

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11) 97.534	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
Requerente (71): AMGEN INC., uma sociedade organizada e existindo segundo as leis do Estado de Delaware, Estados Unidos da América, norte-americana, industrial, com sede em 1840 Dehavilland Drive, Thousand Oaks, California 91320 Estados Unidos da América			
Inventores (72): RODNEY M. RICHARDS, DAVID L. SNITAM, THEODORE JONES e GREGORY S. BROWN			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
01.05.1990	US	07/517,631	
19.04.1991	US	07/686,478	
Epígrafe: (54) "MÉTODO PARA REDUZIR A CONTAMINAÇÃO DE TRANSPORTE EM UM PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) Descreve-se um método económico e eficaz para reduzir a contaminação de transporte em um processo de amplificação. O método da presente invenção permite reduzir ou eliminar a contaminação de base em um produto de amplificação, mediante a incorporação de pelo menos uma modificação no produto de amplificação. Em uma amostra de ensaio, o produto de amplificação modificada é facilmente distinguível de uma sequência alvo. Antes de se amplificar o alvo em uma amostra de ensaio nova, pode tratar-se a amos-			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO (Continuação)

Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
-----------------------	-----	---------------------	----------------------------------

Resumo (continuação) (57)

2

tra para eliminar selectivamente o produto de amplificação conta-
minante, de modo tal que este não pode ser amplificado na nova
amostra.

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

Dr. Agente Oficial da Propriedade Industrial

(Dr. Jorge Garin)

5.

"MÉTODO PARA REDUZIR A CONTAMINAÇÃO DE TRANSPORTE EM
UM PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO"

Antecedentes

São utilizados rotineiramente ensaios de diagnósticos para detectar a presença e/ou a quantidade de produtos analisáveis em amostras de ensaio retiradas de um doente ou de outro indivíduo. Os produtos analisáveis habitualmente incluem antigénios e anticorpos que são medidos mediante a utilização de técnicas de imunodiagnóstico para identificar certos estados de doença e vários tipos de situações de não doença tal como a gravidez. O alcance dos níveis altos de sensibilidade e especificidade é importante para a maioria dos ensaios de diagnóstico. Este facto é particularmente importante quando os produtos a analisar estão presentes em concentrações relativamente baixas. Os vários melhoramentos que têm permitido alcançar níveis de sensibilidade mais altos nos processos de imunodiagnóstico têm incluído o uso de anticorpos monoclonais nas configurações dos ensaios e a incorporação de métodos para amplificar o sinal utilizado como uma etiqueta nestes tipos de ensaios.

Mais recentemente, avanços no campo da biologia molecular têm permitido a detecção de sequências de ácido nucleico específicas nas amostras de ensaio utilizando-se uma técnica conhecida como diagnóstico de sonda. Nos diagnósticos de sonda, é utilizada uma sequência de ácido nucleico para "sondar" a amostra ligando-se especificamente o analisável alvo ao seu ácido nu

cleico complementar. Isto torna possível a detecção de doenças num estágio precoce porque o material genético de ácido nucleico aparece frequentemente numa amostra de ensaio de meses ou mesmo de anos antes de decorrer tempo suficiente para que o ácido nucleico alvo seja transcrito para um antigénio. Este facto é particularmente verdadeiro em certos tipos de doenças transmitidas por via sexual, tais como a infecção pelo vírus de imunodeficiência humana. Ranki et al, The Lancet 85(59) 589-593 (1987). Além da detecção de doenças várias e de alterações genéticas, pode ainda utilizar-se a capacidade dos diagnósticos de sonda para identificarem a presença de genes específicos ou para se obterem outras informações genéticas pertinentes, tais como a presença de genes que codificam para antigénios responsáveis pela rejeição de enxertos, assim como informação genética aplicada nos testes de cancro e de oncogenes na medicina forense.

No seu potencial total, os diagnósticos de sonda são teoricamente capazes de detectarem tanto quanto uma molécula numa amostra de ensaio. Um dos principais obstáculos para alcançar o potencial total dos diagnósticos de sonda é a dificuldade inerente que se encontra na detecção de quantidades extremamente pequenas de sequências alvo frequentemente presentes nas amostras. Como uma consequência, têm-se centrado recentemente os esforços para melhorar a sensibilidade dos diagnósticos de sonda nos métodos para a ampliação da sequência de ácido nucleico alvo.

A ampliação da sequência alvo pode ser realizada por qualquer um dos numerosos meios que envolvem a reprodução ou replicação repetitiva de uma dada sequência de DNA ou ácido nucleico.

co alvo de RNA, resultando numa amplificação linear ou exponencial depende do método particular utilizado.

Os métodos anteriores que foram utilizados rotineiramente para a produção de cópias múltiplas de sequências de ácido nucleico envolveram a clonagem da sequência de ácido nucleico alvo em um sistema celular hospedeiro apropriado. Estes métodos utilizam técnicas de clonagem tradicionais em que o ácido nucleico pretendido é inserido em um vector apropriado que, subsequentemente é utilizado para a transformação do hospedeiro. Quando o hospedeiro se desenvolve em cultura, o vector é replicado, produzindo cópias adicionais da sequência de ácido nucleico pretendida. A sequência de ácido nucleico alvo que é inserida no vector pode ser de ocorrência natural ou sintetizada. Por outras palavras, a sequência de ácido nucleico alvo pretendida pode ser sintetizada in vitro e, em seguida, inserida num vector que é ampliado por crescimento como descrito na patente de invenção Norte Americana Nº 4293652.

As patentes de invenção Norte Americanas Nº 4683195 e Nº 4683202 descrevem um método automatizável, correntemente referido como reacção de cadeia de polimerase (PCR), para ampliar a quantidade de sequência de ácido nucleico alvo numa amostra de ensaio. A amplificação por reacção de cadeia de polimerase utiliza dois iniciadores oligonucleotídicos que são complementares às extremidades das diferentes fracções das cadeias opostas de uma secção da sequência alvo. A hibridação seguinte destes iniciadores com o alvo, formam produtos de extensão complementar à sequência alvo na presença de DNA polimerado e um excesso de nucleosido trifosfato. Os iniciadores são orientados de forma a que a síntese de DNA por polimerase se processe através da região

entre os iniciadores. O produto de extensão hibridado é em seguida desnaturado do alvo e o ciclo é repetido, actuando também o produto da extensão como matriz para a formação de mais produto da extensão nos ciclos subsequentes de amplificação. Os ciclos continuam até à obtenção de uma quantidade suficiente da sequência de ácido nucleico alvo para que resulte num sinal mensurável no ensaio de escolha. Teoricamente, cada ciclo sucessivo duplica a quantidade de ácido nucleico sintetizado no ciclo anterior, resultando numa acumulação exponencial do produto ampliado.

O pedido de patente de invenção internacional nº 89/02649 descreve um tipo diferente de processo de amplificação automático utilizável. Neste tipo de processo de amplificação, pares previamente sintetizados de sondas de amplificação hibridam continuamente com uma secção da sequência alvo. As extremidades contíguas são em seguida ligadas para formar o produto de ampliação complementar. Após a ligação, o produto de ampliação completado é separado do alvo por desnaturação pelo aquecimento.

O processo é depois repetido, com o produto alvo e o produto de amplificação resultante actuando com uma matriz para as sondas nos ciclos subsequentes até à obtenção de uma quantidade suficiente da sequência de ácido nucleico alvo de forma a resultar no sinal medível através do ensaio escolhido. Como com a reacção de cadeia de polimerase, cada ciclo sucessivo duplica, teoricamente, a quantidade de ácido nucleico proveniente do ciclo anterior.

Os métodos de amplificação que utilizam sondas previamente sintetizadas têm sido geralmente referidos como reacção de cadeia de ligase (LCR), embora a ligação das sondas se possa

alcançar por meios diferentes dos da acção de uma ligase, tal como, por exemplo, a ligação por via química ou fotoquímica.

Ainda que os métodos de ampliação do ácido nucleico tenham revolucionado os diagnósticos de sonda por permitirem a detecção de quantidades extremamente pequenas de sequências de ácido nucleico nas amostras em ensaio, também têm criado os seus próprios problemas nos diagnósticos de rotina, designadamente, os falsos positivos devido à contaminação de transporte.

A ampliação repetida de um ácido nucleico de análise para muitos milhões ou biliões de vezes a sua concentração normal numa amostra de ensaio engloba a possibilidade de contaminação de transporte nas novas amostras a partir das amostras contendo o alvo ampliado. Isto, por seu lado, pode criar artificialmente sinais fortes nas subseqüentes amostras de ensaio, incluindo os falsos positivos em que amostras negativas são contaminadas.

A contaminação de transporte pode ocorrer como resultado de um transporte mecânico de amostra para amostra ou como o resultado de uma contaminação transportada pelo ar. A contaminação transportada pelo ar é inevitável quando os recipientes de reacção que contém a amostra de ensaio ampliada são abertos por qualquer razão, tal como para a adição de reagentes ou a amostragem do analisável ampliado para detecção.

Esta simples acção pode aspirar milhões de moléculas do produto de amplificação para o ar contaminando uma área de trabalho normal de laboratório com centenas de moléculas por cm^3 . Tem sido impossível preservar totalmente da contaminação com outros espécimes através do contacto com estas cópias transportadas pelo ar independentemente do grau de cuidado observado pe

lo operador(es).

As técnicas seguintes para manipulação dos problemas de contaminação criados pela ampliação de sequências alvo, ainda que sugeridas para o uso no processo de amplificação do tipo de reacção de cadeia de polimerase, devem ser aplicadas na generalidade a outros tipos de processo de ampliação: (1) separação física (tal como compartimentos separados) de pré-ampliação e as amostras de pré e de pós ampliação; (2) armazenagem separada e divisão dos reagentes; (3) o uso de pipetas de deslocamento positivo; (4) técnicas de laboratório meticolosas; e, (5) selecção escurupulosa dos controlos. Amplifications -- A forum for PCR Users, 2, 4(1989). Contudo, estas medidas não só são muito dispendiosas como resumem as condições das mais ideais. Além disso, ainda que estas técnicas muito dispendiosas sejam praticadas meticolosamente, este tipo de precauções não pode eliminar totalmente o problema da contaminação. Permanecem dificuldades inerentes aos trabalhadores de laboratório que invariavelmente transportam a contaminação sobre si e nas suas roupas e ainda na circulação do ar contaminado de compartimento para compartimento através de ventiladores. Kitchin, Nature, 344, 201 (1990).

Tem sido sugerido o tratamento dos reagentes com uso ultra-violeta para controlo do produto de amplificação contaminante num processo de amplificação do tipo PCR. Esta sugestão é baseada na capacidade conhecida pelos ultra-violeta para destruir a integridade do DNA. Ainda que o mecanismo desta acção seja desconhecido, foi demonstrado que o produto de amplificação contaminante com base numa reacção de cadeia de polimerase pode ser destruído nos tampões assim como no iniciador dNTP e nas prepara

ções de Taq polimerase por irradiação com ultra-violetas. Sarkar et al, Nature, 343, 27 (1990). Embora os iniciadores de PCR de cadeia simples sejam aparentemente capazes de sobreviver a este tratamento, pares de cadeia dupla de sondas de LCR são provavelmente mais sensíveis ao tratamento pela irradiação e podem ser destruídos. Além disso, a radiação com luz-ultra-violeta não pode ser utilizada directamente nas amostras não analisadas porque pode causar a destruição de moléculas alvo de cadeia dupla devido a esse tratamento.

Constitui um objectivo da presente invenção proporcionar um método eficaz válido para reduzir significativamente a contaminação do transporte que se encontra quando se utiliza o processo de amplificação nos ensaios de diagnóstico de sonda. Constitui ainda um objectivo da presente invenção proporcionar um método para redução da contaminação que é simples de realizar e que é adaptável a numerosos tipos diferentes de processos de amplificação.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método económico e eficaz para reduzir a contaminação de produtos de amplificação num processo de amplificação. O método da presente invenção é realizado através da modificação do produto de amplificação de forma a que o produto de amplificação modificado se distingue da sequência alvo. Antes da aplicação o ácido nucleico de uma nova amostra, a nova amostra pode ser tratada de um modo apropriado para remover selectivamente ou destruir, ou por outra forma tornar o produto de amplificação contaminante modificado não viável de

forma a que este não possa ser ampliado através dos processos de ampliação subsequentes. O tratamento neste sentido reduz a contaminação de transporte e os falsos positivos provocados por este tipo de contaminação sem alterar os níveis da sequência alvo de ocorrência natural.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 representa um diagrama que mostra a modificação do ligando de um produto de ampliação proveniente de LCR e remoção subsequente do produto de ampliação modificado com um parceiro de ligação específico imobilizado.

A Fig. 2 representa um diagrama que mostra a modificação do ligando de um produto de ampliação derivado de PCR e remoção subsequente do produto de ampliação modificado com um parceiro de ligação específico imobilizado.

A Fig. 3 representa um diagrama que mostra a modificação do agente de ligação cruzada de um produto de ampliação derivado de LCR e subsequente ligação cruzada irreversível do produto de ligação ampliado.

A Fig. 4 representa um diagrama que mostra o agente de ligação e sua modificação cruzada de um produto de amplificação derivado de PCR e subsequente ligação cruzada irreversível do produto de ampliação modificado.

A Fig. 5 representa um diagrama que mostra a modificação do sítio de restrição de um produto de ampliação derivado de LCR e cisão subsequente do produto de ampliação modificado com uma enzima de restrição.

A Fig. 6 representa um diagrama que mostra a modifica-

ção do sítio de restrição de um produto de amplificação derivado por PCR e cisão subsequente do produto de amplificação modificado com uma enzima de restrição.

A Fig. 7 representa um diagrama que mostra o iniciador parcial de uma fracção de um sítio de restrição modificado de um produto de amplificação derivado por PCR que foi fundido com uma enzima de restrição.

A Fig. 8 representa um diagrama que mostra a modificação do sítio de restrição de um produto de amplificação derivado de PCR e separação subsequente do produto de amplificação modificado com uma enzima de restrição de corte remoto.

A Fig. 9 representa um diagrama que mostra a modificação do sítio de restrição de um produto de amplificação derivado de LCR e separação subsequente do produto de amplificação modificado com uma enzima de restrição de corte remoto.

A Fig. 10 representa a preparação de sondas de amplifição oligonucleotídicas ou indicadores que incorporam um sítio de cisão por via química.

A Fig. 11 representa a sequência de amplificação, sondas de amplificação, produto de amplificação resultante e sondas de detecção dos Exemplos 1 e 2.

A Fig. 12 representa uma fotografia de um autoradiograma que mostra as eficiências de amplificação relativa de produtos de amplificação modificados por enzima de restrição e alvos após o tratamento da sequência alvo e do produto de amplificação modificado com uma enzima de restrição.

A Fig. 13 representa o DNA de polisítios utilizado no Exemplo 3, para avaliar as enzimas de restrição do corte remoto.

A Fig. 14 é uma fotografia de um autoradiograma que re-



presenta as eficiências de corte relativo de enzimas de restrição de corte remoto diversas no que se refere a DNA de polissí-tios.

A Fig. 15 representa um diagrama que mostra a modificação do sítio de restrição duplo de um produto de amplificação derivado por PCR e subsequente separação do produto de amplificação modificado com uma enzima de restrição de corte remoto.

A Fig. 16 representa uma sequência de amplificação de 147 pares de bases (contida em pUC 9), que corresponde a iniciadores de amplificação de PCR modificados e não modificados e um iniciador de detecção do Exemplo 4.

A Fig. 17 é a fotografia de um autoradiograma que mostra as eficiências relativas de amplificação por PCR utilizando-se iniciadores modificados e não modificados assim como a incapacidade do produto de amplificação modificado para servir como matriz nas amplificações subsequentes como demonstrado nos Exemplos 4B e 4C.

A Fig. 18 é uma fotografia de um autoradiograma mostrando a destruição efectiva de um produto de amplificação derivado por PCR modificado mediante o tratamento com agentes de corte correspondentes, como demonstrado no Exemplo 4C.

A Fig. 19 representa um diagrama que mostra os produtos resultantes de cortes simples e duplo num produto de amplificação por PCR contendo duas modificações do sítio de restrição de corte remoto.

A Fig. 20 representa uma sequência de amplificação de HIV de 162 pares de base , que correspondem a iniciadores de amplificação modificados e um iniciador de detecção do Exemplo 5.

A Fig. 21 é a fotografia de um autoradiograma mostrando a formação e quantificação de produto de amplificação modificado, derivado por PCR como demonstrado no Exemplo 5A.

A Fig. 22 é a fotografia de um autoradiograma mostrando a destruição de "pré-amplificação" efectiva de contaminação de transporte em um processo de amplificação do tipo PCR, como demonstrado no Exemplo 5B.

A Fig. 23 representa um diagrama que mostra uma sequência de amplificação de HIV de 75 pares de bases, dois iniciadores de amplificação por PCR modificados por Ribonucleótidos e um iniciador de detecção utilizado no Exemplo 6.

A Fig. 24 representa uma fotografia de um autoradiograma mostrando a amplificação por PCR utilizando-se iniciadores PCR contendo uma substituição ribonucleotídica única e as suas respectivas extremidades 3' como demonstrado no Exemplo 6A.

A Fig. 25 representa uma fotografia de um autoradiograma mostrando a quantificação do produto de amplificação derivado por PCR modificado por ribonucleótido por comparação com padrões como demonstrado no Exemplo 6A.

A Fig. 26 é uma fotografia de um autoradiograma mostrando a destruição quantitativa de um produto de amplificação derivado por PCR modificado por ribonucleótido utilizando-se RNase A como um agente de corte, como demonstrado no Exemplo 6B.

A Fig. 27 é uma fotografia de um autoradiograma mostrando a destruição de "pré-amplificação" efectiva de um produto de amplificação derivado por PCR modificado por ribonucleótido utilizando-se uma base forte como um agente de corte, como demonstrado no Exemplo 6C.

A Fig. 28 é um diagrama que representa uma sequência de

amplificação de HIV de 45 pares de bases e as correspondentes sondas de amplificação modificadas ribonucleotídicas utilizadas para gerar o produto de amplificação derivado por LCR modificado ribonucleotídico do Exemplo 7.

A Fig. 29 é uma fotografia de um autoradiograma mostrando a amplificação por LCR utilizando-se sondas de amplificação contendo uma única substituição ribonucleotídica nas suas extremidades 3' respectivas, como demonstrado no Exemplo 7A.

A Fig. 30 é uma fotografia de um autoradiograma que mostra a quantificação de produto de amplificação derivado por LCR modificado ribonucleotídico por comparação com padrões, como demonstrado no Exemplo 7A.

A Fig. 31 é uma fotografia de um autoradiograma mostrando a destruição de "pré-amplificação" efectiva de produto de amplificação derivado por LCR modificado por ribonucleotídico utilizando-se uma base forte com um agente de corte, como demonstrado no Exemplo 7B.

A Fig. 32 é uma fotografia de um autoradiograma que mostra a destruição quantitativa de produto de amplificação derivado por LCR modificado ribonucleotídico utilizando-se RNase A como um agente de corte, como demonstrado no Exemplo 7C.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção permite a formação provocada pelo produto de amplificação contaminante ou eliminá-lo através da incorporação de pelo menos uma modificação no produto de amplificação. O produto de amplificação modificado é facilmente distinguível da sequência alvo numa amostra de ensaio e pode ser

eliminado selectivamente.

A fim de mais claramente se entender a presente invenção, é útil indicar as definições de certos termos que se utilizarão posteriormente.

Amplificação significa o aumento do número de cópias de uma sequência de ácido nucleico numa amostra para ensaio. As cópias que são geradas durante a Amplificação podem ser cópias exactas ou complementares. Além disso, as cópias podem ser modificadas por um meio que controle a contaminação. A Amplificação pode processar-se de uma forma linear ou de uma maneira exponencial, isto é, a uma velocidade maior do que a Amplificação linear.

Sequência de ácido nucleico é um ribonucleotídico ou um desoxiribonucleótido que pode ser modificado relativamente a: (1) à estrutura de fosfato; (2) aos nucleósidos; e/ou (3) ao radical de açúcar do oligonucleótido. As sequências de ácido nucleico podem conter marcadores ou outros radicais ligados a estas e podem ser interrompidas pela presença de ainda outros grupos, caso a hibridação possa verificar-se.

A sequência alvo é a sequência de ácido nucleico a procurar em um ensaio particular.

A sequência de amplificação é uma extensão designada de uma sequência alvo que inicialmente actua como sequência matriz num processo de amplificação. A sequência de amplificação pode compreender a extensão completa da sequência alvo ou uma sua fracção representativa.

Sequência Matriz é a sequência de ácido nucleico sobre a qual produto de amplificação se forma. No primeiro ciclo de amplificação, a sequência de amplificação actua como a sequên-

cia matriz. Nos ciclos subsequentes de amplificação, o produto de amplificação também serve como uma sequência matriz.

"Sonda de amplificação" é uma sequência de ácido nucleico que é: (1) ou complementar de uma fracção de uma cadeia única de uma sequência de amplificação de dupla cadeia; ou, (2) uma porção complementar ou idêntica a uma sequência de amplificação de cadeia única. As sondas da amplificação hibridam com a sequência de amplificação suficientemente adjacente para cada uma permitir que as sondas se unam. A "sonda de amplificação" pode ou não ser modificada em uma ou em ambas as extremidades para se unirem com outras "sondas de amplificação". Além disso, uma "sonda de amplificação" pode eventualmente ser modificada pela incorporação de um meio para controlar a contaminação.

"Iniciador de amplificação" é utilizado aqui para referir uma sequência de ácido nucleico que é complementar a uma fracção da extremidade de uma sequência de amplificação e que é capaz de actuar como um ponto de iniciação de síntese de um produto de extensão inicial que é complementar da sequência de amplificação. O produto da extensão iniciador é formado na presença de nucleótidos e de um agente para polimerização tal como a DNA polimerase. Um "iniciador de amplificação" pode eventualmente ser modificado pela incorporação de um meio que controle a contaminação.

"Sonda ou iniciador pré-sintetizado" é utilizado para significar uma sequência oligonucleotídica que foi sintetizada antes de ser adicionada a uma mistura reaccional da amostra de ensaio.

"Extremidade prolongada" de um iniciador de amplificação significa a extremidade de um iniciador de amplificação que actua

de acordo com uma polimerase para formar o produto de extensão. A "extremidade prolongada" poderá ser a extremidade 3'.

"Produto de amplificação" refere-se a uma cópia idêntica e/ou à cópia complementar de uma sequência de amplificação. O "produto de amplificação" é sintetizado in situ durante um processo de amplificação. O "produto de amplificação" pode ser ligado com uma sequência de ácido nucleico que é produzida pela ligação de uma série de sondas de amplificação que hibridam de forma contígua para uma sequência de amplificação. O "produto de amplificação" pode também ser o produto de extensão de uma reação de cadeia de polimerase. O termo "produto de amplificação" inclui o produto de amplificação modificado.

"Produto de amplificação modificado" é utilizado para referir o produto de amplificação que contém pelo menos um sítio de modificação.

"Sítio de modificação" refere-se a uma localização única em que foi incorporado um meio para controlar a contaminação do produto de amplificação em um produto de amplificação. Um "sítio de modificação" inclui, por exemplo, mas sem limitação, a introdução de um ligando, a introdução de um agente de ligação cruzada ou um sítio de cisão química e alteração de base(s) para alcançar um sítio de reconhecimento de enzima.

"Produto de amplificação contaminante" é o produto de amplificação que é introduzido numa amostra de ensaio por meio de um meio diferente da amplificação da sequência originalmente presente numa amostra de ensaio. O "produto de amplificação contaminante" pode, por exemplo, ser o resultado de um transporte mecânico ou de uma contaminação transportada pelo ar de uma amostra de ensaio com o produto de amplificação de uma amostra ou de amos

tras amplificadas anteriormente.

"Complementar" refere-se a uma complementaridade suficiente para permitir a ocorrência de hibridação. Não é necessária a complementaridade completa.

"Substancialmente complementar" refere-se a complementaridade em que pelo menos uma das bases está trocada.

"Sítio de pseudo-restrição" é uma sequência de resíduos de ácido nucleico que pela alteração de pelo menos um nucleótido representa um sítio de reconhecimento de enzima de restrição. Embora o termo "alteração" seja utilizado, os "sítios de pseudo-restrição" são de ocorrência natural e deve considerar-se que qualquer sequência nucleotídica que não represente um sítio de restrição poderá ser um "sítio de pseudo-restrição".

Um "sítio de pseudo-restrição preferido" é um sítio de pseudo-restrição que requer apenas a modificação de uma base para alcançar um sítio de reconhecimento de enzima de restrição.

"Sítio de reconhecimento" é utilizado para significar a sequência específica reconhecida por uma enzima, tal como um endonuclease de restrição ou um RNase .

"Sítio de cisão de enzima" significa uma ligação fosfodiéster que é hidrolisada por uma enzima tal como uma endonuclease de restrição ou uma RNase.

"Endonuclease de restrição de corte remoto" ou "cortador remoto" é uma endonuclease de restrição que corta DNA de cadeia dupla num sítio exterior do sítio de reconhecimento da enzima.

A presente invenção diz respeito a um meio para controlar a contaminação do transporte de um produto de amplificação contaminante. O produto de amplificação modificado é criado, co

mo uma parte do processo de amplificação, pela incorporação de pelo menos um sítio de modificação no produto de amplificação de tal modo que o produto de amplificação modificado é distinto da sequência alvo. Como resultado desta modificação, o produto de amplificação contaminante modificado pode ser eliminado selectivamente mediante a remoção, destruição ou, de outra forma que inviabilize o produto de amplificação modificado como sequência matriz para eventos de amplificação subsequentes. O meio para a eliminação selectiva do produto de amplificação modificado evidentemente que varia no que se refere à modificação particular incorporada no produto de amplificação.

É possível incorporar um método de controlo da contaminação da presente invenção num tratamento de pré-amplificação ou num tratamento de pós-amplificação, ou numa associação de ambos os tratamentos de pré e pós amplificação das amostras de ensaio. No caso de tratamento de pós-amplificação, o produto de amplificação modificado é eliminado selectivamente das amostras de ensaio amplificadas após se completar o processo de amplificação. Este processo minimiza efectivamente a dissiminação do produto modificado através do espaço laboratorial ou de trabalho onde pode contaminar novas amostras de ensaio, produzindo deste modo falsos positivos. O tratamento após a amplificação, contudo, não elimina completamente o problema da contaminação, porque em algum grau a contaminação do ar ocorrerá através do processo simples de abertura de um tubo de reacção para adicionar reagentes (por exemplo um agente de corte) necessários para eliminarem selectivamente o produto contaminante.

Na maioria dos casos, contudo, é possível e de facto preferido o "pré-tratamento" das novas amostras de ensaio para

selectivamente eliminar o produto de amplificação modificado contaminante antes de se submeter as novas amostras à amplificação. No caso de tratamento antes da amplificação, o produto de amplificação modificado pode contaminar novas amostras, com o produto de amplificação contaminante a ser substancialmente removido ou destruído sem ser nas próprias novas amostras de ensaio.

Quando os reagentes de amplificação (por exemplo, sondas ou iniciadores de amplificação) são susceptíveis de destruição pelo mesmo agente que se utiliza para eliminar selectivamente o produto de amplificação contaminante, será necessário adicionar os reagentes de amplificação após o tratamento de pré-amplificação na amostra de ensaio. Quando, contudo, os reagentes de amplificação são resistentes à destruição pelo agente utilizado para eliminar selectivamente o produto contaminante (por exemplo quando se utilizam certos tipos de sítios de modificação de reconhecimento de enzima de restrição remotos ou substituições ribonucleotídicas), o agente destruidor pode ser adicionado à amostra de ensaio imediatamente antes da amplificação, isto é, após a adição na amostra de ensaio de todos os reagentes necessários, proporcionando deste modo o maior grau de controlo da contaminação.

O método da presente invenção permite controlar a contaminação de transporte de um modo económico, fiável e eficiente. Isto é particularmente importante num conjunto de diagnóstico quando os processos de amplificação são rotineiramente aplicados. Nestes tipos de conjuntos o mesmo analisável é continuamente ampliado uma vez e outra ainda, complicando mais o problema da contaminação do produto de amplificação das novas amostras.

Quanto maior é o período em que o analisável em causa é analisado, maior é o problema da contaminação. Por exemplo, a aspiração de apenas 1 μ l de uma única amostra de 100 μ l, que foi ampliada para 100 em fotomoles de produto de amplificação, libertará 600 milhões de cópias no ar do alvo. Se, eventualmente, se dispersam num meio de trabalho ambiental típico, isso resulta numa concentração de aproximadamente 350 moléculas de produto de amplificação contaminante para cada polegada cúbica de área de trabalho.

A solução para a contaminação de transporte proporcionada pela presente invenção não requer fases de frequente elaboração e de esforços dos métodos anteriores. Por exemplo, a presente invenção elimina a necessidade de utilizarem câmaras separadas para a introdução, amplificação e detecção de novas amostras de ensaio. Identicamente, o uso de roupas descartáveis, pipetas de deslocamento positivo dispendiosas e canalização descartável especial e dispositivos de manipulação da amostra são também desnecessários. O método proporcionado aqui tem uma menor variação inerente e não contém as limitações auto impostas dos métodos anteriores tais como, por exemplo, a limitação da quantidade de padrão que se desenvolve conjuntamente com o processo de amplificação. Serão evidentes aos técnicos nesta matéria muitas outras vantagens do método da presente invenção.

O método da presente invenção contempla e abrange a introdução de um número de diferente tipo de modificações no produto de amplificação que é gerado e num processo de amplificação. O que é importante na selecção de uma modificação particular é que a modificação proporciona um meio para distinguir e/ou separar ou destruir o produto de amplificação da sequência

alvo no subsequente ensaio das amostras de ensaio. Neste sentido, o produto de amplificação contaminante é removido, destruído ou de outro modo inviabilizado como uma matriz para a amplificação antes da amplificação da sequência alvo na nova amostra de ensaio tratada.

Os tipos de modificação úteis para distinguir o produto de amplificação contaminante serão evidentes para os técnicos nesta matéria com base nos ensinamentos da presente invenção. Estas modificações podem incluir, por exemplo, a introdução de um ligando, a introdução de um agente de ligação cruzada ou a introdução de um sítio de reconhecimento de enzima (incluindo sítios de reconhecimento de enzima de restrição) ou outro grupo eliminável apropriado.

Certas modificações da presente invenção terão um maior número de limitações do que outras, como será descrito mais por menorizadamente. Como uma consequência, certas modificações se rão preferidas em certas situações, dependendo das características de um analisável particular. A modificação preferida para um produto de ampliação tem um dado processo de ensaio será evidente para o técnico corrente nesta matéria com base nas características do analisável que se irá ampliar e nos ensinamentos da presente invenção.

Uma modificação é preferencialmente incorporada num produto de amplificação utilizando-se sondas de amplificação previamente sintetizadas ou iniciadores que contenham a modificação escolhida. A amplificação com estas sondas ou iniciadores modificados será será por seu lado incorporada a modificação ou modificações no produto ou produtos de amplificação completos. A modificação das sondas de amplificação ou dos iniciadores pode ser

realizada por qualquer um dos numerosos métodos que são conhecidos dos técnicos nesta matéria. No caso de ligandos ou outros tipos similares de modificações, por exemplo, a modificação pode ser introduzida na sonda oligonucleotídica completada ou no iniciador após a síntese do oligonucleotídico. No caso de sítios de reconhecimento de enzima, a modificação ou modificações pode simplesmente ser substituída na sonda oligonucleotídica ou no iniciador durante a síntese. É também possível, no caso de PCR, ampliar o alvo com polimerase na presença de um ou mais nucleósido trifosfatos modificados para gerar o produto de amplificação modificado. (Ver por exemplo, Langer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(11), 6633-6637, (1981).

O número de sítios de modificação incorporado em um produto de amplificação modificado pode também variar embora o sítio seja usualmente suficiente para reduzir de forma significativa a contaminação. Na maioria dos casos, é, de facto, preferível incorporar apenas um sítio de modificação devido à redução esperada na eficiência do processo de amplificação de, por exemplo, impedimento estérico (causado pela introdução de radicais vultuosos), interferência com a hibridação (causada pela destruição) de ligações de hidrogénio entre nucleótidos complementares), ou a ausência de complementaridade total das sondas ou dos iniciadores de amplificação com o alvo (causada pela incorporação de sítios de reconhecimento de enzima de restrição). Neste último caso, contudo, será considerado que a perda de eficiência de ciclização será principalmente no primeiro ciclo da ampliação onde apenas a sequência de ampliação tem complementaridade substancial com a sonda ou com o iniciador modificados que servem como matriz. Portanto, a perda de eficiência espera

da diminuirá proporcionalmente com o aumento da quantidade relativa do produto de amplificação que actua como matriz (e tendo complementaridade completa com as sondas ou com os iniciadores).

Quando o produto de amplificação não é desnaturado após o ciclo final da ampliação é apenas necessário modificar uma sonda ou iniciador de amplificação. Neste caso, o produto de amplificação modificado resultante terá cadeia dupla, permitindo que ambas as cadeias sejam removidas ou destruídas através de uma modificação que é incorporada apenas em uma das cadeias. Se, contudo, a mistura reaccional da amostra de ensaio é submetida a uma fase de desnaturação, após o ciclo de ampliação final, ambos os iniciadores de amplificação e pelo menos duas sondas de amplificação de cadeia oposta têm que ser modificados (isto é, que representam as cadeias superior e inferior dos pares da sonda) a fim de assegurar que todo o produto da ampliação contami-nante é substancialmente inviabilizado pela hibridação subsequen-te.

Quando se introduziu um ligando no produto de ampliação, o produto de ampliação modificado do ligando resultante pode ser selectivamente eliminado fazendo-se contactar a amostra de en-saio contendo o produto de ampliação modificado com o parceiro de ligação específico imobilizado para o ligando. O suporte de imobilização é, em seguida, removido como companheiro do produ-to de ampliação modificado pela ligação com o ligando. Quando se realiza a eliminação selectiva numa nova amostra de ensaio (isto é, antes da iniciação de um processo de ampliação) o parceiro de ligação específica imobilizado deve ser submetido ao contacto com a nova amostra de ensaio antes da sonda de amplificação ou dos reagentes iniciadores da ampliação serem adiciona-

dos à nova amostra de ensaio. Se a mistura reaccional da nova amostra de ensaio se faz contactar após a adição destes reagentes, as sondas ou os iniciadores modificados nos reagentes serão extraídos da solução conjuntamente com o produto de ampliação contaminante.

O ligando que é incorporado como a modificação será de preferência um membro mais pequeno de um par de ligação específico, porque assim minimizará a redução na eficiência de amplificação que se espera devido ao impedimento estérico provocado pela presença de um ligando na sonda de ampliação ou iniciadores. Um exemplo de um ligando preferido é a biotina. Outro ligando preferido é a fluoresceína. O ligando é introduzido em, pelo menos, um iniciador de amplificação, no caso de PCR, ou em, pelo menos, uma sonda de amplificação no caso de LCR. A Figura 1 apresenta uma modificação de ligando do produto de ampliação resultante de um tipo de reacção de cadeia de ligase do processo da ampliação (produto da ampliação derivado de LCR) e remoção subsequente do produto de ampliação modificado com um parceiro de ligação específico imobilizado para o ligando. A Figura 2 apresenta um esquema idêntico relativamente ao produto de ampliação derivado de uma reacção de cadeia de polimerase (produto de ampliação derivado de PCR). O produto de ampliação modificado por biotina ou por fluoresceína resultante pode ser removido das amostras de ensaio subsequentes fazendo-se contactar estas amostras com avidina ou anticorpo antifluoresceína imobilizados, respectivamente.

Na realização de modificação do ligando da presente invenção, prefere-se modificar a sonda ou o iniciador de ampliação numa localização da sonda ou do iniciador que não interfira com

a acção de alguma enzima ou outro reagente utilizado no processo de ampliação; por exemplo, polimerase no caso de uma reacção de ampliação do tipo de cadeia de polimerase (PCR) do processo de ampliação e ligado no caso de um processo de ampliação de tipo reacção de cadeia de ligase. Nas situações em que a polimerase pode "ler até ao fim" ("read through") através do sítio de modificação num processo de ampliação do tipo PCR, o iniciador da amplificação pode ser modificado em ou próximo de outra qualquer localização além da extremidade prolongada do iniciador. Quando, no entanto, a polimerase não pode "ler até ao fim" através do sítio de modificação o iniciador de PCR deve ser modificado na sua extremidade 5'.

Porque os processos de ampliação do tipo LCR não utilizam uma polimerase, as limitações da leitura até ao fim da enzima não são uma relação com a localização dos sítios de modificação do ligando nas sondas de ampliação. No caso de LCR, prefere-se em geral modificar a sonda de ampliação em qualquer localização muito diferente das extremidades contíguas. Para as sondas de ampliação que formam um segmento de extremidade do produto de ampliação, também é possível modificar estas sondas nas suas extremidades de não ligação. De outro modo, todas as sondas de ampliação serão de preferência modificadas próximo da região central da sonda.

As sondas de amplificação ou iniciadores podem ser modificados com os ligandos preferidos de fluorosceína ou biotina utilizando-se métodos convencionais. Por exemplo, a sonda oligonucleotídica ou o iniciador pode modificar-se com um ligando utilizando um processo de duas fases, em que um grupo amina é introduzido primeiro durante a síntese do oligonucleotídico. A

ligação, oxidação, desprotecção e remoção seguintes do iniciador oligoamínico , ou sonda de suporte utilizada durante a síntese pode ligar-se o ligando.

Outros meios para controlar a contaminação dos transportes do produto de ampliação contaminante envolvem a incorporação de um agente de ligação cruzada ligado por covalência a pelo menos uma das sondas de ampliação ou iniciadores utilizados por um processo de ampliação. O agente de ligação cruzada do produto de ampliação modificado resultante pode ser activado química ou fotoquimicamente para ligação cruzada covalente com o produto de amplificação modificado com cadeias de ácido nucleico complementares. As cadeias de ácido nucleico complementares podem ser complementarmente modificadas ou produto de ampliação não modificado ou podem estar sob a forma de DNA veicular se o produto de ampliação modificado foi desnaturado. Neste último caso, ambas as cadeias do produto de ampliação têm que ser modificadas para substancialmente todo o produto de ampliação resultante ser selectivamente eliminado.

O produto de amplificação modificado com ligação cruzada irreversível será um produto de ampliação modificado inerte a qualquer ampliação posterior por impedimento de desnaturação completa do produto de ampliação complementar modificado após este ponto. Em alguns casos, existirá o risco de danificação do ácido nucleico alvo em uma nova amostra de ensaio por tratamento da amostra com um activador apropriado para o agente de ligação cruzada. Este risco pode ser evitado, contudo, quando grupos de foto ligação cruzada foram preparados para absorver a luz num comprimento de onda que não é nocivo para os ácidos nucleicos alvo. O tratamento da nova amostra de ensaio deve, contudo, processar-se na ausência de novos reagentes de sonda de ampliação

a fim de destruir o produto contaminante sem exercer ligação cruzada por novos reagentes.

O agente de ligação cruzada é incorporado na sonda(s) ou no iniciador(es) de ampliação utilizando-se métodos convencionais. Num tipo LCR de processo de ampliação, prefere-se localizar o agente de ligação cruzada no meio de uma sonda de ampliação que por sua vez se incorporará o agente de ligação cruzada próximo do centro do produto de ampliação resultante como é praticamente possível. No que se refere à sonda de ampliação comportando o agente de ligação cruzada, é muito preferido localizar o agente de ligação cruzada na região central da sonda de forma a não interferir com a junção ou ligação das extremidades da sonda modificada. Na Figura 3 isto está representado, onde a modificação de ligação cruzada é incorporada no produto de ampliação a partir de um par médio de sondas de um conjunto de três pares de sondas de ampliação.

No caso de um processo de ampliação do tipo PCR, é preferido incorporar o agente de ligação cruzada tão próximo quanto possível da extremidade prolongada de um iniciador de ampliação sem que intervenha significativamente com a polimerase. Como no caso de uma modificação de ligando, se a presença de um agente de ligação cruzada interfere com a capacidade de leitura total da polimerase utilizada para a extensão do iniciador, a modificação deve ser colocada de preferência na extremidade 5' do iniciador. A Figura 4 representa a incorporação de uma modificção de ligação cruzada do produto de ampliação derivado por PCR utilizando-se um iniciador previamente sintetizado que foi modificado em ou cerca da zona média do iniciador.

É mais preferido, contudo, modificar o produto de ampliação pela incorporação de, pelo menos, um sítio de reconhecimento

de enzima num produto de ampliação como um meio para controlar a contaminação de transporte. O sítio de reconhecimento da enzima pode ser introduzido no produto de ampliação através da aplicação dos reagentes de ampliação modificados (por exemplo, sondas ou iniciadores de ampliação modificados). Na ampliação do tipo PCR é também possível introduzir o sítio de reconhecimento da enzima por meio da utilização de nucleosido trifosfato modificado que em seguida podem servir como sítio de reconhecimento de enzima e como um substrato para a polimerase.

O sítio de modificação de reconhecimento da enzima torna o produto de amplificação modificada resultante receptivo à subsequente destruição por uma enzima que separará selectivamente o produto de ampliação mas que deixa o alvo ou a sequência de ampliação intacta.

Exemplos de sítios de reconhecimento de enzima incluem mas não estão limitados a sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e sítios de reconhecimento de RNase.

Como os outros tipos de modificações, é possível incorporar uma diversidade de sítios de modificação de reconhecimento de enzima no produto de amplificação. É, evidente, que se prefere incorporar os sítios de modificação de reconhecimento de enzima em o produto de amplificação numa localização ou localizações que, quando cindidas, resultarão na mais completa destruição do produto de amplificação. A localização preferida para o sítio de reconhecimento da enzima pode variar relativamente ao sítio que se pensa constituir a amostra para a análise, e isso será, no caso de sítios de reconhecimento de enzima de restrição, determinado, em algum grau, pela localização e pelo número dos sítios de pseudo-restrição preferidos, na sequência al-

vo. Quando, apenas se utiliza um sítio de reconhecimento de enzima para modificar o produto de ampliação, este será habitualmente preferido colocado no sítio de reconhecimento de enzima como de forma central no produto de ampliação completado, para se alcançar a possível maior destruição eficaz.

A localização central de um único sítio de reconhecimento de enzima é mais facilmente alcançado com o produto de ampliação derivado de LCR do que com o produto de ampliação derivado de PCR. Isto porque é possível um controlo maior na construção do produto de ampliação utilizando-se sondas de ampliação LCR sintetizadas previamente do que disponível relativamente às porções predominantes de um produto de amplificação derivado de PCR que são necessariamente sintetizadas in situ durante a ampliação. Por exemplo, com o produto de ampliação derivado de PCR, é habitualmente necessário colocar pelo menos uma parte do sítio de reconhecimento único da enzima na porção iniciadora da ampliação do produto de ampliação, em vez de ter um sítio de restrição completo localizado algures na porção prolongada de polimerase que representa a vasta região central do produto de ampliação completo. Em contraste, um único sítio de reconhecimento de enzima pode ser facilmente introduzido no meio dos produtos de amplificação utilizando-se um processo de amplificação do tipo LCR.

Limitações adicionais, elas próprias estão presentes no que se refere à colocação de um sítio de reconhecimento de uma enzima única em um produto de ampliação derivado de PCR. Mais evidente, é a colocação de um sítio de modificação de reconhecimento da enzima o mais central no produto de ampliação completo colocará a modificação na extremidade prolongada do iniciador da

ampliação. Devido a esta extremidade do iniciador actuar através da polimerase para formar o produto da extensão no processo de ampliação de PCR, a colocação de um sítio de modificação em ou próximo deste local potencialmente poderá interferir com a extensão de polimerase para formar o produto de ampliação, e pode portanto diminuir a eficiência da ampliação onde a sequência alvo actua como uma sequência matriz. Quando, contudo, se pretendem sítios de reconhecimento de enzima múltiplos é possível incorporar estes sítios de modificação múltiplos em a fracção central (polimerase prolongada) do produto de amplificação resultante utilizando-se um ou mais nucleósidos trifosfatos, tais como, por exemplo, um ribonucleótido trifosfato (reconhecido por um RNase) em vez de o dextriribonucleósido trifosfato correspondente durante a ampliação.

A fim de se realizar o método da presente invenção utilizando-se um sítio de modificação de reconhecimento de enzima reconhecido por RNase sintetiza-se previamente uma porção seleccionada de uma sonda de ampliação utilizando-se séries de bases de RNA em lugar de bases de DNA que formam o restante produto de ampliação. As séries de bases de RNA podem ser tão pequenas quanto uma base de RNA na sua extensão (no caso de RNase A), ou várias bases de extensão (no caso de RNase H), ou a extensão total do produto de amplificação. Diferentemente da incorporação dos sítios de reconhecimento de enzima de restrição, os sítios de reconhecimento de RNase não resultam necessariamente de uma perda de eficácia devido à desnecessidade de se sacrificar a complementaridade total, no último caso. Não somente pode existir a complementaridade total com substituições de base de RNA mas a formação de RNA/DNA híbridos pode ser até mais forte do

que os híbridos de DNA/DNA. As localizações preferidas para as séries de bases de RNA serão evidentes para os técnicos nesta matéria através da experimentação mínima à luz dos ensinamentos da presente invenção. De um modo geral, prefere-se que as séries de base de RNA sejam pelo menos cerca de uma a três bases de extensão, dependendo da RNase particular escolhida como agente para a eliminação selectiva do produto de ampliação modificado.

Podem-se utilizar diferentes tipos de enzimas de RNase para destruir um sítio de modificação de reconhecimento de RNase que está incorporado no produto de ampliação modificado. Uma RNase preferida é a RNase H. A RNase H é específica para híbridos RNA/DNA e separará somente as bases de RNA, no duplex, deixando intacta a cadeia de DNA. Quando se utiliza RNase H para destruir o produto de ampliação modificado do sítio de reconhecimento de enzima, é importante que o sítio de reconhecimento de RNase seja incorporado em ambas as cadeias do produto de ampliação modificado e além disso, que a localização dos sítios de reconhecimento de RNase alvo estejam em diferentes locais de ampliação do produto. Neste sentido, o sítio de reconhecimento de RNase em cada cadeia está localizado em oposição a uma cadeia de DNA do produto de ampliação complementar, permitindo a RNase H separar ambas as cadeias duplex do produto de ampliação modificado.

Porque a enzima RNase H não separa duplexes de RNA/RNA ou DNA/DNA, o produto de ampliação contaminante que pode ser transportado para uma nova amostra de ensaio pode ser eliminado selectivamente sem receio de, inadvertidamente, destruir a sequência de DNA alvo que pode hibridar com o produto de ampliação modificado.

Outros tipos de enzimas RNase preferidos conhecidos como

específicos para RNase de cadeia única, incluem, por exemplo, RNase A, RNase C13, RNase T₂ e RNase U₂. Quando estes tipos de enzimas são utilizados, não existirá perigo de separar o DNA alvo. É particularmente preferida RNase A, porque a sua especificidade é devida a uma substituição de ribonucleotido único.

É ainda possível incorporar um sítio de modificação de reconhecimento de enzima que é reconhecido por uma enzima de restrição. Cada sítio de modificação de enzima de restrição no produto de amplificação será o substancialmente complementar a um pseudo-sítio de restrição na sequência de ampliação. É preferido que o sítio da enzima de restrição seja introduzido no produto de amplificação com um número mínimo de imperfeições no que se refere à sequência alvo. É ainda mais preferido que apenas uma base seja alterada para introduzir o sítio de reconhecimento, isto é, que o sítio de reconhecimento da enzima de restrição se localize opostamente a um sítio de pseudo-restrição preferido.

A selecção da(s) enzima(s) de restrição e de um sítio de modificação de enzima(s) de restrição correspondente(s) em um produto de amplificação particular será influenciada por um número de factores que inclui o custo e a disponibilidade de várias enzimas de restrição. É ainda importante e preferido escolher uma enzima que tenha uma grande eficiência de corte no que se refere ao produto de amplificação sintético que é gerado através de um processo de amplificação. Algumas enzimas de restrição, por exemplo, consideram-se que cindem sequências oligonucleotídicas sintéticas de forma muito menos eficiente do que as sequências do tipo natural. Enzima(s) de restrição preferida(s)

para uma dada amostra de análise e sistema de amplificação serão evidentes para um técnico com base nas indicações da presente invenção.

A incorporação de um sítio de modificação de enzima de restrição num produto de ampliação realiza-se de preferência começando por a selecção da sequência alvo de uma sequência de ampliação que contenha pelo menos um sítio de pseudorestrição preferido. Quando estão contidos um certo número de sítios de pseudorestrição preferidos na sequência de amplificação designada, haverá mais opções disponíveis no que se refere à localização da modificação do sítio ou sítios de restrição no produto de ampliação modificado. Antes da selecção final do sítio ou sítios de modificação de enzima de restrição do produto de ampliação, é importante sondar a sequência de ampliação total para confirmar que não existem sítios de restrição de ocorrência natural sequência de amplificação que possam ser submetidos à acção de enzima de restrição escolhida para separação selectiva do produto de ampliação modificado. Se existem estes sítios de ocorrência natural, deve escolher-se um sítio de modificação de enzima de restrição alternativo, porque de outro modo a sequência de ampliação será destruída com o produto de ampliação modificado.

Em geral, as enzimas de restrição estarão aptas para separar somente o produto de ampliação modificado que é de cadeia dupla. Portanto, o sítio de restrição do produto de ampliação modificado não deve ser desnaturado antes do contacto com a enzima de restrição apropriada. Será, contudo, necessário desnaturar em certos sistemas de detecção o produto de amplificação. Quando um sistema de detecção que utiliza sondas complementa-

res, como descrito no Pedido de Patente de Invenção Internacional Nº 89/02649, foi utilizado, será ainda possível separar o produto desnaturado tanto quanto o sítio de restrição é incorporado em sondas de detecção e o duplex de sonda de amplificação/sonda de detecção resultante não é desnaturado.

A modificação de um produto de amplificação derivado de LCR com um único sítio de modificação de enzima de restrição está representada na Figura 5. Neste diagrama, estão ligados três pares de sondas para formar o produto de amplificação, com um par médio de sondas contendo o sítio de modificação de reconhecimento de enzima de restrição. Isto resulta em um produto de amplificação modificado derivado de LCR susceptível à acção de uma enzima de restrição que destruirá o produto de amplificação modificado por corte deste em, aproximadamente, metade. A sequência de amplificação do alvo é resistente à acção da enzima e permanece no seu estado natural. Neste aspecto, contudo, novas amostras para ensaio devem ser tratadas para se remover o produto de amplificação contaminante antes da adição de novos reagentes de sonda, porque os pares de sondas de amplificação modificados, necessárias para o processo de amplificação seguinte, poderão também ser destruídos.

A Figura 6 representa o mesmo sítio de modificação único incorporado em um iniciador de amplificação utilizado em um processo de amplificação do tipo PCR. O produto de amplificação modificado derivado de PCR resultante é susceptível de destruição com a mesma enzima de restrição, mas no caso do produto de amplificação derivado de PCR resultante a cisão tem lugar cerca de uma extremidade do produto de amplificação. O potencial inconveniente para este corte irregular do produto derivado de

PCR está representado na Figura 7, a qual representa o início parcial do produto de amplificação derivado de pCR separado num processo de amplificação subsequente. O início parcial ocorre porque a fracção maior do produto de amplificação cindido contém algo das bases complementares para o iniciador. O início parcial do produto de amplificação contaminante derivado de PCR cindido nos processos de amplificação subsequentes podem ainda dar origem a resultados de amostras de ensaio muito artificiais, incluindo falsos positivos.

O início parcial pode ser evitado em alguns casos se o sítio de modificação da enzima de restrição pode ser incorporado suficientemente próximo da extremidade de extensão do iniciador de forma a que o sítio de reconhecimento resultante realmente ocorra na porção prolongada de polimerase do produto de amplificação. Isto pode, contudo, ser difícil de alcançar sem a interferência com a capacidade da polimerase para iniciar a extensão do iniciador. O início parcial, pode de preferência, ser eliminado utilizando-se enzimas de restrição de corte remoto e incorporação de sítios de modificação de restrição correspondentes apropriados nos produtos de ampliação modificados de um processo de amplificação do tipo PCR. A incorporação do sítio de reconhecimento da enzima de restrição de corte remoto em um produto de amplificação derivado de PCR está apresentada na Figura 8. Neste caso, o sítio de reconhecimento de enzima de restrição de corte remoto é incorporado em um iniciador de amplificação previamente sintetizado, mas a extensão real pela enzima de restrição ocorre na fracção prolongada do produto de amplificação completo. Como resultado, o produto de amplificação derivado de PCR destruído não pode participar nos eventos de amplifi-



cação subsequente porque não existe a oportunidade para a con ocorrência de iniciação parcial.

Cortes remotos podem também ser úteis e, em alguns casos preferidos, para a modificação do produto de amplificação derivado de LCR. Quando o sítio de reconhecimento e os sítios de separação correspondentes se podem localizar nas regiões do produto de amplificação representada por diferentes pares de sondas, será possível contactar uma nova amostra de ensaio com enzima de restrição ainda que após a adição dos reagentes de sonda de amplificação querem o alvo contendo amostras sem perigo de cisão das sondas simultaneamente com a do produto de amplificação destruído contaminante. A Figura 9 apresenta a incorporação de um sítio de reconhecimento de enzima de restrição de corte remoto em um dos pares da extremidade de um conjunto de três pares de sondas de forma a que o produto de amplificação derivado de LCR terminado poderá ser separado numa posição aproximadamente média do produto completo. Neste caso, o sítio de cisão corresponde à porção do produto de amplificação completo representada pelo par médio das sondas de amplificação.

É ainda possível introduzir um sítio de cisão química em um produto de amplificação mediante a modificação da estrutura do ácido nucleico das sondas de amplificação ou dos iniciadores que são utilizados em um processo de amplificação. É de maior preferência a utilização deste aspecto em um processo de amplificação de tipo LCR de que num processo de amplificação de tipo PCR, porque a presença de um sítio quimicamente separável é idêntico a interferir com a capacidade de leitura de algumas polimerases. O produto de amplificação modificado contendo um sítio de modificação quimicamente cindível pode ser destruído me-

diante o tratamento com um reagente que cinde no sítio ou sítios de modificação. A incorporação de uma fracção quimicamente cindível pode ser capaz de minorar o problema da eficiência de corte reduzida observada em algumas das enzimas de restrição no que se refere a sequências sintéticas, uma vez que as reacções de cisão química não tem como base uma enzima biologicamente activa e, portanto, não devem distinguir entre ácidos nucleicos sintéticos ou do tipo natural. Além disso, os radicais cindíveis por via química serão separados independentemente do facto do produto de amplificação modificado ser de cadeia dupla ou de cadeia única.

Neste aspecto, os sítios de cisão podem ser incorporados em sondas previamente sintetizadas ou em iniciadores utilizando-se reagentes comercialmente disponíveis como representado na Figura 10. A sonda parcial ou a sequência iniciadora são sintetizadas previamente de forma a conterem grupos amina nas extremidades 3' ou 5' das sequências parciais. Estas extremidades marcadas com amina são em seguida ligadas com um reagente de ligação homobifuncional para formar a sequência completa mas interrompida que é utilizada como sonda ou iniciador de amplificação. Por exemplo, é possível utilizar DSP (ditiobis(succinimidil-propionato)), DST (disuccinimidil-tartarato), ou EGS (etilenoglicolbis(succinimidil-succinato)) representado na Figura 10, para ligar entre si as extremidades 3' e 5' da sonda parcial ou da sequência iniciadoras, formando-se deste modo os reagentes de sonda completos contendo o sítio de cisão. Neste caso, o produto de amplificação modificado gerado com estas sondas ou iniciadores pode ser destruído por separação com um agente de redução tal como o ditiotreitól (onde se utiliza DSP como agente de

ligação homobifuncional), um agente oxidante tal como o peridato de sódio (quando é utilizado DSP), ou hidroxilamina (quando é utilizado EGS).

Será preferível localizar um sítio de modificação separável por via química próximo do meio de uma sonda ou de um iniciador de amplificação de forma a que o rompimento da hibridação seja minimizado. É possível construir sondas ou iniciadores de amplificação modificada de forma a que estes reagentes sejam ou totalmente complementares (o grupo separável está contido numa ansa) ou substancialmente complementar (o grupo separável está substituído por um dos nucleótidos na sequência da sonda) na sequência de amplificação. Em certos casos, por exemplo, quando uma substituição ribonucleotídica proporciona um grupo separável por via química, os reagentes poderão ser completamente complementares da sequência de amplificação sem a necessidade de uma ansa.

A substituição ribonucleotídica confere ao produto de amplificação modificado resultante, simultaneamente, o sítio de reconhecimento da enzima e o sítio de cisão química mediante a incorporação da mesma ligação labil. Este produto de amplificação modificado é lábil para um ou para ambos: (1) base forte (cisão química); e, (2) certas RNase (destruição enzimática). Em qualquer dos casos, os produtos de cisão resultantes não podem continuar a funcionar como matrizes para a amplificação.

Estas ligações labéis são incorporadas de preferência no produto de amplificação modificado utilizando-se sondas ou iniciadores de amplificação contendo uma substituição ribonucleotídica única nas suas extremidades 3' respectivas. No caso de PCR, ambos os iniciadores de amplificação conterão a substituição

ribonucleotídica. No caso de LRC pelo menos uma cadeia superior e uma cadeia inferior da sonda de amplificação, conterá a substituição ribonucleotídica. Porque a substituição ribonucleotídica ocorre nas extremidades 3' das sondas ou dos iniciadores, as ligações lábeis do produto de amplificação mo dificado são realmente criadas in situ durante a amplificação. Como um resultado, os reagentes de amplificação não contêm a ligação labil (isto é, não são bases labeis), permitindo deste modo o transporte da contaminação para ser destruído por tratamento com uma base forte ou com uma RNase na presença des tes reagentes resistentes ao tratamento sem afectar a sua inte gridade para a ampliação. Além disso, a capacidade do alvo do tipo natural para servir como uma matriz para a ampliação não é praticamente afectada pelo tratamento com a base ou com RNase, permitindo a destruição do produto de amplificação contaminante remanescente lábil na presença do alvo e dos reagentes de amplificação numa nova amostra de ensaio.

Existem duas condições importantes para se gerarem pro du tos de amplificação modificados derivados de PCR ou de LCR de iniciadores de amplificação ou de sondas de amplificação modificados contendo uma substituição ribonucleotídica. Primeiro, a enzima necessária para a formação do produto de amplificação tem que operar efectivamente na presença da substituição. No caso de PCR, a polimerase deve prolongar-se de um dos grupos hidroxilo nas extremidades 3' dos iniciadores a hibridizar. No caso de LCR, a ligase deve catalizar a ligação covalente de um grupo 3'-ribose de uma sonda oligonucleotídica para um grupo 5'-fosfato de outra sonda oligonucleotídica. Segundo o produto de amplificação modificado resultante (que contém um ou mais

ribonucleotídicos internos) deve servir para uma matriz viável para os ciclos de amplificação subsequentes. Isto é, no caso de PCR, a polimerase deve ler-se através da ligação ribonucleotídica.

O método da presente invenção não se limita a processos de amplificação do tipo LCR ou PCR, mas pode ser utilizada para controlar problemas de contaminação encontrados noutros tipos de processos de amplificação tais como, por exemplo, tipos de transcrição de processos de amplificação e de reacção de renovação da cadeia.

Os exemplos seguintes são fornecidos para auxiliar a compreensão da presente invenção, cujo verdadeiro âmbito está indicado nas reivindicações apenas. Entende-se que as modificações a introduzir nos processos descritos se farão sem afastamento do espírito da presente invenção.

A fim de demonstrar a eficácia da presente invenção, utilizaram-se diferentes sequências de ácido nucleico sintéticas para simular: (1) sequências de amplificação; (2) produtos de amplificação; (3) produtos de amplificação modificados; (4) sondas de amplificação; (5) sondas de detecção; (6) iniciadores de amplificação; (7) iniciadores de detecção; e (8) um poliadaptador utilizado para determinar a eficiência de corte de enzimas de restrição em sequências sintéticas de ácido nucleico. Estas sequências sintéticas estão representadas nas figuras 11, 13, 16, 20, 23 e 28.

EXEMPLO 1

Preparação de sequências sintéticas

Preparam-se as sequências de amplificação sintéticas (AS), sondas de amplificação (AP), sondas de amplificação fosforiladas por via química (pAP), sondas de detecção (DP), sondas de detecção fosforiladas por via química (pDP), representadas na Figura 11, e DNA de polisítios utilizando-se um sintetizador Applied Biosystems model 380B (Applied Biosystems, Inc., Foster City, Califórnia), como descrito no Pedido de Patente de Invenção Internacional Nº 89/02649, cujas porções importantes estão incorporadas aqui pela referência.

Os oligonucleótidos foram fosforilados quimicamente utilizando-se um reagente de fosforilação obtível de Glen Research Corporation (Herndon, Virgínia), Catálogo Nº 10-1900-90. Este reagente foi descrito primeiro por T. Horn e M. Urdea, Tetrahedron Lett., 27, 4705-4708 (1986), e pode ser utilizado com protocolos de síntese automatizada de fosforamidite convencional. A síntese de oligonucleótidos automatizada dos instrumentos Applied Biosystem processadas na direcção 3'- 5' com o agente de fosforilação química de introdução conveniente no último ciclo da síntese. A eficiência da fosforilação foi quantificada medindo-se a quantidade de grupo dimetil dimetoxilotrilito libertado após o último ciclo. Utilizaram-se processos de desprotecção, cisão e purificação convencionais para isolar os oligonucleótidos 5' fosforilados quimicamente pretendidos.

EXEMPLO 2

Produto de amplificação modificado de sítio de restrição único
Produto de amplificação com a introdução de modificação do sítio de restrição

Este exemplo descreve a introdução de sítios de modificação de enzimas de restrição em produtos de amplificação num processo de amplificação do tipo LCR. A introdução dos sítios de modificação de enzima de restrição neste exemplo foi realizada utilizando-se sondas de amplificação previamente sintetizadas contendo os sítios de modificação de enzima de restrição para ampliação de uma sequência de amplificação contendo os sítios de pseudo-restrição preferidos correspondentes. Os sítios de modificação de enzima de restrição foram escolhidos de forma a que cada uma das seis sondas de amplificação, isto é, três pares, contivesse um sítio de modificação de enzima de restrição e também uma única base alterada relativamente à sequência de amplificação, isto é, hibridando opostamente a um sítio de pseudo-restrição preferido na sequência de amplificação.

Desejou-se ainda demonstrar a eliminação selectiva de o produto de amplificação modificado de enzima de restrição demonstrando-se que os produtos de amplificação modificados resultantes continham o sítio de modificação de enzima de restrição ampliados de forma muito pouco eficaz (isto é, substancialmente destruídos) após o tratamento com a enzima de restrição apropriado, enquanto que sequências de amplificação continham o sítio de pseudo-reconhecimento correspondentes não alterados após o tratamento com a mesma enzima de restrição.

Embora o produto de amplificação modificado (AMP_1) fosse construído para conter um sítio de endonuclease de restrição Hae III e dois Bbv I, apenas se utilizou o sítio Hae III como a modificação escolhida para demonstrar a separação do produto de amplificação. A sequência de amplificação (AS) difere do produto de amplificação relativamente apenas a três pares de

bases que são introduzidas no produto de amplificação (AMP_1) através de três pares de sondas de amplificação (AP_1/pAP_1' , pAP_2/pAP_2' , e pAP_3/pAP_3'), contendo cada um dos diferentes pares de bases. A sequência de amplificação contém os sítios de pseudo-restrição correspondentes para os sítios de endonuclease de restrição incorporados no produto de amplificação.

A. Digeste de Endonuclease de Restrição da Sequência de Amplificação

Produto de Amplificação Modificado e DNA veicular

A fim de se determinar a eficácia da cisão por enzima de restrição do produto de amplificação para destruir a sua capacidade para servir como uma matriz nos processos de amplificação subsequentes, ajustaram-se reacções de endonuclease de restrição seguintes para um volume final de 100 μ l em tampão contendo: 0,05 mg/ml de BSA (albumina de soro bovino), 50 mM Tris HCl, 6,6 mM $MgCl_2$, 6,6 mM DTT (ditiotreitól).

Reacção 1: 2 femtomoles AMP_1 + 20 unidades de enzima de restrição Hae III activa

Reacção 2: 2 femtomoles AMP_1 + 20 unidades de enzima de restrição Hae III inactivada pelo calor

Reacção 3: 2 femtomoles AS + 20 unidades de enzima de restrição Hae III activa

Reacção 4: 2 femtomoles AS + 20 unidades de enzima de restrição Hae III inactivada pelo calor

Reacção 5: 1 μ g de DNA de placenta humana + 20 unidades

de enzima de restrição Hae II activa

Reacção 6: 1 μ g de DNA de placenta humana + 20 unidades de enzima de restrição Hae III inactivada pelo calor

Incubaram-se todas as seis reacções à temperatura de 37°C durante 16 horas, seguidas de 90°C durante 10 minutos para destruir qualquer actividade de Hae III remanescente.

B. Amplificação de Sequência de Amplificação Sintética e de Produto de Amplificação Modificado de Sítio de Restrição após Tratamento com Enzima de Restrição Hae III Activa e In-activa

A sequência de amplificação (AS), o produto de amplificação modificado por sítio de reconhecimento de enzima de restrição (AMP₁), e DNA de placenta humana (HP-DNA), provenientes das seis reacções citadas anteriormente, foram ampliados em duplicado num processo de amplificação do tipo LCR de 15 ciclos utilizando-se três pares de sondas de amplificação (AP₁/pAP₁', pAP₂/pAP₂', e pAP₃/AP₃), como representado na Figura 5. Deve notar-se que estas sondas tinham três pares de bases alteradas com a sequência de amplificação mas eram completamente complementares em AMP₁.

Podem utilizar-se muitos tipos diferentes de ligases para efectuar a ligação das sondas hibridadas continuamente em um processo de amplificação do tipo LCR. Por exemplo, o pedido de patente de invenção internacional nº 89/02649 descreve a utilização de uma ligase de E. coli (disponível por New England Biolabs,

Inc., Beverly, Massachusetts) para ligar as sondas de amplificação. Geralmente, prefere-se, contudo, o uso de uma ligase estável ao calor (TSL) a fim de evitar a necessidade de adição contínua de reagente de ligase recente em cada ciclo de amplificação de LCR. Neste exemplo utilizou-se ligase de DNA HB8 estável ao calor isolada de *thermus thermophilus* (AACC nº 27634), obtida através de uma dádiva de Miho Takahashi (Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences, Protein Chemistry Laboratory, 11 Minamiooya, Machida-shi, Tokyo 194, Japan), utilizado para se ligar as sondas de amplificação através do ciclo de amplificação.

Preparou-se tampão de ligase de DNA estável ao calor numa concentração de 10x para conter 500 mM Tris HCl de pH 7,6, 66 mM $MgCl_2$, 10 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), 66 mM DTT e 500 μ g/ml de BSA.

Preparou-se tampão de impregnação para conter 11,8 mM de EDTA, 6,3 M de ureia, 0,02% de azul de brofenol e 0,02% de xileno cianol.

Uma centena de atomoles de DNA para cada uma das reacções de 1 a 4 e 5 μ g de HP-DNA de cada uma das reacções 5 e 6 foram ampliadas em duplicado utilizando-se um Perkin-Elmer/Cetus Thermocycler (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut). Cada reacção de amplificação foi iniciada com um volume de 50 μ l de 1x TSLB contendo 2 picomoles de cada uma das sondas de ampliação (AP_1/pAP_1' , pAP_2/pAP_2' , e pAP_3/pAP_3'), 0,03 unidades de TSL, e 66 μ M de NAD em tubos Eppendorf de 0,5 ml. Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral a cada tubo de reacção para impedir a evaporação durante o ciclo térmico. As reacções de amplificação processaram-se em 15 ciclos por aquecimento a 90°C durante 2 minutos e 50°C durante 5 minutos para cada ciclo.

C. Deteccção do Produto de Amplificação Modificado no Sítio de Restrição

Os produtos de amplificação foram detectados do Exemplo 1B utilizando-se dois sistemas de detecção da sonda como descrito no pedido de patente de invenção internacional nº 89/02649, cuja parte importante se incorporou aqui pela referência. A ligase de DNA HB8 e o tampão TSLB foram substituídos por ligase de E. coli e tampões de ligase E. Coli do pedido de patente de invenção internacional nº 89/02649. Utilizaram-se as sondas de detecção DP_1 e pDP_2 , representadas na Figura 11, para detectar o produto de amplificação.

A fim de proporcionar um meio para a visualização subsequente dos produtos de amplificação modificados por auto-radiografia, foi fosforilada a sonda DP_1 com $\gamma^{32}P$ -ATP e polinucleótido quinase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana) utilizando-se fósforo radioactivo com uma actividade específica aproximada de 7000 Ci/mole. Separou-se o excesso por $\gamma^{32}P$ -ATP do oligonucleótido fosforilado por meio de filtração por gel através de Sephadex G50/50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Prepararam-se as reacções de detecção com um volume final de 16 μ l de 1x TSLB e contendo um décimo das misturas de reacção de amplificação, 200 femtomoles de cada sonda de detecção ($\gamma^{32}P$ - DP_1 e pDP_2), 0,03 unidades de TSL, e 66 μ M de NAD. Completaram-se as reacções de detecção por aquecimento a 90°C durante cinco minutos e em seguida a 50°C durante 10 minutos. Retiveram-se em seguida as reacções mediante a adição de igual volume de tampão de impregnação, seguido de aquecimento à tempe

ratura de 90°C durante mais três minutos. Separam-se os produtos por Electroforese das misturas reaccionais em um gel de desnaturação a 15% poliacrilamida e visualizaram-se por autoradiografia (ver Figura 2). As eficácias de ampliação relativas foram avaliadas com base em sinais de densidade de laser em um LKB UltroScan tm XL (Pharmacia LKB Biotech, Inc., Piscataway, New Jersey).

O produto de amplificação cindido (reacção 1, faixas 1 e 2) ampliou apenas 7% tão eficazmente como o produto de amplificação não cindido (reacção 2, faixas 3 e 4). Isto corresponde a uma redução eficaz efectiva do produto de amplificação contaminante cerca de 93%.

A sequência de amplificação cindida (reacção 3) e não cindida (reacção 4) (faixas 5 e 6 e 7 e 8, respectivamente) apresentou uma ampliação com um grau de eficácia aproximadamente idêntico. Isto demonstra que a sequência de amplificação que continha os sítios de reconhecimento da pseudo enzima de restrição não é afectada pelos tratamentos com a mesma enzima de restrição que destrói o produto de amplificação modificado correspondente.

O HP-DNA veicular separado (reacção 5) e não separado (reacção 6), (faixas de 9 a 12), não exibiu sinal o que indica que os sinais nas faixas de 1 a 8 não são devidos a quaisquer interacções não específicas com o DNA ou outros componentes das misturas reaccionais.

Deve notar-se que a sequência de amplificação não separada (AS, reacção 4, faixas 7 e 8) amplia apenas 18% tão eficazmente quanto o produto de amplificação não separado (AMP₁, reacção 2, faixas 3 e 4). Este facto é muito provavelmente devido a

que as sondas de amplificação contêm três alterações relativamente à sequência de amplificação e são totalmente complementares apenas com o produto da amplificação.

Exemplo 3

Avaliação de Enzimas de Corte Remoto

Deve notar-se que o produto de amplificação modificado proveniente do Exemplo 2 pode também ser separado com Bbv I, a enzima de restrição de corte remoto. Neste caso, a sonda de amplificação AP_1/pAP_1' , pAP_2/pAP_2' , e pAP_3/AP_3' do Exemplo 2 não devem ser separadas pela enzima Bbv I. Outras enzimas de restrição de corte remoto podem ser utilizadas para cindir o produto de amplificação modificado correspondentemente por processos de amplificação PCR ou tipo LCR.

A fim de identificar enzimas de corte remoto com graus relativamente altos de eficácia de corte, seleccionaram-se oito enzimas diferentes adquiridas de New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts) para a avaliação do uso potencial como "cortadores remotos" no sítio de modificação de reconhecimento de enzima de restrição da presente invenção. Foi designada uma sequência de DNA de cadeia dupla de 42 bases para conter os sítios de reconhecimento de enzima de restrição para todas as enzimas de restrição de corte remoto, como representado na Figura 13. As cadeias inferior e superior desta sequência de DNA de polisítios foram sintetizadas utilizando-se um sintetizador Applied Biosystems modelo 380B (Applied Biosystems Inc., Foster City, Califórnia), como descrito no Exemplo 1. Estas sequências complementares ficaram a hibridar para formar

a sequência da cadeia dupla para a avaliação do corte remoto. Quantidade equimoleculares das cadeias superiores e inferiores de DNA polisítios foram adicionadas conjuntamente e aquecidas rapidamente a 90°C e em seguida arrefecidas para a temperatura ambiente para se formar DNA sz cadeia dupla apropriado para a cisão de endonuclease de restrição.

Vinte picomoles de DNA de polisítios de cadeia dupla foi marcado com γ -32p em ambas as extremidades 5', como descrito para γ -32p-DP₁ no Exemplo 2.

O DNA polisítio foi submetido a cisão por oito enzimas de restrição seleccionadas utilizando-se oito reacções separadas contendo 200 fentomoles do DNA de polisítio marcado com 32p, 1x o tampão e uma das enzimas seguintes num volume reaccional total de 50 μ l:

Reacção	Enzima de Restrição	Quantidade de Enzima de restrição (unidades)	Tampão
1	ALW I	4	1x TSLB
2	Bbv I	2	1x TSLB
3	BspM I	4	1x TSLB*
4	Fok I	8	1x TSLB
5	Ple I	1	1x TSLB
6	Hga I	8	1x TSLB
7	HpH I	0,8	1x TSLB
8	SfaN I	3	1x TSLB

* + 100 mM NaCl

Todas as oito reacções foram incubadas à temperatura de 37°C durante 4 horas. Após a incubação, misturou-se meta de de cadauma das reacções com igual volume de reagentes de EDTA/corante, aqueceu-se à temperatura de 90°C durante três minutos e em seguida ensaiou-se em gel de poliacrilamida de desnaturação a 10% aplicando-se técnicas convencionais e visualizou-se por auto-radiografia. Como apresentado na Figura 14, embora todos os "cortadores remotos" cindissem o DNA de poli-sítio modificado, Fok I demonstrou a mais alta eficiência de corte neste sistema.

EXEMPLO 4

Modificação de Sítio de Restrição Remoto Duplo de Produtos de Amplificação Derivados de PCR

Com base nos resultados da avaliação da enzima de corte remoto do Exemplo 3, designou-se um outro exemplo para demonstrar a utilização de Fok I como uma modificação de enzima de restrição de corte remoto num processo de amplificação do tipo PCR. Dois sítios de modificação de enzima de restrição de corte remoto Fok I foram introduzidos num produto de amplificação derivado de PCR, como representado na Figura 15. Estes sítios de modificação foram incorporados num produto de amplificação utilizando-se dois iniciadores PCR modificados apropriadamente contendo cada um uma única base alterada relativamente a um sítio de restrição pseudo Fok I preferido localizado na sequência de amplificação. Diferentemente de um sítio de corte não remoto, a incorporação do sítio de reconhecimento de enzima de restrição de corte remoto num iniciador de amplificação modificação

do resulta em um produto de amplificação modificado que contém os sítios de cisão Fok I na fracção prolongada do produto de amplificação, embora se pense que os sítios de reconhecimento correspondentes se liguem com a fracção derivada do iniciador. Consequentemente, o tratamento deste produto de amplificação mo dificado com a enzima de restrição Fok I resulta em produtos cindidos (como apresentado na Figura 15) que não são susceptíveis ao fenómeno de iniciação parcial anteriormente descrito.

Seleccionou-se uma sequência de 147 pares de bases contida em pUC 9 como sequência de amplificação para este exemplo. A região de 147 pares de bases escolhida está representada na Figura 16 com a sequência de iniciadores de amplificação naturais, AP6 e AP7' (não contendo alterações relativamente ao alvo) iniciadores de amplificação de alteração simples AP8 e AP9' (para incorporar os sítios de reconhecimento da enzima de restrição Fok I no produto de amplificação) e PAD22, um iniciador de detecção.

A. Preparação de pUC9 Alvo para Amplificação

Neste exemplo utilizou-se o plasmídeo pUC 9 de 2707 pares de bases como uma fonte de DNA alvo. O DNA alvo de pUC 9 foi preparado para a amplificação por corte de plasmídeo circular com endonuclease de restrição Fok I para alcançar uma se quência linear apropriada para a ampliação. Foi conveniente utilizar a enzima de restrição Fok I porque é a mesma enzima que tem já sido seleccionada para a destruição do produto de amplificação modificado apropriadamente. É possível, contudo, utilizarem-se outras enzimas de restrição para linearizar ou fragmentar o plasmídeo, com a condição de o sítio de restrição

apropriado se localizar no plasmídeo. O plasmídeo pUC 9 contém cinco sítios de reconhecimento de Fok I com a sequência de amplificação contida no fragmento de Fok I maior (1340 pares de bases) do proveniente do tratamento de linearização.

Deve notar-se que quando as temperaturas do ciclo de amplificação permanecem inferiores a cerca de 95°C, é habitualmente necessário fragmentar ou linearizar o plasmídeo, o cromossoma ou outro alvo de uma amostra de ensaio para facilitar a desnaturação completa durante o primeiro ciclo de amplificação. Quando as temperaturas do ciclo de amplificação excedem cerca de 95°C, a linearização e/ou fragmentação ocorrerão necessariamente durante a amplificação.

Utilizaram-se os seguintes reagentes:

DNA plasmídeo, pUC 9 numa concentração de 0,45 µg/ml obtido de Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, Maryland).

O tampão de reacção foi obtido por diluição a 1/10 de tampão de reacção (10x) fornecido por GeneAmp™ DNA Amplification Reagent Kit de Perkin-Elmer/cetus (Norwalk, Connecticut). O tampão reaccional (10x) contém 10 mM Tris HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 0,1% p/v de gelatina. O tampão reaccional obtido deste modo para se utilizar nesta experiência foi um tampão reaccional (1x).

Obteve-se a endonuclease de restrição Fok I com uma concentração de 4 unidades/µl de New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts).

O DNA plasmídico foi cortado em tampão reaccional 1x mediante a adição de 2 µl (0,9 µg) de DNA de pUC 9 e 2 µl (8 unidades) de endonuclease de restrição Fok I a 50 µl de tampão de reacção 1x. A mistura reaccional resultante permaneceu a incu-

bar à temperatura de 36°C durante 45 minutos, sendo qualquer actividade da enzima remanescente destruída por aquecimento à temperatura de 90°C duraçte 10 minutos seguida de um período de incubação de 45 minutos. A concentração da sequência alvo nesta miqtura reaccional foi calculda a 9,25 fentomoles/ μ l.

B. Amplificação PCR/Detecção Utilizando Iniciadores de Ampli-
ficação Naturais versus Iniciadores de Amplificação Modi-
ficados

A fim de se determinar se a alteração de uma única base contida em iniciadores de PCR modificados realiza apropriadamente um processo de amplifciação do tipo PCR, realizaram-se amplificações lado a lado utilizando-se ou iniciadores de amplificação naturais (AP₆ e AP₇', contendo complementaridade total com a sequência de amplificação) ou iniciadores de amplificação modificados (AP₈ e AP₉', contendo complementaridade substancial com a sequência de amplificação). As misturas reaccionais de amplificação lado a lado foram submetidas a vinte ciclos sendo os produtos subsequentemente visualizados utilizando-se um iniciador de detecção PAD₂₂.

Os reagentes seguintes utilizados neste exemplo foram obtidos como uma parte de um conjunto de reagentes de amplificação de DNA Perkin-Elmer/Cetus GeneAmp TM: 10 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão de reacção 10x (descrito no Exemplo 4A, anteriormente), e DNA polimerase Amplitaq TM (5 unidades por μ l).

O tampão de hibernação foi igual ao descrito no Exemplo 2B.

O iniciador de detecção PAD₂₂ foi marcado na sua extremidade 5' com 32p para uma actividade específica de aproximadamen-

te 7000 Ci/mole, como descrito no Exemplo 2C.

DNA de pUC 9 alvo foi preparado por diluição do plasmídeo de corte Fok I (do Exemplo 4A) em TE (1mM Tris , pH 8,0, 0,1 mM EDTA) até se alcançar a concentração pretendida.

Todas as reacções de amplificação foram realizadas em tubos Eppendorf de 0,5 ml com um volume total de 50 μ l de tampão reaccional 1x que também continha dNTP's a uma concentração de 200 μ M e 2,5 unidades de DNA polimerase Amplitaq TM. Além do que se citou anteriormente, as reacções também continham:

	<u>Iniciadores de Amplificação</u>	<u>pUC 9 Alvo</u>
Reacção 1:	25 pmoles de AP ₈ e de AP ₉ '	100 amoles
Reacção 2:	25 pmoles de AP ₈ e de AP ₉ '	0,0 amoles
Reacção 3:	25 pmoles de AP ₆ e de AP ₇ '	100 amoles
Reacção 4:	25 pmoles de AP ₆ e de AP ₇ '	0,0 amoles

Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral em cada tubo para impedir a evaporação durante o processo de amplificação . As reacções incluíram vinte ciclos num Perkin-Elmer/Cetus Thermocycler com aquecimento à temperatura de 90°C durante dois minutos, seguidos de cinco minutos à temperatura de 50°C para cada ciclo.

Os produtos de amplificação foram visualizados selectivamente utilizando-se o sistema de detecção associado com a polimerase (PAD). Neste processo permitiu-se a hibridação de um PAD marcado com o produto de amplificação resultante na presença de um excesso de DNPs e de uma polimerase para gerar um produto de extensão marcado (detecção). Este produto de detecção

marcado é em seguida separado do excesso do iniciador PAD marcado em PAD e subsequentemente visualizado por auto-radiografia. Porque o iniciador PAD deve competir com o iniciador de amplificação em excesso para hibridação com o produto de amplificação, o iniciador PAD é designado para ser maior, isto é, ser um T_m maior, do que o iniciador de amplificação. Portanto, a temperatura da reacção pode ser ajustada de forma a favorecer a hibridação do iniciador PAD.

A um décimo (5 μ l) de cada mistura reaccional adicionou-se 1 μ l de uma solução contendo 200 femtomoles de iniciador de detecção marcado com 32p (PAD₂₂) e 0,25 unidades de polimerase Amplitaq TM. O iniciador PAD foi circularizado e prolongado por aquecimento das reacções à temperatura de 90°C durante cinco minutos seguidos por dez minutos a 65°C. Após arrefecimento à temperatura ambiente, suspenderam-se as reacções mediante a adição de 15 μ l de tampão de impregnação seguido de aquecimento até 90°C durante cinco minutos. As reacções desenvolveram-se com um marcador marcado com 32p, pBR 322 de corte Hpa II em um gel de poliacrilamida de desnaturação a 10%, utilizando-se técnicas convencionais e visualização por auto-radiografia.

As intensidades relativas dos produtos de PAD de 147 pares de bases de cada uma das misturas reaccionais estão representadas na Figura 17. Os iniciadores de amplificação modificados, contendo uma única alteração do pseudo sítio de restrição da sequência de amplificação, ampliaram com aproximadamente a mesma eficiência dos iniciadores naturais. (Comparar os resultados da faixa da reacção 1 com os resultados da faixa de reacção 3). Os resultados dos controles zero (reacção 2 e reacção 4) demonstram que não ocorre acumulação susceptível do produto pro

veniente da ciclização na ausência do alvo.

C. Destruição do Produto de Amplificação Derivado de PCR Modificado

Trataram-se as mesmas quatro misturas reacionais do Exemplo 4B com endonuclease de restrição Fok I ou Fok I inativada pelo calor (controle) e em seguida submeteram-se à detecção com PAD para se avaliar a eficiência de corte relativa.

Utilizou-se a endonuclease de restrição Fok I para destruir o produto de amplificação derivado de PCR modificado. Todos os outros reagentes utilizados neste exemplo foram obtidos como parte de um conjunto de reagentes de amplificação de DNA Perkin-Elmer/Cetus GeneAmp™ como citado no Exemplo 4B.

A endonuclease de restrição Fok I inativada pelo calor (Δ Fok I) foi preparada por aquecimento de stock concentrado em enzima à temperatura de 90°C durante 10 minutos. A endonuclease Δ Fok I resultante foi confirmada como inactiva mediante a observação da sua incapacidade para cortar o plasmídeo de DNA pUC 9.

Adicionou-se uma alíquota de 25 μ l de tampão de reacção 1x a um décimo (5 μ l) de cada reacção de amplificação (1, 2, 3 e 4) do Exemplo 4B, conjuntamente com 2 μ l (8 unidades) de Fok I activa (reacções 1A, 2A, 3A e 4A, respectivamente) ou 2 μ l de Δ FokI (reacções 1 Δ , 2 Δ , 3 Δ , e 4 Δ , respectivamente). Estas misturas reacionais permaneceram em incubação durante 16 horas à temperatura de 37°C seguidos de cinco minutos à temperatura de 90°C.

A eficiência do corte das enzimas Fok I e Δ Fok I no

produto de amplificação derivado de PCR foi avaliada utilizando-se uma detecção de PAD. Seguidamente ao tratamento com enzima de restrição, removeu-se uma alíquota de 15 μ l de cada uma das misturas reaccionais e adicionaram-se em seguida a 10,5 μ l uma solução que tinha sido ajustada para 0,95x no tampão de reacção e que continha 200 femtomoles de ^{32}p -PAD₂₂ (actividade específica de 7000 Ci/mmol), 2,5 unidades de DNA polimerase Amplitaq TM e era 925 μ M de cada dNTB (concentração final de 392 μ M). Estas misturas reaccionais foram em seguida aquecidas a 90°C durante cinco minutos seguidos de dez minutos à temperatura de 65°C para se completar a reacção de extensão. As reacções foram suspensas mediante a adição de 25 μ l de tampão de impregnação seguido de aquecimento à temperatura de 90°C durante cinco minutos. As amostras das misturas reaccionais diluídas desenvolveram-se por electroforese de gel de poliacrilamida a 10% (PAGE) e os produtos foram visualizados por autoradiografia. O filme foi exposto durante a fase de autoradiografia a fim de revelar a presença de produtos de cisão embora em quantidades mínimas.

Como apresentado na Figura 18, o produto de amplificação modificado resultante da utilização de iniciadores de amplificação modificados por alteração da base única (contendo sítios Fok I) foi completamente destruído pelo tratamento com a enzima Fok I activa (reacção 1A). Em contraste, o produto de amplificação formado com iniciadores naturais não foi afectado após a exposição à mesma enzima Fok I activa (reacção 3A), como indicado pelo forte sinal PAD que se apresenta num autoradiograma no par de bases 147. Como esperado, nem o produto de amplificação modificado nem o produto de amplificação não modificado

foi aceite pelo tratamento com a enzima Fok I inactivada pelo calor (reacções 1 Δ e 3 Δ , respectivamente). Os controlos alvo zero (reacções 2A, 4A, 2 Δ e 4 Δ) não apresentaram quaisquer produtos no par de bases 147 no auto-radiograma, confirmando que todos os sinais de par de bases 147 eram sem dúvida derivados de produtos de amplificação.

Um ligeiro sinal foi visível na reacção de detecção de PAD da reacção 1A cerca do par de bases 127. Este sinal errante foi determinado como originado de extensão do iniciador PAD em uma matriz de produto de amplificação modificado que tinha sido cortado somente em um dos dois sítios Fok I disponíveis como representado na Figura 19. Como se mostra na Figura 19, existem dois produtos possíveis que podem resultar do corte único Fok I, em que somente um responde à fase de detecção PAD, produzindo um produto de 127 pares de bases. É importante notar que nenhum destes produtos de amplificação modificados parcialmente cortados é complementar para ambos os iniciadores de amplificação modificados que são necessários para a participação como uma matriz em processos de amplificação subsequentes.

D. Amplificação de PCR de Produtos de Amplificação Tratados com Fok I

A fim de melhor examinar o grau de cisão nas reacções do Exemplo 4C, diluíram-se as mesmas misturas reaccionais e submeteram-se a um segundo circuito de 20 ciclos de amplificação PCR com iniciadores de amplificação modificados AP₈ e AP₉', como anteriormente descrito no Exemplo 4B. Os produtos de amplificação resultantes foram então submetidos a detecção PAD

como descrito no Exemplo 4C. No caso destas amostras "re-ampliadas", eram esperados ainda que vestígios de produto de amplificação não cortado ampliado para um nível detectável, exactamente como produto contaminante transportado que se esperava produzir um sinal detectável num conjunto clínico. Todos estes reagentes para "re-ampliação" e processo de detecção subsequente foram como descritos anteriormente.

Cada reacção de separação do Exemplo 4C foi diluída em série de TE por um factor de 1/100 000. Devido às reacções de separação resultaram elas próprias efectivamente numa diluição a 1/6 das misturas reaccionais de amplificação originais, a diluição a 1/100 000 representa uma diluição total de 1/600 000 no que se refere às misturas reaccionais de amplificação originais. Além disso, porque apenas 5 μ l das amostras diluídas foram "re-ampliadas" comparado com o volume original de 50 μ l das misturas reaccionais de ampliação, a "re-ampliação" representa somente 1/6 000 000 do número total do produto de ampliação (modificados e não modificados) que foram sintetizados in situ como uma consequência da ampliação PCR original do Exemplo 4B. Este valor de 1/6 000 000 é representativo do grau de contaminação transportado esperada em conjunto laboratorial clínico típico,

Adicionaram-se 5 microlitros de cada uma das diluições finais (1/600 000) das misturas reaccionais de clivagem a 45 μ l de uma solução que foi ajustada de forma a que a solução final, contendo 5 μ l da amostra diluída, era 1x em tampão de reacção, 200 μ M em cada dNTP, e continha 25 picomoles de cada iniciador de amplificação (AP_8 e AP_9'), e 2,5 unidades de Amplitaq Tm polimerase. As misturas reaccionais provenientes de cada uma das reacções 1A, 2A, 3A, 4A, 1 Δ , 2 Δ , 3 Δ e 4 Δ foram designadas

como reacções 1A+, 2A+, 3A+, 4A+, 1 +, 2 +, 3 Δ + e 4 Δ +, respectivamente (em que "+" indica que as reacções foram ampliadas de novo com uma segunda amplificação de PCR de 20 ciclos. Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral a cada uma das misturas reaccionais após o que se fecharam em tubos de Eppendorf de 0,5 ml e que ciclizaram 20 vezes num Perkin-Elmer/Cetus Thermocycler mediante aquecimento à temperatura de 90°C durante dois minutos seguidos de 50°C por um período de cinco minutos para cada ciclo.

Uma alíquota de uma solução contendo 200 femtomoles de iniciador de detecção marcado com 32p (PAD₂₂) e 0,25 unidades de Amplitaq TM polimerase foi adicionada a um décimo (5 μ l) de cada mistura reaccional "re-ampliada". A reacção de detecção PAD foi desenvolvida por aquecimento das misturas reaccionais à temperatura de 90°C durante 5 minutos, seguida de 65°C durante 10 minutos. Os produtos da reacção foram diluídos com 15 μ l de tampão de impregnação e aquecidos à temperatura de 90°C por um período de cinco minutos, antes de se realizar a desnaturação em PAGE 10% conjuntamente com um marcador marcado com 32p, pBR 322 de corte Hpa II, e visualizados por auto-radiografia. Na Figura 17 apresenta-se uma fotografia dos resultados. Deve notar-se que este gel e este auto-radiograma também contém os resultados provenientes das reacções 1, 2, 3 e 4 citadas no Exemplo 4B, anteriormente.

As reacções de 1 Δ + e 3 Δ + exibem os tipos de sinais que se esperam resultar da amplificação de PCR de amostras que tinham sido contaminadas com 1/6 000 000 de produtos provenientes das reacções 1 e 3, respectivamente. Estes resultados representam um falso positivo típico resultante deste nível de

contaminação numa amplificação do tipo PCR de 20 ciclos. Em contraste, a amplificação da amostra contaminada com o produto de amplificação modificado que tinha sido anteriormente tratado com a enzima de restrição Fok I (reação 1A+) não produziu produto de 147-mer detectável, por outras palavras não produziu o falso positivo. O tratamento do produto de amplificação não modificado com a enzima de restrição Fok I (reação 3A+) resultou num sinal de igual intensidade quando comparado com o tratamento deste mesmo produto de amplificação não modificado com a enzima Fok I inactivada pelo calor (reação 3A+). Este facto demonstra a destruição selectiva do produto de amplificação modificado proveniente do tratamento com a endonuclease de restrição Fok I activa na presença da sequência alvo natural permanece inalterado por este tratamento. As amplificações alvo zero (reação 2A+, 2 Δ +, 4A+, e 4 Δ +) não exibiram produtos de detecção, confirmando que os produtos de 147-mer são de facto derivados das matrizes do produto de amplificação e não são formados esporadicamente.

EXEMPLO 5

Modificação do Sítio de Restrição Remoto Duplo de Produtos de Amplificação Derivados de PCR: Corte Após Contaminação

Embora o Exemplo 4 demonstre o êxito do tratamento após a amplificação de uma amostra de ensaio amplificada anteriormente, para remover o transporte da contaminação, será, como sublinhado anteriormente, mais eficaz num ambiente de laboratório "pré-tratar" novas amostras de ensaio com o agente de corte apropriado imediatamente antes da amplificação da nova amostra de

ensaio. Neste sentido, qualquer produto de amplificação contaminante será destruído nas novas amostras por uma fase de incubação prévia que incluirá a adição do agente de corte (por exemplo, Fok I) em um tubo fechado com todos os reagentes de ampliação presentes exactamente antes do início da ampliação.

Um assunto potencial relativamente à aplicação de um controlo de contaminação de pré-tratamento é apresentado pela concentração inicial muito baixa esperada do produto de ampliação contaminante nas novas amostras de ensaio. Este aspecto surge devido à perda observada da actividade catalítica de certos agentes de corte nestes tipos de concentrações de substrato baixas. Portanto, a eficácia do agente de corte para destruir o produto de amplificação modificado nas novas amostras de ensaio deve diminuir grandemente a eficácia do controlo de contaminação de pré-tratamento. O Exemplo 4 mostra que o agente de corte é muito eficaz quando o produto de amplificação modificado é tratado com o agente de corte imediatamente após a ampliação em que o produto modificado está numa concentração relativamente elevada.

A fim de verificar se a contaminação pode ser verificada deste modo, ampliou-se uma fracção de 162 pares de bases do gene de HIV pol utilizando-se iniciadores de ampliação modificados AP₁₆ e AP₁₇, para incorporar os sítios de restrição Fok I nos produtos de amplificação. O produto foi quantificado pela comparação do sinal de detecção PAD da extensão de PAD₄ de iniciador de detecção nos produtos resultantes com a obtida dos padrões. As sequências oligonucleotídicas utilizadas neste estudo estão representadas na Figura 20. Este produto de ampliação modificado foi em seguida diluído e adicionado a subsequentes

reacções de amplificação contendo o alvo natural a fim de simular uma experiência de contaminação controlada. As amostras contaminadas resultantes foram depois tratadas com agentes de corte activo Fok I ou com o agente de corte inactivo Δ Fok I antes da amplificação. A comparação dos sinais resultantes proporcionou uma comparação da eficiência de destruição do produto contaminante devido ao tratamento com o agente de corte.

A. Amplificação de PCR de HIV com Iniciadores de Amplificação Modificados e Detecção Quantitativa do Produto Modificado

O ácido nucleico utilizado para alvo e padrões na seguinte experiência foi um clone de 10,0 kb pBR 322 contendo aproximadamente 6 kb de HIV (isolado BH10; Gallo et al, Nature, 313, 277-284, 1985). O clone foi linearizado para amplificação mediante o corte com BamHI. O mesmo clone foi usado para a obtenção de padrões para a quantificação do produto na fase de detecção por corte com Pvu II e Hae III para produzir um fragmento com 255 pares de bases contendo o fragmento de 162 pares de bases destinado à amplificação. O iniciador de detecção PAD₄ prolongava-se neste fragmento para produzir um produto de 162 bases. O rendimento do produto de PCR pode ser em seguida avaliado comparando-se o produto de detecção resultante de 162-mer com o produto de 192-mer resultante de quantidade conhecidas do padrão.

Os reagentes seguintes foram obtidos como uma parte de o conjunto de reagentes de amplificação de DNA GeneAmp™, Perkin-Elmer/Cetus (Norwalk, Connecticut): 10 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), e tampão de reacção (10x), como descrito no Exemplo 4A.

Obteve-se Amplitaq™ DNA polimerase de Perkin-Elmer/Ce

tus numa concentração de 8 unidades/ μ l.

Obteve-se DNA polimerase termofílica por doação de Molecular Biology Resources, Inc. (Milwaukee, Wisconsin) numa concentração de 3 unidades/ μ l.

As endonucleases de restrição BamH I (25 unidades/ μ l), Pvu II (50 unidades/ μ l), e Hae III (10 unidades/ μ l), e os respectivos tampões de corte 10x foram obtidos de New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts). O tampão BamH I (10x) tinha 1500 mM NaCl, 60 mM Tris (pH 7,9), 60 mM $MgCl_2$, 60 mM B-mercaptoetanol, e continha BSA a uma concentração de 100 μ g/ml. O tampão de Hae III (10x) tinha 200 mM Tris (pH 7,9), 100 mM Mg Acetato, 500 mM K Acetato, e 10 mM DTT. O tampão Pvu II (10x) tinha 10 mM Tris (pH 7,9), 100 mM $MgCl_2$, 500 mM NaCl, e 10 mM DTT.

As sequências nucleotídicas AP₁₆, AP₁₇, e PAD₄ foram sintetizadas e purificadas de acordo com o método descrito no Exemplo 1.

O PAD₄ oligonucleotídico foi marcado na extremidade 5' com 32p para uma actividade específica de aproximadamente 7000 Ci/mole, como descrito no Exemplo 2C.

Utilizou-se como DNA veicular, DNA de placenta humana (HP-DNA, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) que se tratou mediante aquecimento de uma solução com a concentração de 10 mg/ml em 5 mM $MgCl_2$ durante 10 minutos à temperatura de 90°C.

Preparou-se a sequência alvo por linearização de um clone HIV em pBR 322 (HIV 11) contendo aproximadamente 5700 pares de bases da sequência HIV com BamH I. O clone (0,026 μ g) foi incubado com 25 unidades de BamH I em 20 μ l de 1x BamH I tampão durante quatro horas à temperatura de 37°C. Após o corte, diluí-

-se o alvo de forma a que o número pretendido de moléculas alvo estivesse contido em 5 μ l de TE com a presença de HP-DNA na concentração de 1 μ g/ μ l.

O padrão utilizado para quantificar os produtos de amplificação foi separado do seguinte modo: 2 μ g do mesmo clone utilizado para preparar o alvo foram incubados em 100 μ l de tampão de corte de 1x Pvu II contendo 250 unidades de Pvu II durante uma hora à temperatura de 37°C. A solução foi ajustada para 0,3 μ M em NaCl utilizando-se NaCl 5,0 M e 3 volumes de etanol foram adicionados para precipitar o DNA. Após rotação a 14 000 xg durante 30 minutos, o aglomerado de DNA foi isolado por decantação do sobrenadante e seco sob vácuo. O DNA aglomerado foi em seguida cortado com 50 unidades de enzima de restrição Hae III em 100 μ l de tampão de restrição 1x Hae III mediante incubação durante uma hora à temperatura de 37°C. A actividade da enzima residual foi destruída por aquecimento da reacção à temperatura de 90°C durante 5 minutos. O fragmento de restrição de 255 pares de bases resultante, contendo a região de amplificação de 162 pares de bases, deveria hibridar com o iniciador de detecção PAD₄ e prolongar-se na presença de dNTPs e polimerase para formar um produto de 192 bases que podia ser utilizado para quantificar o produto de extensão de amplificação de 162 pares de bases.

Todas as reacções de amplificação se realizaram em tubos de Eppendorf de 0,5 ml com um volume total de 50 μ l de tampão de reacção 1x, contendo também em cada dNTP a uma concentração de 10 μ M, 25 pmoles de cada um dos iniciadores de amplificação AP₁₆ e AP₁₇, 5,0 μ g de HP-DNA e 2,5 unidades de DNA polimerase Amplitaq TM. Além disso, as reacções ainda conti-

nam:

Reacção 1: 25 000 moléculas de alvo

Reacção 2: 1 000 moléculas de alvo

Reacção 3: 0,0 moléculas de alvo

Adicionaram-se 2 gotas de óleo mineral em cada tubo para impedir a evaporação durante a amplificação. As reacções incluíram 25 ciclos num Perkin-Elmer cetus Thermocycler com aquecimento à temperatura de 90°C durante 2 minutos, seguidos de 5 minutos à temperatura de 50°C para cada ciclo. Os produtos de amplificação conjuntamente com os padrões foram visualizados selectivamente utilizando-se um iniciador de detecção PAD₄, como descrito em seguida.

As reacções de detecção realizaram-se com um volume total de 30 µl de tampão de reacção 1x contendo também cada dNTP numa concentração de 333 µM, 200 femtomoles de PAD₄ (7000 Ci/mole), e 0,6 unidades de polimerase termofílica (MBR). Além disso, as reacções de detecção também continham:

<u>Reacção</u>	<u>Pvu II/Hae III</u> <u>Padrão de corte</u>	<u>Reacção de</u> <u>Amplificação</u>
1S	50 femtomoles	
2S	40 femtomoles	
3S	30 femtomoles	
4S	20 femtomoles	
5S	10 femtomoles	
6S	2,0 femtomoles	
1A		5,0 µl de Reacção 1

<u>Reacção</u>	<u>Pvu II/Hae III</u> <u>padrão de corte</u>	<u>Reacção de</u> <u>Amplificação</u>
2A		5,0 μ l de Reacção 2
3A		5,0 μ l de Reacção 3

As reacções de detecção realizaram-se por aquecimento dos tubos à temperatura de 90°C durante 5 minutos seguidos de incubação à temperatura de 60°C por um período de 10 minutos. As reacções foram detidas pela adição de 30 μ l de tampão de impregnação e aquecimento à temperatura de 90°C durante 3 minutos seguido de arrefecimento para a temperatura ambiente. Os produtos foram analisados desenvolvendo-se as amostras em PAGE de desnaturação a 15% seguida de auto-radiogramã. Como se apresenta na fotografia do auto-radiogramã na Figura 21, os padrões (faixas 1S-6S) produziram um produto de detecção de mobilidade ligeiramente menor do que o produto de detecção proveniente das reacções de amplificação (faixas 1A-3A). Isto é corrente com as dimensões calculadas de 192 e 162 pares de bases, respectivamente.

As reacções de amplificação mostraram uma resposta linear para a quantidade de alvo inicial e não exibiram qualquer sinal do produto para a reacção de alvo zero (faixa 3A). A reacção 2 (faixa 2A) pode ser calculada para conter aproximadamente 10 femtomoles/5 μ l de reacção comparando-se o sinal produzido pelo padrão de 10 femtomoles (reacção 5S). O produto reaccional modificado proveniente desta amplificação foi utilizado em experiências de contaminação controladas pormenorizadas em seguida.

B. Amplificação PCR de HIV na Presença de Contaminação Com e Sem Corte

Nesta experiência, alvo do tipo natural (1000 ou 0 moléculas) foi contaminado ou com 200 000 ou 20 000 ou 0 moléculas de produto de amplificação modificado proveniente da reacção 2A. As reacções foram em seguida tratadas com o agente de corte activo (Fok I) ou com um agente de corte inactivo Δ Fok I. Após a incubação com um agente de corte em tubos de reacção fechados durante um período previamente determinado, as reacções foram circularizadas para alcançar a amplificação. A temperatura do primeiro ciclo de PCR de 90°C destrói qualquer actividade de Fok I, de forma a que os produtos de amplificação modificados formados recentemente acumulam-se exponencialmente de moléculas alvo do tipo natural não submetidas a corte.

Todos os reagentes utilizados neste exemplo foram os descritos anteriormente iguais a esses no Exemplo 5A, com a excepção dos seguintes reagentes adicionais: endonuclease de restrição Fok I com uma concentração de 4 unidades/ μ l obtida de New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts).

O agente de corte inactivo Δ Fok I, foi obtido por aquecimento de uma porção de enzima Fok I num banho de água em ebulição durante 10 minutos.

O tampão de impregnação foi igual ao descrito no Exemplo 2B.

O produto de amplificação modificado proveniente da reacção 2A, com a concentração inicial de 2 femtomoles/ μ l, utilizado para contaminar as amostras, foi diluído em série com água para se obter o número pretendido de moléculas contaminantes, para a adi

ção às amostras.

Todas as reacções se realizaram em tubos de Eppendorf de 0,5 ml com um volume total de 50 μ l em tampão reaccional 1x, que também continha dNTP em cada tubo com uma concentração de 200 mM, 25 picomoles de cada iniciador de amplificação AP₁₆ e AP₁₇, , 5,0 μ l de HP-DNA e 2,5 unidades de DNA polimerase Amplitaq TM. Além destes, as reacções também continham o seguinte:

<u>Reacção</u>	<u>Moléculas</u> <u>Alvo</u>	<u>Moléculas de</u> <u>Contaminação</u>	<u>Agente de</u> <u>Corte</u>
1	1000	20,000	Fok I
2	1000	20,000	Fok I
3	0	20,000	Fok I
4	0	20,000	Fok I
5	1000	20,000	Δ Fok I
6	1000	20,000	Δ Fok I
7	0	20,000	Δ Fok I
8	0	20,000	Δ Fok I
9	1000	200,000	Fok I
10	1000	200,000	Fok I
11	0	200,000	Fok I
12	0	200,000	Fok I
13	1000	200,000	Δ Fok I
14	1000	200,000	Δ Fok I
15	0	200,000	Δ Fok I
16	0	200,000	Δ Fok I
17	1000	0	Nenhum
18	1000	0	Nenhum
19	0	0	Nenhum
20	0	0	Nenhum

As reacções designadas para incluir Fok I continham 8 unidades da enzima activa. As reacções designadas para incluir Δ Fok I continham uma quantidade igual da forma inactivada pelo aquecimento deste enzima. Foram adicionadas duas gotas de óleo mineral a cada tubo para impedir a evaporação durante a amplificação. As reacções foram colocadas num Perkin-Elmer/Cetus Thermocycler e aquecidas à temperatura de 37°C por 60 minutos a fim de completar as reacções de corte seguidas de 25 ciclos de aquecimento a 90°C durante 2 minutos e a 50°C por um período de 5 minutos, para se completarem as reacções de amplificação. Os produtos reaccionais foram detectados combinando-se 5 μ l de cada reacção com 1 μ l de uma solução de PAD₄ marcado com 32p em TE (200 femtomoles, 7000 Ci/mmol), seguida de aquecimento à temperatura de 90°C durante 5 minutos e depois a 60°C por um período de 10 minutos. Após o arrefecimento para a temperatura ambiente, adicionaram-se 10 μ l de tampão de impregnação e aqueceram-se as reacções para 90°C durante 3 minutos e arrefeceram-se de novo para a temperatura ambiente. As reacções foram analisadas desenvolvendo-se as amostras em PAGE de desnaturação a 15% seguidas de auto-radiografia.

A fotografia do auto-radiograma (Figura 22) demonstra que as amostras contaminadas foram tratadas com o agente de corte inactivado antes da amplificação forneceram fortes falsos positivos (produto de 162-mer) nas faixas alvo-zero (reacções 7,8, 15 e 16). Idto torna impossível observar verdadeiros positivos (reacções 5,6,13 e 14) devido aos acentuados sinais de fundo. Em contraste, as amostras contaminadas que foram tratadas com o agente de corte activo antes da amplificação exibiram controlos de 1000 moléculas fortes (reacções 1, 2, 9 e 10) relativo aos seus

respectivos controlos de moléculas zero (reacções 3, 4, 11 e 12). É interessante notar que os sinais resultantes de 1000 moléculas de alvo em que se utilizou Fok I para cortar a contaminação (reacções 1, 2, 9 e 10) são muito mais acentuados do que os sinais resultantes de 1000 moléculas alvo que não foram contaminados ou tratados com Fok I (reacções 17 e 18). Não se encontra explicação para este fenómeno de sinais de amplificação reforçados nas reacções de amplificação que continham Fok I, contudo isto tem sido observado de uma forma rotineira.

Esta forma de controlo de contaminação é especialmente atraente porque as reacções de amplificação nunca necessitam de serem abertas após tratamento com o agente de corte a fim de iniciar as reacções de amplificação. Isto assegura que a contaminação não tratada possa entrar no recipiente do reactor antes da amplificação, para se produzirem falsos positivos.

EXEMPLO 6

Modificação Ribonucleotídica do Produto de Amplificação Derivado de PCR: Cisão Química versus Enzimática do Produto de Amplificação Modificado

Neste exemplo, fez-se uma única substituição ribonucleotídica em cada iniciador de amplificação a fim de se introduzir uma modificação lábil em cada cadeia do produto de amplificação derivado de PCR resultante. As ligações lábeis no produto de amplificação resultante foram criadas por extensão de polimerase do iniciador de amplificação modificado que continham o ribonucleótido único nas suas extremidades 3' respectivas. Isto tornou o produto de amplificação modificado receptivo à destruição enzi-

mática (com RNase A a baixas temperaturas) e à destruição por via química (na presença de uma base forte a temperaturas elevadas).

Foi utilizada uma região de HIV de 75 pares de bases como sequência de amplificação. Este alvo de 75-mer foi amplificado utilizando-se dois iniciadores de amplificação de 15-mer (AP₁₈ e AP₂₁ , e um iniciador de detecção de 26-mer (PAD₅), como apresentado na Figura 23.

A. Amplificação PCR de HIV com Iniciadores de Amplificação Modificados numa Detecção Quantitativa do Produto de Amplificação Modificado Resultante

Neste exemplo, ampliou-se um clone HIV pBH10 (Hahn et al, Nature, 312, 116, 1984) utilizando-se iniciadores de amplificação modificados AP₁₈ e AP₂₁ , contendo uma única modificação ribonucleotídica nas suas extremidades 3'. Os produtos de amplificação modificados resultantes foram em seguida quantificados por diluição em série e re-amplificação concorrentemente com quantidades conhecidas de padrões do alvo do tipo natural. Estas amostras do produto de amplificação modificado e quantificadas foram reservadas para posteriormente se utilizarem em experiências subsequentes.

Obteve-se DNA polimerase Amplitaq Tm de Perkin-Elmer/Cetus a uma concentração de 8 unidades/ μ l.

Obtiveram-se desoxinucleósido-5'-trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) como parte de um conjunto de reagentes de amplificação GeneAmp TM Perkin-Elmer/Cetus com uma concentração de 10 mM cada.

O tampão de reacção (10x) continha 100 mM Tris (pH 8,3), 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, e gelatina (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) com uma concentração de 1 µg/ml.

Foram sintetizadas sequências oligonucleotídicas AP₁₈, AP₂₁ e PAD₅ e purificadas como descrito no Exemplo 1, com a excepção de AP₁₈ que foi sintetizado de um sub-corte de DNA que se inicia como guanosina, e AP₂₁, foi sintetizado a partir de um suporte de RNA que se inicia com uracil. Estes suportes de RNA estão comercializados por Glen Research Corporation (Herdon, Virgínia).

O oligonucleotídico de detecção PAD₅ foi marcado na extremidade 5' com 32p com uma actividade específica aproximada de 7000 Ci/mole, como descrito no Exemplo 2C.

Utilizou-se como DNA veicular DNA de placenta humana (HP-DNA, Sigma Chemical Company) e tratou-se com aquecimento com uma solução a uma concentração de 10 mg/ml em 10 mM de MgCl₂ durante 10 minutos num banho de água emboliente.

Preparou-se DNA de HIV alvo com diluição de um clone de HIV pBH10 em TE para o grau molecular pretendido e adicionou-se o igual volume de uma solução de HP-DNA em PE com uma concentração de 2 µg/ml. A presença de HP-DNA impede a ligação não específica de pequenas quantidades de DNA alvo ao contentor.

Todas as reacções de amplificação foram realizadas em tubos de reacção Eppendorf de 0,5 ml com um volume total de 100 µl de 1x de tampão de reacção contendo ainda cada dNTP numa concentração de 100 µM, 50 picomoles de cada iniciador de amplificação (AP₁₈ e AP₂₁), 5,0 µg de HP-DNA e 3,2 unidades de polimerase Amplitaq TM. Além disso, cada recipiente de reacção também continha:

Reacção 1-4: 1000 moléculas de alvo

Reacção 5-6: 0 moléculas de alvo

Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral em cada tubo para impedir a evaporação durante a amplificação. A ciclização foi feita por trinta vezes num Thermocycler-Elmer/Cetus mediante aquecimento a 95°C durante um período de 30 segundos, seguidos de 50°C durante 5 minutos para cada ciclo.

Após a ciclização estar terminada, associaram-se as reacções 1-4 (1000 moléculas de alvo), assim como as reacções 5 e 6 (0 moléculas de alvo) a fim de proporcionar stocks de trabalho homogêneos de ambos os produtos de amplificação modificados e do controlo molecular zero correspondente. As reacções reunidas de 1 a 4 foram referidas como reacção 1K, embora os controlos reunidos, reacções 5 e 6, sejam referidos como reacções OK.

Os produtos de amplificação foram detectados por associação de 10 μ l de cada uma das reacções de 1K ou OK com 1 μ l de sonda PAD₅ de detecção marcada com 32p (7000 Ci/mole, 100 femtomoles/ μ l) e aquecimento à temperatura de 95°C durante 2 minutos, seguida de 60°C durante 10 minutos. Após arrefecimento para a temperatura ambiente, adicionaram-se 10 μ l de tampão de impregnação e as reacções foram submetidas a 90°C durante três minutos seguidos mais uma vez de arrefecimento para a temperatura ambiente. Os produtos reaccionais foram analisados por desenvolvimento das amostras em PAGE de desnaturação a 10%, seguido de auto-radiografia.

Como se apresenta na Fig. 24, houve um sinal de detecção muito forte (um 79-mer constituído por um 75-mer mais quatro resíduos de adenosina adicionais no iniciador PAD) proveniente de reacções de 1000 moléculas (reacção 1K na faixa 1)

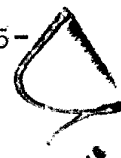
e ausência de sinal de detecção nas reacções de moléculas 0 (reacção OK na faixa 2). Este facto indica que este tipo de iniciador modificado é apropriado para os processos de amplificação do tipo PCR.

A quantidade de produto de amplificação foi avaliada por desenvolvimento de uma amplificação PCR com diluições em série da reacção 1K conjuntamente com quantidades conhecidas de alvo de tipo natural.

Todas as reacções de amplificação foram realizadas em tubos Eppendorf de 0,5 ml com um volume total de 50 μ l de tampão reaccional 1x, que também continham dNTP a uma concentração de 200 μ M, 25 picomoles de cada iniciador de amplificação (AP₁₈ e AP₂₁), 5,0 μ g de HP-DNA e 3,2 unidades de AmplitaqTM DNA polimerase em cada tubo. Além disso, cada uma das reacções também continha:

Reacção 7:	1000 moléculas de alvo
Reacção 8:	1000 moléculas de alvo
Reacção 9:	200 moléculas de alvo
Reacção 10:	200 moléculas de alvo
Reacção 11:	0 moléculas de alvo
Reacção 12:	0 moléculas de alvo
Reacção 13:	5 μ l de uma diluição $1/3 \times 10^5$ de Rxn 1K
Reacção 14:	5 μ l de uma diluição $1/3 \times 10^5$ de Rxn 1K
Reacção 15:	5 μ l de uma diluição $1/3 \times 10^6$ de Rxn 1K
Reacção 16:	5 μ l de uma diluição $1/3 \times 10^6$ de Rxn 1K
Reacção 17:	5 μ l de uma diluição $1/3 \times 10^7$ de Rxn 1K
Reacção 18:	5 μ l de uma diluição $1/3 \times 10^7$ de Rxn 1K

Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral em cada tubo



para impedir a evaporação durante a amplificação. Cada tubo de reacção foi submetido a ciclização trinta vezes num Parkin-Elmer/Cetus Thermal Cycler mediante aquecimento a 95°C por um período de 30 segundos seguidos de 50°C por um período de 5 minutos para cada ciclo para se alcançar a amplificação. Os produtos resultantes da amplificação foram detectados por combinação de 100 μl de cada tubo reaccional com 1 μl de uma solução de PAD_5 oligonucleotídico marcado com 32p (7000 Ci/mmol, 100 femtomoles/ μl) e aquecimento à temperatura de 95°C durante 2 minutos, seguida de 60°C durante 10 minutos. Após arrefecimento para a temperatura ambiente, adicionaram-se 10 μl de tampão de impregnação em cada reacção e os produtos de detecção foram desnaturados por aquecimento à temperatura de 90°C durante 3 minutos, seguido de arrefecimento para a temperatura ambiente. Visualizaram-se os produtos de detecção por desenvolvimento das amostras em PAGE de desnaturação a 10%, seguida de auto-radiografia.

A fotografia do auto-radiograma apresentada na Fig. 25 evidencia que o produto proveniente da diluição $1/3 \times 10^7$ da reacção 1K (faixas 17 e 18) forneceu um sinal de intensidade igual ao padrão do tipo natural de 1000 moléculas (faixas 7 e 8). Portanto, a reacção 1K contém 3×10^{10} moléculas do produto de amplificação modificado por cada 5 μl de volume reaccional. Isto corresponde a uma eficiência média de ciclo de 92% para a amplificação original.

B. Separação com RNase A do Produto de Amplificação Modificado

Nesta experiência, o produto de amplificação modificado proveniente do exemplo 6A foi submetido a RNase A imediatamente

antes da detecção que utiliza PAD₅ oligonucleotídico. Se está presente o ribonucleótido no produto de amplificação, deverá esperar-se a observação de um produto de detecção com menos 15 bases do que o produto com o comprimento total. Devido à RNase A ser específica para ribo-pirimidinas, apenas a cadeia menor deve ser separada nesta reação (isto é, a cadeia menor do produto de amplificação modificado contém uma única ligação ribonucleotídica de uracilo, enquanto que apenas o componente ribonucleotídico da cadeia superior é ribo-guanosina, uma purina). Além disso, porque o iniciador de detecção marcado hibrida e prolonga-se da cadeia menor, o grau de corte deve ser evidente pela presença de um produto de detecção menor (6'-mer).

Adquiriu-se RNase A de Sigma Chemical Company e dissolveu-se em TE/150 mM de NaCl com uma concentração de 10 mg/ml. Destruíu-se a actividade de DNase por aquecimento desta solução durante 15 minutos num banho de água ebuliente. Aqueceu-se uma diluição a 1/200 (50 µg/ml) deste stock em 150 mM de NaCl num banho de água em ebulição durante mais 15 minutos e arrefeceu-se para a temperatura ambiente para ser utilizado na experiência seguinte:

O iniciador de detecção PAD₅ foi o que se utilizou anteriormente no processo descrito no Exemplo 6A.

As reações 1K e OK, da experiência anterior, foram utilizadas como fonte do produto de amplificação modificado.

As reações de corte estão indicadas do seguinte modo:

<u>Reacção</u>	<u>Produto</u>	<u>RNase</u>
1	10 µl Reacção 1K	1 µl
2	10 µl Reacção 1K	0 µl
3	10 µl Reacção OK	1 µl
4	10 µl Reacção OK	0 µl

As reacções de corte ficaram a processar-se durante duas horas à temperatura ambiente e os produtos resultantes detectaram-se mediante a adição de 1 μ l de PAD₅ marcado com 32p (7000 Ci/mole, 100 femtomoles/ μ l), seguido de aquecimento à temperatura de 95°C durante 2 minutos e depois a 60°C durante 10 minutos. Após o arrefecimento para a temperatura ambiente, adicionaram-se 10 μ l do tampão de impregnação e desnaturaram-se as amostras por aquecimento à temperatura de 90°C durante três minutos e em seguida arrefeceram-se para a temperatura ambiente. Os produtos reaccionais foram depois analisados por desenvolvimento das amostras em PAGE a 10% de desnaturação, seguida de auto-radiografia.

Apresenta-se na Figura 26 a fotografia do auto-radiograma. A comparação de produtos de amplificação modificados tratados com RNase e com os produtos não tratados (reacção 1, faixa 1 e reacção 2, faixa 2, respectivamente) confirmam que a RNase processa o corte no sítio do ribonucleótido como é evidente pela presença de um produto de detecção menor na faixa 1. Além disso, a reacção parece ser quantitativa. Como esperado, não se detectou a presença de sinais de detecção em qualquer dos tubos de controlo de moléculas zero (faixas 3 e 4).

C. Amplificação PCR de HIV na Presença de Contaminação com ou sem Corte de Base Forte

Nesta experiência, moléculas alvo do tipo natural (plasmídeo pBH10) foram contaminadas com produto de amplificação modificado proveniente da reacção 1K e em seguida tratadas com KOH como agente de corte ou com KCl como controlo. Após o cor-

te para destruir a contaminação, as amostras foram neutralizadas e submetidas a amplificação PCR para confirmar a destruição das moléculas contaminantes.

A contaminação proveniente da reacção 1K que continha produto de amplificação modificado numa concentração de 6×10^9 moléculas/ μ l, como quantificado de acordo com o método descrito no Exemplo 6A. Esta amostra foi diluída em série para se obter um stock de trabalho que contivesse 1000 moléculas de produto de amplificação modificado por cada 5 μ l. Este stock de trabalho também continha HP-DNA numa concentração de 0,25 μ g/ μ l para impedir a perda de moléculas do produto durante a ligação não específica.

O DNA alvo, HP-DNA, Tampão de Reacção, dNTPs, iniciadores de amplificação AP₁₈ e AP₂₁, e iniciador PAD₅ de detecção marcado, foram os mesmos que se descreveram posteriormente no Exemplo 6A.

Obteve-se AmplitaqTM DNA polimerase de Perkin-Elmer/Cetus numa concentração de 5 unidades/ μ l.

Dissolveu-se o hidróxido de potássio (KOH) em água desionizada para se obter um stock de trabalho com uma concentração de 600 mM.

Dissolveu-se cloreto de potássio (KCl) em água desionizada para se obter um stock de trabalho com uma concentração de 600 mM.

Diluiu-se o ácido clorídrico (HCl) em água desionizada para se obter um stock de trabalho com uma concentração de 600 mM.

As moléculas alvo foram contaminadas devido à mistura de 5 μ l de alvo (1000 ou zero moléculas) com 5 μ l de stock de trabalho de contaminação (1000 moléculas). Estas amostras foram

depois tratadas com 5 μ l de KOH ou com 5 μ l de KCl, stocks de trabalho (600 mM, com uma concentração final de potássio de 200 mM) e submetidas a aquecimento à temperatura de 94°C durante 60 minutos para se completarem as reacções de corte. As amostras foram depois neutralizadas pela adição ou de 5 μ l de HCl nas amostras tratadas com KOH ou de 5 μ l de H₂O nas amostras tratadas com KCl. Estas reacções foram designadas do seguinte modo:

<u>Reacção</u>	<u>KOH</u>	<u>KCl</u>	<u>HCl</u>	<u>H₂O</u>	<u>Alvo</u>
1	0 μ l	5 μ l	0 μ l	5 μ l	1000
2	0 μ l	5 μ l	0 μ l	5 μ l	1000
3	0 μ l	5 μ l	0 μ l	5 μ l	0
4	0 μ l	5 μ l	0 μ l	5 μ l	0
5	5 μ l	0 μ l	5 μ l	0 μ l	1000
6	5 μ l	0 μ l	5 μ l	0 μ l	1000
7	5 μ l	0 μ l	5 μ l	0 μ l	0
8	5 μ l	0 μ l	5 μ l	0 μ l	0

Todas as reacções foram em seguida ajustadas para um volume final de 100 μ l e para serem 1x em tampão de reacção e para conterem cada uma dNTP numa concentração de 100 μ M, 50 picomoles de cada iniciador de amplificação AP₁₈ e AP₂₁, e 3,2 unidades de Amplitaq TM de DNA polimerase. As reacções foram em seguida ciclarizadas trinta vezes num Perkin-Elmer/Cetus Thermal Cycler pelo aquecimento à temperatura de 95°C durante 2 minutos seguidas de 50°C durante 5 minutos para cada ciclo. Os produtos de amplificação resultante foram detectados por associação de 10 μ l de cada reacção com 1 μ l de uma solução de PAD₅

oligonucleotídico marcado com ^{32}P (7000 Ci/mole, 100 femtomoles/ μl) e aquecimento a 95°C durante 2 minutos, seguidos de 60°C durante 10 minutos. Após arrefecimento para a temperatura ambiente, adicionaram-se 10 μl de tampão de impregnação em cada reacção e desnaturaram-se os produtos por aquecimento à temperatura de 90°C durante 3 minutos e depois por arrefecimento para a temperatura ambiente. Os produtos foram analisados pelo desenvolvimento das amostras em PAGE de desnaturação a 10%, seguidos de autoradiografia.

A fotografia do auto-radiograma está presente na Fig. 27. Como esperado, no caso em que as amostras foram tratadas com KCl (reacções 1 a 4, faixas 1 a 4, respectivamente), as reacções de alvo com 1000 moléculas não podem ser diferenciadas dos controlos de alvo com zero moléculas.

Este facto é devido ao falso sinal fortemente positivo resultante da presença de 1000 moléculas de contaminação que permanecem inalteradas pelo tratamento com KCl. Em contraste, no caso em que as amostras foram tratadas com KOH antes da amplificação, as amplificações do alvo de 1000 moléculas (reacções 5 e 6, respectivamente), são facilmente distinguíveis dos controlos de zero moléculas correspondentes, reacções 7 e 8, faixas 7 e 8, respectivamente. Isto verifica-se porque o sinal de interferência de 1000 moléculas de contaminação foi efectivamente removido pelo tratamento com KOH.

EXEMPLO 7

Modificação Ribonucleotídica de Produtos de Amplificação derivados de LCR: Cisão Química e Enzimática de Contaminação

Neste exemplo, foram introduzidas diversas modificações labeis em cada cadeia de um produto de amplificação produzido por uma amplificação do tipo LCR. As ligações labeis neste exemplo foram produzidas através da ligação de sondas de amplificação que continham um único ribonucleótido nas extremidades 3'. Como o produto de amplificação derivado de PCR modificado similarmente, do Exemplo 6, a introdução deste tipo de ligação lábil no produto de amplificação modificado torna-o receptível à destruição enzimática, com RNase a temperaturas menores e à destruição química, na presença de uma base forte a temperaturas elevadas.

Foi utilizada uma região de 45 pares de bases de HIV como sequência de amplificação neste exemplo. O alvo de 45-mer foi enviado utilizando-se três pares de sondas de amplificação (AP_{18}/pAP_{18} , pAP_{19}/pAP_{19} , e pAP_{20}/pAP_{20}), como demonstrado na Fig. 28.

A. Amplificação LCR de HIV Utilizando-se Sondas de Amplificação Modificadas e Detecção Quantitativa destas Sondas

Nesta experiência, foi ampliado um clone de HIV da região de 45 pares de bases, utilizando-se três pares de bases de sondas de amplificação, AP_{18}/pAP_{18} , pAP_{19}/pAP_{19} , e pAP_{20}/pAP_{20} , como representado na Fig. 28. As sondas de amplificação pAP_{18} , pAP_{19} , pAP_{19} , pAP_{20} , e pAP_{20} continham resíduos únicos de ribonucleótidos na extremidade 3', de tal forma que a ligação produzia um produto de amplificação modificado contendo ligações ribonucleotídicas labeis. Os produtos de amplificação modificados resultantes foram depois quantificados por comparação com pa

drões e por diluições em série, seguidos de nova amplificação utilizando-se quantidades conhecidas de HIV de tipo natural alvo como padrões. Este produto de amplificação quantificado foi depois utilizado em experiências posteriores como contaminação veicular controlada.

A ligase estável ao calor (TSL) de *thermus thermophilus*, HB8 (ATCC Nº 27634) e o tampão de DNA ligase estável ao calor (TSLB) foram idênticos aos utilizados no Exemplo 2B.

O AP₁₈ oligonucleotídico foi como o descrito no Exemplo 6A e continha um resíduo de ribo-guanosina na extremidade 3'.

pAP₁₈, oligonucleotídico tinha extremidade 5' fosforilada por via química e foi sintetizado e purificado como descrito no Exemplo 1.

Os oligonucleótidos pAP₁₉, pAP₁₉', pAP₂₀ e pAP₂₀' foram sintetizados para conter o grupo fosfato na extremidade 5' e um resíduo único de ribonucleótido na extremidade 3'. O grupo fosfato foi introduzido por fosforilação química, como descrito no Exemplo 1. Os ribonucleótidos 3' foram introduzidos por síntese de iniciação de suportes de RNA apropriados, isto é, pAP₁₉ foi sintetizado a partir de um suporte de RNA-G, pPA₁₉, foi sintetizado a partir de um suporte RNA-C, pAP₂₀ foi sintetizado a partir de um suporte de RNA-A e pAP₂₀', foi sintetizado a partir de um suporte de RNA-U. Os suportes de RNA foram adquiridos por Glen Research Corporation (Herndon, Virginia). Após a síntese, os oligonucleótidos foram submetidos a protocolos de desprotecção padrão e purificação, como descrito no Exemplo 1. Deve notar-se que para as experiências seguintes não é necessário que pAP₂₀ contenha um ribonucleótido na extremidade 3' nem que o oligonucleótido pAP₂₀' seja fosforila

do na extremidade 5'. Esta modificação foi incorporada para tornar o sistema susceptível ao uso de um maior número de sondas de amplificação nas experiências futuras.

O par das sondas de amplificação AP₁₈/pAP₁₈, foi marcado com 32p por meio de γ32p-deoxiadenosina trifosfato e T4 kinase para uma actividade específica aproximada de 7000 Ci/mmole, como descrito no Exemplo 2C. Deve notar-se que apenas na sonda de amplificação AP₁₈ era marcada, porque o oligonucleótido pAP₁₈, já é fosforilado na extremidade 5'.

HP-DNA foi igual ao descrito no Exemplo 6A.

O DNA alvo, clone pBH10, foi diluído para a concentração apropriada numa solução de HP-DNA a 1 µg/µl, e em seguida aquecido num banho de água ebuliente durante 15 minutos para fragmentação e desnaturação do DNA plasmídeo.

Todas as reacções de amplificação foram realizadas em tubos de Eppendorf de 0,5 ml com um volume total de 40 µl de 1x TSLB e continham 2 picomoles de cada sonda de amplificação (AP₁₈, pAP₁₈', pAP₁₉, pAP₁₉', pAP₂₀ e pAP₂₀'), com 100 femtomoles adicionais de par de amplificação marcado com 32p pAP₁₈//pAP₁₈', 0,6 unidades de TSL, 10 µg de HP-DNA, e eram 66 µM em NAD. Cada reacção continha um total de 2,10 picomoles do par de amplificação AP₁₈/pAP₁₈, com uma actividade específica média de 333 Ci/mmole. Esta marca proporcionou um meio de visualiza-ção dos produtos de amplificação resultantes. Além do citado anteriormente, as reacções continham também:

Reacção 1:	20 attomoles de alvo
Reacção 2:	20 attomoles de alvo
Reacção 3:	2 attomoles de alvo
Reacção 4:	2 attomoles de alvo

Reacção 5:	0,2 attomoles de alvo
Reacção 6:	0,2 attomoles de alvo
Reacção 7:	0,0 attomoles de alvo
Reacção 8:	0,0 attomoles de alvo

Adicionaram-se 2 gotas de óleo mineral em cada tubo para impedir a evaporação durante a amplificação. Estas reacções foram submetidas a ciclos 15 vezes num Perkin-Elmer/Cetus Thermal Cycler por aquecimento à temperatura de 90°C durante 2 minutos seguidos de 50°C durante 5 minutos para cada ciclo. Foi retirado 1/8 de cada reacção (5 μ l) e adicionado a 10 μ l de tampão de impregnação. As amostras foram desnaturadas por aquecimento à temperatura de 90°C durante 3 minutos, seguido de arrefecimento para a temperatura ambiente. As reacções de amplificação foram analisadas por desenvolvimento das amostras em PAGE de desnaturação a 15%, seguidas de auto-radiografia. Aproximadamente 5 minutos antes da separação electroforética se completar, foram introduzidas no gel quantidades conhecidas do par de oligonucleótidos AP₁₈/pAP₁₈, com a mesma actividade específica utilizada nas experiências, para servirem como padrões na avaliação do rendimento do produto de amplificação. Estes padrões apresentam-se na faixa 9 (25 femtomoles), na faixa 10 (2,5 femtomoles), e na faixa 11 (0,25 femtomoles).

Uma fotografia do auto-radiograma, Fig. 29, mostra que o produto de amplificação de 45-mer esperado se forma em resposta directa à quantidade de alvo presente no início da reacção de amplificação. Não há sinal detectável nos controlos de zero moléculas (reacções 7 e 8, faixas 7 e 8), embora os produtos de amplificação de 45 bases dos níveis de alvo ainda menores

(0,2 attomole, reacções 5 e 6, faixas 5 e 6, respectivamente) fossem visíveis no autoradiograma.

Com base na comparação dos sinais dos produtos de amplificação de 45-mer das reacções 1-6 (faixas 1-6) com os padrões (faixas 9-11), as reacções foram avaliadas como tendo sido amplificadas 10000 vezes, o que representa uma eficiência de ciclo média de 85%.

A fim de proporcionar uma confirmação da quantidade do produto de amplificação modificado, diluiu-se a reacção 1 em série (com base no rendimento avaliado do produto de amplificação modificado) e "re-ampliou-se" conjuntamente com padrões de alvo de tipo natural.

Todas as reacções de amplificação foram desenvolvidas em tubos de Eppendorf de 0,5 μ l com o volume total de 40 μ l de 1x TSLB, e continham dois picomoles de cada uma das sondas de amplificação (AP₁₈, pAP₁₈, pAP₁₉, pAP₁₉, pAP₂₀, pAP₂₀), uma quantidade adicional de 100 femtomoles de par de sondas de amplificação marcado com 32p AP₁₈/pAP₁₈, (actividade final específica de 333 Ci/mmol), e 0,06 unidades de TSL, 5 μ g de HP-DNA, e eram 66 μ M em NAD. Além do citado anteriormente, as reacções continham também o seguinte:

	Alvo	Produto de Amplificação
<u>Reacção</u>	<u>(attomoles)</u>	<u>modificado (attomoles)</u>
12	10	0
13	10	0
14	1	0
15	1	0
16	0	0

<u>Reacção</u>	<u>Alvo (attomoles)</u>	<u>Produto de Amplificação modificado (Attomoles)</u>
17	0	0
18	0	100
19	0	100
20	0	10
21	0	10
22	0	1
23	0	1

Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral a cada tubo de reacção para impedir a evaporação durante a ampliação. As reacções foram submetidas a 15 ciclos num Perkin-Elmer/Cetus Thermal Cycler por aquecimento a 90°C durante dois minutos, seguidos de 50°C durante 5 minutos para cada ciclo. Foi retirado e adicionado 1/4 de cada reacção (10 µl) a 10 µl de tampão de impregnação. As amostras foram desnaturadas pelo calor à temperatura de 90°C durante 3 minutos, seguido de arrefecimento para a temperatura ambiente. As reacções de amplificação foram analisadas pelo desenvolvimento das amostras em PAGE de desnaturação a 15% seguida de auto-radiografia.

Uma fotografia do auto-radiograma, Fig. 30, mostra que os sinais produzidos da amplificação de 10 attomoles calculados do produto de ampliação modificado (reacções 20 e 21, faixas 20 e 21, respectivamente) e de 10 attomoles de alvo do tipo natural (reacções 12 e 13, faixas 12 e 13, respectivamente) são equivalentes. Este facto confirma que o rendimento calculado do produto na reacção 1 era exacto. O produto de amplificação modificado da reacção 1 foi utilizado nos exemplos se-

guintes como um produto de amplificação contaminante.

B. Amplificação LCR de HIV na Presença de Contaminação com e sem Corte por Base Forte

Neste Exemplo, moléculas alvo do tipo natural (plasmídeo pBH10) foram contaminadas com o produto de ampliação modificado proveniente da reacção 1 e em seguida tratadas com KOH como agente de corte ou com KCl como controlo. Após o corte para destruir a contaminação, as amostras foram neutralizadas e submetidas a amplificação LCR para confirmar que as moléculas contaminantes estavam destruídas.

A contaminação foi proveniente de misturas reaccionais sob a forma de produto de amplificação modificado proveniente da reacção 1 (quantificado de acordo com o Exemplo 7A) para ter um nível de 5 femtomoles do produto por 1 ul de mistura reaccional. Este produto foi diluído e adicionado a misturas reaccionais na concentração pretendida.

Dissolveu-se o hidróxido de potássio em água desionizada para se obter um stock de trabalho com uma concentração de 700 mM.

O cloreto de potássio foi dissolvido em água desionizada para se obter um stock de trabalho com uma concentração de 700 mM.

O ácido clorídrico (HCl) foi dissolvido em água desionizada para se obter um stock de trabalho com uma concentração de 700 mM.

Todos os reagentes foram iguais aos descritos no Exemplo 7A.

As reacções que continham alvo (10 attomoles ou zero attomoles), contaminação, 10 attomoles, HP-DNA (5 µg) e sondas de amplificação (2,0 picomoles de cada uma de AP₁₈/pAP₁₈, pAP₁₉/pAP₁₉, e pAP₂₀/pAP₂₀, e 0,10 picomles de pAP₁₈/pAP₁₈, marcados com 32p) num volume de 18 µl e foram em seguida tratados com 4 µl de stock de trabalho de hidróxido de potássio ou de cloreto de potássio (700 mM, com uma concentração reaccional final de 127 mM) e aquecidas à temperatura de 90°C durante 30 minutos para completar a reacção de corte. As reacções foram depois neutralizadas com 4 µl de ácido clorídrico ou de água e submetidas a amplificação de LCR como descrito em seguida. As reacções foram designadas do seguinte modo:

<u>Reacção</u>	<u>KOH</u>	<u>KCL</u>	<u>HCL</u>	<u>H₂O</u>	<u>Alvo</u>
					<u>(amoles)</u>
1	4 µl	0 µl	4 µl	0 µl	10
2	4 µl	0 µl	4 µl	0 µl	10
3	4 µl	0 µl	4 µl	0 µl	0
4	4 µl	0 µl	4 µl	0 µl	0
5	0 µl	4 µl	0 µl	4 µl	10
6	0 µl	4 µl	0 µl	4 µl	10
7	0 µl	4 µl	0 µl	4 µl	0
8	0 µl	4 µl	0 µl	4 µl	0

Todas as reacções foram em seguida ajustadas para um volume final de 40 µl, de maneira a conterem 1x de TSLB, 66 uM de NAD e 0,06 unidades de TSL. Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral a cada reacção para impedir a evaporação durante a amplificação. As reacções foram depois submetidas a 15 ciclos num

Perkin-Elmer/cetus Thermal Cyclor por aquecimento à temperatura de 90°C durante 2 minutos, seguido de 50°C por 5 minutos em cada ciclo. Retirou-se 1/8 das reacções (5 µl) e adicionou-se a 10 µl de tampão de impregnação desnaturando-se por aquecimento à temperatura de 90°C durante 3 minutos. Os produtos resultantes foram analisados por desenvolvimento das amostras em PAGE a 15% de desnaturação, seguida de auto-radiografia.

A fotografia do auto-radiograma (Fig. 31) mostra que as amostras contaminadas tratadas com cloreto de potássio deram sinais de 10 attomoles de alvo (reacções 5 e 6, faixas 5 e 6, respectivamente), que são indistintas dos sinais de alvo de zero attomole (reacções 7 e 8, faixas 7 e 8, respectivamente). Este resultado era de esperar porque o sinal de interferência resultante de 10 attomoles de contaminação lhe era devido. Em contraste, as amostras tratadas com hidróxido de potássio não evidenciaram sinal de reacções de zero attomole de alvo (reacções 3 e 4, faixas 3 e 4, respectivamente) e sinais de alvo de 10 attomoles (reacções 1 e 2, faixas 1 e 2, respectivamente) que são claramente positivas acima de zero. Este facto demonstra que o agente de corte, o hidróxido de potássio, elimina afectivamente quaisquer sinais de interferência provenientes da presença de contaminação.

C. Amplificação LCR de HIV Seguida de Corte com RNase A

Neste exemplo, foi ampliada uma fracção de HIV mediante a aplicação de sondas de amplificação modificadas (Fig. 28) iguais às utilizadas nos exemplos anteriores, com produtos resultantes que se submeteram a RNase A como agente de corte. Como a RNase A é

específica para resíduos de pirimidina, o tratamento deve cortar apenas a cadeia menor do produto de amplificação. A cadeia menor do produto de amplificação modificado resultante contém duas ligações internas ribopirimidínicas, enquanto que a cadeia superior contém dois resíduos internos de ribo-purina. Por este motivo, a sonda de amplificação PA₂₀, foi marcada com 32p de forma que apenas a cadeia menor do produto de amplificação resultante estava marcada.

Como pPA₂₀, já continha um grupo 5'-fosfato, o marcador 32p foi introduzido mediante um processo de permuta de Kinação pelo processo seguinte. Adicionaram-se 10 unidades de T4 polinucleótido kinase (New England Biolabs, Inc.) a uma solução contendo 1,0 picomoles de oligonucleótido pAP₂₀, 2,5 nanomoles de adenosina 5'-fosfato (ADP, Sigma Chemical Company), e 100 picomoles de γ32p-adenosina 5'-trifosfato (ATP, 7000 Ci/mole) em 10 μl de tampão (40 mM tris, pH 7,6/10 mM MgCl₂/12,5 mM DTT). A mistura reaccional foi deixada a incubar à temperatura de 37°C durante 30 minutos, seguida de 90°C durante 5 minutos, para parar a reacção de permuta. Em seguida, foi separado o oligonucleótido marcado do excesso de marcador fazendo-se passar da reacção através de uma coluna de Sephadex G-50 (Sigma Chemical Company) utilizando-se 10 mM de carbonato de hidrogénio e trietilamónio como eluente. As fracções contendo o oligonucleótido foram reunidas e evaporadas utilizando-se um concentrador SpeedVac (Savant Instruments, Inc., Farmingdale, New York). O produto foi re-suspenso em 20 μl de TE (50 femtomoles/μl) e determinado para conter uma actividade específica de aproximadamente 3500 Ci/mole.

As sondas de amplificação (AP_{18}/pAP_{18} , pAP_{19}/pAP_{19} e pAP_{20}/pAP_{20}), a ligase estável à temperatura (TSL), o tampão de DNA ligase estável à temperatura (TSLB), o DNA veicular (HP-DNA) e DNA alvo (plasmídeo pBH10) foram iguais aos descritos no Exemplo 7A.

Dissolveu-se RNase A (Sigma Chemical Company) em TE/150 mM de NaCl com uma concentração de 10 mg/ml. A actividade de DNase contaminante foi destruída mediante o aquecimento desta solução durante 15 minutos num banho de água ebuliente. Utilizou-se uma diluição a 1/20 deste stock em TE na experiência seguinte.

Todas as reacções de amplificação desenvolveram-se em tubos Eppendorf de 0,5 ml com um volume total de 20 μ l de 1x TSLB e continham 1,0 picomoles de cada sonda de amplificação (AP_{18} , pAP_{18} , pAP_{19} , pAP_{19} , pAP_{20} e pAP_{20}), e uma quantidade adicional de 50 femtomoles de sonda de amplificação marcada com ^{32}P , pAP_{20} , 0,03 unidades de TSL, 5 μ g de HP-DNA e eram 66 mM em NAD. Cada reacção portanto continha um total de 1,05 picomoles de pAP_{20} , com uma actividade específica final aproximada de 167 Ci/mmol. Este marcador foi fornecido como um meio de visualização da cadeia menor dos produtos de amplificação resultantes. Em adição ao citado anteriormente, as reacções também continham:

- Reacção 1: 0,0 attomoles do alvo
- Reacção 2: 0,0 attomoles do alvo
- Reacção 3: 10,0 attomoles do alvo
- Reacção 4: 10,0 attomoles do alvo

Adicionaram-se duas gotas de óleo mineral a cada tubo

para impedir a evaporação durante a amplificação. As reacções foram submetidas a 15 ciclos num Perkin-Elmer/Cetus Thermal Cycler com aquecimento à temperatura de 90°C durante 2 minutos seguida de 50°C durante 5 minutos para cada ciclo. Adicionaram-se 1/4 de cada uma das reacções (5 µl) a 5 µl de tampão de impregnação e em seguida submeteu-se a aquecimento à temperatura de 90°C durante 3 minutos e a arrefecimento para a temperatura ambiente para se obter a desnaturação. Retiraram-se quantidades adicionais de 5 µl, 1/4, de cada uma das reacções e trataram-se com 2 µl de RNase A (solução de) (1,0 µg). Cada uma das reacções foi iniciada à temperatura ambiente durante 60 minutos e em seguida diluída pela adição de 5 µl de tampão de impregnação em cada uma das amostras seguida de aquecimento a 90°C por um período de três minutos e depois de arrefecimento para a temperatura ambiente. As reacções tratadas com RNase A foram designadas como reacções 1R, 2R, 3R e 4R.

Os produtos reaccionais foram analisados por desenvolvimento das amostras em PAGE a 10% de desnaturação seguido de autoradiografia. Uma fotografia do auto-radiograma apresentada na Fig. 32 mostra o produto de amplificação de 45-mer esperado em reacções alvo de 10 attomoles (reacções 3 e 4, faixas 3 e 4, respectivamente), enquanto que os controlos correspondendo a alvo zero (reacções 1 e 2, faixas 1 e 2, respectivamente) não exibiram sinais do produto de amplificação. Em contraste, nenhuma das amostras tratadas com RNase A mostrou qualquer sinal do produto de amplificação de 45-mer (reacções 1R, 2R, 3R e 4R, faixas 5, 6, 7 e 8, respectivamente). Estes factos confirmam que o produto de amplificação modificado é efectivamente destruído pelo agente de corte a RNase A.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Método para reduzir a contaminação de produto de amplificação em um processo de amplificação, caracterizado pelo facto:

a) de se introduzir pelo menos uma modificação no produto de amplificação referido, de tal modo que o produto de amplificação modificada resultante se distingue duma certa sequência alvo; e

b) de se fazer contactar o produto de amplificação, citado antes, com um meio para, selectivamente, eliminar esse produto de amplificação modificada.

2.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se escolher a modificação no grupo constituído por ligantes, agentes de ligação cruzada, sítios de reconhecimento de enzima e sítios cindíveis por via química.

3.- Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a modificação referida ser um sítio de reconhecimento de uma enzima e de o meio, também referido, para a eliminação selectiva do produto de amplificação modificado ser uma enzima.

4.- Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima, citado antes, ser um sítio de reconhecimento de RNase e de o meio, também referido antes, para eliminar selectivamente o produto de amplificação modificado ser uma RNase.

5.- Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de se escolher a RNase entre RNase H e RNase A.

6.- Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de a RNase, citada antes, ser RNase A.

7.- Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima, citado

antes, ser um sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição e de o meio para a eliminação selectiva, também citado antes, de o produto de amplificação modificada ser uma enzima de restrição.

8.- Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima de restrição, referido antes, ser reconhecido por uma enzima de restrição de corte remoto.

9.- Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de a enzima de restrição de corte remoto, citada antes, ser Fok I.

10.- Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a modificação, referida antes, ser um ligante e de o meio citado para a eliminação selectiva de o produto de amplificação, também citado antes, ser um parceiro de ligação específica imobilizado para o ligante, referido antes.

11.- Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de se escolher o ligante, citado antes, entre biotina e fluoresceína.

12.- Método de acordo com a reivindicação 2, caracte

rizado pelo facto de a modificação, citada antes, ser um agente de ligação cruzada e de o meio, referido antes, para selectivamente eliminar o produto de amplificação modificada, referido ser um activador para um agente de ligação cruzada, citado antes.

13.- Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a modificação, citada antes, ser um sítio cindível quimicamente.

14.- Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de o sítio cindível por via química ser incorporado em uma sonda de amplificação por ligação de extremidades 3' e 5' às sequências parciais da sonda por meio de um reagente de ligação homobifuncional escolhido no grupo constituído por di-tio-bis(succinimidil-propionato, disuccinimidil-tartarato e glicol-bis-(succinimidil-succinato) de etileno.

15.- Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de o sítio quimicamente cindível, citado antes, incluir uma ligação ribonucleotídica interna.

16.- Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o processo de amplificação, citado antes, ser um tipo de reacção de cadeia de polimerase de processo de

amplificação ou um tipo de reacção de cadeia de ligase de proce
so de amplificação.

17.- Conjunto para utilização em um tipo de reacção de cadeia de polimerase de processo de amplificação, caracteriza
do pelo facto de incluir:

a) pelo menos um iniciador de amplificação modificada, capaz de introduzir pelo menos uma modificação em um produto de amplificação derivado de reacção de cadeia de polimerase (PCR) de tal forma que o produto de amplificação modificada derivado de PCR é diferenciável da sequência alvo; e

b) um meio para a eliminação selectiva de o produto de amplificação modificada derivado de PCR, citado antes.

18.- Conjunto de acordo com a reivindicação 17, carac
terizado pelo facto de se escolher o iniciador de amplificação modificada, citada antes, entre iniciadores de amplificação modi
ficada de ligantes, iniciadores de amplificação modificada de agentes de reacção cruzada, iniciadores de amplificação modifica
da de sítio de reconhecimento de enzima e iniciadores de amplifi
cação modificada pela presença de um sítio cindível quimicamente.

19.- Conjunto de acordo com a reivindicação 18, carac
terizado pelo facto de o iniciador de amplificação modificada ser um iniciador de amplificação modificada de sítio de reconhe-

cimento de enzima e de o meio para eliminar selectivamente o pro
duto de amplificação derivado de PCR, citado antes, ser uma enzima
ma.

20.- Conjunto de acordo com a reivindicação 19, caracter
terizado pelo facto de o sítio de reconhecimento da enzima, citado
do antes, ser um sítio de reconhecimento de RNase e de os meios,
citados antes, para eliminação selectiva do produto de amplificação
ção modificada derivado de PCR, também citado antes, ser uma
RNase.

21.- Conjunto de acordo com a reivindicação 20, caracter
terizado pelo facto de se escolher a RNase, citada antes, entre
RNase H e RNase A.

22.- Conjunto de acordo com a reivindicação 21, caracter
terizado pelo facto de a RNase, citada antes, ser RNase A.

23.- Conjunto de acordo com a reivindicação 19, caracter
terizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima, citado
do antes, ser um sítio de reconhecimento de enzima de restrição
e de os meios para a eliminação selectiva de o produto de amplifi
ficação modificada derivado de PCR, também citado antes, ser uma
enzima de restrição.

24.- Conjunto de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima de restrição, citado antes, ser reconhecido por uma enzima de restrição de corte remoto.

25.- Conjunto de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de a enzima de restrição de corte remoto, citada antes, ser Fok I.

26.- Conjunto de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de o iniciador de amplificação modificada ser um iniciador de amplificação modificado pela presença de um sítio quimicamente cindível e de o meio, citado antes, para eliminação do produto de amplificação modificada derivado de PCR, também citado antes, ser uma base forte.

27.- Conjunto de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de o iniciador de amplificação modificada, citado antes, conter uma substituição ribonucleotídica.

28.- Conjunto de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo facto de a substituição ribonucleotídica, citada antes, ser na extremidade 3' de o iniciador de amplificação modificada, citada antes.



29.- Conjunto para utilização em um tipo de reacção de cadeia de polimerase do processo de amplificação, caracterizado pelo facto:

a) de incluir uma mistura de desoxinucleosidos-trifosfato e de, pelo menos, uma molécula desses ribonucleosidos-trifosfato estar modificada para introduzir pelo menos uma modificação no produto de amplificação derivado de PCR, de tal modo que o produto de amplificação modificada derivado de PCR resultante seja distinguível da sequência alvo; e

b) de incluir um meio para eliminação selectiva do produto de ampliação modificada derivado de PCR, citado antes.

30.- Conjunto de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo facto de se escolher o desoxinucleosido-trifosfato no grupo que consiste em desoxinucleosidos-trifosfato modificados de ligante, desoxinucleosidos-trifosfato modificados de agente de ligação cruzada, desoxinucleosidos-trifosfato modificados de sítio de reconhecimento de enzima e desoxinucleosidos-trifosfato modificados pela presença de um sítio quimicamente cindível.

31.- Conjunto de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima, citado antes, ser um desoxiribonucleosido-trifosfato e de o meio para eliminar selectivamente o produto de amplificação modificada

derivado de PCR, também citado antes, ser uma RNase.

32.- Conjunto de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de o nucleosido-trifosfato ser um desoxiribonucleosido-trifosfato e de o meio para a eliminação do produto de amplificação modificada derivado de PCR, citado antes, ser uma base forte.

33.- Conjunto para utilização em um tipo de reacção de cadeia de ligase do processo de amplificação, caracterizado pelo facto:

a) de incluir pelo menos uma sonda de amplificação modificada capaz de incluir pelo menos uma modificação em o produto de amplificação derivado de uma reacção de cadeia de ligase (LCR), de tal modo que o produto de amplificação modificada derivado de PCR seja distinguível da sequência alvo; e

b) de incluir um meio para eliminar selectivamente o produto de amplificação modificada derivado de LCR, citado antes.

34.- Conjunto de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo facto de a sonda de amplificação modificada, citada antes, se escolher no grupo constituído por sondas de amplificação modificada de ligante, sondas de amplificação modificada de agente de ligação cruzada, sondas de amplificação modificada de

sítio de reconhecimento de enzima e sondas de amplificação modificada pela presença de um sítio cindível por via química.

35.- Conjunto de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de a sonda de amplificação modificada, citada antes, ser uma sonda de amplificação modificada de sítio de reconhecimento de enzima e de o meio para eliminar selectivamente o produto de amplificação modificada derivado de LCR, citado antes, ser uma enzima.

36.- Conjunto de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima, citado antes, ser um sítio de reconhecimento de uma RNase e de o meio para a eliminação selectiva de o produto de amplificação modificada derivado de LCR, também citado antes, ser uma RNase.

37.- Conjunto de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo facto de a RNase, citada, se seleccionar entre RNase H e RNase A.

38.- Conjunto de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo facto de a RNase, citada, ser RNase A.

39.- Conjunto de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo facto de a sonda de amplificação modificada, citada antes, ser uma sonda de amplificação modificada de sítio de reconhecimento de enzima e de o meio para eliminar selectivamente o produto de amplificação modificada derivado de LCR, citado antes, ser uma enzima.

terizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima, citado antes, ser um sítio de reconhecimento de enzima de restrição e de o meio referido antes, para eliminação selectiva de o produto de amplificação modificada derivado de LCR, também referido antes, ser uma enzima de restrição.

40.- Conjunto de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo facto de o sítio de reconhecimento de enzima de restrição referido ser reconhecido por uma enzima de restrição de corte remoto.

41.- Conjunto de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo facto de a enzima de restrição de corte remoto, citada antes, ser Fok I.

42.- Conjunto de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de a sonda de amplificação modificada, citada antes, ser uma sonda de amplificação modificada pela presença de um sítio cindível por via química e de o meio para eliminar o produto de amplificação modificada derivado de LCR, referido, ser uma base forte.

43.- Conjunto de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo facto de a sonda de amplificação modificada citada antes, conter uma substituição ribonucleotídica.



44.- Conjunto de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo facto de a substituição ribonucleotídica, referida antes, ser com a extremidade 3' dessa sonda de amplificação modificada.

45.- Método para amplificar uma sequência de amplificação de uma sequência alvo, caracterizado pelo facto:

a) de se fazer contactar essa sequência de amplificação com pelo menos dois iniciadores de amplificação em excesso e desoxinucleosidos-trifosfato, também em excesso, na presença de um agente de polimerização, sob condições favoráveis à hibridação dos iniciadores de amplificação, referidos, para a sequência de amplificação, também referida e de pelo menos um dos iniciadores de amplificação e/ou dos desoxinucleosidos-trifosfato, citados, terem sido incorporados com uma modificação seleccionada no grupo constituído por ligantes, agentes de ligação cruzada, sítios de reconhecimento de enzima e sítios cindíveis por via química;

b) de se provocar a formação do produto de amplificação modificada;

c) de se efectuar a separação do produto de amplificação modificada citado da citada sequência alvo;

d) de se repetirem as fases de a) até d); e

e) de se fazer contactar o produto de amplificação modificada citado com os meios para eliminarem selectivamente esse

produto.

46.- Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo facto de se realizar a fase (e) no início do processo de amplificação.

47.- Método para amplificar uma sequência de amplificação de uma sequência alvo, caracterizado pelo facto:

a) de se fazer contactar essa sequência de amplificação com pelo menos dois pares de sondas de amplificação, em excesso, na presença de um agente de ligação, sob condições favoráveis à hibridação dessas sondas de amplificação para a sequência de amplificação citada antes, tendo sido incorporada, pelo menos em uma dessas sondas de amplificação uma modificação seleccionada no grupo constituído por ligantes, agentes de ligação cruzada, sítios de reconhecimento de enzima e sítios cindíveis por via química;

b) de se provocar a formação do produto de amplificação modificada;

c) de se efectuar a separação do produto de amplificação modificada citado, da sequência alvo, também citada;

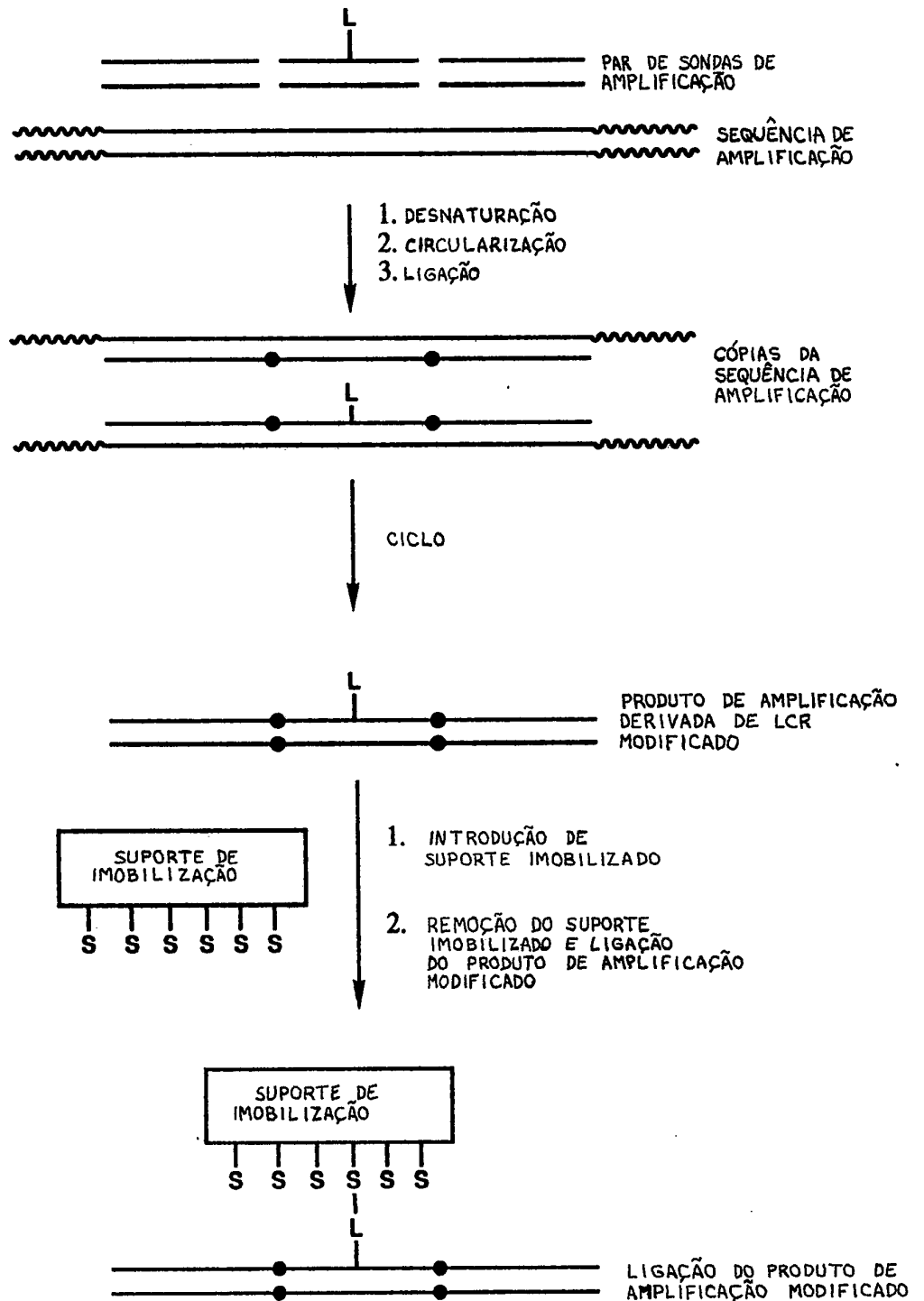
d) de se repetirem as fases de a) a d); e

e) de se fazer contactar o produto de amplificação modificada, citado antes, com os meios para eliminarem selectivamente esse produto de amplificação modificada.

48.- Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo facto de se realizar a fase (e) no início do processo de amplificação.

© Agente Oficial da Propriedade Industrial

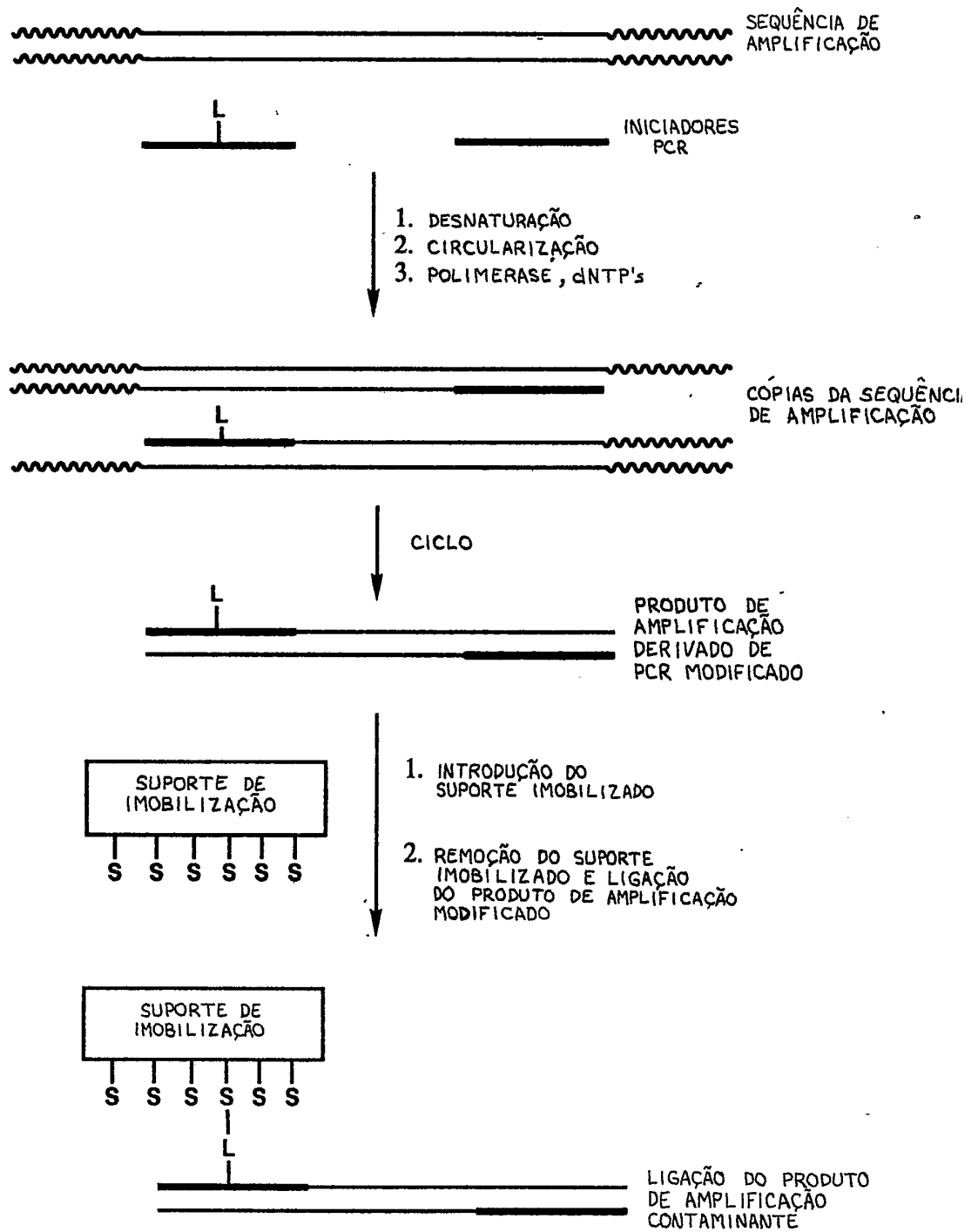
FIG. I



L = MODIFICAÇÃO DE LIGANDO

S = PARCEIRO DE LIGAÇÃO ESPECÍFICO

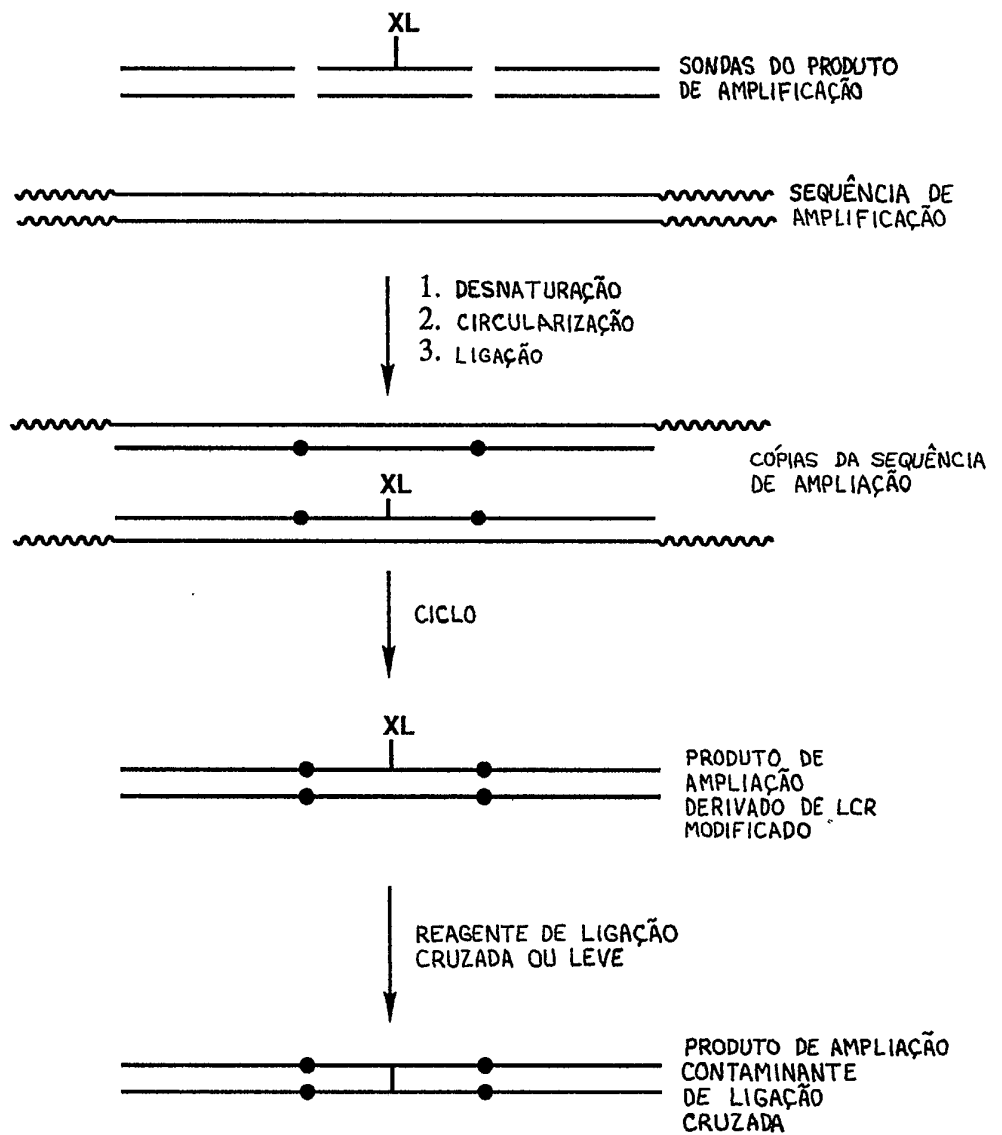
FIG. 2



L = MODIFICAÇÃO DE LIGANDO

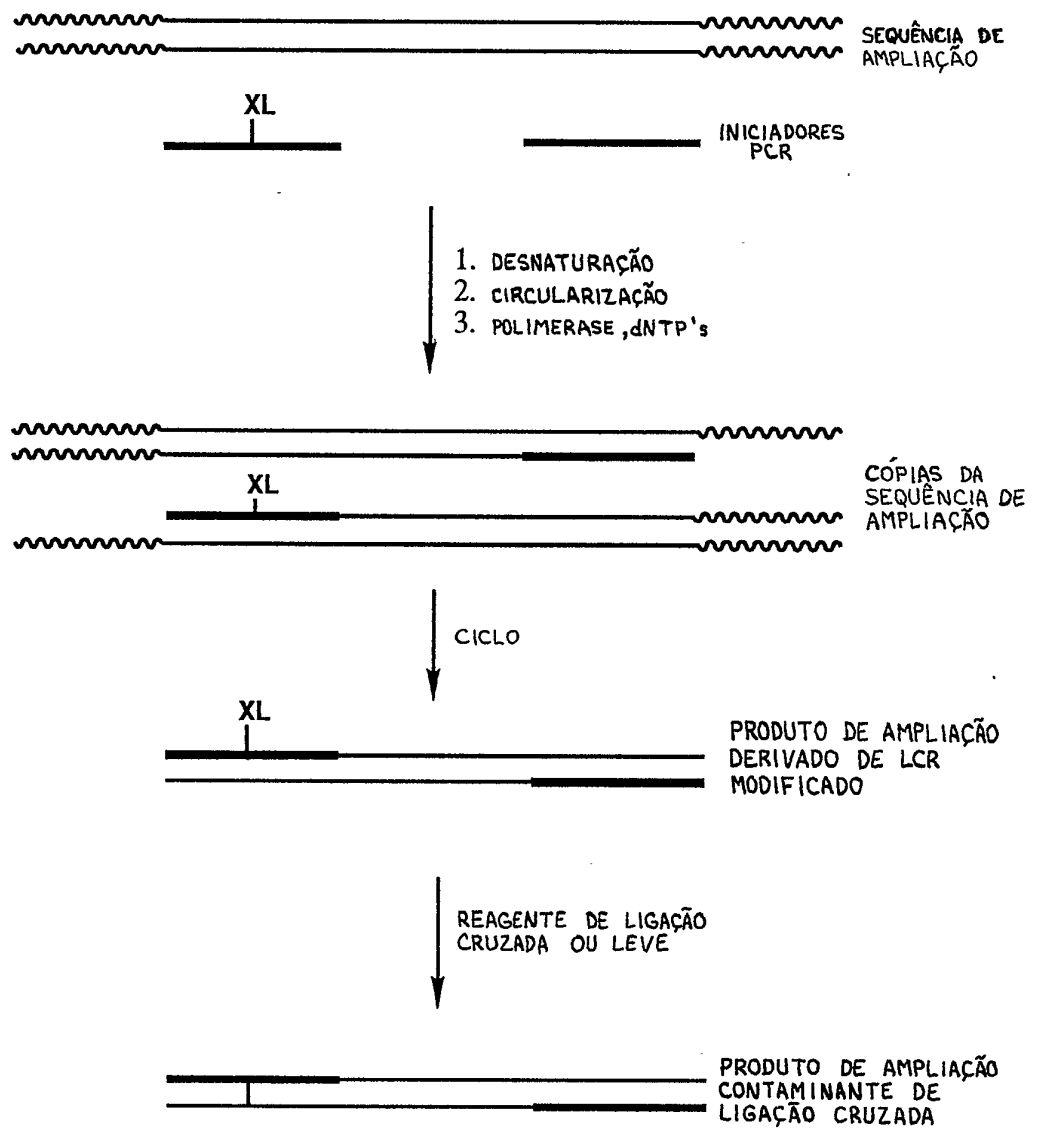
S = PARCEIRO DE LIGAÇÃO ESPECÍFICO

FIG. 3



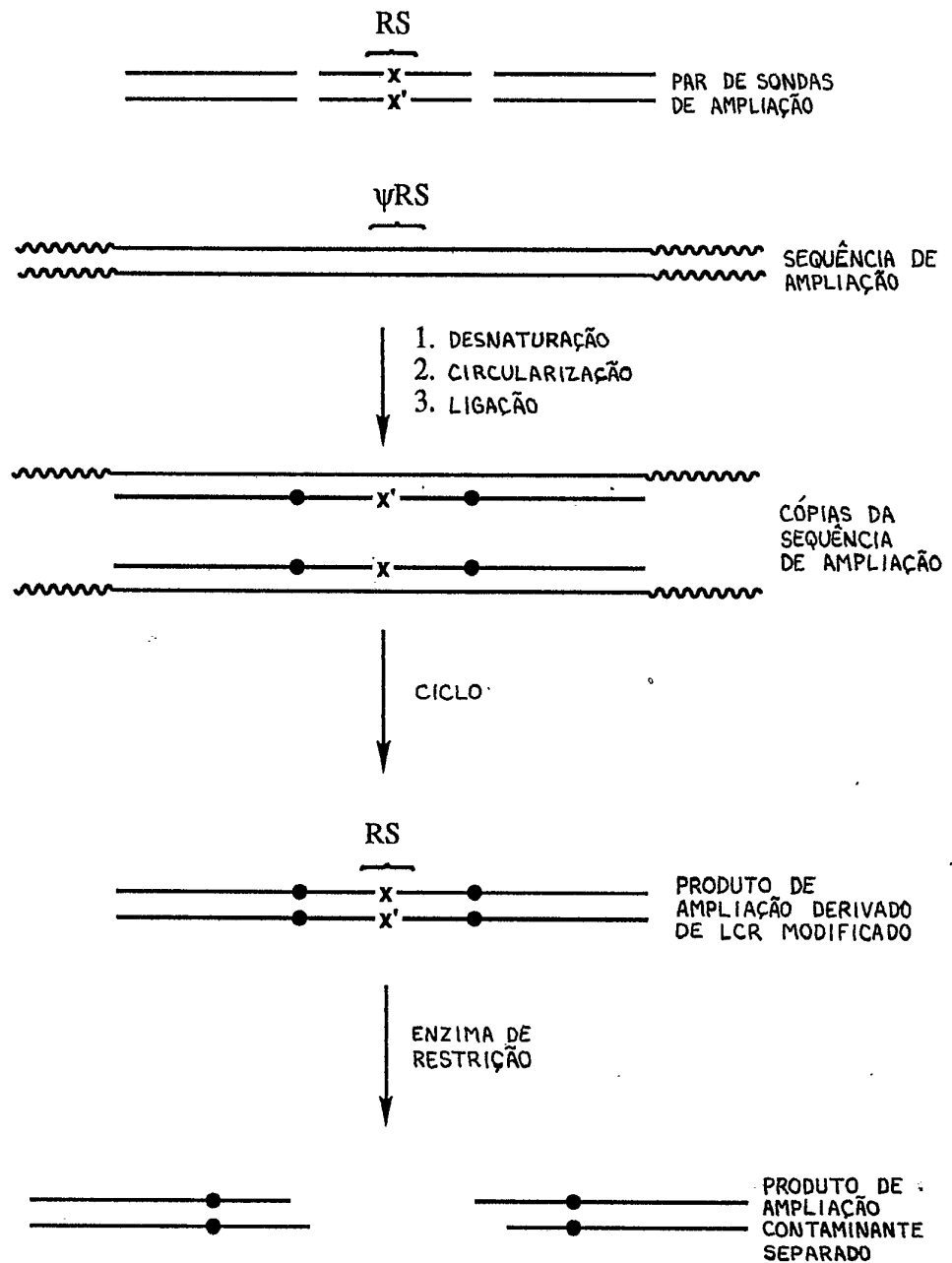
XL = AGENTE DE LIGAÇÃO CRUZADA

FIG. 4



XL = REAGENTE DE LIGAÇÃO CRUZADA

FIG. 5

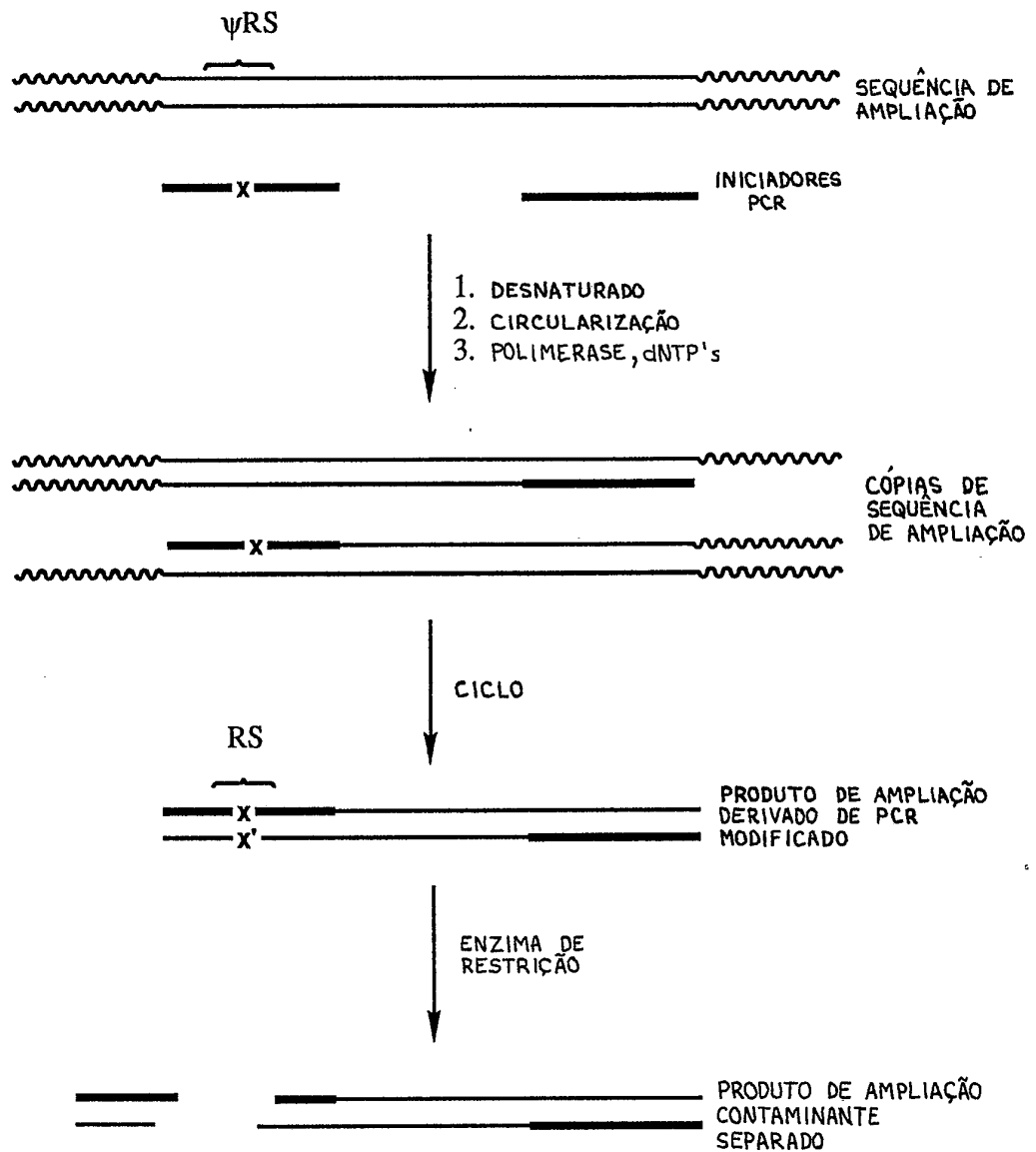


RS = SÍTIO DE RESTRIÇÃO

ψ RS = SÍTIO DE PSEUDO RESTRIÇÃO

x, x' = SEPARAÇÃO DE NUCLEOTIDOS PARA A SEQUÊNCIA DE AMPLIAÇÃO

FIG. 6

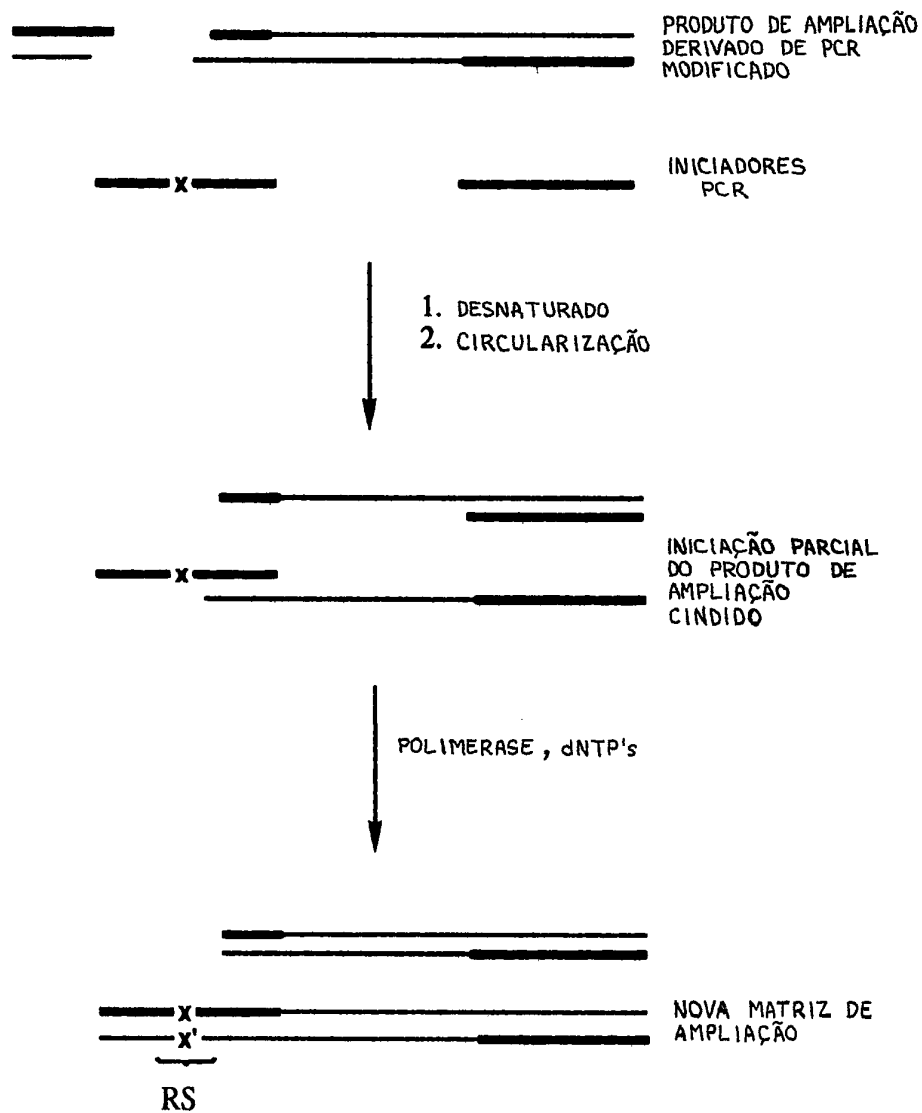


RS = SÍTIO DE RESTRIÇÃO

ψRS = SÍTIO DE PSEUDO RESTRIÇÃO

X, X' = SEPARAÇÃO DE NUCLEOTIDOS PARA A SEQUÊNCIA DE AMPLIAÇÃO

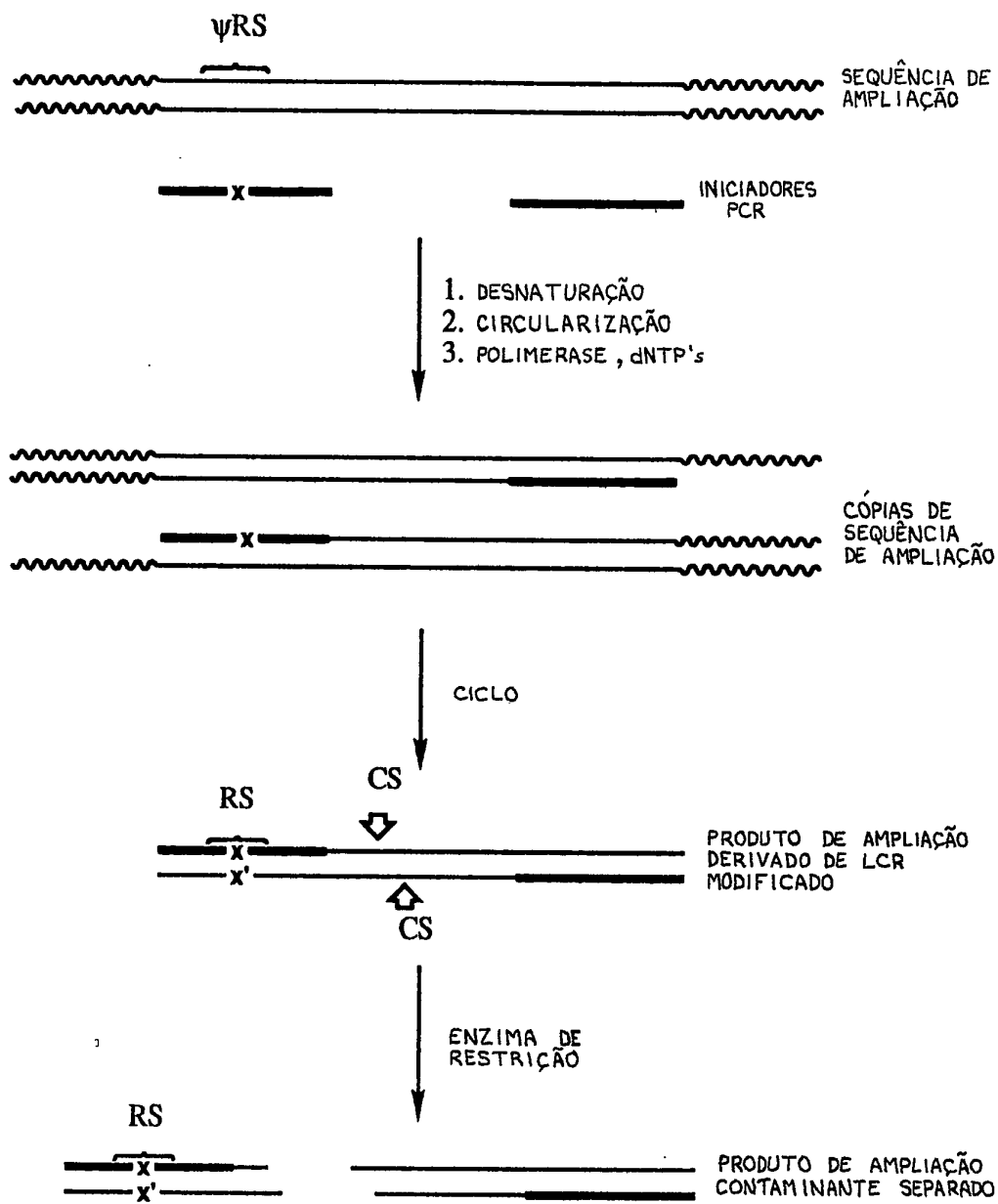
FIG. 7



RS = SÍTIO DE RESTRIÇÃO

X, X' = SEPARAÇÃO DE NUCLEOTIDOS PARA A SEQUÊNCIA DE AMPLIÇÃO

FIG. 8



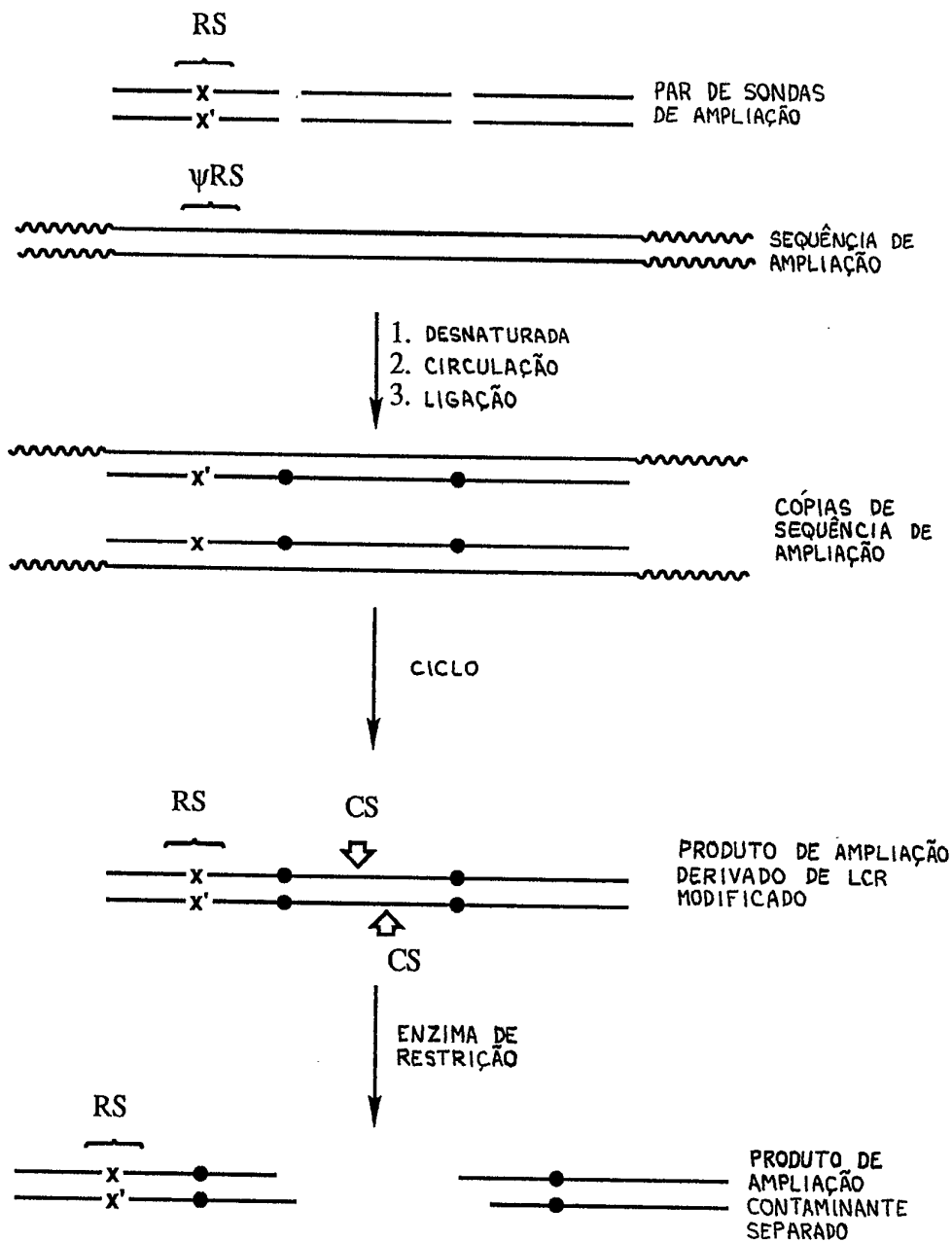
RS = SÍTIO DE RESTRIÇÃO

ψRS = SÍTIO DE PSEUDO RESTRIÇÃO

CS = SÍTIO DE CISÃO

X, X' = SEPARAÇÃO DE NUCLEOTIDOS PARA A SEQUÊNCIA DE AMPLIAÇÃO

FIG. 9



RS = ENZIMA DE RESTRIÇÃO

ψ RS = ENZIMA DE PSEUDO RESTRIÇÃO

CS = SÍTIO DE CLIVAGEM

x, x' = MODIFICAÇÕES DE NUCLEOTIDOS PARA A SEQUÊNCIA DE AMPLIAÇÃO

FIG. 10

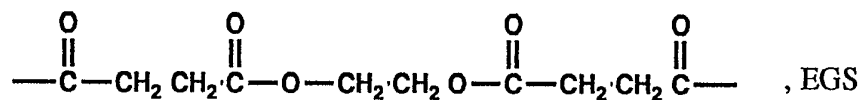
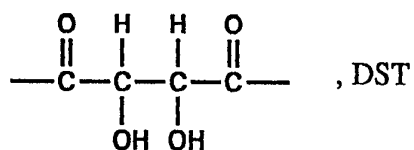
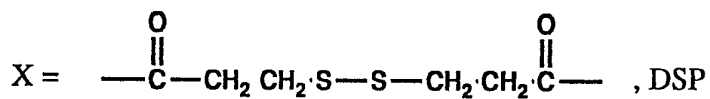
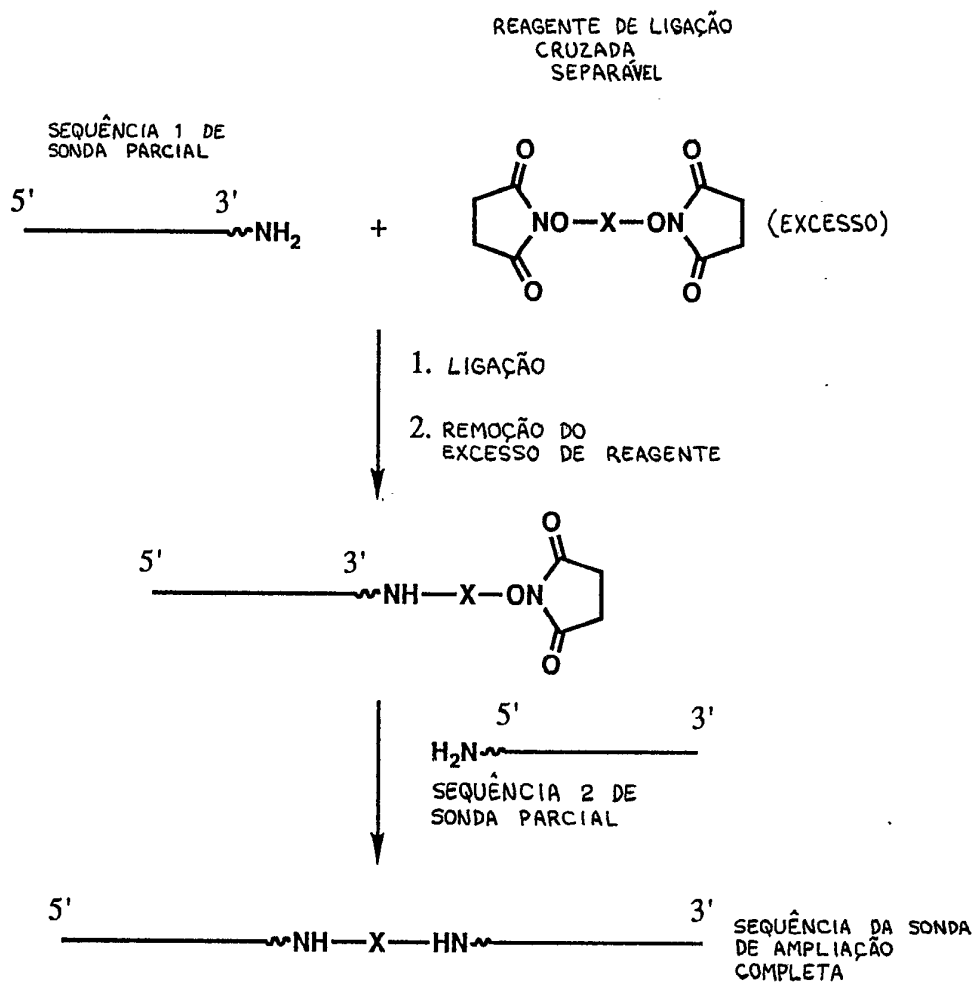


FIG. IIA

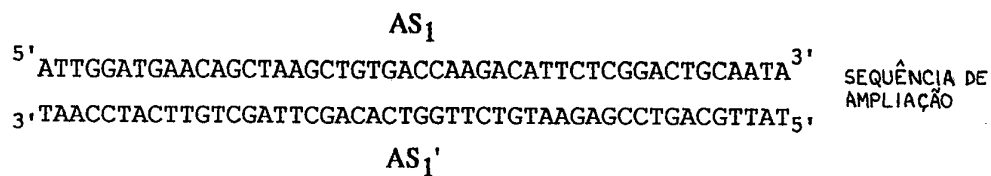


FIG. IIB

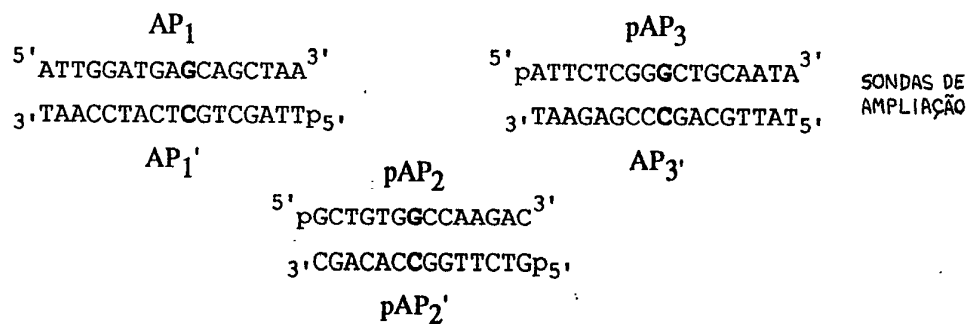


FIG. IIC

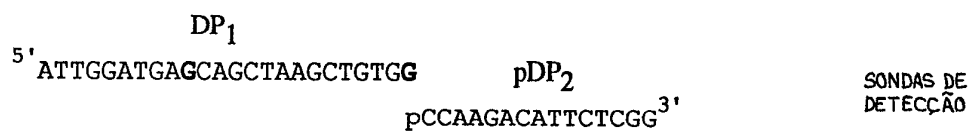
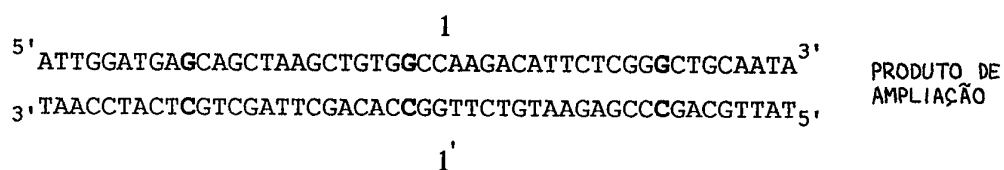


FIG. IID



✓

FIG.12

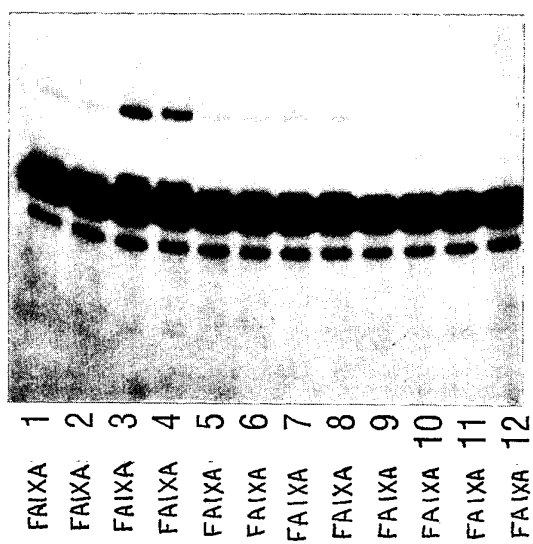


FIG. 13A

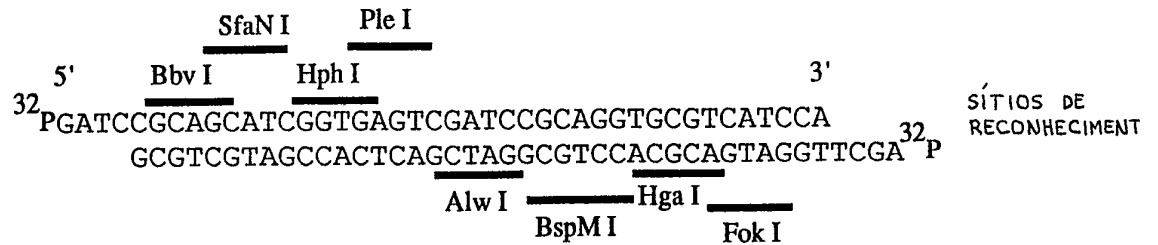


FIG. 13B

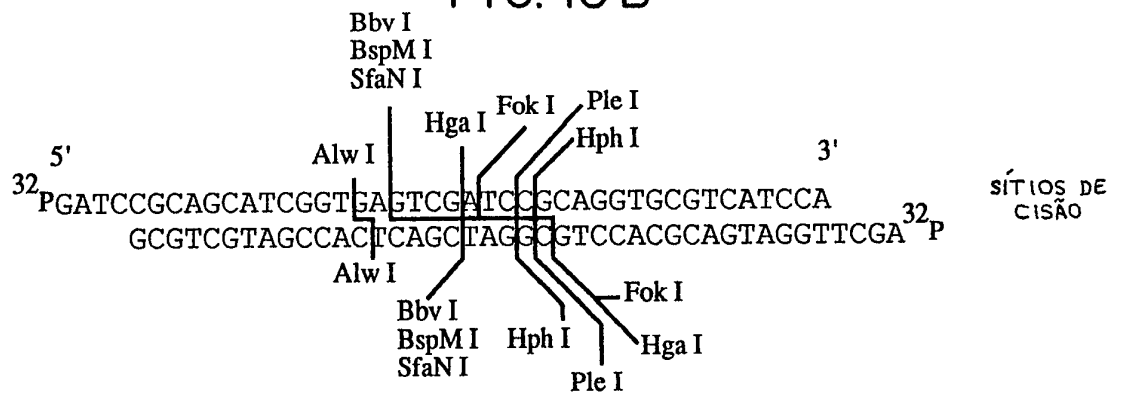


FIG. 13C

ENZIMA DE RESTRIÇÃO	DIMENSÕES DE FRAGMENTOS MARCADOS COM 32P
Alw I	16, 29
Bbv I	18, 24
BspM I	18, 24
Fok I	23, 19
Ple I	25, 20
Hga I	22, 19
Hph I	26, 19
SfaN I	18, 24

✓

FIG. 14

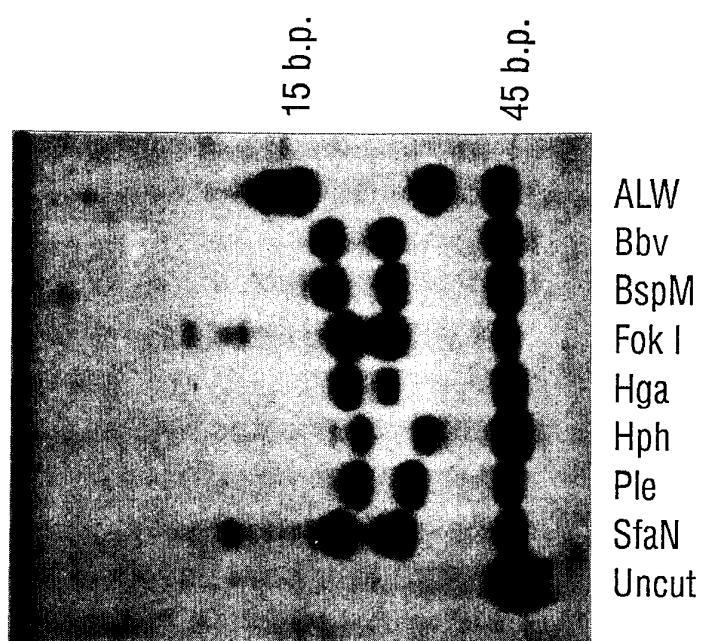
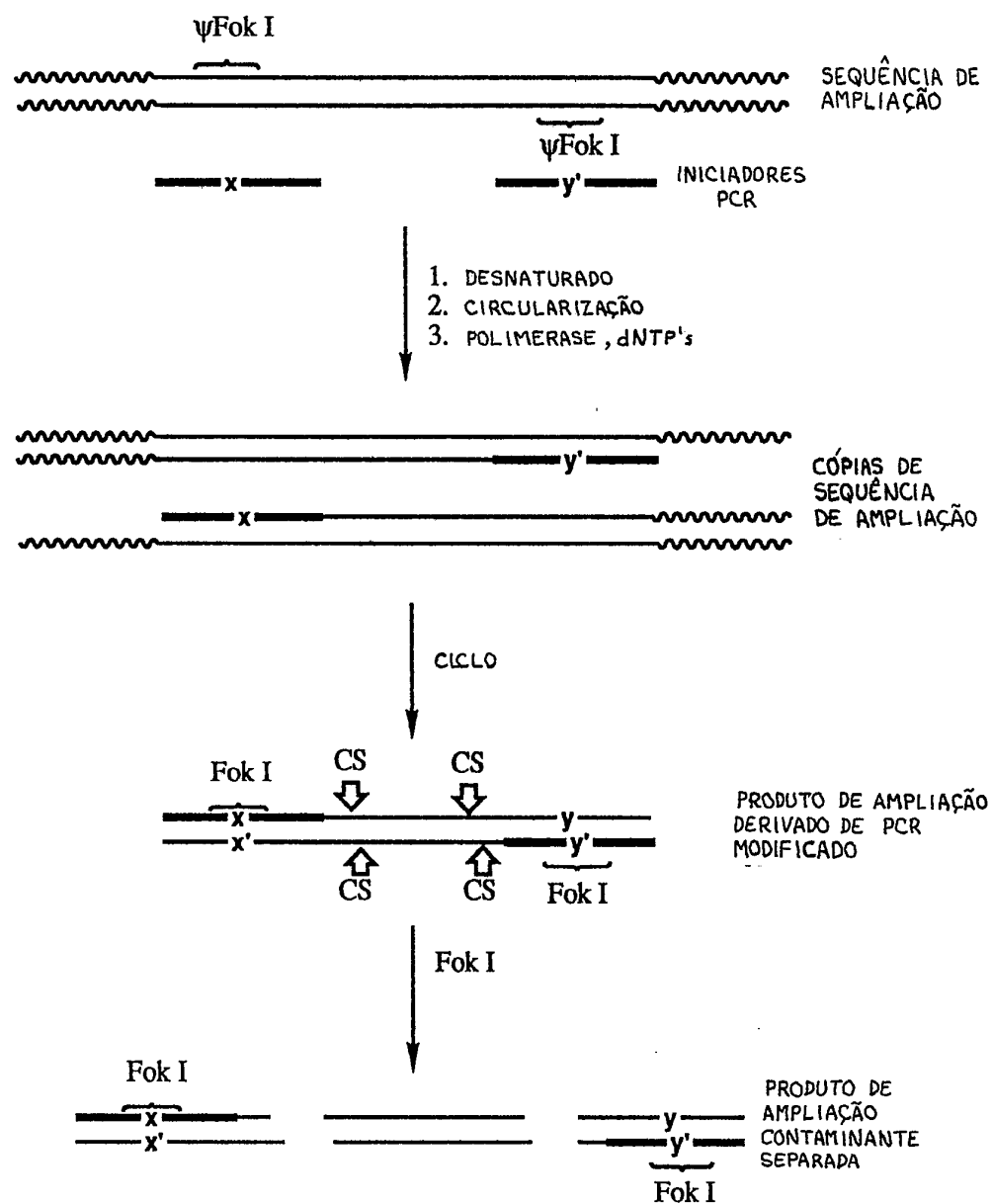


FIG. 15

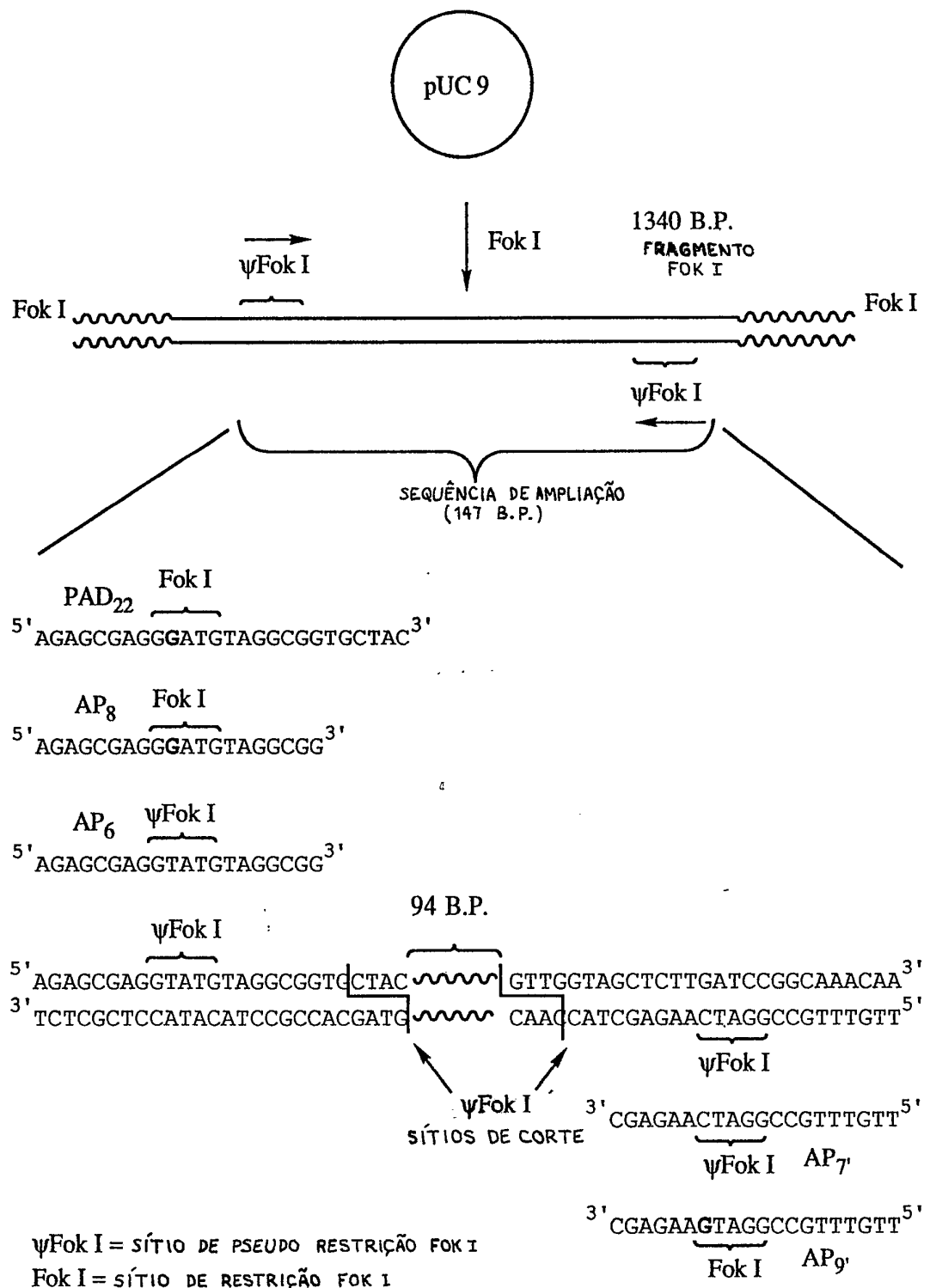


ψ Fok I = SÍTIO DE PSEUDO RESTRIÇÃO FOK I

CS = SÍTIO DE SEPARAÇÃO

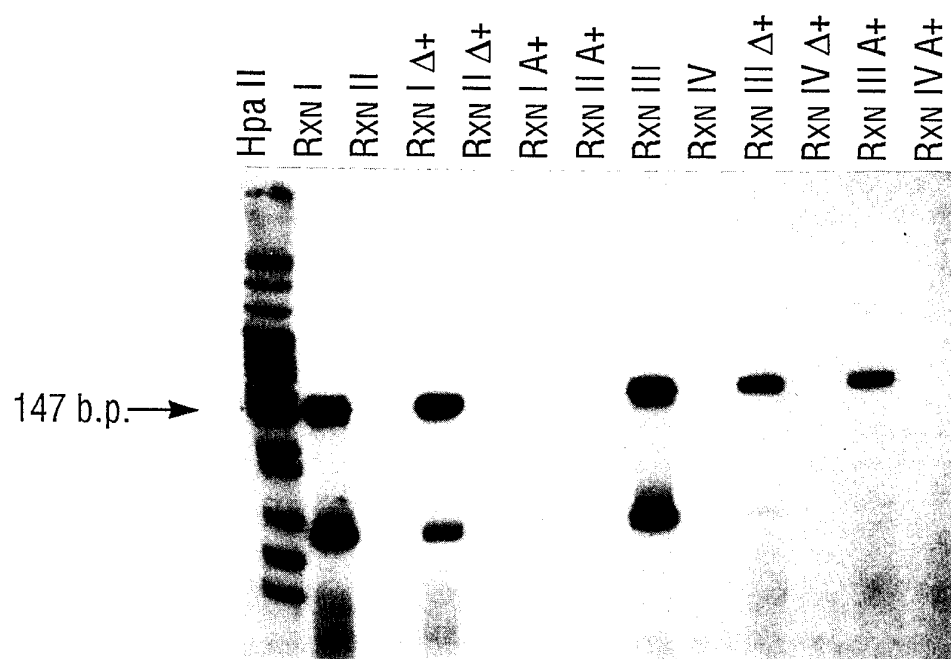
x, y' = SEPARAÇÃO DE NUCLEOTIDOS PARA A SEQUÊNCIA DE AMPLIAÇÃO

FIG. 16



5

FIG.17



5

FIG.18

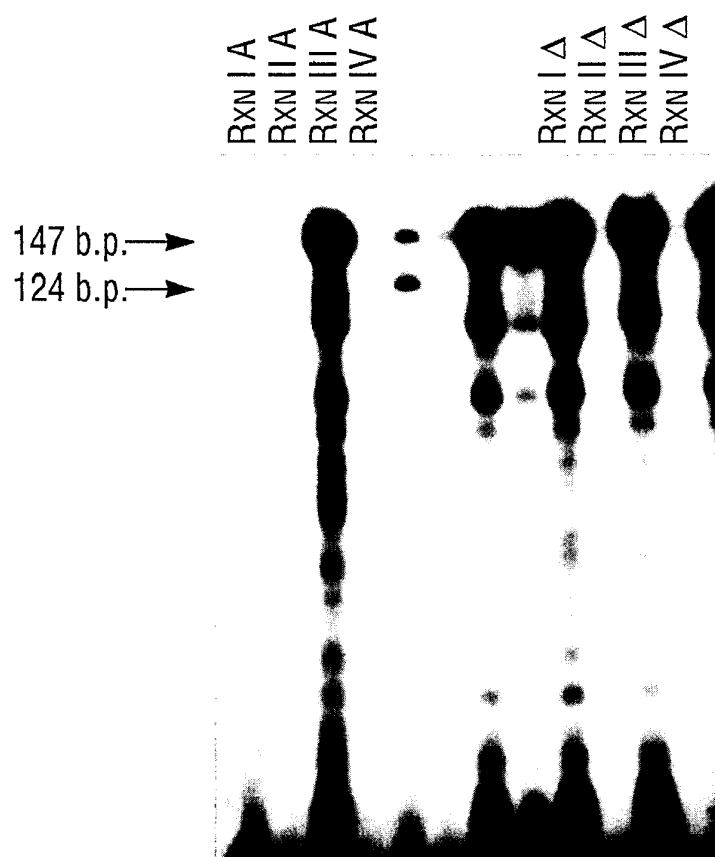


FIG. 19

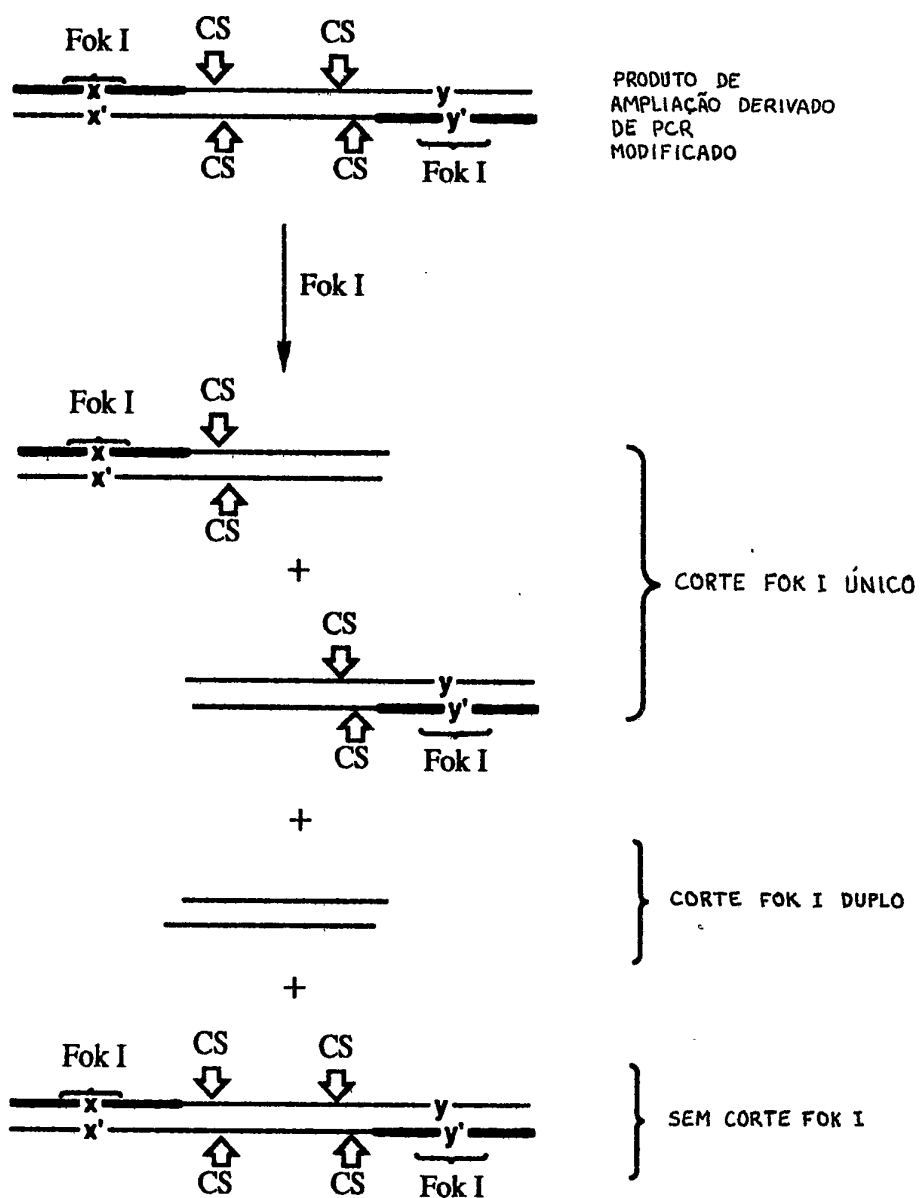


FIG. 20

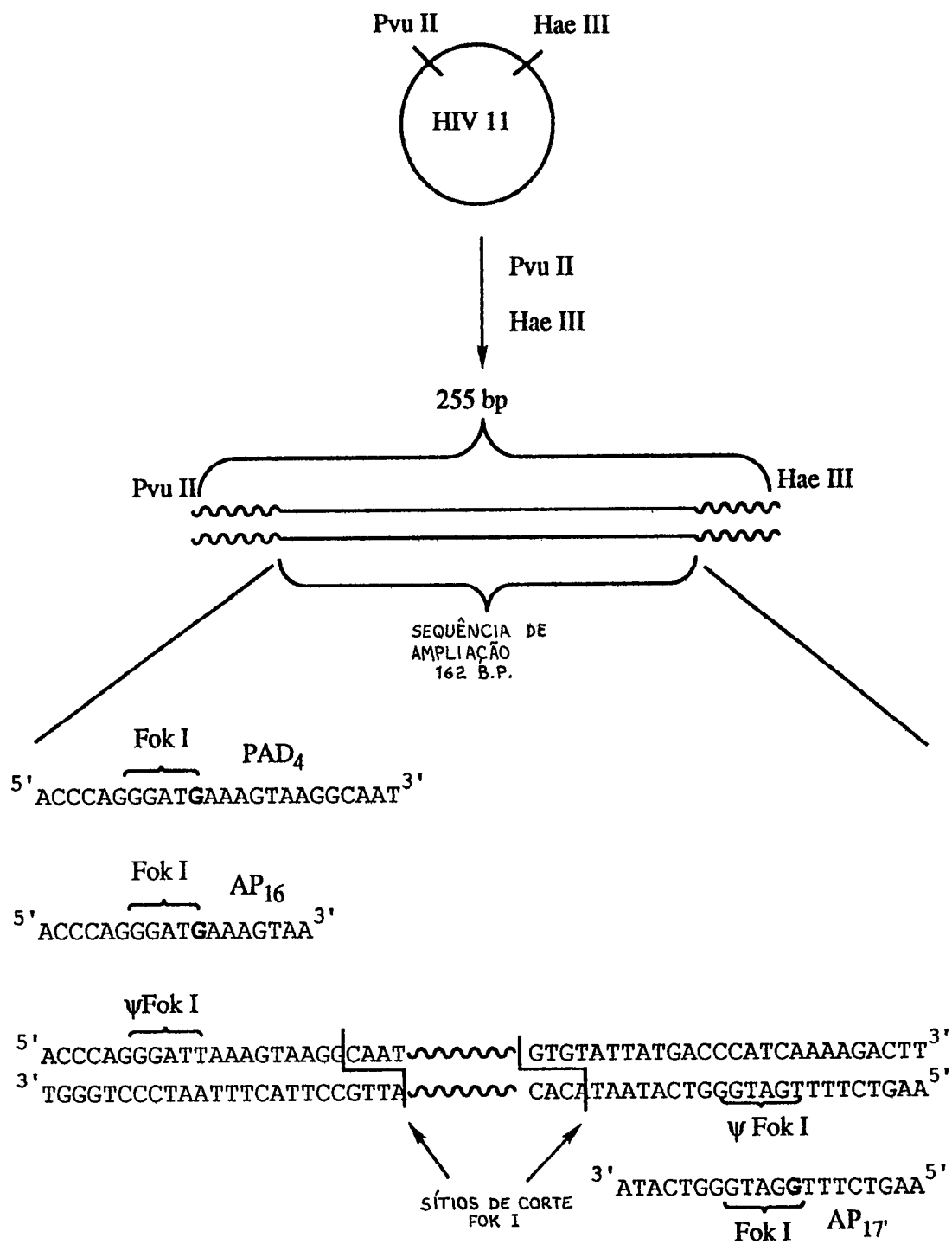
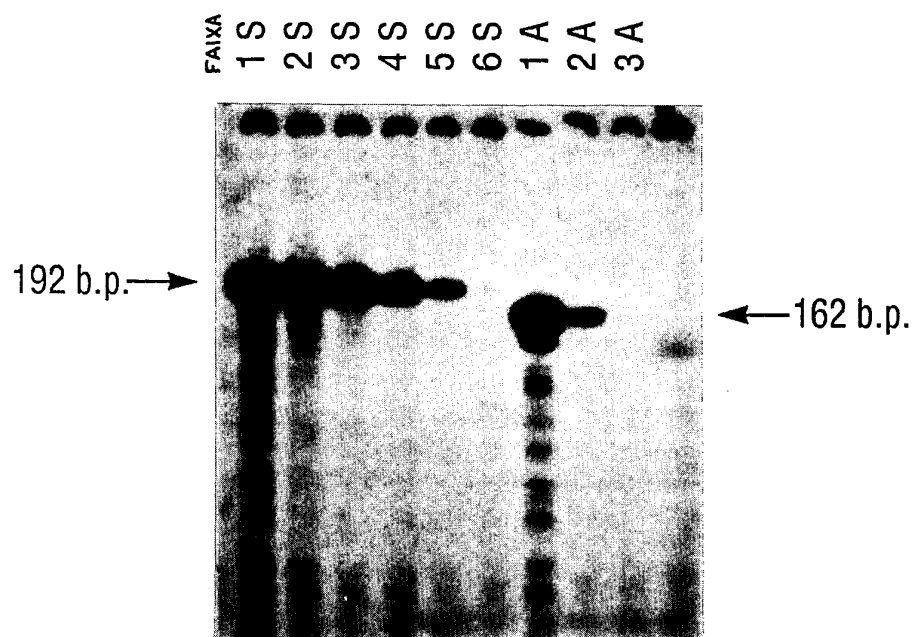
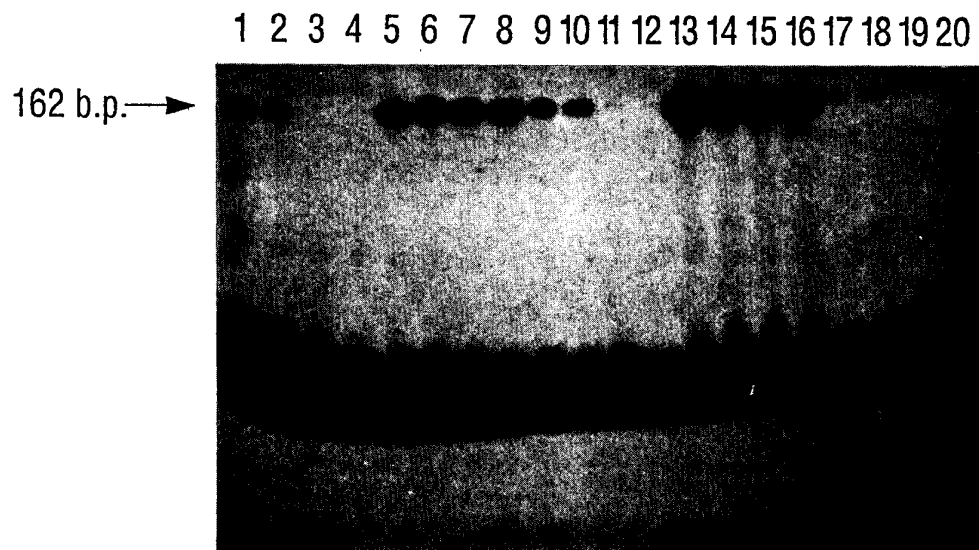


FIG. 21



5.

FIG.22



✓

FIG. 23A

PAD₅
5' AAAACGTTACTCGACAGAGGAGCA 3'

FIG. 23B

AP₁₈
5' CGTTACTCGACAGA (rG)

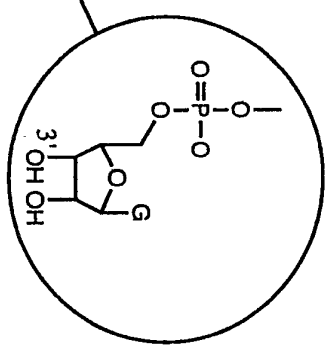


FIG. 23C

5' ~~~~~CGTTACTCGACAGAGGAGCAAGAAATGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT~~~~~ 3'
~~~~~GCAATGAGCTGTCTCCTCTCGTTCTTTACCTCGGTCACTAGATCTGATCTCGGACCTTTCGTAGGTCCTTCAG~~~~~  
HIV-ALVO

FIG. 23D

(Ur) CGTAGGTCCTTCAG 5'  
AP<sub>21</sub>

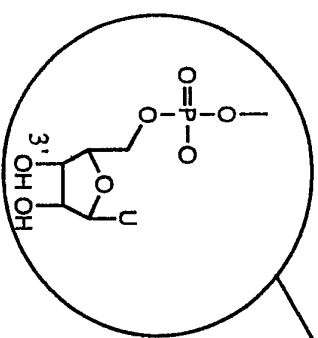
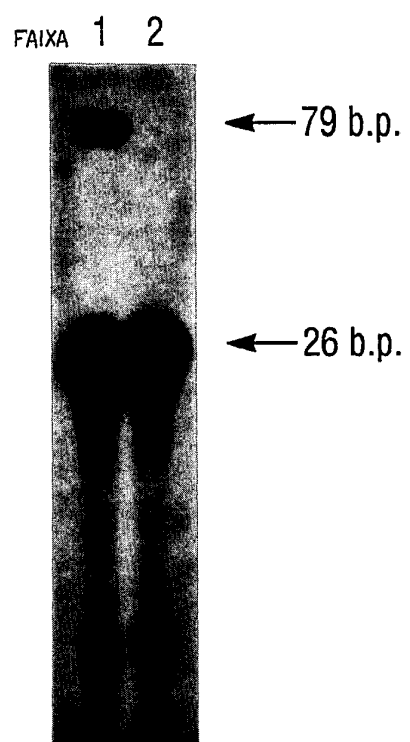
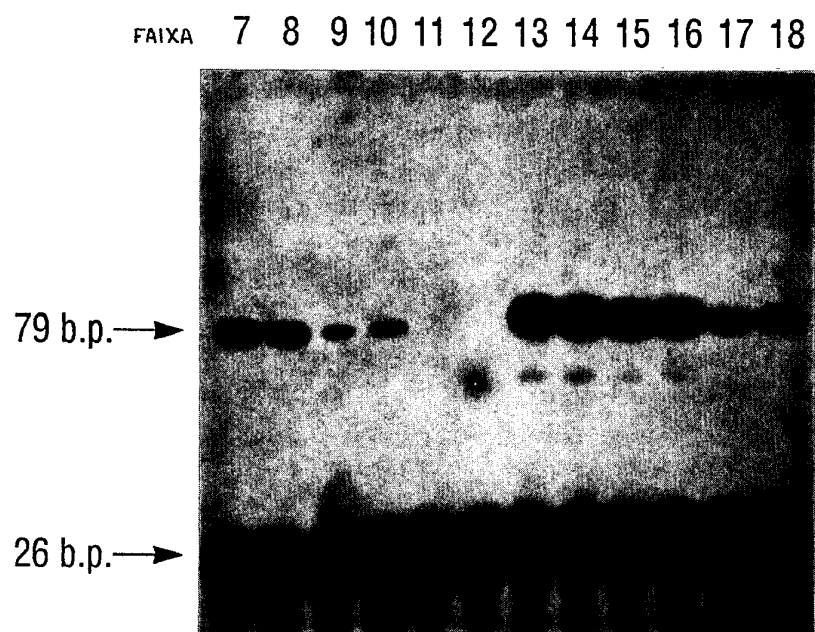


FIG. 24



5

FIG. 25



4.

FIG. 26

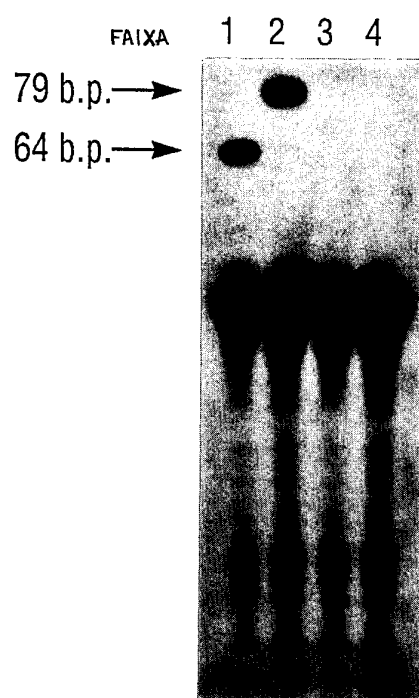


FIG.27



FIG. 28

AP<sub>18</sub> pAP<sub>19</sub> pAP<sub>20</sub>  
 5' CGTTACTCGACAGA (rG) pGAGAGCAAGAAATG (rG) pAGCCAGTAGATCCT (rA) 3'

5' CGTTACTCGACAGAGGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTA 3' SEQUÊNCIA  
 3' GCAATGAGCTGTCTCCTCTCGTTCTTTACCTCGGTCATCTAGGAT 5' ALVO

3' GCAATGAGCTGTCTCp (Cr) TCTCGTTCTTTACCp (Ur) CGGTCATCTAGGATp 5'  
 pAP<sub>18'</sub> pAP<sub>19'</sub> pAP<sub>20'</sub>

↓  
 AMPLIFICAÇÃO  
 LCR

5' CGTTACTCGACAGA (rG) GAGAGCAAGAAATG (rG) AGCCAGTAGATCCT (rA) 3'  
 3' GCAATGAGCTGTCTC (Cr) TCTCGTTCTTTACC (Ur) CGGTCATCTAGGATp 5'

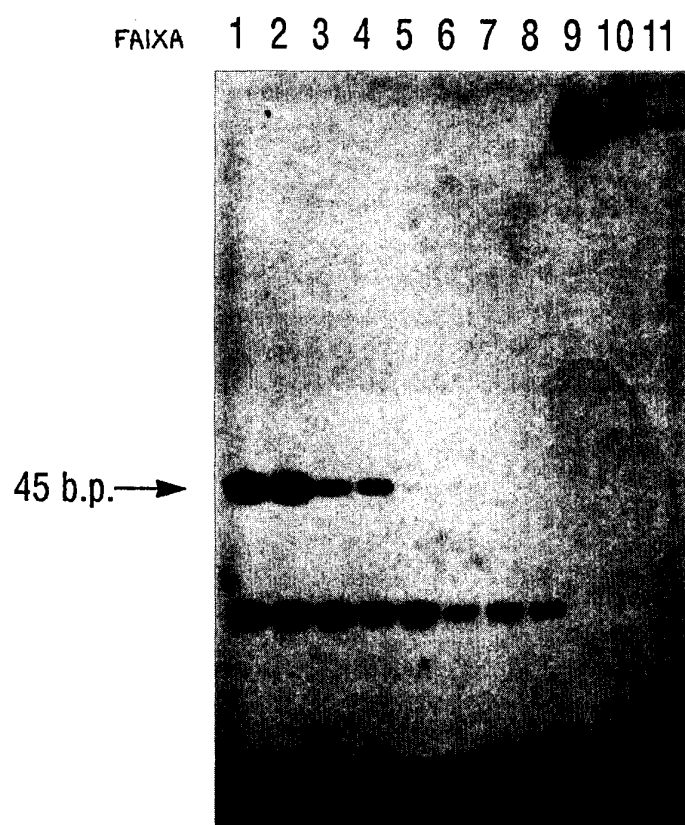
PRODUTO DE  
 AMPLIFICAÇÃO  
 MODIFICADO

p= GRUPO FOSFATO

r= RIBONUCLEÓTIDO

4.

FIG.29



4.

FIG.30

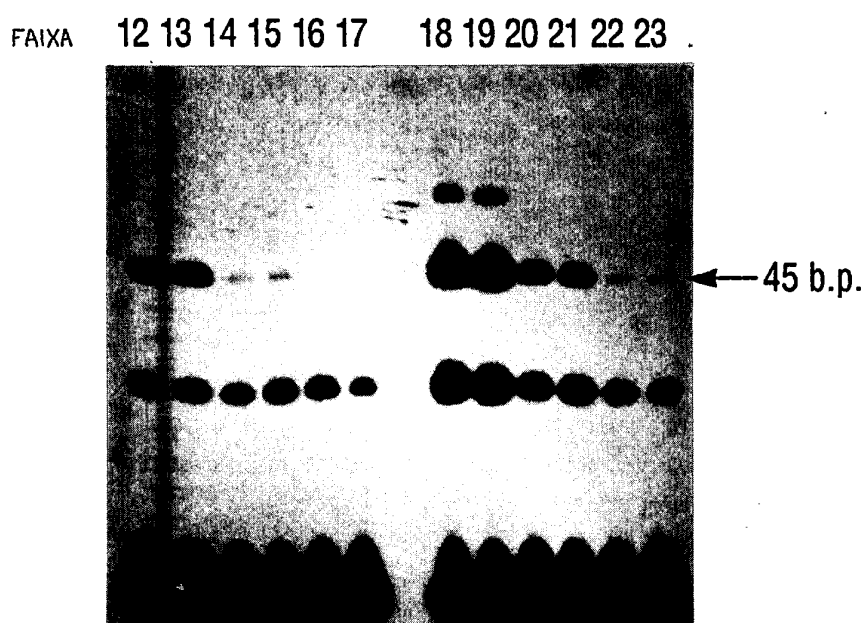


FIG. 3I

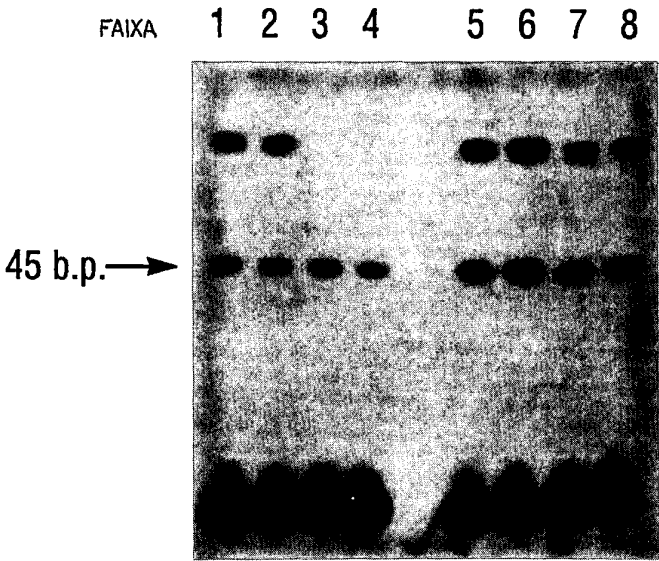


FIG. 32

