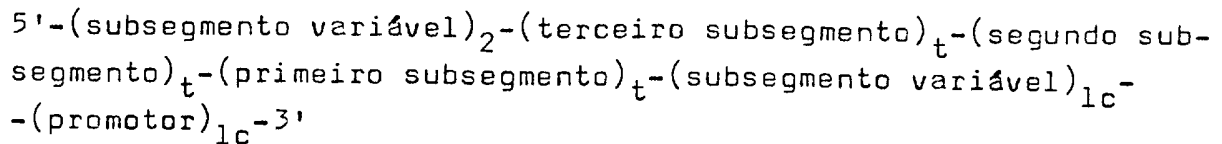
IV

na qual o (5'-subsegmento primário)₂ tem a sequência de um subsegmento do (terceiro subsegmento)_t que termina com o nucleótido do terminal 5' do (terceiro subsegmento)_t e na qual o (subsegmento variável)₂ é um segmento com 0 a 100 nucleótidos que é contíguo ao terminal 5' do (5'-subsegmento primário)₂;

(5) extensão do referido segundo segmento primário, hibridado de acordo com o passo (4), numa reacção catalisada por uma segunda ADN polimerase para originar um segundo segmento comple-

-18-

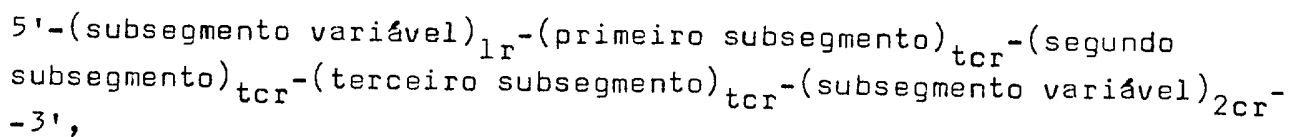
mentar de ADN que compreende um subsegmento de fórmula V:



V

na qual o (subsegmento variável)_{1c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₁, e o (promotor)_{1c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (promotor)₁, sob a condição de a referida segunda ADN polimerase ser igual ou diferente da referida primeira ADN polimerase; e

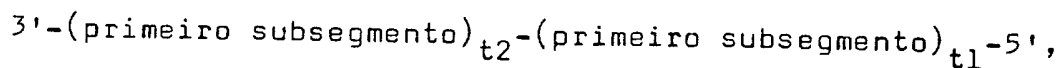
(6) utilização do produto de cadeia dupla do passo (5) como molde para a reacção catalisada por uma primeira ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago, que reconhece o promotor do qual uma cadeia é o (promotor)₁, para originar um primeiro produto de ARN de fórmula VI:



VI

na qual o (subsegmento variável)_{1r} é o segmento de ARN com a sequência do (subsegmento variável)₁, o (primeiro subsegmento)_{tcr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_t, o (segundo subsegmento)_{tcr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (segundo subsegmento)_t, o (terceiro subsegmento)_{tcr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (terceiro subsegmento)_t, e o (subsegmento variável)_{2cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₂.

Noutro dos seus aspectos, o invento refere-se a um método no qual o (primeiro subsegmento)_t tem, pelo menos, 10 nucleótidos em comprimento e é de fórmula XIII:

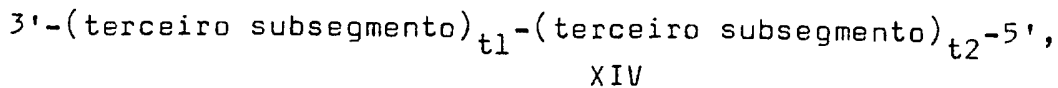


XIII

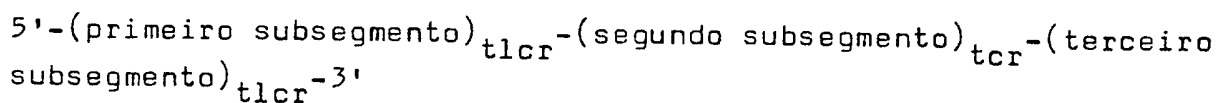
na qual o (primeiro subsegmento)_{t2} tem 0 ou mais nucleótidos e, se mais de 0, é contíguo ao terminal 3' do (primeiro subsegmento)_{t1},

-19-

e o (primeiro subsegmento)_{t1} tem pelo menos 10 nucleótidos de comprimento; em que o (terceiro subsegmento)_t é de fórmula XIV:

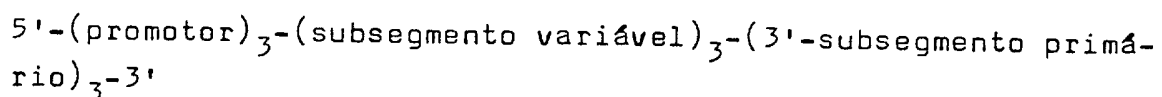


na qual o (terceiro subsegmento)_{t2} tem 0 ou mais nucleótidos e, se mais de 0, é contíguo ao terminal 5' do (terceiro subsegmento)_{t1}, e o (terceiro subsegmento)_{t1} tem pelo menos 10 nucleótidos em comprimento; na qual o (3'-subsegmento primário)₁ tem a sequência complementar à de um subsegmento do segmento alvo o qual compreende todo o (primeiro subsegmento)_{t2} e 0 ou mais nucleótidos do (primeiro subsegmento)_{t1}; na qual (5'-subsegmento primário)₂ é um subsegmento que compreende todo o (terceiro subsegmento)_{t2} e 0 ou mais nucleótidos do (terceiro subsegmento)_{t1}; e na qual, após os passos (1) a (6) já referidos, o subsegmento de ARN de fórmula VII:



na qual o (primeiro subsegmento)_{t1cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_{t1} e o (terceiro subsegmento)_{t1cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (terceiro subsegmento)_{t1}, é adicionalmente amplificado por um método que compreende:

(7) hibridação do referido primeiro produto de ARN de fórmula VI com um terceiro primário, que é um ADN de cadeia simples que inclui um subsegmento do terminal 3' de fórmula VIII:

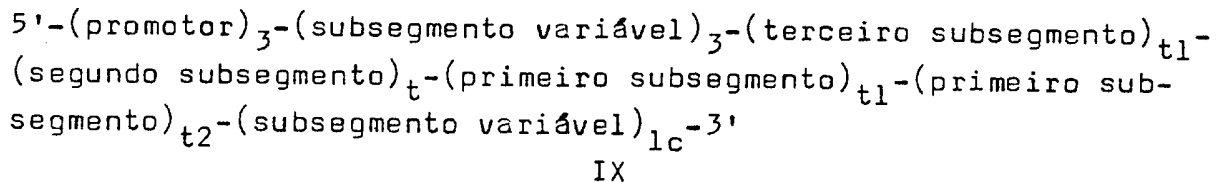


na qual o (promotor)₃ é um segmento de ADN de cadeia simples com a sequência da cadeia mais dum promotor específico da ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago, sendo a referida sequência do (promotor)₃ igual ou diferente à do (promotor)₁, o (subsegmento variável)₃ é um segmento de ADN de cadeia simples com 0 a 100 nucleótidos que é contíguo ao nucleótido do terminal 3' do (promot

-20-

tor)₃ e ao nucleótido do terminal 5' do (3'-subsegmento primário)₃, e o (3'-subsegmento primário)₃ é um segmento de ADN de cadeia simples que tem a mesma sequência que o (terceiro subsegmento)_{t1} e é contíguo ao nucleótido do terminal 3' do (promotor)₃ se o (subsegmento variável)₃ tem 0 nucleótidos;

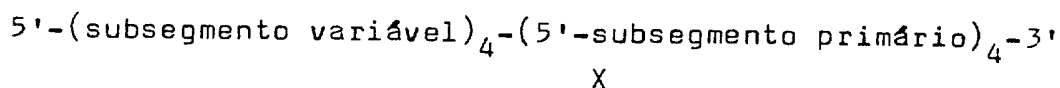
(8) extensão do referido terceiro primário hibridado de acordo com o passo (7) numa reacção catalisada por uma terceira ADN polimerase, que é uma transcriptase inversa e é igual ou diferente das referidas primeira e segunda ADN polimerases, para originar um terceiro segmento de ADN complementar que inclui um subsegmento do terminal 3' de fórmula IX:



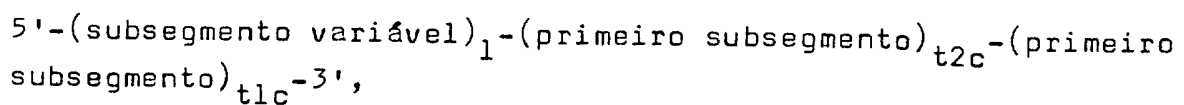
na qual o (subsegmento variável)_{1c} é um ADN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₁;

(9) transformação do duplex formado na reacção do passo (8) em cadeias simples;

(10) hibridação do terceiro ADN complementar produzido na reacção do passo (8) com um quarto primário de fórmula X:



na qual o (subsegmento variável)₄ é um segmento de 0 a 100 nucleótidos e o (5'-subsegmento primário)₄ é um subsegmento de sequência conhecida que é contíguo ao nucleótido de 3' do (subsegmento variável)₄, se o (subsegmento variável)₄ tem mais de 0 nucleótidos, e que inclui pelo menos 10 nucleótidos do segmento de fórmula XX:



na qual o (primeiro subsegmento)_{t2c} é um segmento de ADN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_{t2} e o (primeiro

-21-

subsegmento)_{t1c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_{t1}, com a condição de que pelo menos um dos referidos pelo menos 10 nucleótidos está em ou a 5' do nucleótido do terminal 5' do (primeiro subsegmento)_{t1c};

(11) extensão do referido quarto primário hibridado de acordo com o passo (10) numa reacção catalisada por uma quarta ADN polimerase, que é igual ou diferente das referidas primeira, segunda e terceira ADN polimerases, para originar um quarto ADN complementar que inclui um segmento de fórmula XI:

$$5'-(\text{primeiro subsegmento})_{t1c}-(\text{segundo subsegmento})_{tc}-(\text{terceiro subsegmento})_{t1c}-(\text{subsegmento variável})_{3c}-(\text{promotor})_{3c}-3',$$

XI

na qual o (segundo subsegmento)_{tc} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (segundo subsegmento)_t, o (terceiro subsegmento)_{t1c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (terceiro subsegmento)_{t1}, o (subsegmento variável)_{3c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (segmento variável)₃, e o (promotor)_{3c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (promotor)₃; e

(12) utilização do produto de cadeia dupla do passo (11) como molde numa reacção catalisada por uma segunda ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago, que é igual ou diferente da referida primeira ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago e que reconhece o promotor do qual uma cadeia é o (promotor)₃, para produzir um segundo produto de ARN com um subsegmento do terminal 5' de fórmula XII:

$$5'-(\text{subsegmento variável})_{3r}-(\text{terceiro subsegmento})_{t1r}-(\text{segundo subsegmento})_{tr}-(\text{primeiro subsegmento})_{t1r}-X_{12}-(\text{subsegmento variável})_{4cr}-3',$$

XII

na qual o (subsegmento variável)_{3r} é o segmento de ARN com a sequência do (subsegmento variável)₃, o (terceiro subsegmento)_{t1r} é o segmento de ARN com a sequência do (terceiro subsegmento)_{t1}, o (segundo subsegmento)_{tr} é o segmento de ARN com a sequência do (segundo subsegmento)_t, o (primeiro subsegmento)_{t1r} é o segmento de ARN com a sequência do (primeiro subsegmento)_{t1}, o (subsegmen-

-22-

to variável)_{4cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₄, e X₁₂ é o segmento de ARN com a sequência complementar do subsegmento do (5'-subsegmento primário)₄ que está a 5' do terminal 5' do (primeiro subsegmento)_{tlc}.

Como notado anteriormente, o invento também fornece conjuntos para a realização dos métodos de amplificação do invento. No caso do método do invento que compreende a produção dum primeiro produto de ARN, um conjunto do invento conteria os dois primários, a correspondente ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago, e a ADN polimerase. Um conjunto para a realização do método de acordo com o invento que permite a produção de ambos um primeiro e um segundo produtos de ARN, conteria quatro primários adequados (dois conjuntos de dois) com as polimerases correspondentes necessárias.

Métodos e conjuntos de acordo com o invento para a realização de ensaios de hibridação de sonda de ácido nucleico que asseguram a amplificação de um segmento alvo de acordo com o invento, permite em adição aos passos e componentes, respectivamente, dos métodos e conjuntos para amplificação, passos e componentes necessários para a detecção do produto de ARN resultante da amplificação de acordo com o invento. Os especialistas compreendem os vários passos e componentes adicionais, respectivamente, que são necessários para detectar ARN a partir dum processo de amplificação por qualquer dos numerosos métodos de ensaio de hibridação de sonda de ácido nucleico conhecidos. Um método de ensaio de hibridação de sonda de ácido nucleico preferido, envolvendo a amplificação de ARN marcado e capturado por pérolas, é ilustrada no Exemplo II.

Prefere-se que o (3'-subsegmento primário)₁, o (5'-subsegmento primário)₂, o (3'-subsegmento primário)₃, e o (5'-subsegmento primário)₄ tenham entre 20 e 40 nucleótidos, e mais preferivelmente cerca de 30 nucleótidos para melhorar a especificidade com que os vários primários se ligam às extremidades dos segmentos alvo que se pretendem amplificar.

É também preferido que o segmento alvo dum ácido nucleico de interesse, que é seleccionado para amplificação (em virtude da

-23-

selecção do (primeiro subsegmento)_t e do (terceiro subsegmento)_t serem seleccionados de maneira que o (segundo subsegmento)_{tr} tem pelo menos 30, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 50, nucleótidos. Isto permite a utilização do (segundo subsegmento)_{tcr} ou do (segundo subsegmento)_{tr} no produto de ARN amplificado como alvos para sondas de ácido nucleico que não possuirão sequências que se sobreponham às de qualquer subsegmento primário.

Enquanto que a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago pode utilizar moldes com mais de 1000 pb, a sua eficiência de transcrição diminui à medida que o molde se torna mais comprido. Portanto, segmentos alvo com menos de 1000 pb de comprimento são preferidos.

É preferível utilizar um conjunto de primários idêntico ao usado na síntese de ARN, para num segundo ciclo de TAS produzir ARN. Como foi dito na secção que descreve a produção de ARN, o par primário não se deverá sobrepor. Na realização do método do invento em que a produção de ARN é desejada, é possível que o subsegmento do segmento alvo com a sequência complementar à do (5'-subsegmento primário)₄ esteja na direcção 5' desde o e não se sobreponha ao, subsegmento do segmento alvo com a sequência complementar à do (3'-subsegmento primário)₁. De modo similar, é preferido que o subsegmento do segmento alvo com a sequência igual à do (3'-subsegmento primário)₃ esteja na direcção 3' desde o, e não se sobreponha ao, subsegmento do segmento alvo com a sequência igual à do (5'-subsegmento primário)₂. Esta estratégia pode ser preferida porque reduz a competição dos diferentes primários para os mesmos sítios e, portanto, pode melhorar significativamente a eficiência da amplificação de acordo com o invento. Onde existe alguma sobreposição entre conjuntos de primários afins é preferível remover qualquer primeiro conjunto de primários não usado, antes de empregar o segundo conjunto.

O foco do presente invento está na ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago devido à sua alta especificidade para certos promotores. Outras polimerases que semelhantemente têm alta especificidade para promotores particulares, podem ser utilizadas de acordo com o invento em lugar da polimerase de bacteriófago e entende-se que o invento abrange também essas outras polime-

rases.

As ARN polimerases dependentes de ADN de bacteriófago preferidas são as de T7, T3 e SP6. Os promotores preferidos para utilização com estas polimerases estão descritos nos exemplos e nas reivindicações, mas conhecem-se na especialidade e podem também ser empregues, numerosos outros promotores para estas polimerases.

Além disto, polimerases de bacteriófago que não as três preferidas e promotores reconhecidos por tais polimerases, podem ser utilizados de acordo com o invento.

Nos métodos do invento é preferida a utilização para ADN polimerase de transcriptases inversas e ADN polimerase sem actividade de exonuclease de 5' para 3'. É preferível que uma única ADN polimerase seja utilizada em todos os passos do processo. As ADN polimerases preferidas são a transcriptase inversa de AMV e a transcriptase inversa de MMLV recombinante. Outras polimerases são, contudo, aceitáveis, tais como a ADN polimerase termo-estável de *Thermus aquaticus* (ver Chien e colab., J. Bacteriol. 127, 1550 (1976)), ADN polimerase de T7 recombinante da marca SequenaseTM da U.S. Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio, E.U.A., e a bem conhecida ADN polimerase I do fragmento de Klenow de *E. coli*, e ADN polimerase α de timo de vitelo.

Os "subsegmentos variáveis" que são facultativamente incluídos nos vários primários servem três funções. De facto, eles podem ser mais adequadamente denominados "subsegmentos para fins múltiplos". Em primeiro lugar, para o primeiro e terceiro primários, os quais incluem os promotores, os subsegmentos dos promotores incluem preferencialmente sequências de iniciação da transcrição que são preferidas pela ARN polimerase correspondente ao promotor. Em segundo lugar, para todos os primários, um subsegmento variável pode facultativamente conter um segmento particular pelo qual o produto de ARN da amplificação pode ser detectado num ensaio de hibridação da sonda de ácido nucleico. De facto, amplificação (e ensaio) pode ocorrer simultaneamente para vários segmentos alvo diferentes com a utilização de conjuntos primários que diferem nos seus segmentos de reconhecimento (por ex., (3'-sub-

segmento primário)₁) mas que incluem um subsegmento variável comum. O subsegmento variável pode também conter uma sequência de poliligandos que convenientemente contém uma pluralidade de sítios de restrição para facilitar a clonagem subsequente. Finalmente os subsegmentos variáveis podem ser utilizados para incorporar no produto de ARN da amplificação sequências necessárias para permitir que o produto de ARN seja (autocataliticamente) replicado por uma ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago, tais como a Q/β replicase (ver Miele e colab., acima) e sequências de BMV do cromossoma 3 de ARN do vírus da planta que promove a síntese de ARNm de revestimento. Ver Ahlquist e colab., J. Mol. Biol. 172, 369 (1984); Ahlquist e colab., Plant Mol. Biol. 3, 37 (1984); Ahlquist e colab., J. Mol. Biol. 153, 23 (1981); Miller e colab., Nature 313, 68 (1985); Miller e colab., Virology 125, 236 (1983); e Ou e colab., PNAS 79, 5235 (1982).

No caso da Q/β replicase, que é conhecida na especialidade, é realizada preferivelmente pela inclusão, no (subsegmento variável)₂, da sequência

5'-CGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGGCGCGACCTTCGTGC-3' e no (subsegmento variável)₁ da sequência

5'-TGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3', e depois replicação (autocataliticamente) do primeiro produto de ARN (isto é, ARN I na figura 1; ver também figura 4), ou inclusão no (subsegmento variável)₄ da sequência

5'-CGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGGCGCGACCTTCGTGC-3' e no (subsegmento variável)₃ da sequência

5'-TGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3', e depois replicação (autocataliticamente) do segundo produto de ARN (isto é, ARN II na figura 1; ver também figura 4).

No caso da utilização da replicase de BMV, também conhecida, é realizado de preferência pela inclusão da sequência seguinte para BMV na sequência variável 2 (bases 1-25) (no uso específico do exemplo de HIV abaixo):

-26-

Promotor de BMV

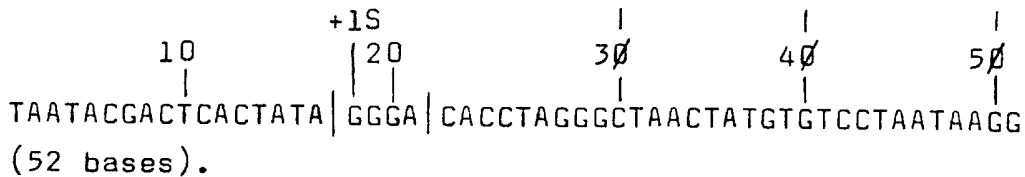
TCS = 87-29 (HIV-específico)



50
 |
 AAGCTA-3' (53 bases), como uma sequência núcleo; adicionalmente
 sequência rica em AU a 5' pode ser utilizada para aumentar a ac-
 tividade da replicase de BMV. Este oligo deve ser utilizado co-
 mo segundo primário. O primeiro primário usado com este segundo
 primário é um primário HIV-específico, baseado em T7.

Promotor T7

TCS = 87-34



Pormenores adicionais, não restritivos, para auxiliar à compreensão do invento são fornecidos nos exemplos seguintes:

4. Exemplos

EXEMPLO I

10 ml de sangue dum paciente suspeito de estar infectado com um vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) é fraccio-
 nado com um aparelho SepracellTM (Sepratech Corp., Oklahoma City, Oklahoma, E.U.A.) ou, alternativamente, com um gradiente de Fi-
 coll, para isolar os linfócitos. Os linfócitos são em seguida lisados e o seu ácido nucleico é isolado com um aparelho extrac-
 tor (Molecular Biosystems Inc., San Diego, California, E.U.A.) ou, alternativamente, os linfócitos são lisados por tratamento pa-
 drão com enzima-dodecil sulfato de sódio (SDS) e o ácido nucleico é isolado por cromatografia de fase inversa em celulose DEAE. Is-
 to é feito como se segue:

Centrifugar as células: 5k rpm durante 4' a partir de 1 ml de so-
 lução salina tamponada com Tris (TBS), pH 7,5.

Retirar o sobrenadante.

-27-

Ressuspender a pelota em:

500 μ l NaCl 0,3 M/Tris 20 mM, pH 7,5	Mexer bem
100 μ l SDS a 2%	e depois adi
200 μ l proteinase K a 5 mg/ml	cionar à
200 μ l 0,25 M EDTA	pelota.

Submeter a vortex vigorosamente e incubar a 50° durante 45', submetendo a vortex durante 10-15 segundos em cada 10'.

Carregar numa coluna de extractor drenada e permitir a entrada.

Lavar a coluna 1 vez 4 ml de NaCl 0,3 M/Tris 20 mM, pH 7,5.

Eluir ADN/ARN com 4 ml de NaCl 0,5 M/Tris 20 mM, pH 7,5.

Para eluir adicionar: 5 μ l de glicogénio
 400 μ l NaOAc 3 M
 9,0 ml de EtOH gelado
 mexer bem

Precipitar a -20°C durante toda a noite. Pode ser utilizado um banho de gelo seco/etanol durante uma hora.

Centrifugar ADN/ARN durante 15' a 10 000 rpm num rotor de tina basculante; escoar o EtOH e secar num "kimwipe" durante ~2'.

Liofilizar durante 10'.

Ressuspender a pelota em 170 μ l de TE.

Incubar a 37°C durante 5'.

Verter uma coluna de centrífuga de 1 ml como se segue:

Tapar uma seringa de 1 ml com uma pequena quantidade de lã de vidro (esterilização em autoclave).

Encher a seringa com TE (Tris-EDTA) tratado com dietilpirocarbonato (DEPC).

Adicionar rapidamente Sephadex G-50 fino (em TE; esterilizado em autoclave).

Continuar a adicionar até que a matriz sólida ultrapasse o topo da seringa.

Centrifugar 30 segundos a 1000 rpm numa centrífuga de mesa IEC. Lavar com 100 μ l de TE, centrifugar durante 1' a velocidade média (cerca de 1000 rpm). Rejeitar a lavagem.

-28-

Carregar o extracto na coluna. Centrifugar novamente durante 1'. Lavar com 150 μ l de TE, centrifugar a ~1000 rpm durante 1'. Retirar a lavagem e a primeira fracção. Amostras para múltiplas reacções podem ser retiradas neste passo.

Adicionar 1/10 volume de LiCl 8 M. Misturar com 2,5 x vol. EtOH a 100%. Submeter a bom vortex. Precipitar com gelo seco/EtOH durante 30'.

Centrifugar durante 15' à velocidade máxima numa microcentrifuga a 4°C. Secar a pelota.

Após o isolamento, o ácido nucleico total da amostra é dissolvido em 100 μ l de tampão TE (Tris.Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). 10 μ l dos 100 μ l de ácido nucleico total são dissolvidos até um volume final de 100 μ l contendo:

Tris.Cl 40 mM, pH 8

NaCl 25 mM

MgCl₂ 10 mM

ditiotreitól (DTT) 10 mM

espermidina 2 mM

100 μ g/ml de albumina de soro bovino

400 mM de cada de dATP, dCTP, dGTP e TTP

adiciona-se ADN de cadeia simples com 101 bases 30 nM com a sequência 5'-GAACGCGGCT ACAATTAATA CATAACCTTA TGTATCATAC ACATACGATT TAGGTGACAC TATA GAATAC TTTCGTAACA CTAGGCAAAG GTGGCTTTAT C -3' primário A, Adiciona-se ADN com 29 bases 30 nM com a sequência 5'-ACACCATATG TATGTTTCAG GGAAAGCTA-3', primário B. O primário B, que é o segundo primário, tem a sequência de bases 5151-5179 no gene SOR do HIV-1. Um segmento alternativo para o segundo primário, correspondendo às bases 5357-5387 do gene SOR do HIV-1, tem a sequência 5'-GCACACAAGT AGACCCTGAA CTAGCAGACC A-3', e, se utilizado, está também presente a 30 nM. O primário A é o primeiro primário; os seus 64 nucleótidos em 5' formam a cadeia mais dum promotor para o ARN polimerase dependente de ADN de SP6. O seu segmento de sequência 5'-GAATAC-3' é o (subsegmento alternativo)₁, que inclui o sítio de iniciação da transcrição (o 5'-G) e outras bases aparentemente favorecidas pela ARN polimerase de SP6 no terminal 5' das sequências por ela transcritas. Finalmente, os 31

-29-

nucleótidos do terminal 3' formam o (subsegmento primário)₁ e têm a sequência complementar à das bases 5577-5547 no gene SOR dum HIV-1 isolado (ver Ratner e colab., Nature 313, 277 (1985) para a sequência completa). (O HIV isolado é referido nestes Exemplos como "HIV-1").

De notar que todos os oligonucleótidos empregues nestes exemplos são feitos por síntese de fase sólida num sintetizador automático (Modelo nº. 380A) de Applied Biosystems, Inc. (Foster City, California, E.U.A.) e são purificados por cromatografia essencialmente até à homogeneidade por HPCL utilizando uma coluna de fase inversa C8. Alternativamente outros sintetizadores disponíveis comercialmente e procedimentos de purificação padrão podem ser usados para preparar os oligonucleótidos.

Os 100 µl de solução são aquecidos a 65°C durante 2 minutos e em seguida arrefecidos até 42°C num 1 minuto. Este aquecimento, seguido da manutenção a 42°C ou mais, em combinação com a composição da solução, proporciona condições de rigor suficientes para determinar a hibridação do (3'-subsegmento primário)₁, com suficiente estabilidade para preparar a síntese de ADN, de alta especificidade à sequência complementar à do (3'-subsegmento primário)₁.

Em seguida, 10 unidades da transcriptase inversa do vírus da mioblastose de aves (AMV) ou 500 unidades da transcriptase inversa do vírus da leucémia murina de Moloney do recombinante (MMLV), tal como adquirido a Life Sciences, Inc., St. Petersburg, Florida, E.U.A., são adicionadas à solução e esta é incubada durante 10 minutos a 42°C. (Uma unidade incorpora 1 nmole de TTP numa forma precipitável pelo ácido em 10 minutos a 37°C utilizando poli(A).oligo(T)₁₂₋₁₈ como molde-primário tal como definido por Houts e colab., J. Virol. 29, 517 (1979)). Após a incubação de 10 minutos, a solução é colocada em banho de água a ferver durante 1 minuto. Este aquecimento provoca separação das cadeias do duplex formado pela transcriptase inversa.

Em seguida, a solução é arrefecida até 42°C em 1 minuto. Durante este arrefecimento, o segundo primário hibrida com o segmento do terminal 3' do complemento do segmento alvo formado na

-30-

reacção catalisada pela transcriptase inversa. Novamente, as condições de hibridação são suficientemente rigorosas para originar hibridação suficientemente específica entre o segundo primário e a sequência complementar à do segundo primário.

Após o arrefecimento adiciona-se mais 10 unidades transcriptase inversa de AMV ou mais 500 unidades de transcriptase inversa de MMLV clonado e realiza-se nova incubação a 42°C durante 10 minutos.

Em seguida adiciona-se inibidor de ribonuclease da marca RNasin^R da Promega Biotec, Madison, Wisconsin, E.U.A., é adicionado (facultativamente) até uma concentração de 1 unidade por ml. (1 unidade é a quantidade de inibidor necessária para inibir em 50% a actividade de 5 ng de ribonuclease A. Roth, Meth. Cancer Res. 3, 151 (1976)). Posteriormente, cada um dos ribonucleósidos 5'-trifosfatos, ATP, GTP, CTP e UTP, é adicionado até 400 mM. Finalmente entre 10 e 20 unidades de ARN polimerase dependente de ADN SP6, adquirida à Promega Biotec, são adicionados e a solução resultante é incubada a 42°C durante 30 a 60 minutos. (1 unidade é a quantidade de ARN polimerase necessária para catalisar a incorporação de 1 nmole de ribonucleósido trifosfato num produto in solúvel em ácido, em 60 minutos a 37°C sob condições padrão de reacção Tris.Cl 40 mM, pH 7,9, MgCl₂ 6 mM, DTT 10 mM, espermidina 2 mM, de cada um dos ATP, GTP, CTP e UTP, 0,5 mM de cada, 0,5 Ci de ³H-CTP, 1 g de ADN SP6 e a enzima, num volume total de 50 µl).

Em seguida cada um dos seguintes oligonucleótidos é adicionado para levar a sua concentração a 30 nM:

terceiro primário:

5'-GAACGCGGCT ACAATTAATA CATAACCTTA TGTATCATAC ACATACGATT
TAGGTGACAC TATA GAATAC ACTAATTCAT CTGTATTACT TTGACTGTTT
TTC-3'

quarto primário:

5'-TTTTTTGGTG TTATTAATGC TGCTAGTGCC-3'

No terceiro primário, tal como no primeiro, as 64 bases do terminal 5' são o segmento promotor e as 6 bases seguintes são o segmento variável. O segmento variável consiste nas primeiras 6

-31-

bases transcritas a partir do promotor pela ARN polimerase de SP6, e estas bases são seleccionadas para aumentar o nível de tal transcrição. Finalmente, a porção do (3'-subsegmento primário)₃ do terceiro primário consiste nas 33 bases do terminal 3', na mesma sequência das bases 5388-5420 do gene da estrutura, de leitura aberta pequena (SOR) do HIV-1. O quarto primário tem a sequência complementar à das bases 5546-5517 do gene SOR do HIV-1.

Após adição dos terceiro e quarto primários, a solução é incubada a 42°C durante 1 minuto. Durante este período, ocorre a hibridação entre o (3'-subsegmento primário)₃ do terceiro primário e o primeiro ARN formado na reacção catalisada pela ARN polimerase de SP6. Devido ao rigor das condições de hibridação, o (3'-subsegmento primário)₃ hibrida, com estabilidade suficiente para preparar a síntese de ADN, com alta estabilidade ao segmento de sequência complementar, no primeiro ARN.

Após incubação, 10 unidades de transcriptase inversa de AMV ou 500 unidades de transcriptase inversa de MMLV clonado são adicionadas e a solução é incubada a 42°C durante 10 minutos para originar o terceiro ADN complementar.

A solução é, em seguida, suspensa num banho de água a ferver durante um minuto e arrefecida até 42°C durante 1 minuto para, primeiro, transformar em cadeias simples o duplex entre o terceiro ADN complementar e o primeiro ARN e, em segundo, permitir a hibridação entre o quarto primário e o terceiro ADN complementar. Tal como com as outras hibridações, as condições são suficientemente rigorosas para que ocorra com estabilidade suficiente para preparar a síntese de ADN, a hibridação do quarto primário, com alta especificidade do segmento do terceiro ADN complementar de sequência complementar à do quarto primário.

Em seguida, novamente, 10 unidades de transcriptase inversa de AMV ou 500 unidades de transcriptase inversa de MMLV clonado são adicionadas e a solução é incubada durante 10 minutos a 42°C.

Depois inibidor de ribonuclease da marca RNasin^R é adicionado (facultativamente) para uma concentração até 1 unidade por ml, seguido por 10-20 unidades de ARN polimerase de SP6, e a solu

-32-

ção é incubada a 42°C durante 30 minutos a 1 hora.

O segundo ARN resultante pode ser detectado por uma técnica de hibridação de sonda de ácido nucleico.

EXEMPLO II

Segue-se o procedimento do Exemplo I, com uma modificação anotada abaixo, com três amostras: (A) uma de 10 ml de sangue humano, que se sabe ser isento de HIV; (B) uma de 10 ml de cultura que se sabe ter cerca de 10^3 de células infectadas com HIV-1, por ml; e (C) uma de 10 ml de sangue de uma pessoa suspeita de estar infectada com HIV-1. A modificação do procedimento é que um ribonucleósido trifosfato marcado com α - ^{32}P é incluído como substrato na reacção catalisada pela ARN polimerase de SP6 para originar o segundo ARN. O segundo ARN está, conseqüentemente, marcado com ^{32}P .

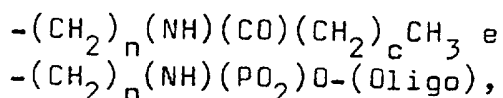
Pérolas macroporosas de Sephacryl-S500TM são derivadas com um ligante terminado por grupo-carboxilo (de fórmula $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}-(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2-$) e depois com oligonucleótido derivado de 5'-(6-amino-hexil fosforamidato) de sequência 5'-TGGTCTGCTA GTTCAGGGTC TACTTGTGTG C-3' que é a sequência complementar à das bases 5357-5387 do gene SOR do HIV-1. (A sequência de bases 4901-4932 do gene SOR ocorre em qualquer segundo ARN produzido durante a amplificação do ácido nucleico a partir de uma amostra). A preparação das pérolas foi feita de acordo com procedimentos descritos no Pedido de Patente dos Estados Unidos, nº. de série 895 756, depositado em 11 de Agosto de 1986, e vulgarmente transmitido e aqui incorporado como referência. Resumidamente, os materiais de suporte são vidro de silicato poroso ou dextrano reticulado macroporoso, derivado com um ligante terminado por amino com substancialmente todos os grupos, que não estão ligados covalentemente através dum grupo fosforamidato ao nucleósido terminal da sonda de captura, sendo bloqueados por interacção não específica com o ácido nucleico tendo um grupo acilo alifático; dextrano reticulado macroporoso activado com brometo de cianogéneo, o qual reage com aminas, para se ligar a oligonucleótidos derivados de aminoalquil fosforamidato; e vidro de silicato poroso, dextrano reticulado macroporoso e polistireno reticulado com divinilbenzeno com um

-33-

ligante terminado por carboxilo ou terminado por ester-succinimido, com uma fracção dos grupos carboxil ligadas numa ligação amida a um grupo amino de um diaminoalcano, do qual o outro amino faz parte dum fosforamidato que, por sua vez, está ligado directamente ao nucleósido terminal da sonda de captura. Materiais de suporte preferidos são vidro poroso controlado derivado de alquilamina de cadeia longa e derivado de carboxilo tal como vendido por Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, E.U.A., sob os números de produto 24875 e 23735, respectivamente, sob a forma de pérolas com diâmetro nominal de poros de 500 Angstroms e diâmetro das partículas entre 125 e 177 micra e Sephacryl S500 vendido por Pharmacia Inc., Piscataway, New Jersey, E.U.A., sob o número de código 17-0475-01, sob a forma de pérolas com um diâmetro em molhado de cerca de 40 a cerca de 105 micra e um volume de exclusão para dextranos de peso molecular superior a cerca de 2×10^7 daltons, sendo o referido Sephacryl derivado com brometo de cianogéneo ou com um ligante terminado por amino ou terminado por carboxilo. Num aspecto, o suporte sólido é um de:

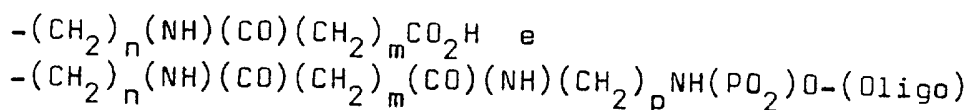
(A) vidro de silicato poroso derivado em silicones com

(1) grupos de fórmula



com substancialmente nenhum silicone derivado com um grupo terminado com um grupo amino, em que c é 0 a 5, n é 2 a 8, -O-(Oligo) é a sonda oligonucleótida, e o átomo de oxigénio ligado ao (Oligo) é a sonda oligonucleótida, e o átomo de oxigénio ligado ao (Oligo) é o oxigénio de 5' do nucleósido de 5' ou o oxigénio de 3' do nucleósido de 3' da sonda, ou

(2) grupos de fórmula



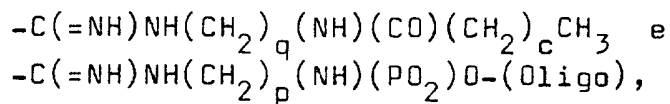
em que m, n e p são iguais ou diferentes e é cada um 2 a 8; ou

(B) um material macroporoso de dextrano reticulado derivado nos oxigénios dos hidroxilos, que se encontram nos carbonos dos grupos açúcar que têm pelo menos um carbono vizinho com um

-34-

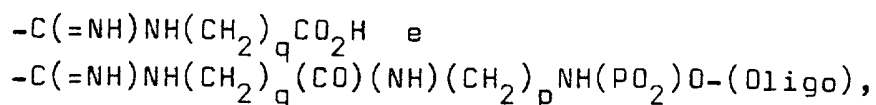
hidroxilo não derivado, com

(1) grupos de fórmula



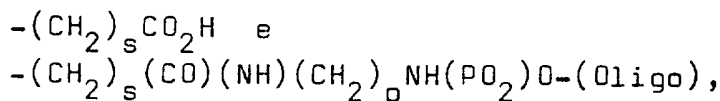
com substancialmente nenhum oxigênio hidroxil derivado com um grupo terminado com um grupo amino, ou

(2) grupos de fórmula



em que c, q e p são iguais ou diferentes e q é 2 a 10; e

(C) polistereno reticulado com divinilbenzeno derivado nos grupos fenil com grupos de fórmula



em que s e p são iguais ou diferentes e s é 2 a 10. Ver Ghosh e colab., Nucleic Acids Research 15, 5353 (1987).

Cada um dos três lotes de 50 mg de pérolas de Sephacryl, derivados como descrito acima, é embebido durante 15 minutos a 37°C em 250 μ l de uma solução de pré-hibridação contendo 0,1% de SDS, 10% de sulfato de dextrano, 1 mg/ml de ADN de esperma de salmão, e 5 x SSPE (NaCl 0,75 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,4 e EDTA 5 mM). Após embebição, o material em pérolas é pelotizado por centrifugação e a solução de pré-hibridação é removida por aspiração.

O ácido nucleico do procedimento de amplificação em cada uma das três amostras é isolado por precipitação em etanol e é, em seguida, dissolvido até 250 μ l em solução que é igual à solução de pré-hibridação mas sem o ADN de esperma de salmão. Cada uma das soluções de ácido nucleico resultantes é em seguida combinada com um lote de pérolas de Sephacryl derivadas com oligonucleótido pré-hibridado e a mistura resultante é incubada com agitação suave a 42°C durante 90 minutos.

As pérolas de Sephacryl são depois pelotizadas por centrifugação, a solução de hibridação é removida por aspiração, e as pérolas são em seguida lavadas três vezes, 10 minutos de cada vez

-35-

a 37°C, com 1 ml de uma solução de 2 x SSC (NaCl 0,30 M, Na.Citrato 0,03 M, pH 7,0). Após cada lavagem as pérolas são pelotizadas por centrifugação e a solução é removida por aspiração.

Imediatamente após a terceira lavagem, as pérolas são submetidas a contagem de Cerenkov.

As pérolas com ácido nucleico amplificado da amostra A produzem um baixo nível de contagem, muito pouco acima da contagem de fundo a partir apenas do fluido de cintilação. As pérolas com ácido nucleico amplificado de amostra B produzem uma contagem num nível muito mais elevado que o observado com as pérolas associadas à amostra A. As pérolas com ácido nucleico amplificado da amostra C, se produzem num nível de contagem significativamente superior ao nível produzido pelas pérolas associadas com a amostra A, indicam que a pessoa, cujo sangue foi colhido para a amostra C, está infectada com HIV-1.

EXEMPLO III

Os procedimentos dos Exemplos I e II são realizados com ARN polimerase de T7 (Promega Biotec) em vez da ARN polimerase de SP6, com cada um do subsegmento 5'-(promotor)₁-(subsegmento variável)₁-3' do primeiro primário e do subsegmento 5'-(promotor)₃-(subsegmento variável)₃-3' do terceiro primário, tendo a sequência 5'-TAATACGACT CACTATA GGGA-3', em que as 17 bases do terminal 5' são o subsegmento promotor e as 4 bases do terminal 3' são o subsegmento variável. O segmento variável corresponde às 4 bases do terminal 5' do transcrito a partir do promotor. O inibidor da ribonuclease não é utilizado em nenhum passo deste processo, pelo menos com o preparado de polimerase da Promega Biotec.

EXEMPLO IV

Os procedimentos dos Exemplos I e II são realizados com ARN polimerase de T3 (de Stratagene, San Diego, California) em vez da ARN polimerase de SP6 e com o seguinte segmento sendo usado como subsegmento do primeiro primário, (promotor)₁-(subsegmento variável)₁ e subsegmento do terceiro primário (promotor)₃-(subsegmento variável)₃: 5'-TATTAACCT CACTAAA GGGA-3', em que as 17 bases do terminal 5' são o segmento promotor e as 4 bases do ter-

-36-

terminal 3' são o segmento variável, incluindo o terminal 5' 4 bases em transcritos a partir do promotor.

EXEMPLO V

Utilizando a ARN polimerase T7 tal como no Exemplo III, o segmento alvo no genoma de HIV obtido a partir de amostras de sangue humano, é amplificado utilizando os seguintes primários em vez dos primários especificados no Exemplo I.

Primeiro primário: 5'-TAATACGACT CACTATA GCGA TCTAATTACT ACCTCTTCTT CTGCTAGACT-3', em que as 30 bases do terminal 3' são complementares em sequência às bases 7076-7047 no gene ENV do HIV-1.

Segundo primário: 5'-ACAAGTTGTA ACACCTCAGT CATTACACAG-3' com a sequência das bases 6838-6866 no gene ENV do HIV-1.

Terceiro primário: mesmas 21 bases do terminal 5' que o primeiro primário deste exemplo associadas às 27 bases do terminal 3' seguintes: 5'-AAAGGTATCC TTTGAGCCAA TTCCCATA-3', que têm a sequência das bases 6875-6902 no gene ENV do HIV-1.

Quarto primário: 5'-AGTTGATACTACTGGCCTAATT-3', com a sequência complementar à das bases 7033-7007 no gene ENV do HIV-1.

EXEMPLO VI

Utilizando ARN polimerase de T7 tal como no Exemplo III, o segmento alvo no genoma de HIV obtido a partir de amostras de sangue humano é amplificado utilizando os seguintes primários em vez dos primários especificados no Exemplo I:

Primeiro primário: os mesmos 21 nucleótidos do terminal 5' que os do primeiro e terceiro primário do Exemplo V associados com os 31 nucleótidos do terminal 3' seguintes: 5'-CACCTAGGGC TAACTATGTG TCCTAATAAG G-3', que têm a sequência complementar à das bases 5471-5441 no gene SOR de HIV-1.

Segundo primário: 5'-ACACCATATG TATGTTTCAG GGAAAGCTA-3', que tem a mesma sequência que as bases 5151-5179 do gene SOR de HIV-1.

Terceiro primário: os mesmos 21 nucleótidos do terminal 5' que os primeiro e terceiro primários do Exemplo V associados aos

-37-

31 nucleótidos do terminal 3', seguintes:

5'-AAGAATAAGTTCAGAAGTACACATCCCACT-3', que têm a mesma sequência que as bases 5220-5249 do gene SOR de HIV.

Quarto primário: 5'-TGGTCTGCTAGTTCAGGGTCTACTTGTGTC-3', que têm a sequência complementar à das bases 5387-5357 do gene SOR de HIV-1.

EXEMPLO VII

O procedimento do Exemplo I é seguido para o isolamento de ácido nucleico a partir de: (1) uma amostra contendo 10^3 células CEM infectadas por HIV misturadas com 10^6 células CEM não infectadas (Cancer Center Research Foundation; CCRF-CEM; ATCC No. CCL 119); e (2) uma amostra contendo 10^6 células CEM não infectadas. Estas amostras são resuspensas em $100 \mu\text{l}$ de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM (TE) após o passo de precipitação pelo etanol para concentrar a amostra obtida a partir da coluna de ExtractorTM (MBI). As amostras resuspensas são fraccionadas numa coluna fina de centrifuga Sephadex G-50 (Maniatis, referido acima), eluindo com TE. As amostras eluídas são concentradas por precipitação pelo etanol (em LiCl 0,8 M, 3 volumes de etanol, em banho de gelo seco/etanol durante 15 minutos). A amostra precipitada é pelotizada por centrifugação. A pelota é drenada, seca e depois ressuspensa em $100 \mu\text{l}$ de uma solução contendo Tris-HCl 40 mM, pH 8,1, MgCl_2 8 mM, NaCl 25 mM, espermidina 2 mM, ditiotretol 5 mM, dATP, dGTP, dCTP e dTTP, $100 \mu\text{M}$ de cada, rATP, rCTP, rGTP e rUTP, 1 mM de cada, $100 \mu\text{g/ml}$ de BSA (livre de nuclease) e primário A de oligonucleótido de ADN (5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTCCTAATAAGG-3) e primário B (5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGGAAAGCTA-3'), 250 nM de cada.

Como controlos, ressuspenderam-se amostras duplicadas de ARN de HIV purificado na concentração de 0,01-fm em $100 \mu\text{l}$ do tampão descrito acima. Finalmente, uma sequência de β -globina de 10-fm, contida no plasmídeo H β 19A [Wallace e colab., Nucl. Acids. Res. 9, 3647 (1981)], que foi linearizado por Hind III, é ressuspensa em $100 \mu\text{l}$ do tampão acima descrito, excepto sem os primários oligonucleótidos. Primário D oligonucleótidos (5'-ACATTGCTT-

-38-

CTGACACAACACTGTGTTCA-3') e primário C (5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAA-AGGACTCAAA-3'), que são específicos para a sequência da β -globina, foram adicionados à reacção da β -globina a 250 nM cada.

Excepto para a amostra de β -globina, as reacções são aquecidas até 65°C durante 1'. A amostra de β -globina é fervida durante 1'. Todas as amostras são arrefecidas até 42°C durante 1 minuto; em seguida são adicionadas 10 unidades de transcriptase inversa de AMV. As reacções são incubadas a 42°C durante 15 minutos, fervidas durante 1 minuto, e depois arrefecidas a 42°C durante 1 minuto. São adicionadas mais 10 unidades de transcriptase inversa de AMV, incubando a 42°C durante 15 minutos. Cem unidades de ARN polimerase de T7 são adicionadas às reacções e estas são incubadas a 37°C durante 30 minutos.

As amostras são fervidas durante 1 minuto e arrefecidas a 42°C durante 1 minuto, seguido pela adição de 10 unidades de transcriptase inversa de AMV. As reacções são incubadas a 42°C durante 15 minutos, fervidas durante 1 minuto e arrefecidas a 42°C durante 1 minuto. Mais dez unidades de transcriptase inversa são adicionadas, seguidas por incubação a 42°C durante 15 minutos. Cem unidades de ARN polimerase de T7 são adicionadas, com uma incubação de 30 minutos a 37°C. Este ciclo é repetido mais duas vezes.

O alvo amplificado é então detectado usando OligoBeadsTM tal como descrito a seguir.

Pérolas de Sephacryl contendo oligonucleótidos específicos de HIV-1 foram preparadas tal como descrito e armazenadas em TE a 4°C numa concentração tal que 250 μ l da suspensão contém 50 mg de pérolas de Sephacryl. Os oligonucleótidos foram sintetizados e purificados por HPLC, tal como descrito.

Os oligonucleótidos empregues tanto para ligação às pérolas como para detecção são homólogos da região SOR do genoma do HIV-1. Os oligonucleótidos utilizados nestes estudos foram 86-31 (oligonucleótidos de detecção) (5'-GCACACAAGTAGACCCTGAACTAGCAG-ACCA-3') e 87-83 (oligonucleótidos de captura na pérola: 5'-ATGCTAGATTGGTAATAACAACATATT-3'), que são homólogos da cadeia sem sentido da região SOR e separados por aproximadamente 100

nucleótidos. Para detecção, os oligonucleótidos foram marcados na extremidade com ^{32}P de acordo com o protocolo padrão. O marcador não incorporado foi removido por filtração de gel numa coluna fina de Sephadex G-50, e o oligonucleótido foi armazenado a -20°C .

Numa experiência típica com sistema de hibridação intercalada baseado em pérolas (BBSHS), o alvo e o oligonucleótido de detecção marcado com ^{32}P são desnaturados em $10\ \mu\text{l}$ de TE contendo 0,2% de SDS a 65°C durante 5 minutos num tubo de Eppendorf. A isto, são adicionados $10\ \mu\text{l}$ de 2X Solução mista de Hibridação (10X SSPE/10% de Sulfato de dextrano). A solução é misturada, centrifugada durante 2 segundos e incubada a 42°C durante 1 hora.

Durante este tempo as pérolas de Sephacryl são pré-hibridadas. A suspensão concentrada de pérolas é bem misturada e $250\ \mu\text{l}$ de alíquotas (50 mg de pérolas) são transferidas para tubos de Eppendorf, agitando entre cada remoção para assegurar uma suspensão uniforme. As alíquotas são centrifugadas durante 10 segundos e o TE é removido com uma pipeta de secagem Pasteur. Em seguida, $250\ \mu\text{l}$ de Solução de Hibridação (5X SSPE [NaCl 0,9M, NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM] 10% de sulfato de dextrano/0,1% de SDS) é adicionada, as pérolas são suspensas por agitação suave e incubadas a 37°C durante 30-60 minutos com agitação ocasional. Imediatamente antes do passo de captura, as pérolas são centrifugadas durante 10 segundos, a solução de pré-hibridação é removida, são adicionados $80\ \mu\text{l}$ de Solução de Hibridação a 37°C e as pérolas são levadas de novo a 37°C .

A solução de hibridação é centrifugada durante 2 segundos e transferida para as pérolas e solução de Hibridação. As pérolas são suspensas e incubadas a 37°C durante 1 hora com agitação frequente para manter a suspensão.

Após a captura, as pérolas são centrifugadas durante 10 segundos e a Solução de Hibridação, contendo alvo não capturado e oligonucleótido de detecção, é transferida para um frasco contador de cintilação. As pérolas são depois lavadas 5 vezes com 2X SSC a 37°C . As primeiras 3 lavagens são rápidas; 1 ml de líquido de lavagem é adicionado, as pérolas são bem agitadas e centri-

-40-

fugadas durante 10 segundos, e o líquido de lavagem é transferido para o frasco de contagem. Para as 2 lavagens finais, 1 ml de líquido de lavagem é adicionado e as pérolas são agitadas e incubadas a 37°C durante 5 minutos antes de serem centrifugadas. Cada lavagem é contada separadamente para monitorizar o procedimento.

Contagens de Cerenkov da Solução de Hibridação, as 5 lavagens e as pérolas são medidas durante 5-10 minutos. A contagem do fundo é subtraída de todas as amostras. O fm detectado do alvo é calculado do seguinte modo:

(CPM nas pérolas/CPM total) X fm do Oligonucleótido
em que CPM total é a soma do CPM para a Solução de Hibridação, 5 lavagens e pérolas.

DETECÇÃO DOS ALVOS AMPLIFICADOS POR BBSHS

Alvo	μ l usados	(10^{-15} moles) detectadas (FM)
10^3 células infectadas com HIV	0,33	0,06
10^6 células CEM não infectadas	0,66	0,13
10^6 células CEM não infectadas	0,07	0,01
	0,14	0,015
	0,7	0,01
	10	0,008
0,01 fm ARN de HIV	0,007	0,14
	0,014	0,29
10 fm ADN de β -globina	10	0,014

EXEMPLO VIII

O procedimento do Exemplo I é seguido para o isolamento dos ácidos nucleicos de duas amostras: a) 10^3 células CEM, infectadas com HIV com 10^6 células CEM não infectadas; e b) 10^6 células CEM de cultura não infectadas, às quais 0,01 fmoles de HIV purificado foi adicionado após extração. O procedimento é então modificado pela purificação posterior através de uma coluna de centrifuga Sephadex G-50 (fina) (Maniatis acima referida) eluindo com TE, após o passo de coluna de Extractor. Isto é seguido

-41-

por uma precipitação por etanol do ácido nucleico (LiCl 0,8 M e EtOH a 2,5 volumes). O ácido nucleico é então ressuspenso em 100 μ l contendo:

Tris-HCl 40 mM, pH 8,1

MgCl₂ 8 mM

NaCl 25 mM

espermidina 2 mM

DTT (ditiotreitól) 5 mM

dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 100 μ M (de cada)

rATP, rCTP, rGTP, rUTP, 1 mM

100 μ g/ml de BSA (livre de nuclease)

oligonucleótido de ADN com 29 pb 250 nM com a sequência

5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3' (primário B)

oligonucleótido de ADN de 56 pb 250 nM com a sequência

5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAA
TAAGG-3' (primário A)

Os 100 μ l da solução são aquecidos até 65°C durante 1 minuto e arrefecidos a 42°C em 1 minuto. Este aquecimento e manutenção a 42°C ou mais, em combinação com a composição da solução, fornece condições de rigor suficiente para hibridação do (3'-subsegmento primário)₁ (ver figura 1) com estabilidade suficiente para a sequência complementar à do (3'-subsegmento primário)₁, no ARN de HIV alvo com alta especificidade.

Em seguida, 10 unidades de transcriptase inversa de vírus de mioblastose de aves (AMV) (Life Sciences, Inc.) são adicionadas à solução, e esta é incubada durante 10 minutos a 42°C. [Uma unidade incorpora 1 nmole de TTP para uma forma precipitável em ácido em 10 minutos a 37°C, usando poli(A)-oligo (T) 12-18 como molde primário, tal como definido por Houts e colab., J. Virol. 29, 517 (1979)]. Após uma incubação de 10 minutos, a solução é colocada em banho de água a ferver durante um minuto. Este aquecimento origina separação das cadeias do duplex formado pela transcriptase inversa e inativação da transcriptase inversa.

Depois, a solução é arrefecida a 42°C em 1 minuto. Durante este arrefecimento, o segundo primário, primário B, hibrida com a extremidade do terminal 3' do (terceiro subsegmento)_{t2c}

-42-

(ver Figura 1) do complemento alvo da cadeia de ADN formada na reacção catalisada pela transcriptase inversa no passo anterior. Novamente, as condições de hibridação são suficientemente rigorosas para a hibridação específica entre o segundo primário e a sequência complementar à do segundo primário.

Após arrefecimento, 10 unidades adicionais de transcriptase inversa de AMV são adicionadas e posterior incubação é realizada durante 10 minutos a 42°C.

Cem unidades de polimerase de T7 são adicionadas à reacção. A reacção é então incubada a 37°C durante 30 minutos. É sintetizado um transcrito de ARN que é complementar ao ARN de HIV alvo original iniciando-se a partir do promotor T7 presente na extremidade 5' do molde de ADN duplex recentemente sintetizado pela transcriptase inversa. O transcrito tem a sequência 5'-GGGA, continuando-se depois com a sequência que é complementar da do segundo subsegmento da sequência alvo (isto é, (segundo subsegmento)_{tcr}; ver figura 1). Dado que a transcriptase inversa não foi inactivada antes deste passo, e dado que o primário B está presente, assim como o desoxinucleótido trifosfato, uma síntese secundária ocorre neste ponto. O primário B hibrida com a região 3' do transcrito de ARN recentemente sintetizado (terceiro subsegmento)_{t2cr} (ver figura 1), que é complementar ao primário B. A transcriptase inversa (que foi adicionada no passo anterior) sintetiza uma cadeia de ADN utilizando o transcrito de ARN recentemente sintetizado (feito pela polimerase de T7) como um molde e usando o oligonucleótido B como o primário na extremidade 5'.

A reacção é, em seguida, fervida durante 1 minuto para desnaturar o duplex ARN:ADN. A reacção é então arrefecida a 42°C em 1 minuto. Durante este passo de arrefecimento, o segmento complementar do alvo do primário A hibrida com a cadeia de ADN sintetizada durante o passo anterior. Ao mesmo tempo, o primário B hibrida com a sua sequência complementar no transcrito de ARN sintetizado no passo anterior.

Após arrefecimento, 10 unidades adicionais de transcriptase inversa de AMV são adicionadas, e é realizada nova incubação a 42°C durante 10 minutos. A transcriptase inversa sintetiza ADN

-43-

complementar do alvo de HIV utilizando o oligonucleótido A como um primário na extremidade 5' e o ADN produzido no passo anterior como um molde. Uma segunda cadeia de ADN é sintetizada utilizando o oligonucleótido B como um primário e o transcrito de ARN produzido no passo anterior como um molde.

A reacção é fervida durante 1 minuto para desnaturar o duplex de ADN e o duplex ARN:ADN. A reacção é arrefecida a 42° num minuto. O primário A hibrida com o ADNc produzido no passo anterior utilizando o transcrito de ARN como molde. (Se a extremidade 3' da cadeia molde também é utilizada como um primário da transcriptase inversa, é produzido um produto idêntico ao produto final da próxima reacção). O primário B hibrida com a cadeia de ADN que é complementar ao ARN de HIV alvo. Esta segunda síntese produz um produto que é um ADN duplex contendo uma sequência do promotor de T7 na sua extremidade 5', assim como um segmento "variável" de 4 pb, 5'-GGGA-3'.

Cem unidades de polimerase de T7 são adicionadas à reacção. A reacção é incubada a 37°C durante 30 minutos. A ARN polimerase de T7 utiliza o ADN duplex de cadeia dupla incluindo um promotor de T7 duplex como um molde para transcrever um ARN que é complementar ao segundo subsegmento alvo contendo a sequência adicional 5'-GGGA-3' na sua extremidade 5'.

Este ciclo (ferver 1', 1' a 42°C, TR 10' a 42°C, TR 10' a 42°C, Polimerase de T7 30' a 37°C) pode ser repetido tantas vezes quantas as necessárias para atingir a amplificação desejada da sequência alvo. O produto resultante pode ser detectado por uma técnica de hibridação com sonda de ácido nucleico.

EXEMPLO IX

ARN de HIV purificado numa concentração de 1 fmole foi resuspenso em:

Tris-HCl 40 mM, pH 8,1

MgCl₂ 8 mM

NaCl 25 mM

espermidina 2 mM

ditiotreititol 5 mM

dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 100 μM (de cada)

-44-

rATP, rCTP, rGTP, rUTP, 1 mM de cada
100 μ g/ml de BSA (livre de nuclease)
oligonucleótido de ADN com 29 pb, 250 nM, com a sequência
5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3' (primário B)
oligonucleótido de ADN com 56 pb 250 nM com a sequência
5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTGTCCTA
ATAAGG-3' (primário A)

Os 100 μ l de solução são aquecidos até 65°C durante 1 minuto e arrefecidos a 42°C em 1 minuto. Este passo de aquecimento e arrefecimento, em associação com a composição da solução, fornece condições de rigor suficiente para a hibridação do primário A com suficiente estabilidade com a sequência complementar à da região do primário A no ARN de HIV alvo \square (primeiro subsegmento)_{t2}, na figura 1 \square , com alta especificidade.

Em seguida, 10 unidades de transcriptase inversa de vírus de mioblastose de aves (AMV) (Life Science, Inc.) são adicionadas à solução, e esta é incubada durante 10 minutos a 42°C. Após uma incubação de 10 minutos, a solução é colocada em banho de água a ferver durante 1 minuto. Este aquecimento provoca a separação das cadeias do duplex formado pela transcriptase inversa e inativação da transcriptase inversa.

A solução é arrefecida a 42°C num minuto. Durante o arrefecimento, o segundo primário B hibrida com a extremidade 3' da recentemente sintetizada cadeia alvo complementar \square ou (terceiro subsegmento)_{t2c}, na figura 1 \square . Novamente, as condições de hibridação são suficientemente rigorosas para a hibridação específica entre o segundo primário e a sequência complementar à do segundo primário.

Após arrefecimento, mais 10 unidades de transcriptase inversa de AMV são adicionadas e nova incubação é realizada durante 10 minutos a 42°C.

Cem unidades de ARN polimerase de T7 (New England Biolabs) são adicionadas à reação. A reação é então incubada a 37°C durante 30 minutos. É sintetizado um transcrito de ARN que é complementar ao ARN de HIV alvo original iniciando-se a partir do promotor de T7 presente na extremidade 5' do molde de ADN duplex

sintetizado pela transcriptase inversa. O transcrito de ARN tem a sequência 5'-GGGA, continuando-se depois com a sequência que é complementar à do segundo subsegmento da sequência alvo (isto é, (segundo subsegmento)_{t_{cr}}, figura 1). Dado que a transcriptase inversa não foi inactivada antes deste passo, e dado que o primário B está presente assim como o desoxinucleótido trifosfatos, ocorre uma síntese secundária neste passo. O primário B hibrida com a região 3' do transcrito de ARN recentemente sintetizado [(terceiro subsegmento)_{t_{2cr}}, ver figura 1] que é complementar ao primário B. A transcriptase inversa (que foi adicionada no passo anterior) sintetiza uma cadeia de ADN utilizando o transcrito de ARN recentemente sintetizado (feito pela ARN polimerase de T7) como um molde, e o oligonucleótido B como um primário na extremidade 5'.

A reacção é em seguida fervida durante um minuto para desnaturar o duplex ARN:ADN. A reacção é depois arrefecida a 42°C num minuto. Durante este passo de arrefecimento o segmento complementar do alvo, do primário A, hibrida com a cadeia de ADN sintetizada no passo anterior. Simultaneamente o primário B hibrida com a sua sequência complementar no transcrito de ARN sintetizado no passo anterior.

Após arrefecimento, são adicionadas 10 unidades de transcriptase inversa de AMV, e é realizada nova incubação a 42°C durante 10 minutos. A transcriptase inversa sintetiza ADN complementar ao do alvo de HIV utilizando o oligonucleótido A como um primário na extremidade 5' e o ADN produzido no passo anterior como um molde. A extremidade 3' da cadeia de molde é usada como um primário para produzir um ADN duplex final com um promotor de T7 de cadeia dupla na sua extremidade 5'. Uma segunda cadeia de ADN é sintetizada utilizando o oligonucleótido B como primário e o transcrito de ARN produzido no passo anterior como um molde.

Cem unidades de polimerase T7 são adicionadas à reacção. A reacção é incubada a 37°C durante 30 minutos. A ARN polimerase de T7 sintetiza um transcrito de ARN utilizando o ADN duplex que contém o sítio de ligação da polimerase (promotor T7) na extremidade 5' como um molde. O transcrito de ARN é complementar ao segundo subsegmento alvo (ver figura 1) contendo a sequência adicio

-46-

nal 5'-GGGA-3' na sua extremidade 5'. Mais ciclos podem ser efetuados para aumentar a amplificação. Os produtos resultantes podem ser detectados por um protocolo de hibridação de ácido nucleico.

EXEMPLO X

Protocolo para última volta de marcação do Produto Amplificado por TAS:

A. Coluna para remoção de nucleótidos frios não incorporados.

1. A reacção de TAS (100 μ l) é tomada após a síntese do ADNc no ciclo final do TAS. Adicionar 400 μ l do Reagente A (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,7, trietilamina 10 mM, EDTA dissódico 1 mM) à reacção.

2. Equilibrar uma coluna pré-carregada de NENSORB₂₀TM (Dupont) molhando o material da coluna com metanol a 100% (grau HPLC), e depois equilibrando com 2 ml de reagente A.

3. Carregar a amostra na coluna.

4. Lavar a coluna 3 vezes com 1 ml de reagente A.

5. Lavar a coluna 3 vezes com 1 ml de água.

6. Eluir os ácidos nucleicos com metanol a 50%, e colectar fracções de 250-300 μ l até um volume total de 1 ml (as primeiras duas fracções conterão a maioria do ácido nucleico).

7. Secar as fracções no "speed-vac" ou no liofilizador.

B. Protocolo para marcar o Produto Amplificado

1. Resuspender as fracções da coluna de NENSORB₂₀TM (as duas primeiras fracções podem ser combinadas) em Tris-HCl 40 mM, pH 8,1, MgCl₂ 8 mM, NaCl 25 mM, espermidina-(HCl)₃ 2 mM, ditioneitol 5 mM, rATP, rCTP e rGTP 400 μ M de cada, rUTP 12 μ M e 25 μ Ci a-³²P-rUTP (800 Ci/mmol).

2. Adicionar 50 unidades de ARN polimerase de T7 (New England Biolabs) por cada 50 μ l da amostra. Incubar a 37°C durante 30 minutos.

3. O marcador não incorporado pode ser removido por uma coluna de centrifuga G-50 (Maniatis acima referido).

-47-

4. A amostra marcada pode ser processada num gel de poli-acrilamida sequenciador a fim de determinar o tamanho do produto amplificado. O produto marcado pode também ser detectado utilizando Oligo-BeadsTM.

EXEMPLO XI

Utilização de um Padrão Interno durante a Amplificação por TAS

Foram preparadas amostras contendo: 1) 0,1 fm de ARN de HIV e 0,1 fm de sequências de ADN de β -globina (H β 19A clivado com PstI); 2) 0,01 fm de ARN de HIV e 0,1 fm de ADN de β -globina (H β 19A clivado com PstI); 3) 0,1 fm de ARN de HIV; ou 4) 0,1 fm de ADN de β -globina (H β 19A clivado com PstI em 100 μ l contendo Tris-HCl 40 mM, pH 8,1, MgCl₂ 8 mM, NaCl 25 mM, espermidina-(HCl)₃ 2 mM, ditiotreitól 5 mM, dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 100 μ l de cada, rATP, rUTP, rCTP e rGTP 1 mM de cada, 100 μ g/ml de BSA (livre de nuclease), e primário A 250 nM (5'-AATTTAATACGACTCACT-ATAGGGACACCTAGGGCTAACTATGTGTCCTAATAAGG-3'), de primário B 250 nM (5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3'), primário C 250 nM (5'-TAA-TACGACTCACTATAGGGAACTAAAGGCACCGAGCACTTTCTTGCC-3'), primário D 250 nM (5'-ACATTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCA-3'). Uma amostra contendo um vigésimo dos ácidos nucleicos de partida foi colocada numa solução de desnaturação de 7,4% de formaldeído, 10x SSC (NaCl 1,5 M, citrato de sódio 0,15 M, pH 7,4) para as amostras no ponto zero do tempo.

As amostras foram fervidas durante 1 minuto e arrefecidas a 42°C durante 1 minuto, sendo depois adicionadas 10 unidades de transcriptase inversa de AMV. As reacções são incubadas a 42°C durante 15 minutos, fervida durante 1 minuto, e arrefecidas a 42°C durante 1 minuto. Mais 10 unidades de transcriptase inversa de AMV são adicionadas, seguidas pela incubação a 42°C durante 15 minutos. Cem unidades de ARN polimerase de T7 são adicionadas, seguidas pela incubação a 37°C durante 30 minutos. Este ciclo é repetido uma segunda vez. (Mais ciclos podem ser efectuados, dependendo da amplificação exigida). Duas amostras contendo um vigésimo dos ácidos nucleicos alvo de partida foram colocadas numa solução de desnaturação para as amostras de transcrição do segundo ponto do tempo.

Todas as amostras foram aquecidas até 55°C durante 30 minutos antes da filtração por duas membranas de nitrocelulose. Os ácidos nucleicos foram fixados à membrana por irradiação com luz UV a 254 nm durante 4 minutos. Como controlos, desturaram-se, 1, 0,1 e 0,01 fm do plasmídeo pARV7/2 [Luciw e colab., Nature 312, 760 (1984)], o qual contém o ADNc do genoma de HIV completo bem como o plasmídeo H β 19A [Wallace e colab., Nucl. Acids Res. 9, 3647 (1981)], em NaOH 0,2 N, neutralizados com igual volume acetato de amónio 2 M, e depois filtrados por uma membrana de nitrocelulose. Uma membrana foi hibridada com oligonucleótido 86-31⁽¹⁾ marcado com ³²P, que é específico para o produto de HIV amplificado. A outra membrana foi hibridada com oligonucleótido 87-459⁽²⁾ marcado com ³²P, que hibridará com o produto de β -globina amplificado assim como ao plasmídeo de β -globina alvo.

As hibridações foram efectuadas em SDS a 1%, NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM (pH 7,4), e 10⁶ cpm/m de oligonucleótido marcado com ³²P durante uma hora a 55°C. As membranas foram lavadas 3 vezes à temperatura ambiente em SDS a 1%, NaCl 0,18 M, NaH₂PO₄ 10 mM (pH 7,4), e EDTA 1 mM, seguidas por uma lavagem no mesmo tampão a 55°C.

As membranas foram então autorradiografadas durante 16 horas num filme KODAK XAR a -70°C com um écran de intensificação.

Notas:

1. 86-31 : 5'-GCACACAAGTAGACCCTGAACTAGCAGACCA-3'
2. 87-459: 5'-AGGTTTAAGGAGACCAATAGAACT-3'

O autorradiograma na figura 3 mostra a quantidade de sequências de HIV e β -globina detectada após dois ciclos de TAS realizados simultaneamente em ácido nucleico de HIV e de β -globina. A quantidade de partida de β -globina manteve-se constante enquanto a quantidade de alvo de HIV foi variada.

Embora o invento tenha sido descrito com alguma especificidade na presente descrição, pessoas com experiência comum nas técnicas pertinentes admitirão variações e modificações ao invento tal como descrito, as quais estão no espírito do invento. Tais variações e modificações estão também dentro do âmbito do invento, tal como descrito e reivindicado aqui.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um ácido nucleico de cadeia dupla, contendo uma sequência correspondente a uma sequência alvo, operacionalmente ligada a um promotor caracterizado por compreender

- proporcionar um primeiro primário de ácido nucleico contendo uma sequência promotora ligada a uma sequência correspondente a um segmento da sequência alvo;

- hibridar, sob condições adequadas, o referido primeiro primário de ácido nucleico com a sequência alvo, numa amostra contendo ácido nucleico,

- prolongar o referido primeiro primário de ácido nucleico, hibridado numa reacção de extensão com polimerase, complementarmente à sequência alvo, para formar um ácido nucleico duplo, correspondente,

- separar as cadeias do referido ácido nucleico duplo,

- hibridar com um promotor separado, contendo a cadeia de sequência, sob condições adequadas, um segundo segmento primário de ácido nucleico, na extremidade oposta de cadeia contendo a sequência promotora,

- prolongar o referido segundo primário de ácido nucleico, numa reacção de extensão com polimerase, complementarmente à referida cadeia contendo a sequência promotora.

2 - Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se repetir o processo pelo menos uma vez.

3 - Método para a detecção de, pelo menos, uma sequência alvo específica de ácido nucleico, numa amostra contendo ácido nucleico, caracterizado por compreender o emprego de ácido nucleico de cadeia dupla de acordo com a reivindicação 1 como molde de ácido nucleico de cadeia dupla para a preparação duma pluralidade de transcritos de ARN, cada um comportando uma sequência de ARN correspondente à referida sequência alvo, e detecção da presença da referida sequência de ARN.

4 - Método de preparação dum ácido nucleico de cadeia

dupla contendo a sequência correspondente à sequência alvo operacionalmente ligada a um promotor, caracterizado por compreender proporcionar um primeiro primário de ácido nucleico contendo a sequência do promotor operacionalmente ligada a uma sequência complementar dum segmento da sequência alvo, e um segundo primário de ácido nucleico tendo uma sequência idêntica a um segmento de uma sequência alvo, correspondendo os referidos primários a regiões diferentes da referida sequência alvo mas não se sobrepondo, ou não se sobrepondo substancialmente, na sua correspondência ao alvo, e sendo seleccionados de modo que um produto da extensão de um deles, quando separado do seu complemento, possa servir como molde para um produto da extensão do outro, o contacto de uma amostra contendo ácido nucleico incluindo a sequência alvo com os referidos primários sob condições de hibridação sequencial e de separação das cadeias a fim de produzir, por sua vez, os produtos da extensão dos referidos primários.

5 - Método para a preparação dum pluralidade de transcritos de ARN, caracterizado por se utilizar ácido nucleico de cadeia dupla, de acordo com as reivindicações 1 ou 4, como molde numa reacção catalisada por uma polimerase que reconhece o promotor, e detecção da presença dos referidos transcritos de ARN.

6 - Método de acordo com as reivindicações 3 ou 5, caracterizado por os referidos transcritos conterem um sítio de reconhecimento da replicase para replicação dos ditos transcritos por indução da replicase.

7 - Método de acordo com as reivindicações 3, 5 ou 6, caracterizado por a sequência de ARN dos referidos transcritos de ARN detectada ser medida dum forma padronizada de modo a determinar a quantidade de sequência alvo contida numa amostra de ácido nucleico utilizada na preparação do molde de ácido nucleico de cadeia dupla.

8 - Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a sequência de ARN dos referidos transcritos de ARN detectada ser medida dum forma padronizada e internamente com a

presença de um número conhecido de cópias de ácido nucleico também contidas na referida amostra.

9 - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a dita sequência alvo estar disposta numa sequência de ácido nucleico associada às características duma doença ou situação genética ou patogénica.

10 - Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a referida sequência de ácido nucleico ser um segmento de um vírus de imunodeficiência humana.

11 - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a referida sequência de ácido nucleico ser um segmento dum gene defeituoso.

12 - Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o promotor ser um promotor do bacteriófago T7 e os transcritos de ARN serem produzidos utilizando ARN polimerase de T7.

13 - Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o promotor ser um promotor de SP6 e os transcritos de ARN serem produzidos utilizando ARN polimerase de SP6.

14 - Método de acordo com as reivindicações 1 ou 4, caracterizado por a reacção de extensão ser catalisada pela ADN polimerase I da *E. coli*.

15 - Método de acordo com as reivindicações 1 ou 4, caracterizado por a reacção de extensão ser catalisada pelo fragmento Klenow da ADN polimerase I da *E. coli*.

16 - Método de acordo com as reivindicações 1 ou 4, caracterizado por a reacção de extensão ser catalisada pela ADN polimerase de T4.

17 - Método de acordo com as reivindicações 1 ou 4, caracterizado por a reacção de extensão ser catalisada pela transcriptase inversa.

18 - Método de acordo com as reivindicações 3 ou 5, caracterizado por os referidos transcritos de ARN serem marcados antes de detecção.

19 - Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado

do por os referidos transcritos de ARN serem radio-marcados.

20 - Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por os referidos transcritos de ARN serem marcados com cromóforo.

21 - Conjunto para a detecção de, pelo menos, uma sequência alvo específica de ácido nucleico numa amostra contendo ácido nucleico, caracterizado por incluir um primeiro primário de ácido nucleico contendo uma sequência do promotor operacionalmente ligada a uma sequência complementar dum segmento de uma sequência alvo e um segundo primário de ácido nucleico tendo uma sequência idêntica a um segmento de uma sequência alvo correspondendo os referidos primários a regiões diferentes da referida sequência alvo, mas não se sobrepondo ou não se sobrepondo substancialmente, na sua correspondência ao alvo, e sendo seleccionados de modo que um produto da extensão de um deles, quando separado do seu complemento, possa servir como molde para um produto da extensão do outro, e meios para hibridação do dito primeiro primário com a referida sequência alvo, extensão da cadeia do primário hibridado, separação das cadeias do "duplex" resultante, hibridação do promotor contendo a cadeia separada do dito segundo primário de ácido nucleico, extensão da cadeia do primário hibridado, levando o ácido nucleico de cadeia dupla assim preparado, contendo uma sequência do promotor, a produzir transcritos e detecção dos referidos transcritos.

22 - Processo para amplificar um segmento de ácido nucleico do alvo de fórmula I:

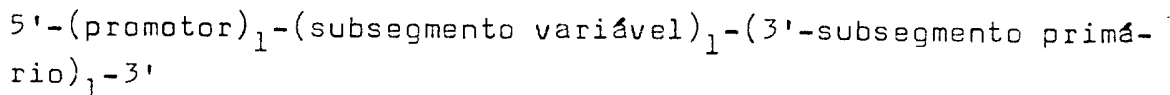
$$3'-(\text{primeiro subsegmento})_t-(\text{segundo subsegmento})_t-(\text{terceiro subsegmento})_t-5'$$

(I)

na qual $(\text{primeiro subsegmento})_t$ é um segmento de ácido nucleico de sequência conhecida com, pelo menos, 10 nucleótidos, contíguo ao terminal 3' do $(\text{segundo subsegmento})_t$; o $(\text{segundo subsegmento})_t$ é um segmento de ácido nucleico com 0 ou mais nucleótidos; e o $(\text{terceiro subsegmento})_t$ é um segmento de ácido nucleico, de sequência conhecida com, pelo menos, 10 nucleótidos contíguo ao terminal 5' do $(\text{segundo subsegmento})_t$, caracteriza-

do por compreender:

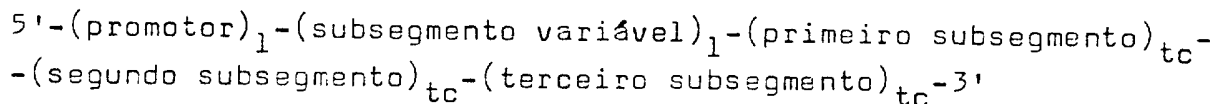
(1) a hibridação de um (primeiro subsegmento)_t do referido segmento alvo com um primeiro primário, que é um ADN de cadeia simples que compreende um subsegmento do terminal 3' de fórmula II:



(II)

na qual o (promotor)₁ é um segmento de ADN de cadeia simples com a sequência da cadeia mais dum promotor específico da ARN polimerase dependente de ADN do bacteriófago, (subsegmento variável)₁ é um segmento de ADN de cadeia simples com 0 a 100 nucleótidos, contíguo ao nucleótido do terminal 3' do (promotor)₁ e ao nucleótido do terminal 5' do (3'-subsegmento primário)₁; e o (3'-subsegmento primário)₁ é um segmento de ADN de cadeia simples com, pelo menos, 10 nucleótidos com uma sequência que é complementar da sequência dum subsegmento do (primeiro subsegmento)_t que termina com o nucleótido do terminal 3' do (primeiro subsegmento)_t; sendo o referido (promotor)₁ contíguo ao terminal 5' do referido (3'-subsegmento primário)₁, se o dito (subsegmento variável)₁ tiver 0 nucleótidos;

(2) a extensão do referido primeiro primário, hibridado de acordo com o passo (1), numa reacção catalisada por uma primeira ADN polimerase originando um primeiro segmento complementar de ADN, que compreende um subsegmento de fórmula III:

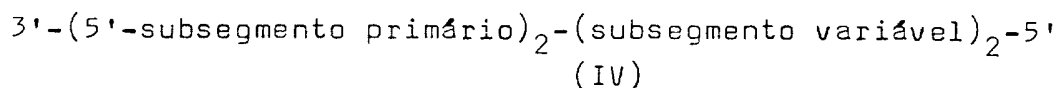


(III)

na qual o (primeiro subsegmento)_{t_c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_t; o (segundo subsegmento)_{t_c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (segundo subsegmento)_t; e o (terceiro subsegmento)_{t_c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (terceiro subsegmento)_t, a condição de que se o segmento alvo é um segmento de ARN, a referida primeira ADN polimerase é uma transcriptase inversa;

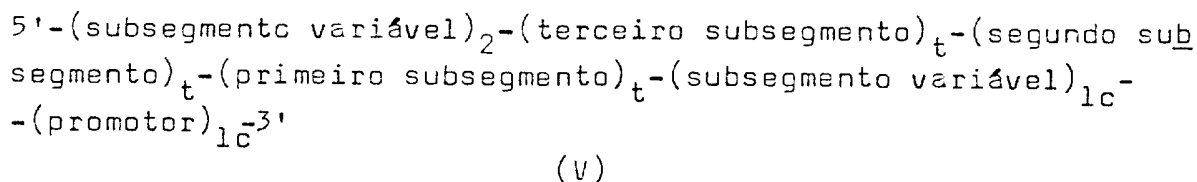
(3) a transformação em cadeias simples do "duplex" formado na reacção do passo (2);

(4) a hibridação do (terceiro subsegmento)_{t_c} do referido primeiro ADN complementar de fórmula III com um segundo primário que é um ADN de cadeia simples com, pelo menos, 10 nucleótidos, de fórmula IV:



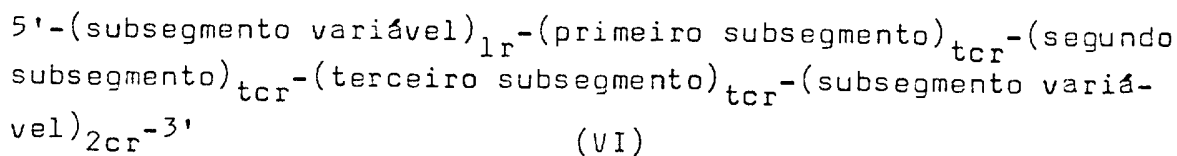
na qual o (5'-subsegmento primário)₂ tem a sequência dum subsegmento do (terceiro subsegmento)_t que termina com o nucleótido do terminal 5' do (terceiro subsegmento)_t; e na qual o (subsegmento variável)₂ é um segmento com 0 a 100 nucleótidos que é contíguo ao terminal 5' do (5'-subsegmento primário)₂;

(5) a extensão do referido segundo segmento primário, hibridado de acordo com o passo (4), numa reacção catalisada por uma segunda ADN polimerase originando um segundo segmento complementar de ADN, que compreende um subsegmento de fórmula V:



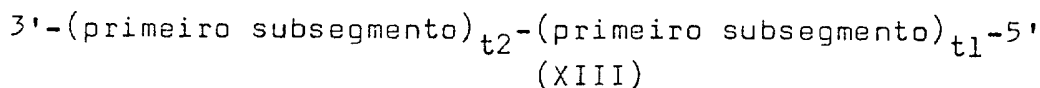
na qual o (subsegmento variável)_{1c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₁; e o (promotor)_{1c} é o segmento de ADN com a sequência complementar à do (promotor)₁, com a condição de que a referida segunda ADN polimerase seja igual ou diferente da referida primeira ADN polimerase; e

(6) a utilização do produto de cadeia dupla do passo (5) como molde numa reacção catalisada por uma primeira ARN-polimerase dependente de ADN de bacteriófago, que reconhece o promotor do qual uma cadeia é o (promotor)₁, para produzir um primeiro produto de ARN de fórmula VI:

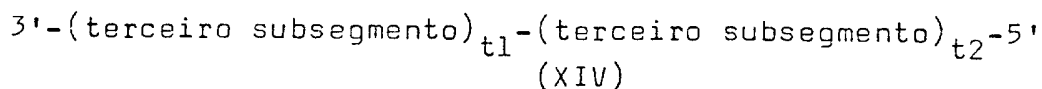


na qual o (subsegmento variável)_{1r} é o segmento de ARN com a sequência do (subsegmento variável)₁; o (primeiro subsegmento)_{tcr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_t; o (segundo subsegmento)_{tcr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (segundo subsegmento)_t; o (terceiro subsegmento)_{tcr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (terceiro subsegmento)_t; e o (subsegmento variável)_{2cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₂.

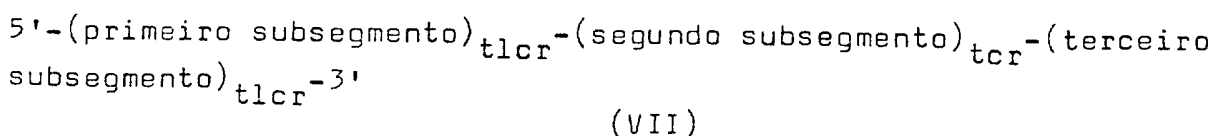
23 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por o (primeiro subsegmento)_t ter, pelo menos, 10 nucleótidos em comprimento e ter a fórmula XIII:



na qual o (primeiro subsegmento)_{t2} tem 0 ou mais nucleótidos e, se mais que 0, é contíguo ao terminal 3' do (primeiro subsegmento)_{t1}, e o (primeiro subsegmento)_{t1} tem, pelo menos, 10 nucleótidos em comprimento; em que o (terceiro subsegmento)_t tem a fórmula XIV:



na qual o (terceiro subsegmento)_{t2} tem 0 ou mais nucleótidos e, se mais que 0, é contíguo ao terminal 5' do (terceiro subsegmento)_{t1}, e o (terceiro subsegmento)_{t1} tem, pelo menos, 10 nucleótidos em comprimento; na qual o (3'-subsegmento primário)₁ tem a sequência complementar à de um subsegmento do segmento alvo que inclui todo o (primeiro subsegmento)_{t2} e 0 ou mais nucleótidos do (primeiro subsegmento)_{t1}; na qual o (5'-subsegmento primário)₂ é um subsegmento que consiste em todo o (terceiro subsegmento)_{t2} e 0 ou mais nucleótidos do (terceiro subsegmento)_{t1}; na qual o (subsegmento variável)₂ tem 0 nucleótidos; e, na qual, após os passos (1) a (6) da reivindicação 1, o subsegmento de ARN de fórmula VII:



na qual o (primeiro subsegmento)_{t₁cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (primeiro subsegmento)_{t₁} e o (terceiro subsegmento)_{t₁cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (terceiro subsegmento)_{t₁}; é adicionalmente amplificado por um método que compreende:

(7) hibridação do referido primeiro produto de ARN de fórmula VI com um terceiro primário, que é um ADN de cadeia simples que inclui um subsegmento do terminal 3' de fórmula VIII:

$$5'-(\text{promotor})_3-(\text{subsegmento variável})_3-(3'\text{-subsegmento primário})_3-3'$$

(VIII)

na qual o (promotor)₃ é um segmento de ADN de cadeia simples com a sequência da cadeia mais de um promotor específico da ARN-polimerase dependente de ADN de bacteriófago, sendo a referida sequência do (promotor)₃ igual ou diferente da sequência do (promotor)₁, o (subsegmento variável)₃ é um segmento de ADN de cadeia simples de 0 a 100 nucleótidos, sendo contíguo ao nucleótido do terminal 3' do (promotor)₃ e ao nucleótido do terminal 5' do (3'-subsegmento primário)₃, e o (3'-subsegmento primário)₃ é um segmento de ADN de cadeia simples que tem a mesma sequência que o (terceiro subsegmento)_{t₁} e é contíguo ao nucleótido do terminal 3' do (promotor)₃ se o (subsegmento variável)₃ tem 0 nucleótidos;

(8) extensão do referido terceiro primário hibridado de acordo com o passo (7) numa reacção catalisada por uma terceira ADN polimerase, que é uma transcriptase inversa e é igual ou diferente das referidas primeira e segunda ADN polimerases, para originar um terceiro segmento de ADN complementar, que inclui um subsegmento do terminal 3' de fórmula IX:

$$5'-(\text{promotor})_3-(\text{subsegmento variável})_3-(\text{terceiro subsegmento})_{t_1}-$$

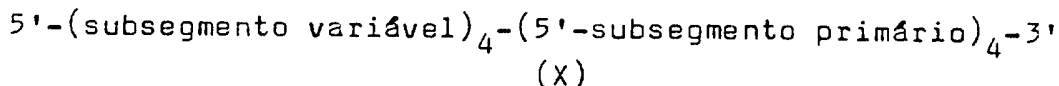
$$-(\text{segundo subsegmento})_t-(\text{primeiro subsegmento})_{t_1}-(\text{primeiro subsegmento})_{t_2}-(\text{subsegmento variável})_{1c}-3'$$

(IX)

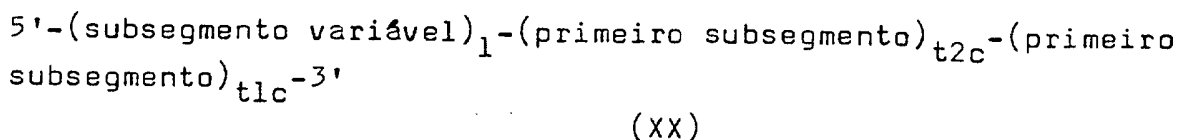
na qual o (subsegmento variável)_{1c} é o ADN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₁;

(9) transformação do "duplex" formado na reacção do passo (8) em cadeias simples;

(10) hibridação do terceiro ADN complementar produzido na reacção do passo (8) com um quarto primário de fórmula X:

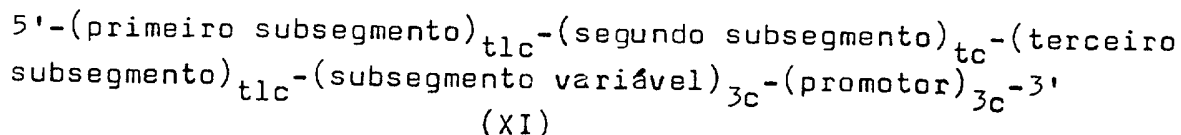


na qual o $(\text{subsegmento variável})_4$ é um segmento de 0 a 100 nucleótidos, e o $(5'\text{-subsegmento primário})_4$ é um subsegmento de sequência conhecida, que é contíguo ao nucleótido do 3' do $(\text{subsegmento variável})_4$, se o $(\text{subsegmento variável})_4$ tem mais de 0 nucleótidos e que inclui, pelo menos, 10 nucleótidos do segmento de fórmula XX:



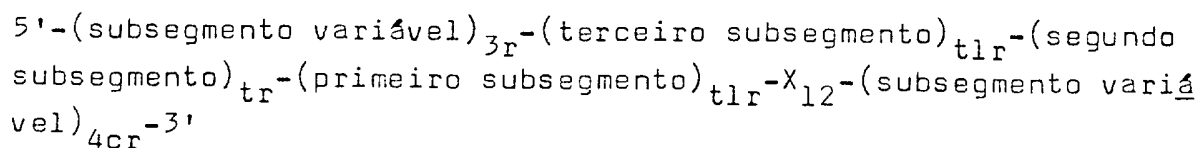
na qual o $(\text{primeiro subsegmento})_{t_{2c}}$ é o segmento de ADN com a sequência complementar à do $(\text{primeiro subsegmento})_{t_2}$ e o $(\text{primeiro subsegmento})_{t_{1c}}$ é o segmento de ADN com a sequência complementar à do $(\text{primeiro subsegmento})_{t_1}$, com a condição de que, pelo menos, um dos referidos pelo menos 10 nucleótidos está em ou a 5' do nucleótido do terminal 5' do $(\text{primeiro subsegmento})_{t_{1c}}$;

(11) extensão do referido quarto primário hibridado de acordo com o passo (10) numa reacção catalisada por uma quarta ADN polimerase, que é igual ou diferente das referidas primeira, segunda e terceira ADN polimerases, para originar um quarto ADN complementar que inclui um segmento de fórmula XI:



na qual o $(\text{segundo subsegmento})_{t_c}$ é o segmento de ADN com a sequência complementar à do $(\text{segundo subsegmento})_t$, o $(\text{terceiro subsegmento})_{t_{1c}}$ é o segmento de ADN com a sequência complementar à do $(\text{terceiro subsegmento})_{t_1}$, o $(\text{subsegmento variável})_{3_c}$ é o segmento de ADN com a sequência complementar à do $(\text{segmento variável})_3$ e o $(\text{promotor})_{3_c}$ é o segmento de ADN com a sequência complementar à do $(\text{promotor})_3$; e

(12) utilização do produto de cadeia dupla do passo (11) como molde numa reacção catalisada por uma segunda ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago, que é igual ou diferente da referida primeira ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago e que reconhece o promotor do qual uma cadeia é o (promotor)₃, para produzir um segundo produto de ARN com um subsegmento do terminal 5' de fórmula XII:



(XII)

na qual o (subsegmento variável)_{3r} é o segmento de ARN com a sequência do (subsegmento variável)₃, o (terceiro subsegmento)_{t1r} é o segmento de ARN com a sequência do (terceiro subsegmento)_{t1}, o (segundo subsegmento)_{tr} é o segmento de ARN com a sequência do (segundo subsegmento)_t, o (primeiro subsegmento)_{t1r} é o segmento de ARN com a sequência do (primeiro subsegmento)_{t1}, o (subsegmento variável)_{4cr} é o segmento de ARN com a sequência complementar à do (subsegmento variável)₄, e X₁₂ é o segmento de ARN com a sequência complementar à do subsegmento do (5'-subsegmento primário)₄ que está a 5' do terminal 5' do (primeiro subsegmento)_{t1c}.

24 - Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por cada um dos (subsegmento variável)₁ e (subsegmento variável)₂ terem 0 a 60 nucleótidos, cada um dos (3'-subsegmentos primário)₁ e (5'-subsegmento primário)₂ terem 15 a 45 nucleótidos, o (segundo subsegmento)_t ter, pelo menos, 30 nucleótidos, e o segmento alvo ter 1000 ou menos nucleótidos.

25 - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por o segmento alvo ser um segmento de ADN, no qual o produto do passo (2) é transformado em cadeias simples por desnaturação térmica, no qual o (subsegmento variável)₂ tem 0 nucleótidos, no qual cada uma das primeira e segunda ADN polimerases é seleccionada a partir do grupo composto por fragmento Klenow da ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, transcriptase inversa de MMLV clonado, ADN polimerase α de timo

de vitelo, ADN polimerase termo-estável de "Thermus-Aquaticus", e ADN polimerase de T7 clonada em SequenaseTM; e por a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser seleccionada a partir do grupo composto por ARN polimerase de T7, ARN polimerase de T3 e ARN polimerase de SP6.

26 - Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por cada uma das primeira e segunda ADN polimerases ser seleccionada a partir do grupo composto por fragmento Klenow de ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, e transcriptase inversa de MMLV clonado.

27 - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por (1) a ARN polimerase dependente da ADN de bacteriófago ser ARN polimerase de T7, o (promotor)₁ ser 5'-TAATACGACTCACTATA-3' e o (subsegmento variável)₁ ter um dinucleótido de sequência 5'-GG-3' no seu terminal 5'; ou (2) a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser ARN polimerase de T3, o (promotor)₁ ser 5'-TATTAACCCCTCACTAAA-3' e o (subsegmento variável)₁ ter um tetranucleótido de sequência 5'-GGGA-3' no seu terminal 5'; ou (3) a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser ARN polimerase de SP6, o (promotor)₁ ser 5'-GAACGC GGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATAACACATACGATTTAGGTGACTATA-3' e o (subsegmento variável)₁ ter um hexanucleótido de sequência 5'-GAATAC-3' no seu terminal 5'.

28 - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por o terminal 5' do primeiro primário ser o nucleótido de 5' do (promotor)₁.

29 - Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por, se a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de T7 ou de T3, o (subsegmento variável)₁ ter a sequência 5'-GGGATGGGGAACCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3', e, se a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de SP6, o (subsegmento variável)₁ ter a sequência 5'-GAATACTGGGGAACCCCTTCGGGGGTCACCTCGCGCAGC-3'.

30 - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por o segmento alvo ser um segmento de ARN, o produto do passo (2) ser transformado em cadeias simples por desnaturação

térmica, o (subsegmento variável)₂ ter 0 nucleótidos, a primeira ADN polimerase ser seleccionada do grupo composto por transcriptase inversa de AMV e transcriptase inversa de MMLV clonado, a segunda ADN polimerase ser seleccionada do grupo composto por fragmento Klenow de ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, transcriptase inversa de MMLV clonado, ADN polimerase α de timo de vitelo, ADN polimerase termo-estável de "Thermus aquaticus", e ADN polimerase de T7 clonado em SequenaseTM, e por a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser seleccionada dum grupo composto por ARN polimerase de T7, ARN polimerase de T3 e ARN polimerase de SP6.

31 - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por a segunda ADN polimerase ser seleccionada do grupo composto por fragmento Klenow de ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, e transcriptase inversa de MMLV clonado.

32 - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado por (1) a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser a ARN polimerase de T7, o (promotor)₁ ser 5'-TAATACGACTCACTATA-3' e o (subsegmento variável)₁ ter um dinucleótido de sequência 5'-GG-3' no seu terminal 5'; ou (2) a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser ARN polimerase de T3, o (promotor)₁ ser 5'-TATTAACCCTCACTAAA-3' e o (subsegmento variável)₁ ter um tetranucleótido de sequência 5'-GGGA-3' no seu terminal 5'; ou (3) a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser a ARN polimerase de SP6, o (promotor)₁ ser 5'-GAA-CGGCGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA-3' e o (subsegmento variável)₁ ter um hexanucleótido de sequência 5'-GAATAC-3' no seu terminal 5'.

33 - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o terminal 5' do primeiro primário ser o 5'-nucleótido do (promotor)₁.

34 - Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado por cada uma das primeira e segunda ADN polimerases ser seleccionada de transcriptase inversa de AMV, e transcriptase inversa de MMLV clonado.

35 - Processo de acordo com a reivindicação 34, caracterizado por, se a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de T7 ou de T3, o (subsegmento variável)₁ ter a sequência 5'-GGGATGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3', e, se a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de SP6, o (subsegmento variável)₁ ter a sequência 5'-GAATACTGGGGAACCCCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3'.

36 - Processo de acordo com as reivindicações 30, 31, 32, 33, 34 ou 35, caracterizado por o segmento alvo ser um segmento do genoma de um vírus de imunodeficiência humana que é um vírus HIV-1 e por (1) o (3'-subsegmento primário)₁ ter a sequência 5'-TCTAATTACTACCTCTTCTTCTGCTAGACT-3' e 5'-CCTCTTCTTCTGCTAGACT-3' e o (5'-subsegmento primário)₂ ter a sequência 5'-ACAAGTTGTAACACCTCAGTCATTACACAG-3', ou (2) o (3'-subsegmento primário)₁ ter a sequência 5'-TTTCGTAACACTAGGCCAAAGGTGGCTTTATC-3' e o (5'-subsegmento primário)₂ ter uma sequência seleccionada do grupo composto por 5'-GCACACAAGTAGACCCTGAACTAGCAGACCA-3' e 5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3'.

37 - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por cada um dos (subsegmentos variável)₁ e (subsegmento variável)₃ ter 0 a 60 nucleótidos, cada um dos (3'-subsegmento primário)₁, (5'-subsegmento primário)₂, (3'-subsegmento primário)₃ e (5'-subsegmento primário)₄ ter 15 a 45 nucleótidos, o (segundo subsegmento)_t ter, pelo menos, 30 nucleótidos e o segmento alvo ter 1000 ou menos nucleótidos.

38 - Processo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado por (A) se o segmento alvo é um segmento de ADN, o produto do passo (2) ser transformado em cadeias simples por desnaturação térmica e o produto do passo (8) ser transformado em cadeias simples por desnaturação térmica, cada uma das primeira, segunda e quarta ADN polimerase ser seleccionada a partir do grupo composto por fragmento Klenow de ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, transcriptase inversa de MMLV clonado, ADN polimerase α de timo de vitelo, ADN polimerase termo-estável de "Thermus aquaticus", e ADN polimerase de T7 clonada em SequenaseTM; a terceira ADN polimerase ser seleccionada a partir do grupo composto por transcriptase inversa de

AMV, e transcriptase inversa de MMLV clonado, e cada uma das primeira e segunda ARN polimerases dependentes de ADN de bacteriófago ser seleccionada do grupo composto por ARN polimerase de T7, ARN polimerase de T3 e ARN polimerase de SP6; e (B) se o segmento alvo é um segmento de ARN, cada um dos produtos do passo (2) e o produto do passo (8) ser transformado em cadeias simples por desnaturação térmica; cada uma das segunda e quarta ADN polimerases ser seleccionada do grupo composto por fragmento Klenow de ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, transcriptase inversa de MMLV clonado, ADN polimerase α de timo de vitelo, ADN polimerase termo-estável de "Thermus aquaticus", e ADN polimerase de T7 clonado em SequenaseTM; cada uma das primeira e terceira ADN polimerases ser seleccionada do grupo composto por transcriptase inversa de AMV e transcriptase inversa de MMLV clonado; e cada uma das primeira e segunda ARN polimerases dependentes de ADN de bacteriófago ser seleccionada do grupo composto por ARN polimerase de T7, ARN polimerase de T3 e ARN polimerase de SP6.

39 - Processo de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por o segmento alvo ser um segmento de ARN, por cada uma das segunda e quarta ADN polimerases ser seleccionada do grupo composto por fragmento Klenow de ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV e transcriptase inversa de MMLV clonado e por cada uma das primeira e terceira ADN polimerases ser seleccionada do grupo composto por transcriptase inversa de AMV e transcriptase inversa de MMLV clonado.

40 - Processo de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por o subsegmento do segmento alvo que tem a sequência complementar à do (3'-subsegmento primário)₁ se encontrar na direcção 3' a partir de e não se sobrepor ao subsegmento do segmento alvo que tem a sequência complementar à do (5'-subsegmento primário)₄, por o subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (5'-subsegmento primário)₂ não se sobrepor ao subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (3'-subsegmento primário)₃.

41 - Processo de acordo com a reivindicação 40, caracterizado por o subsegmento do terceiro ADN complementar com a se-

quência complementar à do (3'-subsegmento primário)₁ se encontrar na direção 5' a partir de e não se sobrepor ao subsegmento do terceiro ADN complementar que tem a sequência complementar à do (5'-subsegmento primário)₄, e por o subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (5'-subsegmento primário)₂ não se sobrepor ao subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (3'-subsegmento primário)₃.

42 - Processo de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por, no terceiro ADN complementar, o (subsegmento variável)_{1c} ter mais de 0 nucleótidos, e por, no duplex entre (5'-subsegmento primário)₄ e terceiro ADN complementar, pelo menos um subsegmento do (5'-subsegmento primário)₄ ser hibridado com o (subsegmento variável)_{1c}.

43 - Processo de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por o subsegmento do segmento alvo que tem a sequência complementar à do (3'-subsegmento primário)₁ se encontrar na direção 3' a partir de e não se sobrepor ao subsegmento do segmento alvo que tem a sequência complementar à do (5'-subsegmento primário)₄, e por o subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (5'-subsegmento primário)₂ não se sobrepor ao subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (3'-subsegmento primário)₃.

44 - Processo de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por o subsegmento do terceiro ADN complementar com a sequência complementar à do (3'-subsegmento primário)₁ se encontrar na direção 5' a partir de, e não se sobrepor ao subsegmento do terceiro ADN complementar que tem a sequência complementar à do (5'-subsegmento primário)₄, e em que o subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (5'-subsegmento primário)₂ não se sobrepor ao subsegmento do segmento alvo que tem a sequência do (3'-subsegmento primário)₃.

45 - Processo de acordo com a reivindicação 44, caracterizado por, no terceiro ADN complementar, o (subsegmento variável)_c ter mais de 0 nucleótidos e por, no duplex entre o (5'-subsegmento primário)₄ e terceiro ADN complementar, se hibridar pelo menos um subsegmento de (5'-subsegmento primário)₄ com o (subsegmento variável)_{1c}.

46 - Processo de acordo com as reivindicações 40, 41, 42, 43, 44 ou 45, caracterizado por (1) se se usar a ARN polimerase de T7 no passo (6) ou no passo (12), o (promotor)₁, se o passo é passo (6), ou o (promotor)₃, se o passo é passo (12), terem a sequência 5'-TAATACGACTCACTATA-3' e, o (subsegmento variável)₁, se o passo é passo (6), ou (subsegmento variável)₃, se o passo é passo (12), terem um dinucleótido de sequência 5'-GG-3' no seu terminal 5'; ou (2) se se usar a ARN polimerase de T3 no passo (6) ou no passo (12), o (promotor)₁, se o passo é o passo (6), ou (promotor)₃ se o passo é o passo (12), terem a sequência 5'-TATTAACCCTCACTAAA-3', e, o (subsegmento variável)₁, se o passo é o passo (6), ou o (subsegmento variável)₃, se o passo é o passo (12), terem um tetranucleótido de sequência 5'-GGGA-3' no seu terminal 5'; ou (3) se se usar a ARN polimerase de SP6 no passo (6) ou no passo (12), o (promotor)₁, se o passo é o passo (6), ou (promotor)₃, se o passo é o passo (12), terem a sequência 5'-GAACGGCGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACTATA-3' e, o (subsegmento variável)₁, se o passo é o passo (6), ou o (subsegmento variável)₃, se o passo é o passo (12), terem um hexanucleótido de sequência 5'-GAATAC-3' no seu terminal 5'; e por o terminal 5' do primeiro primário ser o nucleótido de 5' do (promotor)₁ e o terminal 5' do terceiro primário ser o nucleótido de 5' do (promotor)₃.

47 - Processo de acordo com as reivindicações 40, 41, 42, 43, 44 ou 45, caracterizado por (A) (i) se a primeira ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de T7 ou de T3, o (subsegmento variável)₁ ter a sequência 5'-GGGATGGGGAAACCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3' e o (subsegmento variável)₂ do segundo primário ter a sequência 5'-CGCGCTCTCCCA-GGTGACGCCTCGAGAAGAGGGCGGACCTTCGTGC-3'; ou (ii) se a primeira ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de SP6, o (subsegmento variável)₁ ter a sequência 5'-GAATACTGGGGAAACCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3' e o (subsegmento variável)₂ do segundo primário ter a sequência 5'-CGCGCTCTCCCA-GGTGACGCCTCGAGAAGAGGGCGGACCTTCGTGC-3' (B) (i) se a segunda ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de T7 ou de T3, o (subsegmento variável)₃ ter a sequência 5'-

-GGGATGGGGAAACCCCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3'; (ii) se a segunda ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago é a ARN polimerase de SP6, o (subsegmento variável)₃ ter a sequência 5'-GAA-TACGGGATGGGGAAACCCCCCTTCGGGGGTACCTCGCGCAGC-3' e o quarto primário ter como terminal 5' 40 nucleótidos 5'-CGCGCTCTCCCAGGTGACGCC-TCGAGAAGAGGGCGCGACCTTCGTGC-3'; e (C) após o passo (12), o segundo ARN ser autocataliticamente replicado pela Q/β replicase.

48 - Processo de acordo com as reivindicações 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 ou 45, caracterizado por o segmento alvo ser um segmento do genoma dum vírus de imunodeficiência humana que é um vírus HIV-1 e por (1) o (3'-subsegmento primário)₁ ter a sequência 5'-TCTAATTACTACCTCTTCTTCTGCTAGACT-3', o (5'-subsegmento primário)₂ ter a sequência 5'-ACAAGTTGTAACACCTCAGTCATTACACAG-3', o (3'-subsegmento primário)₃ ter a sequência 5'-AAAGGTATCCTTTGAGCCAATTCCCATA-3', e o quarto primário ter a sequência 5'-AGTTGATACTACTGGCCTAATT-3'; ou (2) o (3'-subsegmento primário)₁ ter a sequência 5'-TTTCGTAACACTAGGCCAAAGGTGGCTTTATC-3', (5'-subsegmento primário)₂ ter a sequência seleccionada do grupo composto por 5'-GCACACAAGTAGACCCTGAACTAGCAGACCA-3' e 5'-ACACCATATGTATGTTTCAGGGAAAGCTA-3', o (3'-subsegmento primário)₃ ter a sequência 5'-ACTAATTCATCTGTATTACTTTGACTGTTTTTC-3', e o quarto primário ter a sequência 5'-TTTTTTGGTGTATTATAATGCTGCTAGTGCC-3'.

49 - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por (A) se o segmento alvo é um segmento de ADN, o produto do passo (2) ser transformado em cadeias simples por desnaturação térmica; cada uma das primeira e segunda ADN polimerases ser seleccionada do grupo composto por fragmentos Klenow de ADN polimerase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, transcriptase inversa de MMLV clonado, ADN polimerase α de timo de vitelo, ADN polimerase termoestável de Thermus aquaticus, e ADN polimerase de T7 clonado em SequenaseTM; e a primeira ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser seleccionada do grupo composto por ARN polimerase de T7, ARN polimerase de T3 e ARN polimerase de SP6; e (B) se o segmento alvo é um segmento de ARN, o produto do passo (2) ser transformado em cadeias simples por desnaturação térmica; a segunda ADN polimerase ser seleccionada do grupo composto por fragmento Klenow de ADN polime

-67-

rase I de E. coli, transcriptase inversa de AMV, transcriptase inversa de MMLV clonado, ADN polimerase α de timo de vitelo, ADN polimerase termo-estável de "Thermus aquaticus" e ADN polimerase de T7 clonado em SequenaseTM; a primeira ADN polimerase ser seleccionada do grupo composto por transcriptase inversa do AMV e transcriptase inversa MMLV clonado, e a primeira ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser seleccionada de ARN polimerase de T7, ARN polimerase de T3 e ARN polimerase de SP6.

50 - Processo de acordo com a reivindicação 49, caracterizado por cada uma das primeira e segunda ADN polimerases ser seleccionada a partir do grupo composto por transcriptase inversa de AMV e transcriptase inversa de MMLV clonado.

51 - Processo de acordo com a reivindicação 50, caracterizado por o terminal 5' do primeiro primário ser o nucleótido de 5' do (promotor)₁; por, se a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser a ARN polimerase de T7, o subsegmento (promotor)₁-(subsegmento variável)₁ do primeiro primário ter a sequência 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; por, se a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser a ARN polimerase de T3, o subsegmento (promotor)₁-(subsegmento variável)₁ do primeiro primário ter a sequência 5'-TATTAACCCTCACTAAAGGGACGCGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; por, se a ARN polimerase dependente de ADN de bacteriófago ser a ARN polimerase de SP6, o subsegmento (promotor)₁-(subsegmento variável)₁ do primeiro primário ter a sequência 5'-GAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACACATACGATT-AGGTGACACTATAGAATACCGGGCTCTCCCAGGTGACGCCTCGAGAAGAGGCGCGACCTTCGTGC-3'; por, o (subsegmento variável)₂ ter a sequência 5'-TGGGGAAACCCCTTCGGGGTCACTCGCGCAGC-3'; e por, após o passo (6), o primeiro ARN ser autocataliticamente replicado com 3β replicase.

67 879

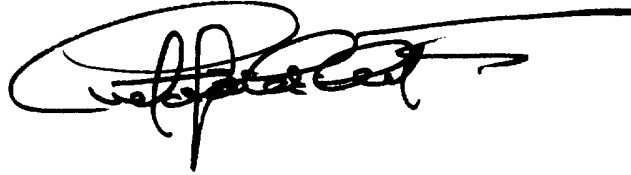
File Nº. 47 104

-68-

Lisboa, 17 JUN. 1983

Por SISKI DIAGNOSTICS, INC.

- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Siska', written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the right.

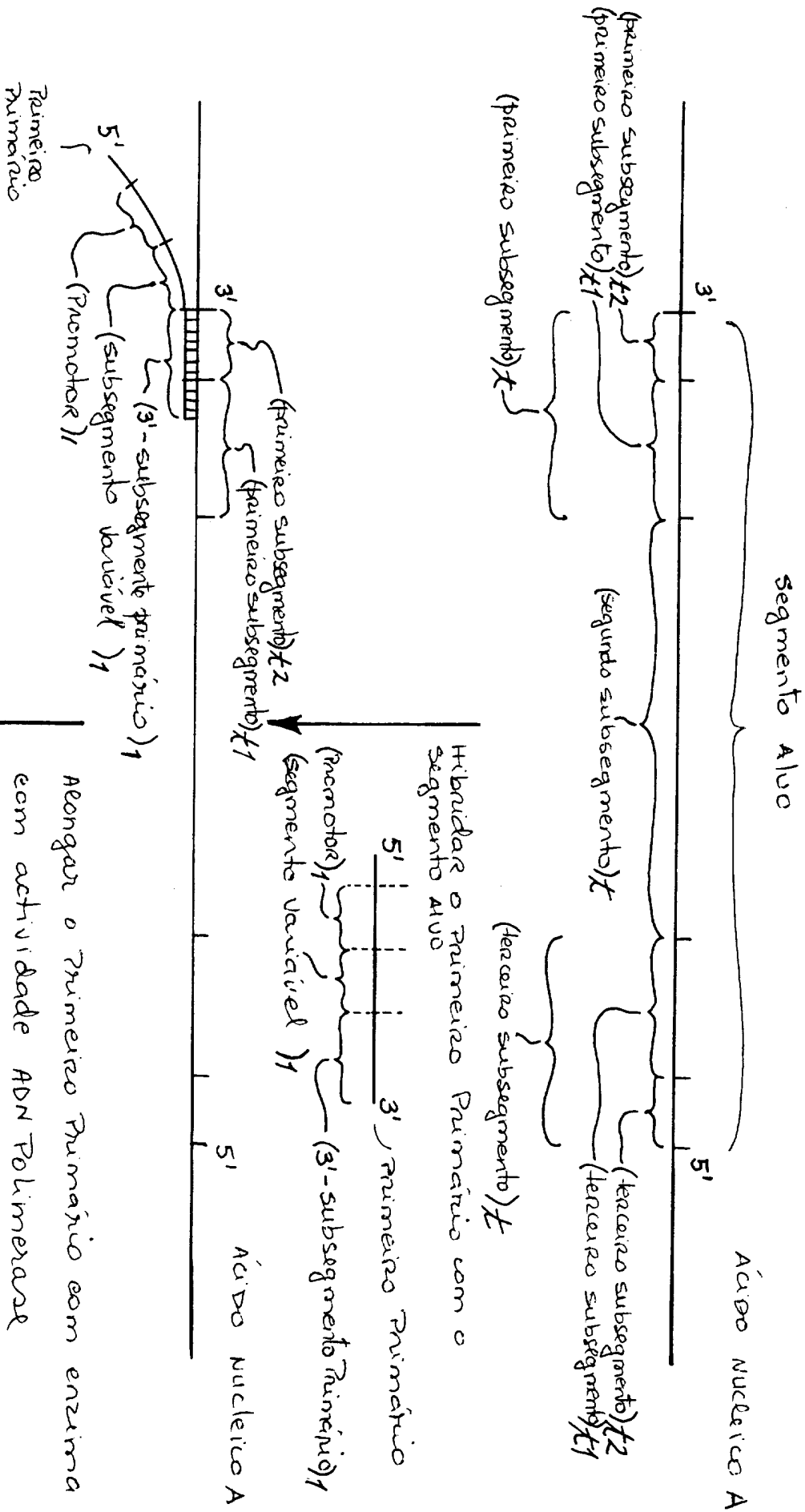
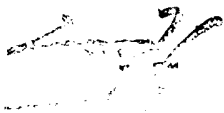


FIG. 1A

Alongar o Primeiro Primário com enzima com actividade ADN Polimerase



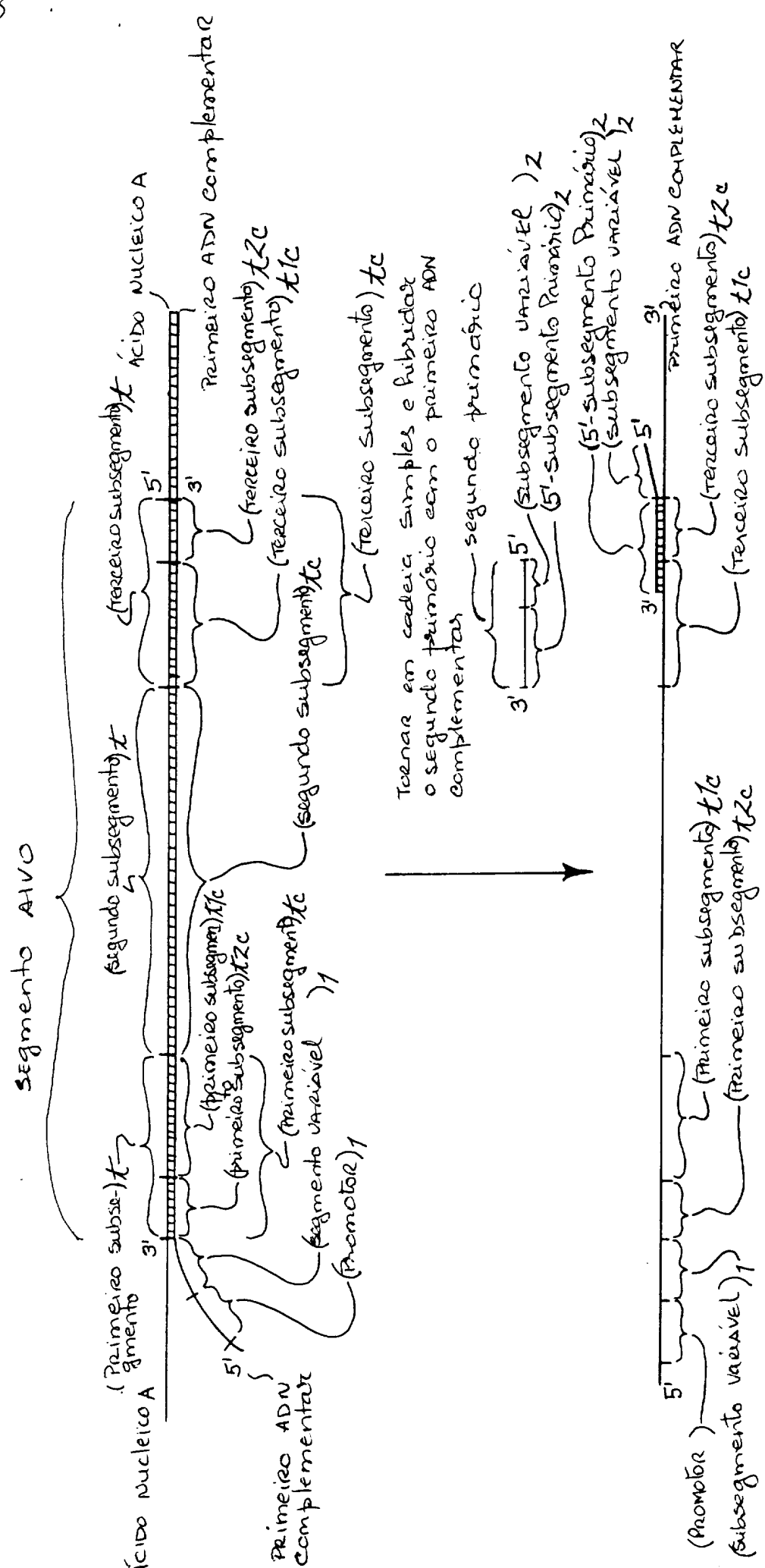
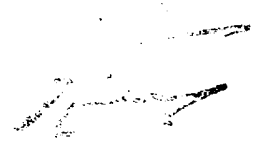
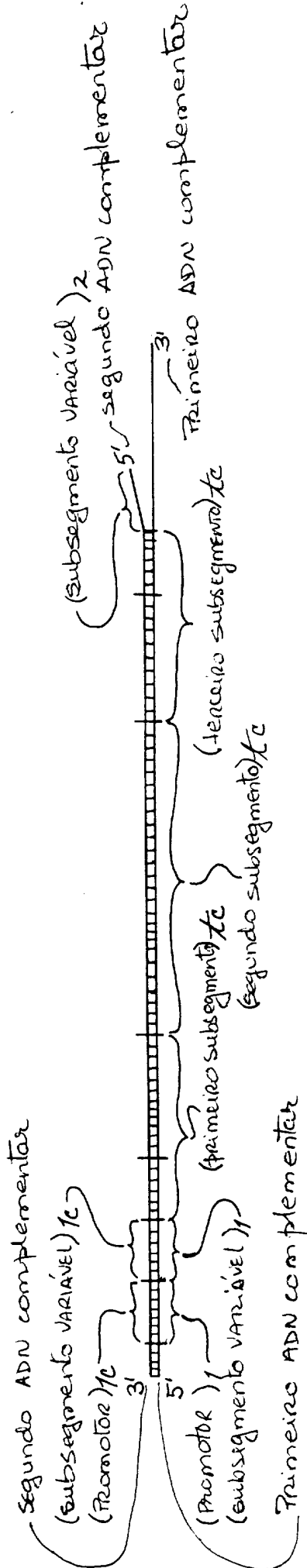


FIG. 1B





Transcrever com ARN Polimerase dependente de ADN de bacteriófago que reconhece (promotor) 1

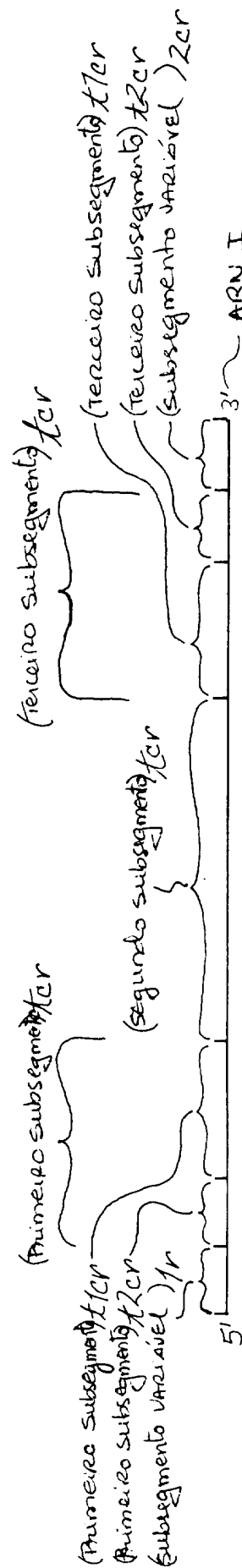


FIG. 1C

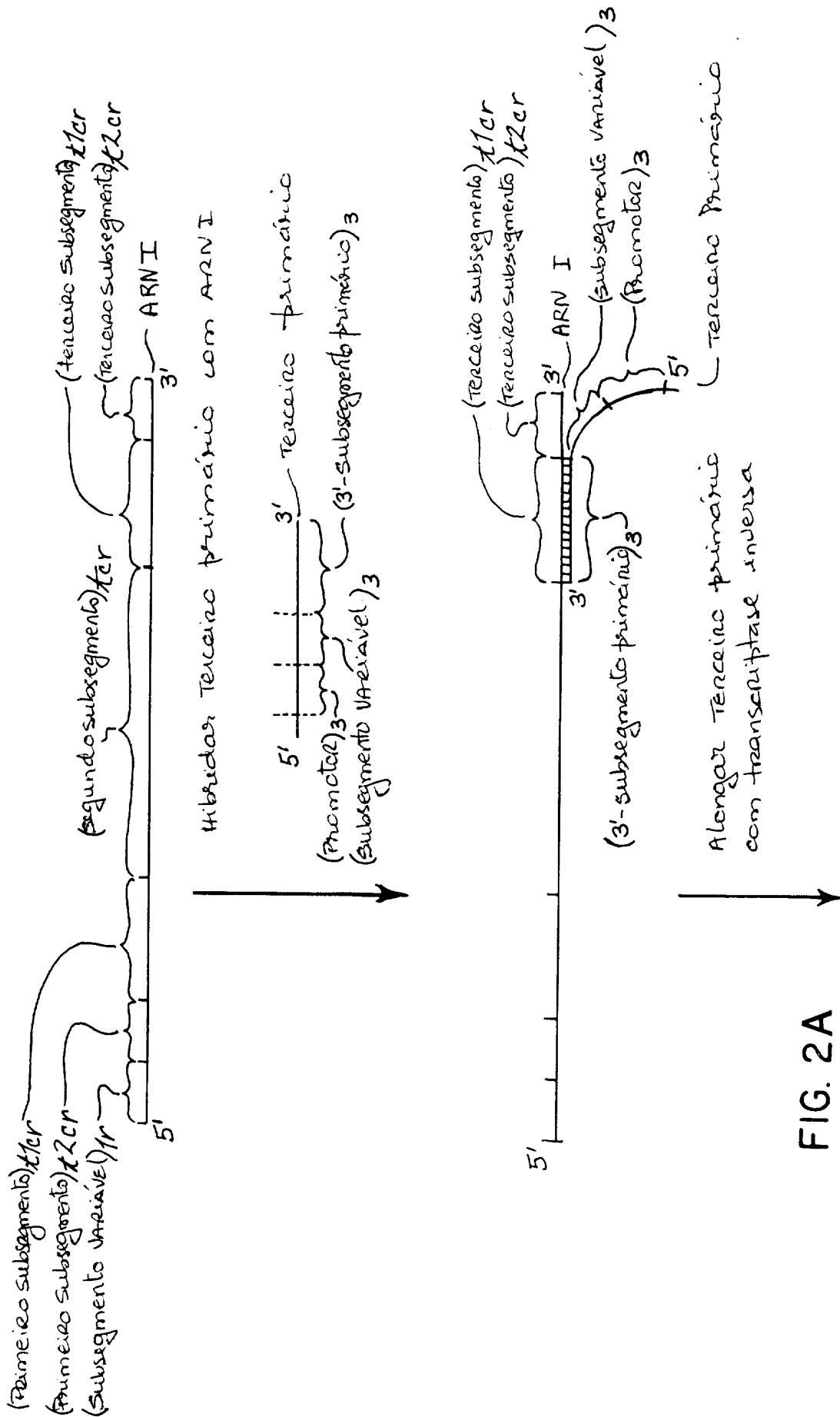
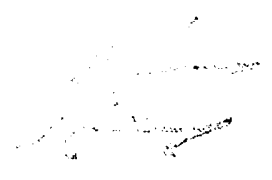
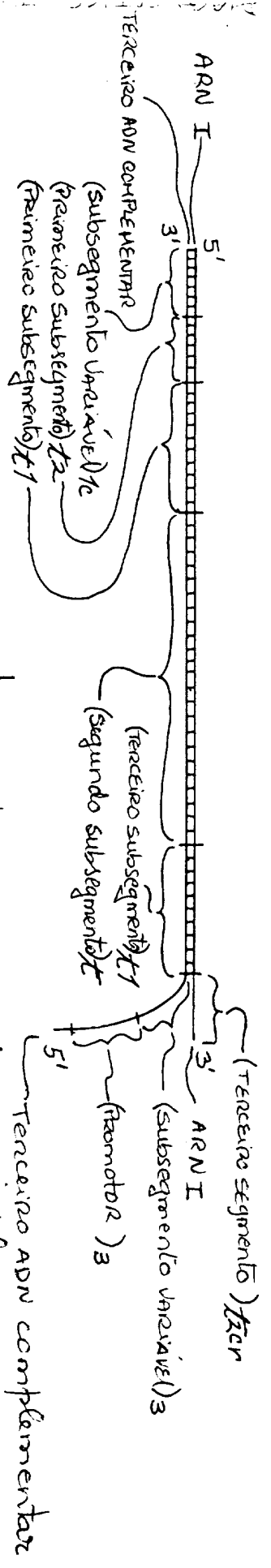


FIG. 2A



Transformar em cadeia simples e hibridar o quarto primario do terceiro ADN complementar

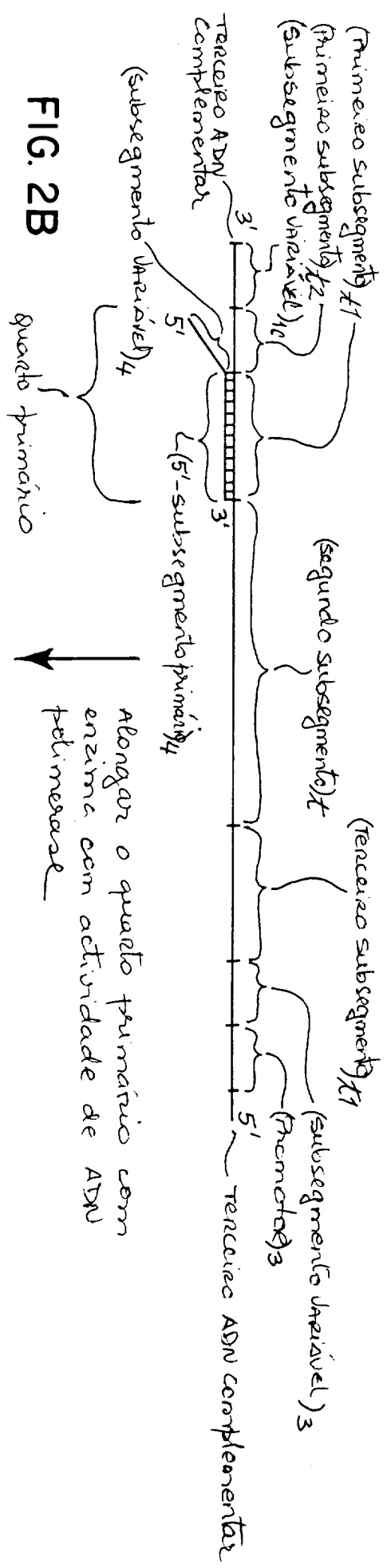
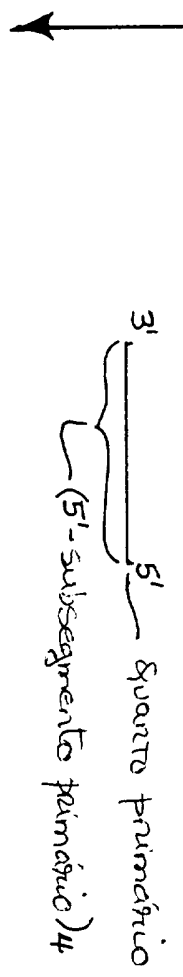


FIG. 2B

Alongar o quarto primario com enzima com actividade de ADN polimerase

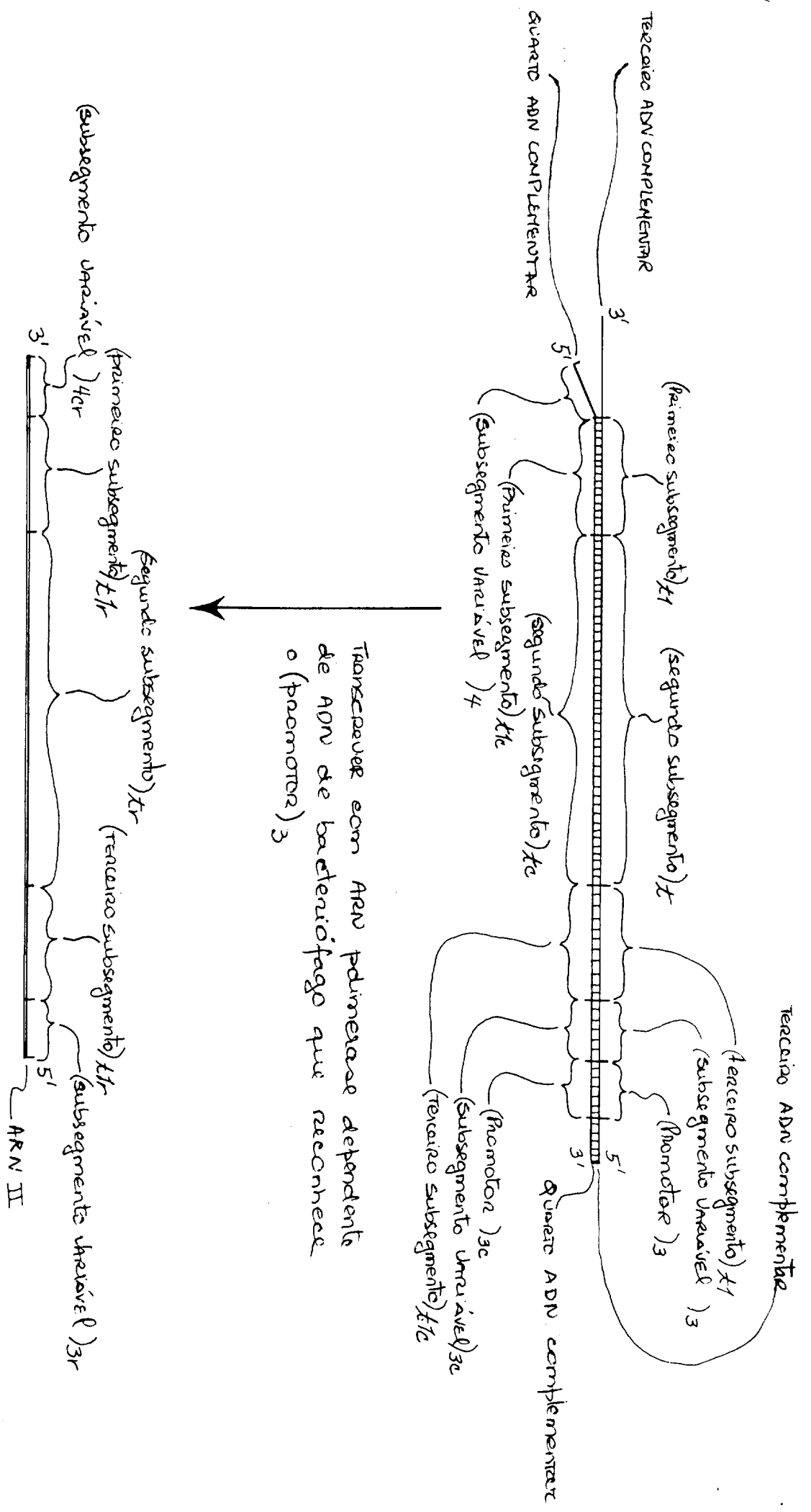


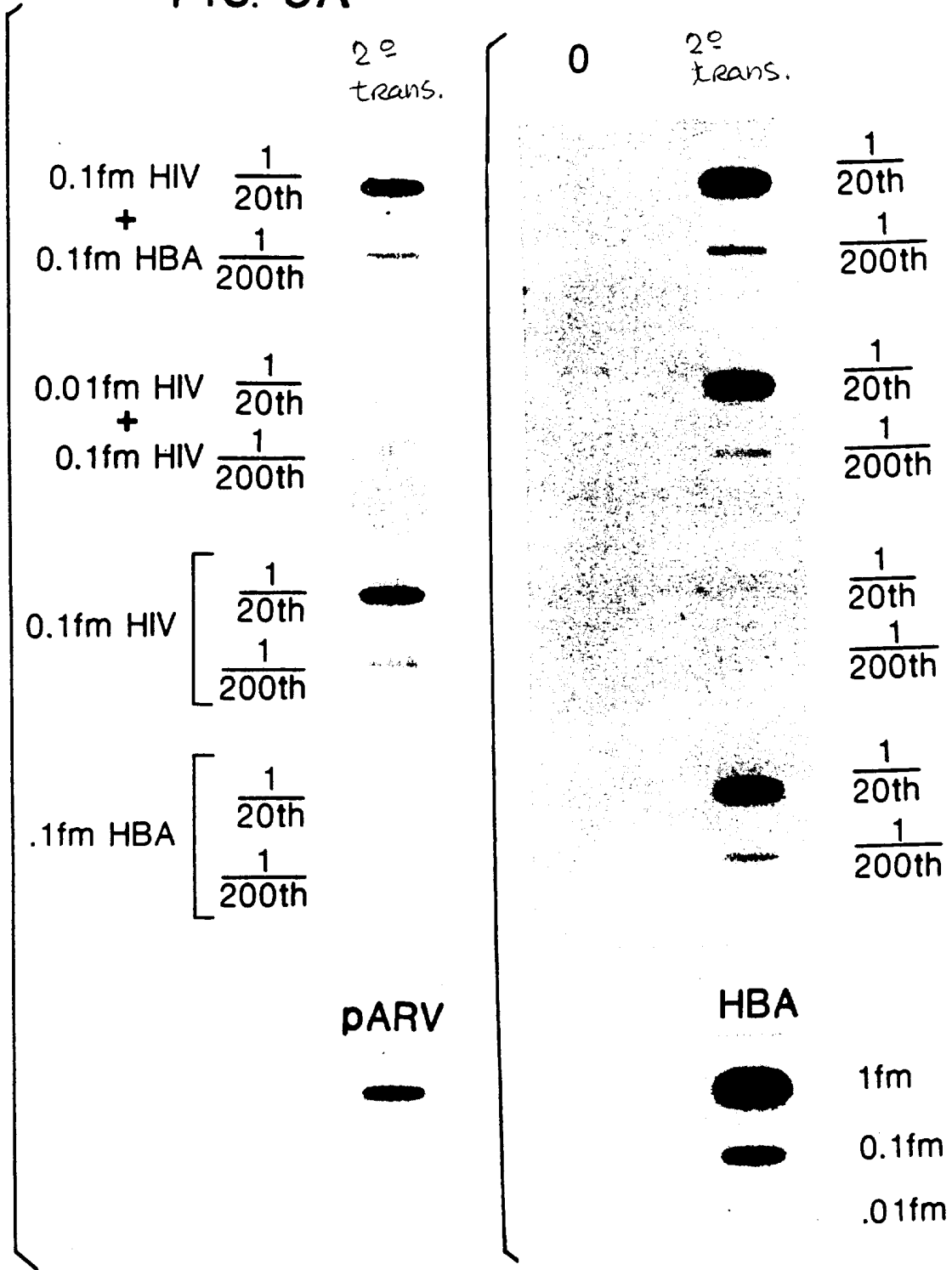
FIG. 2C

7/5

26

FIG. 3A

FIG. 3B



Oligo 86-31

Oligo 87-459

