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

(21) PI 0721095-7 A2

* B R P I 0 7 2 1 0 9 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 13/12/2007
(43) Data da Publicação: 01/07/2014
(RPI 2269)

(51) Int.Cl.:
C12Q 1/68

(54) Título: SISTEMAS E MÉTODOS PARA A ANÁLISE MULTÍPLEX DE PCR EM TEMPO REAL

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 13/12/2006 US 60/869,742

(73) Titular(es): Luminex Corporation

(72) Inventor(es): Charles J. Collins, Douglas F. Whitman

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007087492 de 13/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/074023de 19/06/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SISTEMAS E MÉTODOS PARA A ANÁLISE MULTÍPLEX DE PCR EM TEMPO REAL"**.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Este pedido reivindica prioridade para o pedido de patente provisório U.S. 60/869.742, depositado em 13 de dezembro de 2006, cuja descrição inteira é incorporada por referência.

1. Campo da Invenção

A presente invenção refere-se, em geral, aos sistemas e métodos para efetuar medições da amplificação do DNA, tais como a PCR. Em particular, esta invenção refere-se às medições em "tempo real" da PCR com capacidade de multiplexação. Certas modalidades referem-se a um sistema que utiliza partículas, tais como microesferas paramagnéticas, e uma câmara de formação de imagem de um dispositivo de medição que é também capaz de ciclagem térmica controlável para auxiliar o processo de PCR.

2. Descrição da Técnica Relacionada

A reação em cadeia por polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular para replicar enzimaticamente o DNA, sem utilizar um organismo vivo. A PCR é comumente usada em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para uma variedade de tarefas, tais como a detecção de doenças hereditárias, a identificação de impressões digitais genéticas, o diagnóstico de doenças infecciosas, a clonagem de genes, o teste da paternidade, e a computação de DNA. A PCR tem sido aceita pelos biologistas moleculares como o método de escolha para a detecção de ácido nucleico por causa de sua capacidade de amplificação e precisão sem igual. A detecção de DNA é tipicamente efetuada no ponto final, ou fase de estabilização da reação PCR, tornando difícil quantificar o molde de partida. A PCR em tempo real ou PCR cinética melhora a capacidade da análise da PCR no ponto final por registro da concentração de amplicon, à medida que a reação avança. A concentração de amplicon é mais frequentemente registrada via uma mudança de sinal fluorescente associada com o alvo amplificado. A PCR em tempo real é também vantajosa sobre a detecção no ponto final pelo fato de que a contaminação é limitada porque pode ser efetuada em um sistema

fechado. As outras vantagens incluem maior sensibilidade, faixa dinâmica, velocidade, e menos processos requeridos.

Têm sido usadas diversas químicas de ensaio nos métodos de detecção por PCR em tempo real. Estas químicas de ensaio incluem a utilização de corantes de ligação de DNA de fita dupla, oligonucleotídeos duplamente marcados, tais como os primers "hairpin" ("grampos de cabelo"), e as sondas hairpin. As outras químicas incluem as sondas à base de exonucleases, tais como as sondas de hidrólise. São descritos diversos métodos de PCR e PCR em tempo real nas Patentes U.S. Nºs 5.656.493; 5.994.056; 6.174.670; 5.716.784; 6.030.787; e 6.174.670, que são incorporadas neste documento por referência.

Uma desvantagem da PCR em tempo real atual é a sua capacidade de multiplexação limitada. As tecnologias de PCR em tempo real atuais utilizam fluorocromos relatores que estão livres em solução. Este projeto necessita do uso de fluorocromos espectralmente distintos para cada ensaio dentro de uma reação multíplex. Por exemplo, uma reação multíplex projetada para detectar 4 sequências-alvo requereria um instrumento capaz de distinguir 4 fluorocromos circulantes livres diferentes por diferenciação espectral, não incluindo os controles. Estas exigências não só limitam a capacidade de multiplexação prática, como também aumentam os custos, visto que tais instrumentos tipicamente requerem múltiplos lasers e filtros. As tecnologias atuais de PCR em tempo real têm capacidades de multiplexação de cerca de 1-6 vezes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos sistemas e métodos para a amplificação e a detecção de DNA. Em particular, a presente invenção proporciona sistemas e métodos que aumentam muito as capacidades de multiplexação da PCR em tempo real. Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da

pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, um agente de marcação, e uma pluralidade de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de partículas codificadas de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida da partícula codificada sobre a qual ela está imobilizada; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação com as sondas imobilizadas sobre as partículas codificadas; (d) atrair as partículas codificadas e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre as partículas codificadas para a superfície da câmara; (e) detectar um sinal a partir das partículas codificadas e detectar um sinal diretamente (por exemplo, uma marca incorporada no produto de amplificação) ou indiretamente (por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos complementar, marcada, hibridizada com o produto de amplificação) a partir dos produtos de amplificação; (f) dispersar as partículas codificadas e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre as partículas codificadas a partir da superfície da câmara, antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes.

As partículas podem ser partículas com propriedades magnéticas e/ou partículas com uma densidade que permita que elas permaneçam sobre uma superfície bidimensional em solução. As partículas podem, de uma forma ou outra, permanecer sobre uma superfície bidimensional por forças magnéticas, gravitacionais, ou iônicas, ou por ligação química, ou por qualquer outro meio conhecido para aqueles versados na técnica. As partículas podem consistir em vidro, poliestireno, látex, metal, ponto quântico, polímeros, sílica, óxidos de metais, cerâmica, ou qualquer outra substância adequada para ligação aos ácidos nucleicos, ou substâncias químicas ou proteínas que possam então unir-se aos ácidos nucleicos. As partículas po-

dem ser de formato de bastão ou de formato esférico ou de disco, ou compreender qualquer outro formato. As partículas podem também ser distinguíveis por seu formato ou tamanho ou localização física. As partículas podem ser espectralmente distintas em virtude de terem uma composição contendo corantes ou razões ou concentrações de um ou mais corantes ou fluorocromos, ou podem ser distinguíveis por código de barras ou imagens holográficas ou outras formas impressas de codificação de partículas. Onde as partículas forem partículas magnéticas, elas podem ser atraídas para a superfície da câmara por aplicação de um campo magnético. Também, as partículas magnéticas podem ser dispersas da superfície da câmara por remoção do campo magnético. As partículas magnéticas são preferivelmente paramagnéticas ou superparamagnéticas. As partículas paramagnéticas e superparamagnéticas têm magnetismo desprezível na ausência de um campo magnético, porém a aplicação de um campo magnético induz o alinhamento dos domínios magnéticos nas partículas, resultando em atração das partículas para a fonte do campo. Quando o campo for removido, os domínios magnéticos retornam para uma orientação aleatória, de modo que não há nenhuma atração ou repulsão magnética entre as partículas. No caso do superparamagnetismo, este retorno para a orientação aleatória dos domínios é quase instantâneo, enquanto que os materiais paramagnéticos conservarão o alinhamento dos domínios por algum período de tempo após a remoção do campo. Onde as partículas tiverem densidade suficiente, elas podem ser atraídas para a superfície do fundo da câmara por agitação da câmara, tal como por redemoinho, sonicação, ou movimento fluídico. A agitação da câmara pode também ser usada para auxiliar adicionalmente na dispersão das partículas nos métodos e nos sistemas nos quais as partículas forem atraídas para uma superfície da câmara por outras forças, tais como as forças magnéticas ou iônicas, ou as forças de sucção, ou a filtração a vácuo, ou a afinidade, ou a hidrofilicidade ou a hidrofobicidade, ou qualquer combinação destas.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos

em uma amostra compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, um agente de marcação, e uma pluralidade de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação marcados para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação marcados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação marcados hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação marcados; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes.

Um agente de marcação, o qual pode também ser referido como um relator, é uma molécula que facilita a detecção de uma molécula (por exemplo, uma sequência de ácidos nucleicos) à qual ela está unida. São conhecidas diversas moléculas relatoras que podem ser usadas para marcar os ácidos nucleicos. As moléculas relatoras diretas incluem os fluoroforos, os cromóforos, e os radióforos. Os exemplos não-limitativos de fluoroforos incluem um corante de esquarina fluorescente vermelho, tal como o 1,3-Dioxolato de 2,4-bis[1,3,3-trimetil-2-indolinilidenometil] ciclobutenodi-ílio, um corante de infravermelho, tal como o 1,3-Dioxolato de 2,4 bis [3,3-dimetil-2-(1H-benz[e]indolinilidenometil)] ciclobutenodi-ílio, ou um corante de esquari-

na fluorescente laranja, tal como o 1,3-Diololato de 2,4-bis [3,5-dimetil2-pirrolil] ciclobutenodi-ílio. Os exemplos não-limitativos adicionais de fluoroforos incluem os pontos quânticos, os corantes Alexa Fluor®, AMCA, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY®-FL, BODIPY®-R6G, BODIPY®-TMR, BODIPY®-TRX, Cascade Blue®, CyDye®, incluindo, porém não-limitado ao Cy2®, Cy3®, e Cy5®, um corante de intercalação de DNA, 6-FAM®, Fluoresceína, HEX®, 6-JOE, Oregon Green® 488, Oregon Green® 500, Oregon Green® 514, Pacific Blue®, REG, ficobiliproteinas, incluindo, porém não-limitadas à ficoeritrina e aloficocianina, Rhodamine Green®, Rhodamine Red®, ROX®, TAMRA®, TET®, Tetrametilrodamina, ou Texas Red®. Um reagente de amplificação de sinal, tal como a tiramida (PerkinElmer), pode ser usado para aumentar o sinal de fluorescência. As moléculas relatoras indiretas incluem a biotina, que deve estar ligada a uma outra molécula, tal como estreptavidina-ficoeritrina, para a detecção. Os pares de marcas, tais como os pares de transferência de energia de ressonância de fluorescência ou os pares de corante-repressor, podem também ser empregados.

Os produtos de amplificação marcados podem ser marcados direta ou indiretamente. A marcação direta pode ser obtida, por exemplo, utilizando primers marcados, utilizando dNTPs marcados, utilizando agentes de intercalação de ácidos nucleicos marcados, ou combinações dos acima mencionados. A marcação indireta pode ser obtida, por exemplo, hibridizando uma sonda marcada com o produto de amplificação.

As partículas codificadas, tais como os glóbulos magnéticos codificados, podem ser codificadas com corantes fluorescentes. A codificação com corantes fluorescentes pode empregar corantes fluorescentes com diferentes comprimentos de ondas de emissão fluorescentes e/ou intensidades fluorescentes diferentes.

Em uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de

alvos de ácidos nucleicos, onde um primer de cada par de primers é marcado, e uma pluralidade de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação marcados para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação marcados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação marcados hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação marcados; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes.

Em mais uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de marcas moleculares complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as marcas moleculares são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada marca molecular seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação

com as marcas moleculares imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as marcas moleculares imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir das marcas moleculares; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de grupos de sondas complementar à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde cada grupo de sondas compreende uma primeira sonda marcada com um primeiro membro de um par de transferência de energia fluorescente e imobilizada sobre um glóbulo magnético codificado de modo tal que a identidade da primeira sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada, e uma segunda sonda com um segundo membro do par de transferência de energia fluorescente; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação com os grupos de sondas; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir do par de transferência de energia fluorescente hibridizado com os pro-

dutos de amplificação; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes. Em certos aspectos, o sinal a partir do par de transferência de energia fluorescente é um aumento na fluorescência. Em outros aspectos, o sinal a partir do par de transferência de energia fluorescente é uma diminuição na fluorescência.

Em uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar um alvo de ácido nucleico em uma amostra, compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo o alvo de ácido nucleico, um par de primers para iniciar a amplificação do alvo de ácido nucleico, e um grupo de sondas complementar ao alvo de ácido nucleico, onde o grupo de sondas compreende uma primeira sonda imobilizada sobre um glóbulo magnético, e uma segunda sonda compreendendo uma marca; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para o alvo de ácido nucleico amplificado com o par de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação com o grupo de sondas; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair o glóbulo magnético e os produtos de amplificação hibridizados com a sonda imobilizada sobre o glóbulo magnético codificado para a superfície da câmara; (e) detectar um sinal a partir da segunda sonda hibridizada com os produtos de amplificação; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

onde o alvo de ácido nucleico na amostra é amplificado e detectado. Este método pode ser efetuado como uma única vez ou múltiplas vezes. A multiplexação pode ser atingida utilizando diferentes marcas sobre as segundas sondas e/ou marcando ou codificando as partículas sobre as quais as primeiras sondas são imobilizadas.

Em uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar um alvo de ácido nucleico em uma amostra,

compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo o alvo de ácido nucleico, um par de primers para iniciar a amplificação do alvo de ácido nucleico, um dNTP acoplado a uma molécula repressora, e uma sonda fluorescentemente marcada, complementar ao alvo de ácido nucleico, onde a sonda está imobilizada sobre um glóbulo magnético; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação do alvo de ácido nucleico, os produtos de amplificação compreendendo moléculas repressoras; (c) hibridizar os produtos de amplificação com a sonda imobilizada sobre o glóbulo magnético; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair o glóbulo magnético e os produtos de amplificação hibridizados com a sonda imobilizada sobre o glóbulo magnético codificado para a superfície da câmara; (e) detectar um sinal a partir da sonda marcada, onde uma diminuição no sinal a partir da sonda marcada indica a hibridização da sonda marcada com os produtos de amplificação compreendendo as moléculas repressoras; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; onde o alvo de ácido nucleico na amostra é amplificado e detectado. Este método pode ser efetuado como uma única vez ou múltiplas vezes. A multiplexação pode ser atingida utilizando diferentes marcas sobre as sondas e/ou marcando ou codificando as partículas sobre as quais as sondas são imobilizadas.

Em uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de grupos de sondas complementar à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde cada grupo de sondas compreende uma primeira sonda imobilizada sobre um glóbulo magnético codificado de modo tal que a identidade da primeira sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada, e uma segunda sonda compreendendo uma marca; (b) efetuar um ciclo de amplifi-

cação para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação com os grupos de sondas; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir da segunda sonda hibridizada com os produtos de amplificação; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes.

Em uma modalidade adicional, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, um dNTP acoplado a uma molécula repressora, e uma pluralidade de sondas fluorescentemente marcadas, complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas estão imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação compreendendo moléculas repressoras para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar um sinal a partir dos glóbu-

los magnéticos codificados e um sinal a partir das sondas marcadas, onde uma diminuição no sinal a partir das sondas marcadas indica hibridização das sondas marcadas com os produtos de amplificação compreendendo as moléculas repressoras; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes.

Em uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos; uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde cada par de primers compreende um primeiro primer compreendendo uma sequência especifica para o alvo, uma sequência de marca 5' da sequência específica para o alvo, e opcionalmente um bloqueador entre a sequência específica para o alvo e a sequência de marca, e um segundo primer compreendendo uma sequência específica para o alvo; um agente de marcação; e uma pluralidade de sondas complementares às sequências de marca da pluralidade de pares de primers, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação com marcas e marcados para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação com marcas e marcados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação com marcas e marcados hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de

amplificação com marcas e marcados; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes. Em certos aspectos, o agente de marcação é uma molécula relatora unida ao segundo primer do par de primers. Em outros aspectos, o agente de marcação é um corante de intercalação de ácido nucleico. Deve ser observado que o agente de intercalação de ácido nucleico marcará as marcas complementares hibridizadas mesmo na ausência de amplificação. Isto seria problemático na PCR onde somente for efetuada uma detecção no ponto final, porque não estaria claro se a amplificação foi bem-sucedida ou se o sinal detectado seria somente a partir do agente de intercalação que marca as marcas complementares. Com a PCR efetuada em tempo real de acordo com os métodos descritos neste documento, o sinal a partir do agente de intercalação seria observado aumentar à medida que o número de ciclos de amplificação aumentasse em uma amplificação bem-sucedida. Assim permitindo a diferenciação entre a amplificação bem-sucedida e a marcação somente das marcas complementares.

Os métodos descritos aqui podem adicionalmente compreender a quantificação da quantidade inicial do(s) alvo(s) de ácido(s) nucleico(s) na amostra. A quantificação pode compreender, por exemplo, a determinação das concentrações relativas de DNA presente durante a fase exponencial da PCR em tempo real por representação gráfica da fluorescência contra o número de ciclos em uma escala logarítmica. As quantidades de DNA podem então ser determinadas por comparação dos resultados com uma curva padrão produzida pela PCR em tempo real de diluições em série de uma quantidade conhecida de DNA. Adicionalmente, a PCR em tempo real pode ser combinada com transcrição reversa reação em cadeia por polimerase para quantificar os RNAs em uma amostra, incluindo os RNAs de pequena quantidade.

Os métodos descritos neste documento proporcionam capacida-

des de multiplexação de modo tal que uma pluralidade de pares de primers possa amplificar uma pluralidade de ácidos nucleicos-alvo em uma única reação PCR. Em certas modalidades, há pelo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 pares de primers diferentes em uma reação PCR. Em algumas modalidades, há entre 8 a 100, 8 a 80, 8 a 60, 8 a 40, 8 a 20, 8 a 18, 8 a 16, 8 a 12, 10 a 100, 10 a 80, 10 a 60, 10 a 40, 10 a 20, 10 a 18, 10 a 16, 10 a 12, 12 a 100, 12 a 80, 12 a 60, 12 a 40, 12 a 20, 12 a 18, ou 12 a 16 pares de primers diferentes em uma reação PCR. Em certas modalidades, há pelo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, ou 12 ácidos nucleicos-alvo diferentes em uma reação PCR. Em algumas modalidades, há entre 8 a 100, 8 a 80, 8 a 60, 8 a 40, 8 a 20, 8 a 18, 8 a 16, 8 a 12, 10 a 100, 10 a 80, 10 a 60, 10 a 40, 10 a 20, 10 a 18, 10 a 16, 10 a 12, 12 a 100, 12 a 80, 12 a 60, 12 a 40, 12 a 20, 12 a 18, ou 12 a 16 ácidos nucleicos-alvo diferentes em uma reação PCR. As sondas presentes na reação PCR podem compreender um grupo hidroxila em 3' bloqueado para impedir a extensão das sondas pela polimerase. O grupo hidroxila em 3' pode ser bloqueado com, por exemplo, um grupo fosfato ou um dT invertido em 3'.

A sequência-alvo de ácidos nucleicos pode ser qualquer sequência de interesse. A amostra contendo a sequência-alvo de ácidos nucleicos pode ser qualquer amostra que contenha ácidos nucleicos. Em certos aspectos da invenção, a amostra é, por exemplo, um paciente que está sendo examinado quanto à presença ou ausência de uma ou mais mutações genéticas ou polimorfismos. Em um outro aspecto da invenção, a amostra pode ser de um paciente que está sendo testado quanto à presença ou ausência de um patógeno. Onde a amostra for obtida a partir de um paciente, ela pode ser obtida por métodos conhecidos para aqueles na técnica, tais como aspiração, biópsia, chumaço de algodão, venipunção, punção lombar, amostra fecal, ou amostra de urina. Em alguns aspectos da invenção, a amostra é uma amostra ambiental, tal como uma amostra de água, solo, ou ar. Em outros aspectos da invenção, a amostra é de uma planta, bactérias, vírus, fungos, protozoário, ou metazoário.

Cada ciclo de amplificação tem três fases: uma fase de desnatu-

ração, uma fase de anelamento de primer, e uma fase de extensão de primer. O ciclo de amplificação pode ser repetido até que a quantidade desejada de produto de amplificação seja produzida. Tipicamente, o ciclo de amplificação é repetido entre cerca de 10 a 40 vezes. Para a PCR em tempo real, a detecção dos produtos de amplificação tipicamente será feita após cada ciclo de amplificação. Embora, em certos aspectos da invenção, a detecção dos produtos de amplificação possa ser feita após cada segundo, terceiro, quarto, ou quinto ciclo de amplificação. A detecção pode também ser feita de modo tal que tão pouco quanto 2 ou mais ciclos de amplificação sejam analisados ou detectados. O ciclo de amplificação pode ser efetuado na mesma câmara na qual ocorre a detecção da amplificação, em cujo caso esta câmara necessitaria compreender um elemento de aquecimento, de modo que a temperatura na câmara possa ser ajustada para a fase de desnaturação, a fase de anelamento de primer, e uma fase de extensão de primer do ciclo de amplificação. O elemento de aquecimento tipicamente estaria sob o controle de um processador. O ciclo de amplificação pode, entretanto, ser efetuado em uma câmara diferente da câmara na qual ocorre a detecção da amplificação, em cujo caso a câmara de "amplificação" necessitaria compreender um elemento de aquecimento, porém a câmara de "detecção" ou de "formação de imagem" não seria requerida ter um elemento de aquecimento. Onde a amplificação e a detecção ocorrerem em câmaras separadas, o fluido no qual ocorre a reação de amplificação pode ser transferido entre as câmaras através de, por exemplo, uma bomba ou pistão. A bomba ou o pistão pode estar sob o controle de um processador. Alternativamente, o fluido pode ser transferido entre as câmaras manualmente usando, por exemplo, uma pipeta.

A câmara pode ser, por exemplo, uma câmara de quartzo. Um campo magnético pode ser aplicado à câmara para atrair as partículas magnéticas dentro da câmara para uma superfície da câmara colocando-se um imã permanente adjacente à superfície da câmara ou ativando-se um eletroímã adjacente à superfície da câmara. O ímã não necessita estar em contato físico com a câmara desde que ela esteja fechada o suficiente para o seu

campo magnético atrair as partículas magnéticas dentro da câmara para a superfície da câmara. O campo magnético pode ser removido da câmara movendo-se o ímã permanente ou desativando-se o eletroímã. Obviamente, um eletroímã que seja ativado pode também ser aplicado ou removido da câmara movendo-se mais próximo ou mais afastado da câmara, conforme descrito acima para um ímã permanente. Nas modalidades onde a amplificação e a detecção ocorrerem na mesma câmara, o campo magnético pode ser aplicado durante a fase de anelamento de primer do ciclo de amplificação, durante a fase de extensão de primer do ciclo de amplificação, ou após o ciclo de amplificação. Nas modalidades onde a amplificação e a detecção ocorrerem em diferentes câmaras, o campo magnético tipicamente será aplicado após o ciclo de amplificação, quando o fluido de reação de amplificação for transferido para a câmara de detecção.

As partículas codificadas e os produtos de amplificação sobre a superfície da câmara podem ser detectados usando um sistema de formação de imagens, tal como aqueles descritos neste documento. Por exemplo, a detecção dos glóbulos magnéticos codificados e dos produtos de amplificação marcados pode compreender a formação de imagem de comprimentos de ondas fluorescentes e/ou de intensidades fluorescentes, emitidos a partir dos glóbulos magnéticos codificados e dos produtos de amplificação marcados. A formação de imagens pode compreender a obtenção de uma imagem de decodificação para identificar os glóbulos sobre a superfície da câmara e a obtenção de uma imagem de ensaio para detectar os produtos de amplificação sobre a superfície da câmara. Uma comparação da imagem de decodificação e da imagem de ensaio mostra que os glóbulos têm produtos de amplificação ligados a eles. Visto que as identidades das sondas unidas aos glóbulos são conhecidas por codificação dos glóbulos, a identidade do produto de amplificação hibridizado com a sonda pode também ser determinada. Os métodos da presente invenção podem adicionalmente compreender correlacionar o sinal a partir do produto de amplificação direta ou indiretamente marcado com a concentração de DNA ou RNA em uma amostra. Esta correlação pode compreender as etapas de determinar as concen-

trações relativas de DNA presente durante a fase exponencial da PCR em tempo real por representação gráfica da fluorescência contra o número de ciclos em uma escala logarítmica e por comparação dos resultados com uma curva padrão produzida pela PCR em tempo real de diluições em série de uma quantidade conhecida de DNA ou RNA.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um sistema para efetuar a PCR em tempo real, multiplexada, compreendendo: um termociclador; um sistema de formação de imagem acoplado ao termociclador; partículas magnéticas codificadas adaptadas para serem introduzidas no termociclador; um ímã para introduzir seletivamente um campo magnético no termociclador para imobilizar as partículas magnéticas codificadas.

É contemplado que qualquer método ou composição descrita neste documento possa ser implementada em relação a qualquer outro método ou composição descrita neste documento.

O uso do termo "ou" nas reivindicações é usado para significar "e/ou", a não ser que explicitamente indicado referir-se a alternativas somente ou as alternativas sejam mutuamente exclusivas, embora a descrição suporte uma definição que se refira somente alternativas e "e/ou".

Por todo este pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui o desvio padrão de erro para o dispositivo ou método que está sendo empregado para determinar o valor.

Seguindo a lei de patentes consagrada, as palavras "um" e "uma", quando usadas em conjunção com a palavra "compreendendo", nas reivindicações ou no relatório descritivo, significam um ou mais, a não ser que especificamente observado.

Outros objetivos, características e vantagens da presente invenção tornar-se-ão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada. Deve ser entendido, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indicando modalidades específicas da invenção, são dados como forma de ilustração somente, visto que diversas alterações e modificações dentro do espírito e do escopo da invenção tornar-se-ão aparentes para aqueles versados na técnica a partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos a seguir formam parte do presente relatório descritivo e são incluídos para demonstrar adicionalmente certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor entendida por referência a um ou mais destes desenhos em combinação com a descrição detalhada das modalidades específicas apresentadas neste documento.

Figura 1: A figura 1 é um desenho esquemático de um sistema de formação de imagens.

Figura 2: A figura 2 é um diagrama em blocos mostrando detalhes funcionais do sistema mostrado na figura 1.

Figura 3: A figura 3 é um diagrama esquemático ilustrando a relação das microesferas em uma câmara de detecção.

Figura 4: A figura 4 é um outro diagrama esquemático ilustrando a relação das microesferas em uma câmara de detecção.

Figura 5: A figura 5 é uma ilustração de sondas de marcas moleculares em sua conformação de "hairpin" e em sua conformação aberta quando hibridizadas com uma sequência de ácidos nucleicos complementar.

Figura 6: A figura 6 é uma ilustração de sondas de marcas moleculares em sua conformação aberta quando hibridizadas com uma sequência de ácidos nucleicos complementar. O posicionamento do ímã em proximidade com a câmara de formação de imagem resulta nas sondas de marcas moleculares sendo imobilizadas sobre a superfície da câmara de formação de imagem porque elas estão unidas à microesferas magneticamente sensíveis.

Figura 7: A figura 7 ilustra uma química de detecção por FRET.

Figura 8: A figura 8 ilustra uma química de detecção na qual as moléculas repressoras são incorporadas em uma fita de DNA recentemente sintetizada e uma sonda complementar é marcada com um fluorocromo unido à superfície de um glóbulo.

Figura 9: A figura 9 é um diagrama em blocos de um sistema de formação de imagem.

Figura 10: A figura 10 é um diagrama em blocos de um citômetro

de fluxo usado como um sistema de formação de imagem.

Figura 11: A figura 11 ilustra uma química de detecção de hibridização direta em que um primer de um par de primers é marcado em sua extremidade 5' com uma molécula relatora.

Figura 12: A figura 12 ilustra uma química de detecção de duas sondas.

Figura 13: A figura 13 mostra a sequência de gene genômica Fator V Leiden (SEQ ID NO: 6 e 7).

Figura 14: A figura 14 é um gráfico de Intensidade Fluorescente Mediana (MFI) (eixo y) e o número de ciclos (eixo x) durante a PCR.

Figura 15: A figura 15 mostra diversas sequências de genes de Fibrose Cística (SEQ ID NO: 8-15).

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES ILUSTRATIVAS

A. SISTEMAS DE FORMAÇÃO DE IMAGENS

Retornando agora aos desenhos, observa-se que as figuras não estão desenhadas em escala. Em particular, a escala de alguns dos elementos das figuras está bastante exagerada para enfatizar as características dos elementos. Observa-se também que as figuras não estão desenhadas na mesma escala. Os elementos mostrados em mais do que uma figura, que podem ser similarmente configurados, foram indicados usando os mesmos numerais de referência.

As modalidades do sistema de formação de imagens das figuras 1, 2, e 9 incluem diversas configurações que utilizam dois métodos de formação de imagens de base ampla. Para a detecção da fluorescência, pode ser empregado um único sensor, tal como um tubo fotomultiplicador (PMT) ou fotodiodo avalanche (APD) por comprimento de ondas detectado. Alternativamente, um dispositivo de cargas acopladas (CCD) uni ou bidimensional ou um outro detector de arranjo adequado pode ser usado para a detecção da fluorescência. A fonte de excitação pode ser configurada para proporcionar iluminação difundida (isto é, iluminação proporcionada sobre uma área relativamente grande do volume de formação de imagens do dispositivo de medição (tal como o volume inteiro de formação de imagens do dispositivo

de medição) simultaneamente) usando luz emitida por fontes de luz, tais como os diodos emissores de luz (LEDs), e distribuída para um ou mais materiais no volume de formação de imagens do dispositivo de medição diretamente ou via transmissão óptica por fibras. Alternativamente, a fonte de excitação pode ser configurada para proporcionar iluminação de um ponto relativamente pequeno no volume de formação de imagens do dispositivo de medição, e o sistema pode ser configurado para varrer o ponto relativamente pequeno através do volume de formação de imagens. Neste modo, a iluminação pode ser configurada como um "raio de luz relativamente minúsculo" de luz focada gerada a partir de um ou mais LEDs, um ou mais lasers, uma ou mais outras fontes de luz adequadas, ou alguma combinação destes.

As figuras 1 e 2 ilustram uma modalidade de um sistema configurado para formar imagens de um ou mais materiais em um volume de formação de imagens de um dispositivo de medição. Esta modalidade do sistema inclui os detectores 34, 36, e 38. Os detectores 34, 36, e 38 podem ser câmeras do CCD ou quaisquer outros dispositivos formadores de imagens adequados. Cada um dos detectores pode ter a mesma configuração ou configurações diferentes. Cada um dos detectores pode ser configurado para detectar luz (p.ex, luz com fluorescência a partir das partículas 40 em um volume de formação de imagens definido pela câmara de formação de imagens ou de detecção 42) em um comprimento de ondas diferente ou banda de comprimento de ondas. Além disso, cada um dos detectores pode ser configurado para gerar imagens ou "capturar quadros fluorescentes" das partículas 40 na câmara de formação de imagens 42 (por exemplo, partículas no fundo da câmara de formação de imagens 42).

Nas figuras 1 e 2, as microesferas 40 são alimentadas para a câmara de formação de imagens, a qual pode estar acoplada a um elemento de ciclagem térmica (não mostrado), de modo tal que as microesferas estejam contidas na mesma solução que a reação PCR, durante a reação PCR. As microesferas 40 podem ser atraídas para uma superfície da câmara de formação de imagens 42 em qualquer fase do ciclo da PCR por aplicação de um campo magnético com um ímã 264. As microesferas 40 podem ser libe-

radas da superfície por remoção do campo magnético. Durante a fase de detecção seguinte, as microesferas novamente serão atraídas para a superfície para a formação de imagens. Nas figuras 1 e 2, as microesferas 40 podem também ser alimentadas diretamente para a câmara de formação de imagens 42 a partir de um termociclador (não mostrado). As microesferas 40 podem ser introduzidas na câmara de formação de imagens 42 e atraídas para uma superfície em qualquer fase do ciclo da PCR.

As figuras 1 e 2 ilustram um ímã 264 para atrair seletivamente as microesferas magnéticas 40 para uma superfície. O sistema das figuras 1 e 2 também inclui as fontes de luz 44 e 46 configuradas para emitir luz tendo diferentes comprimentos de ondas ou diferentes bandas de comprimentos de ondas (por exemplo, uma das fontes de luz pode ser configurada para emitir luz vermelha e a outra fonte de luz pode ser configurada para emitir luz verde). A luz emitida pelas fontes de luz 44 e 46 pode incluir, por exemplo, luz em qualquer parte do regime de comprimentos de ondas visível. As fontes de luz 44 e 46 podem incluir os LEDs ou quaisquer outras fontes de luz adequadas, conhecidas na técnica. As fontes de luz 44 e 46 estão dispostas acima da periferia da câmara de formação de imagens 42. Além disso, as fontes de luz estão dispostas acima da câmara de formação de imagens, de modo que cada fonte de luz dirija a luz para as partículas 40 na câmara de formação de imagens 42 em diferentes direções. O sistema também inclui os filtros 48 e 50 acoplados às fontes de luz 44 e 46, respectivamente. Os filtros 48 e 50 podem ser filtros passa-banda ou quaisquer outros filtros espectrais adequados, conhecidos na técnica. Neste modo, o sistema pode usar as fontes de luz 44 e 46 e os filtros 48 e 50 para sequencialmente iluminar as partículas com diferentes comprimentos de ondas ou diferentes bandas de comprimentos de ondas de luz. Por exemplo, a luz vermelha pode ser usada para excitar os corantes de classificação (não mostrados) que podem estar internos às partículas, e a luz verde pode ser usada para excitar as moléculas relatoras (não mostradas) acopladas à superfície das partículas. Visto que a iluminação de classificação é escura durante as medições das relatoras (isto é, no exemplo acima, a luz vermelha não é dirigida para

as partículas, enquanto a luz verde é dirigida para as partículas), a sensibilidade de medição do analito do sistema não será reduzida devido à linha cruzada de fora da luz da banda.

O sistema pode também incluir a lente individual 52 posicionada no centro (ou aproximadamente no centro) do "anel" de iluminação. A lente 52 pode incluir qualquer elemento óptico refrativo adequado, conhecido na técnica. A lente 52 está configurada para formar imagens da luz dispersa e/ou com fluorescência a partir das partículas para um ou mais detectores de CCD de monocromo (por exemplo, os detectores 34, 36, e 38) via um ou mais elementos ópticos, que podem incluir um ou mais filtros dicróicos e um ou mais passa-banda ópticos. Por exemplo, a luz que sai da lente 52 é dirigida para o filtro dicróico 54, o qual pode incluir qualquer elemento óptico dicróico adequado, conhecido na técnica. O filtro dicróico 54 é configurado para refletir luz de um comprimento de ondas ou banda de comprimento de ondas e transmitir luz de outros comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas. A luz refletida pelo filtro dicróico 54 é dirigida para o filtro 56, o qual pode ser um filtro passa-banda ou outro filtro espectral adequado. A luz que sai do filtro 56 é dirigida para o detector 34. A luz transmitida pelo filtro dicróico 54 é dirigida para o filtro dicróico 58, o qual pode incluir qualquer elemento óptico dicróico adequado conhecido na técnica. O filtro dicróico 58 pode ser configurado para refletir luz de um comprimento de ondas ou banda de comprimento de ondas e transmitir luz de outros comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas. A luz transmitida pelo filtro dicróico 58 é dirigida para o filtro 60, o qual pode ser um filtro passa-banda ou outro filtro espectral adequado. A luz que sai do filtro 60 é dirigida para o detector 36. A luz refletida pelo filtro dicróico 58 é dirigida para o filtro 62, o qual pode ser um filtro passa-banda ou outro filtro espectral adequado. A luz que sai do filtro 62 é dirigida para o detector 38.

Além disso, embora o sistema mostrado nas figuras 1 e 2 inclua duas fontes de luz, é para ser entendido que o sistema pode incluir qualquer número adequado de fontes de luz. Por exemplo, o sistema pode incluir múltiplas fontes de luz dispostas em torno da periferia da lente 52. Neste modo,

as fontes de luz podem ser configuradas para proporcionar um "anel" de iluminação que circunda a lente 52. Embora o sistema mostrado nas figuras 1 e 2 inclua três detectores configurados para formar imagens da luz dispersa e/ou com fluorescência a partir das partículas em diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas, é para ser entendido que o sistema pode incluir dois ou mais detectores. Por exemplo, o sistema pode incluir dois ou mais detectores de CCD (e opcionalmente filtros fixos) que podem ser usados para medir simultaneamente o(s) canal(is) de classificação e o(s) canal(is) relator(es), desse modo proporcionando um maior resultado máximo para as medições, juntamente com custo adicional de hardware.

O sistema de formação de imagens pode adicionalmente compreender um subsistema de manuseio de fluido para transferir os fluidos (por exemplo, reação PCR, tampões de lavagem) para a câmara de detecção a partir de um vaso de armazenagem ou a partir de um termociclador ou outra câmara aquecida, se a câmara de detecção não for capaz de ciclagem térmica. O vaso de armazenagem pode ser configurado como um tubo de centrífuga, seringa de injeção, placa de microtítulo ou qualquer outro recipiente de amostra adequado, conhecido na técnica.

O subsistema de manuseio de fluido também inclui uma bomba configurada para mover o fluido de um vaso de armazenagem, termociclador, ou outra câmara aquecida para a câmara de detecção. A bomba pode ter qualquer configuração conhecida na técnica. O sistema de manuseio de fluido pode também incluir uma ou mais válvulas configuradas para controlar o fluxo do fluido através do sistema. O subsistema de manuseio de fluido pode também incluir um reservatório de lavagem para armazenar água potável (ou outro reagente adequado), que pode ser transferida pela bomba para a câmara de detecção. A bomba pode também ser configurada para transferir materiais e qualquer outro fluido na câmara de detecção para um vaso de resíduos. O vaso de resíduos pode ter qualquer configuração conhecida na técnica. As bombas e as válvulas do subsistema de manuseio de fluido podem ser controladas por um processador ou operadas manualmente.

O sistema mostrado nas figuras 1 e 2 é, portanto, configurado para gerar uma pluralidade ou série de imagens representando a emissão fluorescente das partículas 40, em diversos comprimentos de ondas de interesse. Além disso, o sistema pode ser configurado para fornecer uma pluralidade ou série de imagens digitais representando a emissão de fluorescência das partículas para um processador (isto é, uma máquina de processamento). O sistema pode ou não incluir um processador (ver, por exemplo, a figura 9). O processador pode ser configurado para adquirir (por exemplo, receber) dados de imagens a partir dos detectores 34, 36, e 38. Por exemplo, o processador pode ser acoplado aos detectores 34, 36, e 38 em qualquer modo adequado, conhecido na técnica (por exemplo, via meios de transmissão (não mostrados), cada um acoplando um dos detectores ao processador, via um ou mais componentes eletrônicos (não mostrados), tais como conversores de analógicos em digitais, cada um acoplado entre um dos detectores e o processador, etc.). De preferência, o processador é configurado para processar e analisar estas imagens para determinar uma ou mais características das partículas 40, tais como uma classificação das partículas e a informação sobre um analito sobre a superfície das partículas. Uma ou mais características podem ser transmitidas pelo processador em qualquer formato adequado, tal como um arranjo de dados com uma entrada para a magnitude fluorescente para cada partícula, para cada comprimento de ondas. Especificamente, o processador pode ser configurado para efetuar uma ou mais etapas de um método para processar e analisar as imagens. Os exemplos de métodos para processar e analisar as imagens geradas por um sistema, tal como aquele mostrado nas figuras 1 e 2, são ilustrados no Pedido de Patente U.S. Nº de Série 11/534.166, intitulado "Methods and Systems for Image Data Processing", depositado em 21 de setembro de 2006 por Roth, que é incorporado por referência neste documento.

O processador pode ser um processador tal como aqueles comumente incluídos em um computador pessoal típico, um sistema de computador de grande porte, uma estação de trabalho, etc. Em geral, o termo "sistema de computador" pode ser amplamente definido para incluir qualquer

dispositivo tendo um ou mais processadores, que execute as instruções a partir de um meio de memória. O processador pode ser implementado usando qualquer hardware funcional apropriado. Por exemplo, o processador pode incluir um processador de sinais digitais (DSP) com um programa fixo em "firmware", um arranjo de portas programável em campo (FPGA), ou outro dispositivo lógico programável (PLD) empregando "escrito" lógico sequencial em uma linguagem de programação de alto nível, tal como a linguagem de descrição de hardware de circuitos integrados de velocidade muito alta (VHSIC) (VHDL). Em um outro exemplo, as instruções de programa (não mostradas), executáveis sobre o processador para efetuar uma ou mais etapas dos métodos com computador implementado descritos no pedido de patente acima referido, podem ser codificadas em uma linguagem de alto nível, tal como C#, com seções em C++, conforme apropriado, os controles ActiveX, o JavaBeans, as Microsoft Foundation Classes ("MFC"), ou outras tecnologias ou metodologias, como desejado. As instruções de programa podem ser implementadas em quaisquer dos diversos modos, incluindo as técnicas baseadas em procedimentos, as técnicas baseadas em componentes, e/ou as técnicas orientadas por objetos, entre outras. As instruções de programa podem ser transmitidas sobre, ou armazenadas em, um meio de veículo (não mostrado). O meio de veículo pode ser o meio de transmissão, tal como um fio, cabo, ou link de transmissão sem fio. O meio de veículo pode também ser um meio de armazenagem, tal como uma memória somente para leitura, memória de acesso aleatório, um disco magnético ou óptico, ou uma fita magnética.

As modalidades de um sistema de formação de imagens das figuras 1-4 são configuradas para imobilizar substancialmente uma ou mais partículas 40 em uma câmara de formação de imagens 42 do dispositivo de medição. De preferência, este sistema inclui o elemento magnético 264 posicionado sobre o lado da câmara de formação de imagens 42 oposta à óptica do sistema. O elemento magnético 264 pode incluir qualquer elemento magnético adequado, conhecido na técnica, tal como um ímã permanente ou um eletroímã que possa ser usado para gerar um campo magnético ade-

quado. Neste modo, as partículas coloridas com a magnetita incorporada podem ser usadas nas modalidades descritas neste documento, de modo tal que as partículas possam ser substancialmente imobilizadas na câmara de formação de imagens 42 (por exemplo, no fundo da câmara) usando um campo magnético gerado pelo elemento magnético 264 no lado de trás da câmara 42. Embora o elemento magnético 264 seja mostrado espaçado da câmara de formação de imagem 42 em diversas figuras, o elemento magnético 264 pode também estar em contato com a (ou acoplado à) câmara de formação de imagens 42 sobre o lado da câmara de formação de imagens oposto aos elementos ópticos do sistema. O elemento magnético 264 pode ser adicionalmente configurado conforme descrito acima. A figura 3 mostra uma vista lateral de uma câmara de formação de imagens com o ímã 264 posicionado próximo a uma superfície da câmara, de modo tal que os glóbulos 40 estejam substancialmente imobilizados sobre a superfície da câmara. A figura 3 ilustra uma modalidade na qual os fluoroforos estão unidos à superfície dos glóbulos. A figura 4 também mostra uma vista lateral de uma câmara de formação de imagens com o ímã 264 posicionado próximo a uma superfície da câmara, de modo tal que os glóbulos 40 estejam substancialmente imobilizados sobre a superfície da câmara. Na figura 4, entretanto, os fluoroforos estão unidos às sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, primers de PCR) que não estão diretamente acopladas aos glóbulos 40, porém preferivelmente associam-se com os glóbulos 40 via hibridização com as sequências que estão diretamente acopladas aos glóbulos. Isto resulta em fluoroforos de "flutuação livre" quando uma sequência de sonda complementar sobre um glóbulo não estiver disponível para a hibridização com a sequência de ácidos nucleicos à qual está unido o fluoroforo. Os sinais a partir destes fluoroforos de flutuação livre podem aumentar o ruído de fundo quando formando as imagens dos glóbulos imobilizados sobre a superfície da câmara; entretanto, visto que os fluoroforos de flutuação livre não estão geralmente no plano focal do sistema de formação de imagens, pode ser obtida uma formação de imagens bem-sucedida dos glóbulos. Além disso, embora diversas figuras mostrem um elemento magnético posicionado pró-

ximo à câmara de formação de imagens, é para ser entendido que o sistema pode incluir mais do que um elemento magnético, cada um dos quais está posicionado próximo ao lado da câmara de formação de imagens oposta à óptica do sistema.

O sistema pode incluir um ímã que é afixado de modo tal que o ímã seja capaz de mover-se para diversas distâncias em relação à câmara de formação de imagens 42. Após a aquisição de sinal pelo sistema de formação de imagens, o campo magnético pode ser removido (por exemplo, usando um solenóide para mover um ímã permanente ou ativando ou desativando um eletroímã com uma chave), e as partículas 40 podem sair da câmara de formação de imagens, ao mesmo tempo em que novas partículas 40 da amostra seguinte são trazidas para dentro da câmara. As partículas na câmara de formação de imagens 42 podem ser removidas e as partículas podem ser introduzidas na câmara de formação de imagens usando quaisquer das modalidades descritas neste documento. Em uma outra modalidade, as partículas na câmara de formação de imagens 42 podem ser liberadas da superfície e permanecer na câmara, para interagir com os outros elementos em solução, e então atraídas para a superfície novamente para a formação de imagens.

Em uma modalidade, o projeto da câmara de formação de imagens é uma câmara de formação de imagens que tem uma superfície interna relativamente regular sobre o lado da câmara de formação de imagens próxima ao elemento magnético 264, de modo tal que os glóbulos 40 sejam distribuídos aleatoriamente através desta superfície interna à medida que o ímã 264 os atrai para a superfície. Entretanto, a câmara de formação de imagens 42 pode também ser projetada para "segurar" os glóbulos em pontos particulares quando o campo magnético for aplicado. Por exemplo, a superfície interna da câmara de formação de imagens mostrada na figura 1 pode ter um padrão quadrado de recessos gravados formados nela, de modo tal que um glóbulo 40 esteja disposto em um dos recessos gravados com a aplicação de um campo magnético, conforme descrito acima. Tais recessos gravados auxiliam na separação dos glóbulos à medida que o campo magnético é a-

plicado. Os recessos "gravados" podem ser formados por um processo de ataque químico ou outro processo adequado, conhecido na técnica. Além disso, a configuração e o arranjo dos recessos gravados podem variar dependendo, por exemplo, do tamanho dos glóbulos 40 e do espaçamento selecionado entre os glóbulos.

Em um outro exemplo, uma superfície interna de uma câmara de formação de imagens 42 pode ter um padrão de triângulo dos recessos gravados, de modo tal que o glóbulo 40 seja disposto em um dos recessos gravados com a aplicação de um campo magnético, conforme descrito acima. Portanto, os recessos gravados auxiliam na separação dos glóbulos à medida que o campo magnético é aplicado. Ademais, os recessos "gravados" podem ser formados por um processo de ataque químico ou qualquer outro processo adequado, conhecido na técnica. Além disso, a configuração e o arranjo dos recessos gravados podem variar dependendo, por exemplo, do tamanho dos glóbulos e do espaçamento selecionado entre os glóbulos. Embora os recessos gravados sejam preferivelmente bidimensionais no sentido que os glóbulos 40 estão confinados pelos recessos em duas dimensões, estes recessos podem ser substituídos por valas ou quaisquer outros recessos adequados que estejam configurados para confinar os glóbulos em somente uma direção.

Existem outras modalidades que se relacionam aos métodos para imobilizar substancialmente uma ou mais partículas 40 em um volume de formação de imagens de um dispositivo de medição. A imobilização substancial das uma ou mais partículas pode ser efetuada conforme descrito neste documento usando atração magnética, um substrato de filtro a vácuo ou em outros modos conhecidos na técnica. Por exemplo, a imobilização substancial das uma ou mais partículas em um volume de formação de imagens de um dispositivo de medição pode incluir aplicar um campo magnético a um lado de uma câmara de formação de imagens que define o volume de formação de imagens do dispositivo de medição. Além disso, este método pode incluir qualquer(quaisquer) outra(s) etapa(s) descrita(s) neste documento.

Ademais, este método pode ser efetuado por quaisquer dos sis-

temas descritos neste documento. Os exemplos dos métodos e dos sistemas para posicionar as microesferas para a formação de imagens são ilustrados no Pedido de Patente U.S. Nº de Série 11/270.786 para Pempsell, depositado em 9 de novembro de 2005, que é incorporado por referência neste documento. Independentemente do método de imobilização da partícula, as partículas são de preferência substancialmente imobilizadas de modo tal que as partículas não se movam perceptivelmente durante o período de interação com o detector, que pode ser durante múltiplos segundos.

Uma modalidade adicional refere-se a um sistema configurado para transferir uma ou mais partículas para um volume de formação de imagens de um dispositivo de medição a partir de um ou mais vasos de armazenagem (por exemplo, uma alíquota introduzida no sistema da figura 10), para formar a imagem de uma ou mais partículas no volume de formação de imagens, para imobilizar substancialmente os um ou mais materiais no volume de formação de imagens, ou alguma combinação destes. O sistema pode ser configurado para transferir as uma ou mais partículas, como descrito neste documento, para formar imagens das uma ou mais partículas, como descrito neste documento, para imobilizar substancialmente as uma ou mais partículas, conforme descrito neste documento, ou alguma combinação destes.

As medições descritas neste documento geralmente incluem o processamento da imagem para analisar uma ou mais imagens das partículas, para determinar uma ou mais características das partículas, tais como os valores numéricos representando a magnitude da emissão de fluorescência das partículas em múltipos comprimentos de ondas de detecção. O processamento subsequente das uma ou mais características das partículas, tal como utilizando um ou mais dos valores numéricos para determinar um ID do token representando o subgrupo multíplex ao qual pertencem as partículas e/ou um valor de relator representando uma presença e/ou uma quantidade de analito ligado à superfície das partículas, pode ser efetuado de acordo com os métodos descritos nas Patentes U.S. Nºs 5.736.330 para Fulton, 5.981.180 para Chandler e col., 6.449.562 para Chandler e col.,

6.524.793 para Chandler e col., 6.592.822 para Chandler, e 6.939.720 para Chandler e col., que são incorporadas por referência neste documento.

Em um exemplo, as técnicas descritas na Patente U.S. Nº 5.981.180 para Chandler e col. podem ser usadas com as medições fluorescentes descritas neste documento em um esquema de multiplexação no qual as partículas são classificadas em subgrupos para a análise dos analitos múltiplos, em uma única amostra. Os exemplos adicionais do sistema que pode ser configurado conforme descrito aqui (por exemplo, por inclusão de uma modalidade de um subsistema de iluminação descrito neste documento) são ilustrados nas Patentes U.S. Nºs 5.981.180 para Chandler e col., 6.046.807 para Chandler, 6.139.800 para Chandler, 6.366.354 para Chandler, 6.411.904 para Chandler, 6.449.562 para Chandler e col., e 6.524.793 para Chandler e col., que são incorporadas por referência neste documento. O sistema mostrado na figura 10 pode também ser adicionalmente configurado conforme descrito nestas patentes. O sistema mostrado na figura 10 pode ser adicionalmente configurado conforme descrito neste documento em relação aos outros sistemas e modalidades.

Uma outra modalidade dos sistemas de formação de imagens das figuras 1 e 2 configurados para efetuar medições de partículas é mostrada na figura 9. O sistema mostrado na figura 9 pode ser usado em aplicações tais como a medição dos múltiplos analitos de uma amostra. Esta modalidade do sistema é configurada como um sistema de formação de imagens de fluorescência. O sistema inclui um subsistema de iluminação configurado para proporcionar iluminação das partículas 62 durante a medição. Na figura 9, o subsistema de iluminação inclui o LED ou a matriz de LED 108. O LED ou a matriz de LED 108 pode incluir qualquer LED ou matriz de LED apropriada, conhecida na técnica. Ademais, o subsistema de iluminação pode incluir mais do que uma fonte de luz (não mostrada), cada uma das quais é configurada para gerar luz de pelo menos um comprimento de ondas ou pelo menos uma banda de comprimento de ondas. Um exemplo de uma combinação apropriada de fontes de luz para uso no sistema mostrado na figura 9 inclui, porém não está limitado a dois ou mais LEDs ou matrizes

de LEDs. É para ser entendido que uma única matriz de LED pode conter uma única área de emissão (de qualquer formato) ou múltiplas áreas de emissão sobre uma única matriz. Tipicamente, se estas múltiplas áreas de emissão forem de formato retangular, elas são referidas como "barras". As fontes de luz, entretanto, podem incluir pelo menos uma matriz de LED em combinação com uma ou mais outras fontes de luz que não sejam LEDs, tais como aquelas descritas acima. A luz gerada por mais do que uma fonte de luz pode ser combinada em uma via de iluminação comum por um divisor óptico (não mostrado) ou qualquer outro elemento óptico adequado, conhecido na técnica, de modo tal que a luz das fontes de luz possa ser dirigida para as partículas simultaneamente.

Alternativamente, o subsistema de iluminação pode incluir um elemento óptico (não mostrado), tal como um espelho refletor e um dispositivo (não mostrado) configurado para mover o elemento óptico para dentro e fora da via de iluminação, dependendo de qual fonte de luz for usada para iluminar as partículas. Neste modo, as fontes de luz podem ser usadas para iluminar sequencialmente as partículas com diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas de luz. A(s) fonte(s) de luz pode(m) também iluminar o substrato a partir de cima (não mostrado), em vez de a partir de debaixo, do substrato.

A(s) fonte(s) de luz pode(m) ser selecionada(s) para proporcionar luz em comprimento(s) de ondas ou banda(s) de comprimentos de ondas que fará(ão) com que as partículas ou os materiais acoplados a ela(s) ou incorporados nela(s) emitam fluorescência. Por exemplo, o(s) comprimento(s) de ondas ou a(s) banda(s) de comprimentos de ondas pode(m) ser selecionada(s) para excitar os fluoroforos, os corantes fluorescentes, ou outros materiais fluorescentes incorporados nas partículas e/ou acoplados a uma superfície das partículas. Neste modo, o(s) comprimento(s) de ondas ou a(s) banda(s) de comprimentos de ondas pode(m) ser selecionada(s) de modo tal que as partículas emitam fluorescência que é usada para a classificação das partículas. Além disso, o(s) comprimento(s) de ondas ou a(s) banda(s) de comprimentos de ondas pode(m) ser selecionada(s) para excitar os fluorofo-

ros, os corantes fluorescentes, os pontos quânticos, os nanocristais fluorescentes, ou outros materiais fluorescentes acoplados às partículas via um reagente sobre a superfície das partículas ou interno às partículas. Como tais, o(s) comprimento(s) de ondas ou a(s) banda(s) de comprimentos de ondas pode(m) ser selecionada(s) de modo tal que as partículas emitam fluorescência que seja usada para detectar e/ou quantificar a(s) reação(ões) que tenha(m) ocorrido sobre a superfície das partículas ou interna(s) às partículas. Alternativamente, o(s) comprimento(s) de ondas ou a(s) banda(s) de comprimentos de ondas pode(m) ser selecionada(s) para excitar as partículas propriamente ditas, de modo tal que as partículas emitam fluorescência que possa ser usada para determinar as características físicas de tamanho das partículas e/ou a existência de um tipo de partícula, de modo tal que o teste subsequente possa ser selecionado. Um exemplo de uma aplicação para tal sistema é uma aplicação de biodefesa, na qual a emissão sensível à fluorescência e/ou a difusão das partículas possa ser usada para detectar, em um mínimo, a presença potencial de patógenos biológicos ou químicos.

Além da detecção, certo conjunto de características físicas e/ou ópticas pode ser analisado usando a emissão. O subsistema de iluminação também inclui o refletor 110 que é substancialmente elíptico e está disposto em uma via óptica da luz gerada pelo LED ou pela matriz de LED 108. O refletor 110 é configurado para dirigir a luz do LED ou da matriz de LED para um volume de iluminação, de modo tal que uma intensidade da luz por todo o volume de iluminação seja substancialmente uniforme. O LED ou a matriz de LED 108 e o refletor 110 podem ser adicionalmente configurados conforme descrito neste documento. As partículas 40 são dispostas no volume de iluminação durante a medição. Em particular, o refletor 110 é configurado para dirigir a luz do LED ou da matriz de LED 108 para o substrato 114, sobre o qual as partículas 40 estão imobilizadas. As partículas 40 podem incluir quaisquer das partículas descritas acima. O substrato 114 pode incluir qualquer substrato apropriado conhecido na técnica. As partículas imobilizadas sobre o substrato 114 podem ser dispostas em uma câmara de formação de imagens (não mostrada) ou qualquer outro dispositivo, para manter uma po-

sição do substrato 114 e das partículas 40 imobilizadas sobre ele em relação ao subsistema de iluminação. O dispositivo para manter uma posição do substrato 114 pode também ser configurado para alterar uma posição do substrato (por exemplo, focar a iluminação sobre o substrato) antes da formação de imagens.

A imobilização das partículas 40 sobre o substrato 114 da figura 9 pode ser efetuada usando a atração magnética, como discutida acima, uma placa de filtro a vácuo, ou qualquer outro método apropriado, conhecido na técnica, conforme discutido acima. Entretanto, as partículas 40 são preferivelmente imobilizadas de modo tal que as partículas não se movam perceptivelmente durante o período de integração com o detector, que pode ser durante múltiplos segundos.

O sistema mostrado na figura 9 também inclui um subsistema de detecção que é configurado para gerar emissão sensível à luz a partir das (por exemplo, difundida a partir das e/ou emitida pelas) partículas no volume de formação de imagens. Por exemplo, conforme mostrado na figura 9, o subsistema de detecção pode incluir o elemento óptico 116 e o divisor óptico dicróico 118. O elemento óptico 116 é configurado para coletar e colimar luz do substrato 114 e das partículas 40 imobilizadas sobre ele e direcionar a luz para o divisor óptico 118. O elemento óptico 116 pode incluir qualquer elemento óptico apropriado conhecido na técnica. Além disso, embora o elemento óptico 116 seja mostrado na figura 9 como um único elemento óptico, é para ser entendido que o elemento óptico 116 pode incluir mais do que um elemento óptico. Ademais, embora o elemento óptico 116 seja mostrado na figura 9 como um elemento óptico refrativo, é para ser entendido que o elemento óptico 116 pode incluir um ou mais elementos ópticos refletivos, um ou mais elementos ópticos refrativos, um ou mais elementos ópticos difrativos, ou alguma combinação destes.

O divisor óptico 118 pode incluir qualquer divisor óptico apropriado, conhecido na técnica. O divisor óptico 118 pode ser configurado para dirigir a luz a partir do elemento óptico 116 para diferentes detectores com base no comprimento de ondas da luz. Por exemplo, a luz tendo um primeiro

comprimento de ondas, ou banda de comprimento de ondas, pode ser transmitida pelo divisor óptico 118, e a luz tendo um segundo comprimento de ondas, ou banda de comprimento de ondas, diferente do primeiro pode ser refletida pelo divisor óptico 118. O subsistema de detecção pode também incluir o elemento óptico 120 e o detector 122. A luz transmitida pelo divisor óptico 118 pode ser dirigida para o elemento óptico 120. O elemento óptico 120 é configurado para focar a luz transmitida pelo divisor óptico sobre o detector 122. O subsistema de detecção pode adicionalmente incluir o elemento óptico 124 e o detector 126. A luz refletida pelo divisor óptico 118 pode ser dirigida para o elemento óptico 124. O elemento óptico 124 é configurado para focar a luz refletida pelo divisor óptico sobre o detector 126. Os elementos ópticos 120 e 124 podem ser configurados conforme descrito acima em relação ao elemento óptico 116.

Os detectores 122 e 126 podem incluir, por exemplo, os detectores de dispositivos de cargas acopladas (CCD) ou quaisquer outros detectores de formação de imagens adequados, conhecidos na técnica, tais como os detectores de CMOS, os arranjos bidimensionais de elementos fotossensíveis, os detectores de interação de retardamento (TDI), etc. Em algumas modalidades, um detector, tal como um arranjo de formação de imagens de CCD bidimensional, pode ser usado para adquirir uma imagem de substancialmente um substrato inteiro ou de todas as partículas imobilizadas sobre um substrato, simultaneamente. O número de detectores incluídos no sistema pode ser igual ao número de comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas de interesse, de modo tal que cada detector seja usado para gerar imagens em um dos comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas. Cada uma das imagens geradas pelos detectores pode ser filtrada espectralmente usando um elemento óptico passa-banda (não mostrado) ou qualquer outro elemento óptico adequado, conhecido na técnica, que esteja disposto na via de luz a partir do divisor óptico até os detectores. Uma "banda" de filtro diferente pode ser usada para cada imagem capturada. O centro e a largura do comprimento de ondas de detecção para cada comprimento de ondas ou banda de comprimento de ondas na qual

uma imagem é adquirida podem ser equiparados à emissão fluorescente de interesse, quer seja usada para a classificação da partícula, quer seja para o sinal do relator. Neste modo, o subsistema de detecção do sistema mostrado na figura 9 é configurado para gerar múltiplas imagens em diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas, simultaneamente.

Embora o sistema mostrado na figura 9 inclua dois detectores, é para ser entendido que o sistema pode incluir mais do que dois detectores (por exemplo, três detectores, quatro detectores, etc.). Conforme descrito acima, os detectores podem ser configurados para gerar imagens em diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas, simultaneamente, por utilização de um ou mais elementos ópticos para dirigir a luz em diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas para os diferentes detectores, simultaneamente. Além disso, embora o sistema seja mostrado na figura 9 incluir múltiplos detectores, é para ser entendido que o sistema pode incluir um único detector. O único detector pode ser usado para gerar múltiplas imagens em múltiplos comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas, sequencialmente. Por exemplo, a luz de diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas pode ser dirigida para o substrato, sequencialmente, e diferentes imagens podem ser geradas durante a iluminação do substrato com cada um dos diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas.

Em um outro exemplo, podem ser alterados os diferentes filtros para selecionar o comprimento de ondas ou a banda de comprimentos de ondas de luz dirigida para o único detector (por exemplo, movendo os diferentes filtros para dentro e fora da via de formação de imagens), para gerar imagens em diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas, sequencialmente. O subsistema de detecção mostrado na figura 9, portanto, é configurado para gerar uma pluralidade ou série de imagens representando a emissão fluorescente das partículas 112 em diversos comprimentos de ondas de interesse. Além disso, o sistema pode ser configura-

do para fornecer uma pluralidade ou série de imagens digitais representando a emissão de fluorescência das partículas para um processador (por exemplo, uma máquina de processamento). Em tal exemplo, o sistema pode incluir o processador 128. O processador 128 pode ser configurado para adquirir (por exemplo, receber) dados de imagens a partir dos detectores 122 e 126. Por exemplo, o processador 128 pode ser acoplado aos detectores 122 e 126 em qualquer modo adequado, conhecido na técnica (por exemplo, via meios de transmissão (não mostrados), cada um acoplando um dos detectores ao processador, via um ou mais componentes eletrônicos (não mostrados), tais como conversores de analógicos em digitais, cada um acoplado entre um dos detectores e o processador, etc.). De preferência, o processador 128 é configurado para processar e analisar as imagens para determinar uma ou mais características das partículas 40, tais como uma classificação das partículas e a informação sobre um analito sobre a superfície das partículas. Uma ou mais características podem ser transmitidas pelo processador em qualquer formato adequado, tal como um arranjo de dados com uma entrada para a magnitude fluorescente para cada partícula, para cada comprimento de ondas ou banda de comprimentos de ondas. O processador 128 pode ser um processador tal como aqueles comumente incluídos em um computador pessoal típico, um sistema de computador de grande porte, uma estação de trabalho, etc. Em geral, o termo "sistema de computador" pode ser amplamente definido para incluir qualquer dispositivo tendo um ou mais processadores, que execute as instruções a partir de um meio de memória. O processador pode ser implementado usando qualquer outro hardware funcional apropriado. Por exemplo, o processador pode incluir um DSP com um programa fixo em "firmware", um arranjo de portas programável em campo (FPGA), ou outro dispositivo lógico programável (PLD) empregando "escrito" lógico sequencial em uma linguagem de programação de alto nível, tal como a linguagem de descrição de hardware de circuitos integrados de velocidade muito alta (VHSIC) (VHDL).

Em um outro exemplo, as instruções de programa (não mostradas), executáveis sobre o processador 128, podem ser codificadas em uma

linguagem de alto nível, tal como C#, com seções em C++, conforme apropriado, os controles ActiveX, o JavaBeans, as Microsoft Foundation Classes ("MFC"), ou outras tecnologias ou metodologias, como desejado. As instruções de programa podem ser implementadas em quaisquer dos diversos modos, incluindo as técnicas baseadas em procedimentos, as técnicas baseadas em componentes, e/ou as técnicas orientadas por objetos, entre outras.

O sistema mostrado na figura 9 pode ser adicionalmente configurado conforme descrito aqui em relação aos outros sistemas e modalidades.

A figura 10 ilustra uma modalidade de citômetro de fluxo de um sistema de formação de imagens configurado para efetuar as medições das partículas de acordo com certas modalidades da presente invenção. O sistema ilustrado na figura 10 inclui um subsistema de iluminação configurado de acordo com as modalidades descritas neste documento. Na Fig. 10, o sistema é mostrado ao longo de um plano através da seção transversal da cubeta 72, através da qual fluem as partículas 74. Em um exemplo, a cubeta pode ser uma cubeta de sílica fundida padrão, tal como aquela usada em citômetros de fluxo padrões. Entretanto, qualquer outro tipo adequado de configuração de observação ou distribuição, tal como uma corrente de fluxo de ar de uma amostra adequadamente confinada, pode também ser usado para distribuir a amostra para análise. A aplicação do método da PCR em tempo real ao sistema da figura 10 implica transferir uma alíquota da solução de PCR do termociclador para o sistema de detecção da figura 10. Retirando-se uma alíquota em diferentes intervalos do processo de PCR, facilita-se a quantificação do molde ou DNA inicial. Este método pode também manipular as alíquotas adicionando tampões ou reagentes adicionais, ou métodos de amplificação que podem aperfeiçoar a detecção. Os outros métodos podem incluir pré-dividir em alíquotas os reagentes da PCR antes de carregar em um termociclador, e remover estas amostras em intervalos separados no processo da PCR, ou qualquer outro processo de ensaio.

O subsistema de iluminação é configurado para iluminar as par-

tículas 74 com luz. O subsistema de iluminação inclui o LED ou a matriz de LED 76. O LED ou a matriz de LED pode ser qualquer LED ou matriz de LED conhecida na técnica. Além disso, o subsistema de iluminação pode incluir mais do que um LED ou matriz de LED (não mostrado). Em outras modalidades, o subsistema de iluminação inclui o LED ou a matriz de LED 76 e uma ou mais outras fontes de luz (não mostradas), tais como LEDs, matrizes de LEDs, lasers, lâmpadas de arco voltaico, iluminadores de fibras, lâmpadas incandescentes, ou alguma combinação destes. A(s) outra(s) fonte(s) de luz pode(m) incluir qualquer(quaisquer) tal(tais) fonte(s) de luz adequada(s), conhecida(s) na técnica. Neste modo, o subsistema de iluminação pode incluir mais do que uma fonte de luz. Em uma modalidade, as fontes de luz podem ser configuradas para iluminar as partículas com luz tendo diferentes comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas (por exemplo, luz azul e luz verde). Em algumas modalidades, as fontes de luz podem ser configuradas para iluminar as partículas em diferentes direções.

O subsistema de iluminação também inclui o refletor 78 que é substancialmente elíptico e é configurado para dirigir a luz do LED ou da matriz de LED 76 para um volume de iluminação, de modo tal que uma intensidade da luz por todo o volume de iluminação seja substancialmente uniforme ou tenha uma função de iluminação selecionada no volume de iluminação. O LED ou a matriz de LED 76 e o refletor 78 podem ser adicionalmente configurados conforme descrito neste documento. As partículas 74 fluem por todo o volume de iluminação durante a medição. Neste modo, a luz que sai do refletor 78 ilumina as partículas à medida que elas fluem através da cubeta. A iluminação pode fazer com que as partículas propriamente ditas ou um fluoroforo unido a elas ou incorporado nelas emita luz fluorescente tendo um ou mais comprimentos de ondas ou bandas de comprimentos de ondas. O fluoroforo pode incluir qualquer fluoroforo apropriado conhecido na técnica. Em algumas modalidades, as partículas 74, elas próprias, são configuradas para emitir fluorescência ou para emitir naturalmente fluorescência quando iluminadas com luz de intensidade e comprimento de ondas apropriados. Em tal modalidade, a luz que sai do refletor 78 faz com que as partículas emitam

fluorescência.

O sistema mostrado na figura 10 também inclui um subsistema de detecção configurado para gerar emissão sensível à luz a partir das (por exemplo, difundida a partir das e/ou emitida pelas) partículas no volume de iluminação. Por exemplo, a luz difundida que avança a partir das partículas pode ser dirigida para o sistema de detecção 80 pelo elemento óptico 82, o qual pode ser um espelho de duplicação, um componente condutor de luz adequado, ou um componente refletor dicróico. Alternativamente, o sistema de detecção 80 pode ser colocado diretamente na via da luz difundida que avança. Neste modo, o elemento óptico 82 pode não ser incluído no sistema. Em uma modalidade, a luz difundida que avança pode ser luz difundida pelas partículas em um ângulo de cerca de 180° a partir da direção de iluminação pelo subsistema de iluminação, conforme mostrado na figura 10. O ângulo da luz difundida que avança pode não ser exatamente 180° a partir da direção de iluminação, de modo tal que a luz incidente pode não colidir sobre a superfície fotossensível do sistema de detecção. Por exemplo, a luz difundida que avança pode ser luz difundida pelas partículas em ângulos menores do que, ou maiores do que, 180° a partir da direção de iluminação (por exemplo, luz difundida em um ângulo de cerca de 170°, cerca de 175°, cerca de 185°, ou cerca de 190°). A luz difundida pelas partículas em um ângulo de cerca de 90° a partir da direção de iluminação pode também ser coletada pelo subsistema de detecção. A luz difundida pelas partículas pode também, ou alternativamente, ser coletada em qualquer ângulo ou orientação pelo subsistema de detecção.

Em uma modalidade, esta luz difundida pode ser separada em mais do que um feixe de luz por um ou mais divisores ópticos ou espelhos dicróicos. Por exemplo, a luz difundida em um ângulo de cerca de 90° com a direção de iluminação pode ser separada em dois feixes de luz diferentes pelo divisor óptico 84. Os dois feixes de luz diferentes podem ser separados novamente pelos divisores ópticos 86 e 88 para produzir quatro feixes de luz diferentes. Cada um dos feixes de luz pode ser dirigido para um sistema de detecção diferente, o qual pode incluir um ou mais detectores. Por exemplo,

um dos quatro feixes de luz pode ser dirigido para o sistema de detecção 90. O sistema de detecção 90 pode ser configurado para detectar luz difundida pelas partículas. A luz difundida, detectada pelo sistema de detecção 80 e/ou pelo sistema de detecção 90, pode geralmente ser proporcional ao volume das partículas que são iluminadas pela fonte de luz. Portanto, a emissão do sistema de detecção 80 e/ou a emissão do sistema de detecção 90 pode ser usada para determinar um diâmetro das partículas que estão no volume de iluminação.

Além disso, a emissão do sistema de detecção 80 e/ou do sistema de detecção 90 pode ser usada para identificar mais do que uma partícula que esteja grudada a uma outra ou que esteja passando através do volume de iluminação aproximadamente ao mesmo tempo. Portanto, tais partículas podem ser distinguidas das outras partículas da amostra e das partículas de calibração. Os outros três feixes de luz podem ser dirigidos para os sistemas de detecção 92, 94, e 96. Os sistemas de detecção 92, 94, e 96 podem ser configurados para detectar a fluorescência emitida pelo fluoroforo ou pelas partículas propriamente ditas. Cada um dos sistemas de detecção pode ser configurado para detectar a fluorescência de um comprimento de ondas diferente ou uma faixa diferente de comprimentos de ondas. Por exemplo, um dos sistemas de detecção pode ser configurado para detectar a fluorescência verde. Um outro dos sistemas de detecção pode ser configurado para detectar a fluorescência amarelo-alaranjada, e o outro sistema de detecção pode ser configurado para detectar a fluorescência vermelha.

Em algumas modalidades, os filtros espectrais 98, 100, e 102 podem ser acoplados aos sistemas de detecção 92, 94, e 96, respectivamente. Os filtros espectrais podem ser configurados para bloquear a fluorescência de comprimentos de ondas diferentes daquele ou daqueles que os sistemas de detecção são configurados para detectar. Além disso, uma ou mais lentes (não mostradas) podem ser acopladas opticamente a cada um dos sistemas de detecção. As lentes podem ser configuradas para focar a luz difundida ou a fluorescência emitida sobre uma superfície fotossensível dos detectores. A emissão do detector é proporcional à luz fluorescente que

colide sobre ele e resulta em um pulso de corrente. O pulso de corrente pode ser convertido em um pulso de voltagem, filtrado passa-baixo, e então digitalizado por um conversor A/D (não mostrado). O processador 104, tal como um processador de sinal digital (DSP), integra a área sob o pulso para proporcionar um número que representa a magnitude da fluorescência. Conforme mostrado na figura 10, o processador 104 pode ser acoplado ao detector 90 via o meio de transmissão 106. O processador 104 pode também ser acoplado ao detector 90 indiretamente via o meio de transmissão 106 e um ou mais outros componentes (não mostrados), tais como o conversor A/D. O processador pode ser acoplado a outros detectores do sistema em um modo similar. O processador 104 pode ser adicionalmente configurado como descrito neste documento.

Em algumas modalidades, a emissão sensível à fluorescência emitida pelo fluoroforo ou pelas partículas pode ser usada para determinar uma identidade das partículas e uma informação sobre uma reação ocorrida ou ocorrendo sobre a superfície das partículas. Por exemplo, a emissão de dois dos sistemas de detecção pode ser usada para determinar uma identidade das partículas, e a emissão do outro sistema de detecção pode ser usada para determinar uma reação ocorrida ou ocorrendo sobre a superfície das partículas. Portanto, a seleção dos detectores e dos filtros espectrais pode variar dependendo do tipo de corantes ou fluoroforos incorporados nas, ou ligados às, partículas e/ou da reação que está sendo medida (isto é, o(s) corante(s) incorporado(s) nos, ou ligado(s) aos, reagentes envolvidos na reação), ou pode depender das características de fluorescência das partículas propriamente ditas. Os sistemas de detecção que são usados para determinar uma identidade das partículas da amostra (por exemplo, os sistemas de detecção 92 e 94) podem ser fotodiodos avalanche (APDs), tubos fotomultiplicadores (PMTs), ou um outro tipo de fotodetector. O sistema de detecção que é usado para identificar uma reação ocorrida ou ocorrendo sobre a superfície das partículas (por exemplo, o sistema de detecção 96) pode ser um PMT, um APD, ou um outro tipo de fotodetector. O sistema de medição pode ser adicionalmente configurado conforme descrito neste documento.

Embora o sistema da figura 10 inclua dois sistemas de detecção para distinguir entre as partículas tendo diferentes características de corantes, é para ser entendido que o sistema pode incluir mais do que dois sistemas de detecção (isto é, 3 sistemas de detecção, 4 sistemas de detecção, etc.) para distinguir entre as partículas tendo diferentes características de corantes. Em tais modalidades, o sistema pode incluir divisores ópticos adicionais e sistemas de detecção adicionais. Além disso, os filtros espectrais e/ou as lentes podem ser acoplados a cada um dos sistemas de detecção adicionais.

Em certas modalidades, os sistemas descritos neste documento incluem um elemento de controle térmico acoplado à câmara de formação de imagens 42. Com o elemento de controle térmico acoplado à câmara de formação de imagens 42, a temperatura na câmara de formação de imagens pode ser ajustada conforme necessário para efetuar diversas reações biológicas. Desse modo, pelo acoplamento de um elemento de controle térmico acoplado à câmara de formação de imagens, a PCR pode ser efetuada dentro da câmara de formação de imagens 42. Em certos aspectos, a câmara de formação de imagens pode ser acoplada a um dispositivo para a liberação das microesferas a partir da superfície da câmara, incluindo os dispositivos de sonicação ou redemoinho. As outras modalidades incluem os sistemas tendo múltiplas câmaras de detecção e/ou câmaras de detecção disponíveis.

B. PCR

A reação em cadeia por polimerase (PCR) é uma técnica amplamente usada na biologia molecular para amplificar um pedaço de DNA por replicação enzimática in vitro. Tipicamente, as aplicações da PCR empregam a DNA polimerase estável ao calor, tal como a Taq polimerase. Esta DNA polimerase enzimaticamente agrupa-se a uma nova fita de DNA a partir dos nucleotídeos (dNTPs) usando o DNA de fita simples como molde e os primers de DNA para iniciar a síntese de DNA. Uma reação PCR básica requer diversos componentes e reagentes, incluindo um molde de DNA que contenha a sequência-alvo a ser amplificada; um ou mais primers, os quais

são complementares às regiões do DNA nas extremidades de 5' e 3' da sequência-alvo; uma DNA polimerase (por exemplo, a Taq polimerase) que preferivelmente tem uma temperatura ideal em torno de 70°C; os trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs); uma solução de tampão proporcionando um ambiente químico adequado para a atividade ideal e a estabilidade da DNA polimerase; cátions divalentes, tipicamente os íons de magnésio ($Mg2^{+}$); e os íons de potássio como cátions monovalentes.

A maior parte dos métodos de PCR utiliza a ciclagem térmica para submeter a amostra da PCR a uma série definida de etapas de temperaturas. Cada ciclo tipicamente tem 2 ou 3 etapas de temperaturas distintas. A ciclagem é frequentemente precedida por uma etapa de temperatura única ("iniciação") em uma alta temperatura (>90°C), e seguida por uma ou duas etapas de temperaturas no final para a extensão do produto final ("extensão final") ou a armazenagem breve ("retenção final"). As temperaturas usadas e a duração de tempo que elas são aplicadas em cada ciclo dependem de uma variedade de parâmetros. Estes incluem a enzima usada para a síntese de DNA, a concentração de íons divalentes e dNTPs na reação, e a temperatura de fusão (Tf) dos primers. As temperaturas comumente usadas para as diversas etapas nos métodos de PCR são: etapa de iniciação - 94-96°C; etapa de desnaturação - 94-98°C; etapa de anelamento - 50-65°C; etapa de extensão/alongamento - 70-74°C; alongamento final - 70-74°C; retenção final - 4-10°C.

A reação em cadeia por polimerase em tempo real, também chamada reação em cadeia por polimerase em tempo real quantitativa (QRT-PCR) ou reação em cadeia por polimerase cinética, é usada para amplificar e simultaneamente quantificar uma molécula de DNA alvejada. Ela capacita tanto a detecção quanto a quantificação (como número absoluto de cópias ou quantidade relativa quando normalizada para a entrada de DNA ou genes de normalização adicionais) de uma sequência específica em uma amostra de DNA. A PCR em tempo real pode ser combinada com transcrição reversa reação em cadeia por polimerase para quantificar os RNAs de pouca quantidade. As concentrações relativas de DNA presente durante a

fase exponencial da PCR em tempo real são determinadas representando graficamente a fluorescência contra o número de ciclos em uma escala logarítmica. As quantidades de DNA podem então ser determinadas por comparação dos resultados com uma curva padrão produzida pela PCR em tempo real de diluições em série de uma quantidade conhecida de DNA.

A PCR multíplex e a PCR em tempo real multíplex utilizam grupos de primers únicos, múltiplos, dentro de uma única reação PCR para produzir amplicons de diferentes sequências de DNA. Pelo alvejamento dos múltiplos genes simultaneamente, pode ser obtida informação adicional a partir de uma única corrida de teste que, de outro modo, requereria diversas vezes os reagentes e mais tempo para executar. As temperaturas de anelamento para cada um dos grupos de primers devem ser otimizadas para trabalhar dentro de uma única reação.

Os métodos descritos neste documento podem também utilizar técnicas de iniciação assimétricas durante o processo de PCR, que podem aumentar a ligação das sondas relatoras às sequências-alvo complementares. A PCR assimétrica é conduzida com um excesso do primer para a fita escolhida, para preferencialmente amplificar uma fita do molde de DNA mais do que a outra.

C. QUÍMICAS DE DETECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Existem diversas químicas de detecção de ácidos nucleicos comercialmente disponíveis, atualmente usadas na PCR em tempo real. Estas químicas de detecção incluem os agentes de ligação de DNA, a detecção de ácidos nucleicos com base em FRET, as sondas de hibridização, as marcas moleculares, as sondas de hidrólise, e os sistemas à base de corantes-primers. Cada uma destas químicas é discutida em mais detalhe abaixo.

1. Agentes de Ligação de DNA

A primeira análise da PCR cinética foi efetuada por Higuchi e col., que utilizaram o brometo de etídio para ligar os produtos de DNA de fita dupla (Higuchi e col., 1992; Higuchi e col., 1993, Patente U.S. 5.994.056; Pedido Publicado U.S. Nº 2001/6171785). O brometo de etídio, como todos os outros agentes de ligação de DNA usados na PCR cinética, é capaz de

aumentar a intensidade fluorescente com a ligação. O aumento resultante no sinal pode ser registrado durante o curso da reação, e representado graficamente contra o número de ciclos. O registro de dados neste modo é mais indicativo da concentração inicial da amostra de interesse em comparação com a análise de ponto final.

Os corantes de ligação são relativamente baratos comparados às outras químicas de detecção. As vantagens de usar estes corantes de ligação são o seu baixo custo e as excelentes razões de sinal para ruído. As desvantagens incluem as suas propriedades de ligação não específica a qualquer DNA de fita dupla na reação PCR, incluindo os amplicons criados pelas formações de primers-dímeros (Wittwer e col., 1997). Para confirmar a produção de um amplicon específico, deve ser efetuada uma análise da curva de fusão (Ishiguro e col., 1995). Uma outra desvantagem é que a amplificação de um produto mais longo gerará mais sinal do que um mais curto. Se as eficiências de amplificação forem diferentes, a quantificação pode ser ainda mais imprecisa (Bustin e Nolan, 2004).

O SYBR® Green I da Invitrogen® (Carlsbad, CA) é um corante de intercalação popular (Bengtsson e col., 2003). O SYBR® Green I é um corante de cianina assimétrico, ciclicamente substituído (Zipper e col., 2004; Patente U.S. 5.436.134; Patente U.S. 5.658.751). Um corante de cianina assimétrico de ligação, excelente, secundário, conhecido como BEBO, tem sido usado na PCR em tempo real. O BEBO causa um aumento não específico na fluorescência com o tempo, talvez devido a um processo lento de agregação e é menos sensível comparado ao SYBR® Green I. Um corante similar chamado BOXTO também foi descrito para uso em qPCR (Bengtsson e col., 2003; Pedido Publicado U.S. Nº 2006/211028). Como o BEBO, o BOXTO é menos sensível do que o SYBR® Green I (Pedido Publicado U.S. Nº 2006/0211028).

Os outros relatores comuns incluem o YO-PRO-1 e o laranja tiazol (TO), que são corantes de cianina assimétricos de intercalação (Nygren e col., 1998). Embora estes corantes exibam grandes aumentos na intensidade da fluorescência com a ligação, o TO e o Amarelo Oxazol (YO)

foram descritos desempenhar insatisfatoriamente na PCR em tempo real (Bengtsson e col., 2004). Os outros corantes que podem ser usados incluem, porém não estão limitados ao pico verde, laranja acridínio, e cromomicina A3 (Pedido Publicado U.S. Nº 2003/6569627). Os corantes que podem ser compatíveis com a PCR em tempo real podem ser obtidos a partir de diversos vendedores, tais como Invitrogen, Cambrex Bio Science (Walkersville, MD), Rockland Inc. (Rockland, ME), Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI), Biotium (Hayward, CA), TATAA Biocenter AB. (Goteborg, Suécia) e Idaho Technology (Salt Lake City, UT) (Pedido Publicado U.S. Nº 2007/0020672).

Um corante conhecido como EvaGreen® (Biotium) mostrou potencial pelo fato de que ele é projetado para não inibir a PCR, e é mais estável em condições alcalinas comparado ao SYBR® Green I (Dorak, 2006; Pedido Publicado U.S. Nº 2006/0211028). Os outros corantes mais recentes incluem a família de corantes LCGreen® (Idaho Technology). O LCGreen® I e o LCGreen® Plus são os mais comercialmente competitivos destes corantes. O LCGreen® Plus é consideravelmente mais brilhante do que o LCGreen® (Pedido Publicado U.S. Nº 2007/0020672; Dorak, 2006; Pedido Publicado U.S. Nº 2005/0233335; Pedido Publicado U.S. Nº 2066/0019253).

2. Detecção de Ácido Nucleico à Base de FRET

Muitos métodos de detecção de ácidos nucleicos em tempo real utilizam marcas que interagem por Transferência de Energia Ressonante de Förster (FRET). Este mecanismo envolve um par de doador e receptor, onde a molécula doadora é excitada em um comprimento de ondas particular, e subsequentemente transfere a sua energia de modo não radiativo para a molécula receptora. Isto tipicamente resulta em uma troca de sinal que é indicativa da proximidade das moléculas doadora e receptora uma da outra.

Os métodos iniciais de detecção de ácidos nucleicos com base na FRET que estabelecem uma base para esta tecnologia em geral incluem o trabalho por Heller e col. (Patentes U.S. Nºs 4.996.143; 5.532.129; e 5.565.322, que são incorporadas por referência). Estas patentes introduziram a detecção de ácidos nucleicos com base na FRET por inclusão de du-

as sondas marcadas que hibridizam com a sequência-alvo em estreita proximidade uma da outra. Este evento de hibridização faz com que uma transferência de energia produza uma mudança mensurável na resposta espectral, que indiretamente sinaliza a presença do alvo.

Cardullo e col. (incorporados por referência) estabeleceram que a modulação da fluorescência e a transferência de energia ressonante por fluorescência não radiativa podem detectar a hibridização de ácido nucleico em solução (Cardullo e col., 1988). Este estudo utilizou três estratégias de detecção de ácidos nucleicos com base na FRET. A primeira inclui duas sondas marcadas em 5' que eram complementares uma à outra, permitindo que a transferência ocorresse entre um fluoroforo doador e receptor sobre o comprimento do complexo hibridizado. No segundo método, as moléculas fluorescentes foram covalentemente unidas aos dois ácidos nucleicos, uma na extremidade de 3' e a outra na extremidade de 5'. Os ácidos nucleicos marcados com o fluoroforo hibridizaram com sequências distintas, porém estreitamente espaçadas, de um ácido nucleico não marcado, mais longo. Finalmente, um corante de intercalação foi usado como um doador para um fluoroforo receptor que foi covalentemente unido na extremidade de 5' da sonda.

Morrison e col. (1989), incorporados por referência, usaram as sondas marcadas complementares para detectar o DNA-alvo não marcado por hibridização competitiva, produzindo sinais de fluorescência que aumentaram com a concentração crescente do DNA-alvo. Neste caso, foram usadas duas sondas que eram complementares uma à outra e marcadas em suas extremidades de 5' e 3' com fluoresceína e repressor de fluoresceína, respectivamente. Um trabalho posterior também mostrou que as curvas de fusão de fluorescência poderiam ser usadas para monitorar a hibridização (Morrison e Stols, 1993).

3. Sondas de Hibridização

As sondas de hibridização usadas na PCR em tempo real foram desenvolvidas principalmente para uso com os instrumentos LightCycler® da Roche (Pedido Publicado U.S. Nº 2001/6174670; Pedido Publicado U.S. Nº

2000/6140054). Estas são algumas vezes referidas como sondas de FRET, sondas de LightCycler®, ou sondas duplas de FRET (Espy e col., 2006).

As sondas de hibridização são usadas em um formato no qual a FRET é medida diretamente (Wilhelm e Pingoud, 2003). Cada uma das duas sondas é marcada com um membro respectivo de um par de transferência de energia fluorescente, de modo tal que, com a hibridização com regiões adjacentes da sequência-alvo de DNA, a energia de excitação é transferida do doador para o receptor, e a emissão subsequente pelo receptor pode ser registrada como sinal do relator (Wittwer e col., 1997). As duas sondas fazem o anelamento com a sequência-alvo, de modo que a sonda a mutante é fluorescentemente marcada em sua extremidade de 3' e a sonda a jusante é marcada em sua extremidade de 5'. A extremidade de 3' da sonda a jusante é tipicamente bloqueada por fosforilação ou algum outro meio para impedir a extensão da sonda durante a PCR. O corante acoplado à extremidade de 3' da sonda a montante é suficiente para impedir a extensão desta sonda. Este sistema de relator é diferente dos outros métodos de detecção baseados em FRET (marcas moleculares, TaqMan®, etc.) pelo fato de que ele utiliza a FRET para gerar, em vez de reprimir, o sinal fluorescente (Dorak, 2006).

Os fluoroforos receptores típicos incluem os corantes de cianina (Cy3 e Cy5), a 6-carbóxi-4,7,2',7'-tetraclorofluoresceína (TET), a 6-carbóxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina (TAMRA), e a 6-carboxirrodamina X (ROX). Os fluoroforos doadores são normalmente a 6-carboxifluorosceína (FAM) (Wilhelm e Pingoud, 2003). As sondas de hibridização são particularmente vantajosas para a genotipagem e a detecção do emparelhamento inadequado. A análise da curva de fusão pode ser efetuada além do monitoramento por ciclo da fluorescência durante a reação PCR. Um aquecimento lento da amostra após a hibridização pela sonda pode proporcionar informação qualitativa adicional sobre a sequência de interesse (Lay e Wittwer, 1997; Bernard e col., 1998a; Bernard e col., 1998b). O emparelhamento inadequado dos pares de bases alterará a estabilidade de um duplex, em quantidades variadas, dependendo do tipo de emparelhamento inadequado e da posição na sequência (Guo e col., 1997).

4. Marcas Moleculares

As marcas moleculares, também conhecidas como sondas hairpin, são estruturas de tronco em alça que abrem e hibridizam na presença de uma sequência-alvo complementar, tipicamente causando um aumento na fluorescência (Patente U.S. 5.925.517; Pedido Publicado U.S. Nº 2006/103476). As marcas moleculares tipicamente têm uma sequência-alvo de complemento de ácidos nucleicos flanqueada por membros de um par de afinidade que, sob as condições de ensaio na ausência do alvo, interagem um com o outro para formar um duplex-tronco. A hibridização das sondas com suas sequências-alvo pré-selecionadas produz uma mudança conformacional nas sondas, forçando os "braços" a distanciarem-se e eliminando o duplex-tronco e, com isso, separando o fluoroforo e o repressor.

5. Sondas de Hidrólise

As sondas de hidrólise, também conhecidas como o ensaio TaqMan® (Patente U.S. 5.210.015), são populares porque elas somente envolvem uma única sonda por sequência-alvo, em contraste com as duas sondas (como nas sondas de hibridização). Isto resulta em uma economia de custos por amostra. O projeto destas sondas é também menos complicado do que aquele das marcas moleculares. Estas são tipicamente marcadas com um relator sobre a extremidade de 5' e um repressor sobre a extremidade de 3'. Quando o relator e o repressor são fixados sobre a mesma sonda, eles são forçados a permanecerem próximos um do outro. Esta proximidade reprime efetivamente o sinal do relator, mesmo quando a sonda for hibridizada com a sequência-alvo. Durante a fase de extensão ou alongamento da reação PCR, uma polimerase conhecida como Taq polimerase é usada por causa de sua atividade de exonuclease em 5'. A polimerase usa o primer a montante como um sítio de ligação e então se estende. As sondas de hidrólise são clivadas durante a extensão pela polimerase em sua extremidade de 5' pela atividade da exonuclease em 5' da Taq. Quando isto ocorre, o fluoroforo relator é liberado da sonda, e subsequentemente, não mais está próximo do repressor. Isto produz um aumento contínuo no sinal do relator com cada fase de extensão à medida que a reação PCR continua a

ciclagem. Para assegurar o sinal máximo com cada ciclo, as sondas de hidrólise são projetadas com uma Tf que é aproximadamente 10°C maior do que os primers na reação.

Entretanto, o processo de clivar a extremidade de 5' da sonda não necessita requerer amplificação ou extensão da sequência-alvo (Patente U.S. 5.487.972). Isto é efetuado colocando-se a sonda adjacente ao primer a montante, sobre a sequência-alvo. Neste modo, podem ocorrer rodadas sequenciais de anelamento e hidrólise subsequente da sonda, resultando em uma quantidade significativa de geração de sinal na ausência de polimerização. Os usos da reação da sonda de hidrólise em tempo real são também descritos nas Patentes U.S. N°s 5.538.848 e 7.205.105, ambas as quais são incorporadas por referência.

6. Sistemas à Base de Corante-Primer

Existem diversos sistemas à base de primer marcado com corante, disponíveis para a PCR em tempo real. Estes variam na complexidade de sistemas de primers "hairpin" simples até estruturas de primers mais complexas, onde a porção de loop-tronco da sonda "hairpin" é unida, via um ligador não amplificável, ao primer da PCR específico. Estes métodos têm a vantagem que eles não requerem uma sonda marcada intermediária adicional que é essencial para os sistemas de ensaios à base de sondas e eles também permitem a multiplexação que não é possível com os corantes de ligação de DNA. Entretanto, o sucesso de cada um destes métodos é dependente do projeto cuidadoso das sequências dos primers.

Os primers "hairpin" contêm sequências de repetições invertidas que são separadas por uma sequência que é complementar ao DNA-alvo (Nazarenko e col., 1997; Nazarenko e col., 2002; Patente U.S. 5.866.336). As repetições anelam-se para formar uma estrutura de hairpin, de modo tal que um fluoroforo na extremidade de 5' esteja próximo a um repressor na extremidade de 3', reprimindo o sinal fluorescente. O primer "hairpin" é projetado de modo que ele preferencialmente ligar-se-á ao DNA-alvo, em vez de manter a estrutura de hairpin. À medida que a reação PCR progride, o primer anela-se ao produto da PCR que se acumula, o fluoroforo e o repressor

tornam-se fisicamente separados, e o nível de fluorescência aumenta.

Os primers LUX® (Light Upon eXtension) da Invitrogen são primers "hairpin" fluorogênicos que contêm uma extensão curta de 4-6 nucleotídeos na extremidade de 5' do primer, que é complementar a uma sequência interna próxima à extremidade de 3' e sobrepõe a posição de um fluoroforo unido próximo à extremidade de 3' (Chen e col., 2004; Bustin, 2002). O emparelhamento de bases entre as sequências complementares forma um tronco de fita dupla que reprime o corante relator que está próximo, na extremidade de 3', do primer. Durante a PCR, o primer LUX® é incorporado na nova fita de DNA e então se torna linearizado quando uma nova segunda fita complementar for gerada. Esta mudança estrutural resulta em um aumento de até 10 vezes no sinal fluorescente. Estes primers podem ser difíceis de projetar e a estrutura secundária deve ser cuidadosamente analisada para assegurar que a sonda anele-se preferencialmente ao produto da PCR. Os serviços de projeto e validação para os primers LUX® personalizados estão disponíveis a partir da Invitrogen.

Mais recentemente, as sondas "hairpin" tornaram-se parte do primer da PCR (Bustin, 2002). Nesta abordagem, assim que o primer for entendido, a sequência dentro do "hairpin" anela-se ao produto da PCR recentemente sintetizado, rompendo o "hairpin" e separando o fluoroforo e o repressor.

Os primers Scorpion® são moléculas bifuncionais nas quais uma sequência da sonda "hairpin" a montante está covalentemente ligada a uma sequência do primer a jusante (Pedido Publicado U.S. Nº 2001/6270967; Pedido Publicado U.S. Nº 2005/0164219; Whitecombe e col., 1999). A sonda contém um fluoroforo na extremidade de 5' e um repressor na extremidade de 3. Na ausência do alvo, a sonda forma um tronco de 6-7 bases, colocando o fluoroforo e o repressor em proximidade um do outro e permitindo que o repressor absorva a fluorescência emitida pelo fluoroforo. A porção do loop da seção da sonda scorpion consiste em uma sequência complementar a uma porção da sequência-alvo dentro de 11 bases a jusante da extremidade de 3' da sequência do primer. Na presença do alvo, a sonda torna-se unida à

região-alvo sintetizada no primeiro ciclo da PCR. Após o segundo ciclo de desnaturação e anelamento, a sonda e o alvo hibridizam. A desnaturação do loop "hairpin" requer menos energia do que o novo duplex de DNA produzido. Assim, a sequência do loop da sonda scorpion hibridiza com uma porção do produto da PCR recentemente produzido, resultando na separação do fluoroforo do repressor e em um aumento na fluorescência emitida.

Como com todos os métodos à base de corante-primer, o projeto dos primers Scorpion segue considerações de projeto rigorosas para a estrutura secundária e a sequência do primer, para assegurar que uma reação secundária não competirá com o evento correto de sondar. O par de primers deve ser projetado para dar um amplicon de aproximadamente 100-200 bp. Idealmente, os primers devem ter tão pouca estrutura secundária quanto possível e devem ser testados quanto à formação de "hairpin" e estruturas secundárias. O primer deve ser projetado de modo tal que ele não hibridizará com o elemento de sonda, visto que isto resultaria na linearização e em um aumento na emissão não específica de fluorescência. As Tf's dos dois primers devem ser similares e a Tf do tronco deve ser 5-10°C maior do que a Tf da sonda. A sequência da sonda deve ser 17-27 bases de comprimento e o alvo da sonda deve ser 11 bases ou menos a partir da extremidade de 3' do scorpion. A sequência do tronco deve ser 6 a 7 bases de comprimento e deve conter principalmente citosina e guanina. A sequência do tronco em 5' deve começar com uma citosina, visto que a guanina pode reprimir o fluoroforo. Diversos pacotes de software de projeto de oligonucleotídeos contêm algoritmos para o projeto do primer Scorpion e os serviços de projeto personalizado estão disponíveis a partir de alguns vendedores de oligonucleotídeos também.

O sistema Plexor® da Promega é uma tecnologia de PCR em tempo real que tem a vantagem que não há nenhuma sonda para projetar e somente um primer da PCR é marcado (Patente U.S. 5.432.272; Pedido Publicado U.S. Nº 2000/6140496; Pedido Publicado U.S. Nº 2003/6617106). Esta tecnologia beneficia-se da interação específica entre dois nucleotídeos modificados, isoguanina (iso-dG) e 5'-metilisocitosina (iso-dC) (Sherrill e col.,

2004; Johnson e col., 2004; Moser e Prudent, 2003). As características principais desta tecnologia são que as iso-bases somente emparelharão por bases com a iso-base complementar e a DNA polimerase somente incorporará uma iso-base quando a iso-base complementar correspondente estiver presente na sequência existente. Um primer da PCR é sintetizado com um resíduo de iso-dC fluorescentemente marcado como o nucleotídeo 5'-terminal. À medida que a amplificação progride, o primer marcado é anelado e estendido, tornando-se incorporado no produto da PCR. Um iso-dGTP marcado com repressor (dabsil-iso-dGTP), disponível como o nucleotídeo livre na mistura principal da PCR, especificamente emparelha por bases com a iso-dC e torna-se incorporado na fita da PCR complementar, reprimindo o sinal fluorescente. O projeto dos primers para o sistema Plexor é relativamente simples comparado a alguns dos outros sistemas de corante-primer e normalmente segue considerações típicas de projeto de primer não específico para o alvo. Um Sofware de Projeto de Primer Plexor baseado na web, disponível da Promega, auxilia na seleção das combinações apropriadas de corante e repressor, e proporciona links para os fornecedores de oligonucleotídeos, licenciados para fornecer primers contendo iso-bases.

D. QUÍMICAS ILUSTRATIVAS

Conforme discutido acima, existem diversas químicas de detecção de ácidos nucleicos comercialmente disponíveis, atualmente usadas na PCR em tempo real. As tecnologias de PCR em tempo real atuais estão, entretanto, limitadas em suas capacidades de multiplexação a reações de aproximadamente 1-6 vezes. Os métodos e os sistemas da presente invenção podem obter uma multiplexação da PCR em tempo real muito maior, usando as químicas de detecção de ácidos nucleicos comercialmente disponíveis, incluindo as químicas de detecção não anteriormente usadas para a PCR em tempo real. As modalidades que descrevem o uso de diversas destas químicas de detecção no contexto da presente invenção são discutidas abaixo.

1. Marcas Moleculares

As marcas moleculares, também conhecidas como sondas hair-

pin, podem ser descritas como estruturas de tronco em alça que abrem e hibridizam na presença de uma sequência-alvo complementar, tipicamente causando um aumento na fluorescência, porém, na ausência dela, formam uma estrutura de tronco em alça que resulta em fluorescência diminuída (Patente U.S. 5.925.517; Pedido Publicado U.S. Nº 2006/103476). As sondas de acordo com uma modalidade da presente invenção são sondas marcadas que têm uma sequência-alvo de complemento de ácidos nucleicos flanqueada por membros de um par de afinidade, ou braços, que, sob as condições de ensaio na ausência do alvo, interagem um com o outro para formar um duplex-tronco. A hibridização das sondas com suas sequências-alvo préselecionadas produz uma mudança conformacional nas sondas, forçando os "braços" a distanciarem-se e eliminando o duplex-tronco. As modalidades das sondas de acordo com esta invenção empregam marcas interativas, pelo que esta mudança conformacional pode ser detectada, ou empregam uma estrutura de diferenciação de alelo especialmente limitada, ou ambas. Uma mudança característica no nível de sinal depende de se as porções das marcas estão próximas devido às sondas estarem na posição mais próxima, ou estão separadas devido às sondas estarem na posição aberta. De acordo com esta modalidade, as marcas moleculares estão também ligadas a uma partícula espectralmente, ou de outro modo, distinguível, que proporciona níveis maiores de multiplexação do que eram anteriormente possíveis por utilização dos métodos convencionais, onde os corantes uniam-se às sondas "hairpin" por diferenciação da cor do corante, em vez de diferenciação das propriedades da partícula unida à sonda de captura.

As figuras 5 e 6 ilustram como uma modalidade da presente invenção pode separar o fluorocromo da molécula repressora, permitindo a fluorescência detectável sobre a superfície de uma partícula. Na figura 5, as sondas "hairpin" acopladas a uma molécula repressora e um fluorocromo estão homogêneas em solução. A molécula repressora 200 limita a quantidade de fluorescência emitida pela molécula de fluorocromo 202 quando a sonda estiver na formação de hairpin. A sonda de oligonucleotídeo na formação de "hairpin" é designada como 205 na figura 5. Quando o loop interno

da molécula em "hairpin" hibridiza com um amplicon-alvo, o fluorocromo e a molécula repressora são separados, conforme ilustrado nas figuras 5 e 6, permitindo a fluorescência detectável sobre a superfície do glóbulo 40. Para representar esta fluorescência em imagens, os glóbulos 40 são atraídos para o arranjo plano movendo o elemento magnético 264 próximo ao arranjo e detectando a fluorescência com um sistema de formação de imagens, tal como os sistemas de formação de imagens ilustrados nas figuras 1-2, e 9.

2. Sondas de Hibridização

As sondas de hibridização usadas na PCR em tempo real são algumas vezes referidas como sondas de FRET, sondas de LightCycler®, ou sondas duplas de FRET (Espy e col., 2006). As sondas de hibridização são usadas em um formato no qual a FRET é medida diretamente (Wilhelm e Pingoud, 2003). Cada uma das duas sondas é marcada com um membro respectivo de um par de transferência de energia fluorescente, de modo tal que, com a hibridização com regiões adjacentes da sequência-alvo de DNA, a energia de excitação é transferida do doador para o receptor, e a emissão subsequente pelo receptor pode ser registrada como sinal do relator (Wittwer e col., 1997). As duas sondas fazem o anelamento com a sequência-alvo, de modo que a sonda a mutante é fluorescentemente marcada em sua extremidade de 3' e a sonda a jusante é marcada em sua extremidade de 5'. A extremidade de 3' da sonda a jusante é tipicamente bloqueada por fosforilação, ou algum outro meio, para impedir a extensão da sonda durante a PCR. O corante acoplado à extremidade de 3' da sonda a montante é suficiente para impedir a extensão desta sonda.

Nesta modalidade, uma das duas sondas de hibridização pode ser acoplada às partículas distinguíveis (por exemplo, os glóbulos codificados). Nesta situação, a sonda de captura acoplada à partícula será complementar à sequência-alvo de ácidos nucleicos de interesse e a sonda não acoplada hibridizará com uma região adjacente ao longo da sequência-alvo. No contexto de uma reação PCR em tempo real, a sequência-alvo é o amplicon. Os fluoroforos doadores ou os receptores podem ser unidos à sequência de nucleotídeos que está unida à partícula.

Os fluoroforos receptores típicos incluem os corantes de cianina (Cy3 e Cy5), a 6-carbóxi-4,7,2',7'-tetraclorofluoresceína (TET), a 6-carbóxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina (TAMRA), e a 6-carboxirrodamina X (ROX). Os fluoroforos doadores são normalmente a 6-carboxifluorosceína (FAM) (Wilhelm e Pingoud, 2003). A genotipagem da sequência-alvo é efetuada correlacionando as sondas relatoras com as suas sequências correspondentes.

A figura 7 ilustra uma sonda de hibridização de FRET (Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência) modificada, no contexto da presente invenção. O fluoroforo doador 210 é unido à sonda imobilizada sobre a superfície da microesfera paramagnética 40. Ao atingir a fase de detecção de cada ciclo da PCR, a temperatura da solução estará propícia para a hibridização de ambas, a sonda marcada com doador e a sonda marcada com receptor, com a sequência-alvo. A proximidade do par de doador 210 e receptor 212 permitirá a Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência. Isto resultará em fluorescência somente próxima à superfície do glóbulo 40, permitindo que a molécula receptora 212 emita luz em um comprimento de ondas diferente que o doador 210.

Assim, em uma modalidade de efetuar um método para a amplificação e a detecção em tempo real, multiplexada, de uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, usando as sondas de hibridização de FRET, combinar-se-ia em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de grupos de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde cada grupo de sondas compreende uma primeira sonda marcada com um primeiro membro de um par de transferência de energia fluorescente e imobilizada sobre um glóbulo magnético codificado, de modo tal que a identidade da primeira sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada, e uma segunda sonda com um segundo membro do par de transferência de energia fluorescente. Então se efetuaria um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos

amplificados com a pluralidade de pares de primers. Os produtos de amplificação seriam hibridizados com os grupos de sondas. Por aplicação de um campo magnético a uma superfície da câmara, os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados são atraídos para a superfície da câmara, onde um sistema de formação de imagens, tal como aqueles descritos em qualquer outra parte neste documento, detecta um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir do par de transferência de energia fluorescente hibridizado com os produtos de amplificação. O campo magnético pode então ser removido da superfície da câmara para efetuar um ciclo de amplificação adicional. A amplificação e a detecção podem ser repetidas um número desejado de vezes para obter dados quantitativos em tempo real sobre a reação. Deve ser observado que o sinal a partir do par de transferência de energia fluorescente pode ser um aumento na fluorescência ou uma diminuição na fluorescência, dependendo das moléculas relatoras empregadas.

Este sistema de duas sondas pode também ser usado sem um par de FRET. Nesta modalidade, somente a sonda que não está acoplada à partícula é marcada e, portanto, a hibridização de ambas as sondas com a sequência-alvo é detectável em virtude da marca sobre uma das duas sondas. Por exemplo, combinar-se-ia em uma câmara uma amostra contendo uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de grupos de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde cada grupo de sondas compreende uma primeira sonda imobilizada sobre um glóbulo magnético codificado, de modo tal que a identidade da primeira sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada, e uma segunda sonda compreendendo uma marca. Um ciclo de amplificação é efetuado para formar os produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers. Os produtos de amplificação são hibridizados com os grupos de sondas, e um campo mag-

nético é aplicado a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara. A sonda marcada, não imobilizada, também seria atraída para a superfície da câmara porque ela é hibridizada com uma sequência complementar sobre o produto de amplificação. Um sistema de formação de imagens, tal como aqueles descritos em qualquer outra parte neste documento, pode então ser usado para detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir da segunda sonda hibridizada com os produtos de amplificação. O campo magnético pode então ser removido da superfície da câmara, antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional A amplificação e a detecção podem ser repetidas um número de vezes desejado para obter os dados quantitativos em tempo real sobre a reação.

Corantes de FRET de flutuação livre adicionais, ou outras moléculas relatoras que estejam unidas às sondas (por exemplo, uma terceira sonda, quarta sonda, etc. de um grupo de sondas), podem ser incluídos em certas modalidades, onde mais do que um par de sondas é deixado hibridizar com a sequência-alvo de ácidos nucleicos, em qualquer tempo dado, desde que uma sonda do grupo de sondas esteja acoplada a uma partícula ou partícula codificada magnética. Estas sondas adicionais podem adicionalmente aumentar a sensibilidade, a especificidade, e a capacidade de multiplexação do método por adição de características diferenciadoras adicionais ou moléculas relatoras adicionais que estejam unidas ao alvo. Por exemplo, tendo-se uma sonda que é acoplada a uma partícula codificada magnética, esta sonda pode hibridizar com um alvo que seja maior do que a sonda, de modo tal que as outras sondas que são modificadas com as outras moléculas relatoras possam hibridizar com uma região da sequência-alvo que está 5' ou 3' em relação à sonda que é acoplada à partícula codificada magnética.

Podem ser usados reagentes adicionais para melhorar a eficiência de quaisquer das modalidades descritas neste documento. Estes reagentes podem melhorar os métodos por utilização de aditivos da PCR que sejam

conhecidos para aqueles versados na técnica. A BSA ou outras moléculas que atuem como agentes bloqueadores ou detergentes ou tensoativos podem também melhorar os métodos descritos neste documento. A BSA ou outros reagentes similares conhecidos para aqueles versados na técnica podem melhorar a reação PCR efetuada em uma câmara de vidro ou quartzo por redução da atração do DNA e de outros reagentes para as superfícies da câmara de reação. Podem ser usados outros aditivos que exibam efeitos de agrupamento molecular para melhorar o tempo até a hibridização. Podem também ser usadas outras moléculas, reagentes, substâncias químicas, soluções conhecidas para aqueles versados na técnica, que possam melhorar o tempo até a hibridização,. Um exemplo de tais podem ser as proteínas de ligação de ácidos nucleicos ou os ligantes excelentes secundários.

Aqueles versados na técnica reconhecerão que as modificações no corante relator, tais como o método bastante conhecido de adicionar grupos sulfato, alterarão a hidrofilicidade das moléculas corantes, o que pode resultar em menos ligação não específica às partículas magnéticas codificadas.

3. Competição das Duas Sondas

As outras modalidades empregam o uso de duas sondas por sequência-alvo de ácidos nucleicos. Uma sonda é unida a um glóbulo e pode ser marcada com um fluoroforo. Uma sonda "de flutuação livre" complementar é também adicionada, que contém um par de um repressor ou um fluoroforo, de modo tal que a FRET possa ocorrer. Nesta situação, a sonda sobre o glóbulo pode conter um fluoroforo na extremidade de 3', ao mesmo tempo estando unida ao glóbulo na extremidade de 5'. A sonda de flutuação livre será capaz de reprimir o sinal associado com o fluoroforo sobre o glóbulo, sendo projetada como um complemento reverso do mesmo, e tendo uma porção repressora em sua extremidade de 5', de modo tal que ela esteja próxima ao fluoroforo e, portanto, obtenha uma diminuição no sinal na hibridização com a sonda. Estas sondas também estarão presentes durante a amplificação por PCR ou algum outro evento de amplificação. Na fase de detecção do alvo do ciclo da PCR, a sonda de flutuação livre deixará a son-

da unida ao glóbulo e hibridizará com a sequência-alvo. A sonda unida ao glóbulo será projetada de modo tal que ela exiba menos ligação favorável, bem como uma menor temperatura de fusão com a sonda de flutuação livre, comparada à sonda de flutuação livre com a sequência-alvo. À medida que a sequência-alvo aumenta na concentração, enquanto a reação PCR continua, pode ser observado um aumento significativo no sinal associado com os glóbulos. O mesmo efeito de um aumento mensurável no sinal pode ser obtido por um método similar de projetar a sonda que está unida ao glóbulo para exibir ligação favorável da sequência-alvo, em comparação com a cinética de ligação da sequência-alvo com a sonda de flutuação livre. As diferenças na cinética de ligação podem ser obtidas projetando-se a sonda de flutuação livre e a fixada para serem de comprimentos diferentes em relação uma à outra, ou inserindo-se uma base ou mais do que uma base sobre uma das sondas que seja um emparelhamento imperfeito em relação à sequência sobre a outra sonda, porém não em relação á sequência-alvo.

4. Moléculas Repressoras Incorporadas

A figura 8 ilustra um exemplo no qual as moléculas repressoras são incorporadas em uma fita de DNA recentemente sintetizada por pré-acoplamento dos nucleotídeos às moléculas repressoras. Estes nucleotídeo/repressoras pré-acoplados estarão disponíveis na mistura de reação PCR e serão incorporados nos produtos de amplificação. Uma sonda complementar marcada com um fluorocromo unido à superfície do glóbulo 40 resultará em um sistema no qual o sinal fluorescente diminui à medida que é produzida mais e mais da sequência-alvo de oligonucleotídeos. Por exemplo, poder-se-ia combinar em uma câmara uma amostra compreendendo uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma mistura de dNTPs na qual uma parte dos dNTPs está acoplada às moléculas repressoras, e uma pluralidade de sondas fluorescentemente marcadas, complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do

glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada. Um ciclo de amplificação é efetuado para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers. Porque uma parte dos dNTPs na reação de amplificação está acoplada às moléculas repressoras, os produtos de amplificação incorporarão estas moléculas repressoras. Os produtos de amplificação são então hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados, e um campo magnético é aplicado a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara. Os sinais a partir dos glóbulos magnéticos codificados e os sinais a partir das sondas marcadas são então detectados. Porque os produtos de amplificação incorporam as moléculas repressoras, o sinal fluorescente a partir das sondas diminui à medida que é produzido mais e mais do produto de amplificação. O campo magnético pode ser removido da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional. A amplificação e a detecção podem ser repetidas um número desejado de vezes para obter dados quantitativos em tempo real sobre a reação.

5. Hibridização Direta

A PCR pode ser efetuada onde os primers usados para formar as sequências amplificadas ou os amplicons forem marcados com um fluorocromo (por exemplo, Cy3) ou outra substância que permita a detecção. A marcação pode ser, por exemplo, na extremidade principal 5 do primer. A utilização de primers que estejam marcados permite a formação de amplicons marcados. As sequências de ácidos nucleicos amplificadas que estão marcadas podem hibridizar com as, e ser capturada pelas, sondas de oligonucleotídeos que estão acopladas às partículas distinguíveis. Nenhum método de PCR em tempo real comercial, atual, emprega o uso de métodos de hibridização direta.

Uma modalidade que utiliza uma abordagem de hibridização direta é ilustrada na figura 11. Conforme mostrado na figura 11, um primer

de um par de primers é marcado em sua extremidade de 5' com uma molécula relatora, tal como o fluoroforo Cy3. O par de primers amplifica uma sequência-alvo a partir do DNA da amostra presente na PCR, para formar um amplicon marcado. Um glóbulo codificado, magnético, também está presente na PCR, acoplado a uma sonda que é complementar à fita marcada do amplicon. A extremidade de 3' da sonda imobilizada pode ser bloqueada (com um grupo fosfato ou um dT invertido em 3', por exemplo) para impedir a extensão da sonda pela polimerase. Após o número desejado de ciclos da PCR, um campo magnético é aplicado à câmara para atrair os glóbulos codificados, magnéticos, para uma superfície da câmara, para a detecção. Esta etapa é efetuada sob condições de hibridização, de modo tal que os amplicons marcados hibridizarão com as suas sondas complementares e, como tais, serão capazes de serem atraídos para uma superfície da câmara. A presença dos amplicons marcados é detectada pela detecção da marca (por exemplo, um sinal fluorescente a partir de uma marca Cy3) na superfície da câmara. Embora a figura 11 ilustre uma reação em uma única vez, é para ser entendido que este método pode ser aplicado às reações PCR multíplex também. Os glóbulos codificados, as marcas sobre os amplicons, e as suas combinações podem ser usados para distinguir grandes números de diferentes amplicons na mesma reação.

6. Primers com Marcas

Em uma outra modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, compreendendo combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos; uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde cada par de primers compreende um primeiro primer compreendendo uma sequência específica para o alvo, uma sequência de marca 5' da sequência específica para o alvo, e um bloqueador entre a sequência específica para o alvo e a sequência de marca, e um segundo primer compreendendo uma sequência específica para o alvo; um agente de marcação; e uma pluralidade de sondas (antimarcas) complemen-

tares às sequências de marca da pluralidade de pares de primers, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada. Um ciclo de amplificação é efetuado para formar produtos de amplificação com marcas e marcados para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers. Os produtos de amplificação com marcas e marcados são hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados, e um campo magnético é aplicado a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação com marcas e marcados hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara. Os sinais a partir dos glóbulos magnéticos codificados e os sinais a partir dos produtos de amplificação com marcas e marcados são então detectados usando, por exemplo, um sistema de formação de imagens, tal como aqueles descritos neste documento. O campo magnético pode ser removido da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional. A amplificação e a detecção podem ser repetidas um número desejado de vezes para obter dados quantitativos em tempo real sobre a reação. Em certos aspectos, o agente de marcação pode ser uma molécula relatora unida ao segundo primer do par de primers. Em outros aspectos, o agente de marcação pode ser um corante de intercalação.

Conforme mencionado acima, as sequências de marca complementares (isto é, as marcas e as antimarcas) podem ser usadas nos primers e nas sondas. Diversas abordagens foram desenvolvidas que envolvem o uso de marcas de oligonucleotídeos unidas a um suporte sólido que pode ser usado para hibridizar especificamente com os complementos da marca que estão acoplados aos primers, sequências das sondas, sequências-alvos, etc. A seleção adequada das sequências de marca e antimarca que não sejam de hibridização é útil nos ensaios, particularmente nos ensaios em um ambiente de hibridização altamente paralela, que requeria um severo comportamento de hibridização não cruzada.

São consideradas certas propriedades termodinâmicas de formação de híbridos de ácidos nucleicos no projeto das sequências de marca e antimarca. A temperatura na qual os oligonucleotídeos formam duplexes com as suas sequências complementares, conhecida como a T_f (a temperatura na qual 50% do duplex de ácido nucleico estão dissociados), varia de acordo com diversas propriedades dependentes da sequência, incluindo as energia de ligação de hidrogênio dos pares canônicos A-T e G-C (refletidas na composição de GC ou de base), a energia livre emaranhada e, em menor grau, as interações vizinhas mais próximas. Estas energias variam amplamente entre os oligonucleotídeos que são tipicamente usados nos ensaios de hibridização. Por exemplo, a hibridização de duas sequências de sondas compostas de 24 nucleotídeos, uma com um teor de GC de 40% e a outra com um teor de GC de 60%, com o seu alvo complementar, sob condições padrões, teoricamente pode ter uma diferença de 10° C na temperatura de fusão (Mueller e col., 1993). Os problemas na hibridização ocorrem quando os híbridos são deixados se formar sob condições de hibridização que incluem uma única temperatura de hibridização que não é ótima para a hibridização correta de todas as sequências de oligonucleotídeos de um grupo. Pode ocorrer a hibridização com emparelhamento imperfeito das sondas não complementares, formando duplexes com estabilidade mensurável do emparelhamento imperfeito (Santalucia e col., 1999). O emparelhamento imperfeito dos duplexes em um grupo particular de oligonucleotídeos pode ocorrer sob condições de hibridização onde o emparelhamento imperfeito resulta em uma diminuição na estabilidade do duplex, que resulta em uma T_f maior do que o duplex correto menos estável daquele grupo particular. Por exemplo, se a hibridização for efetuada sob condições que favoreçam a sequência de duplex de emparelhamento perfeito rica em AT, existe a possibilidade por hibridizar uma sequência de duplex rica em GC que contém uma base emparelhada imperfeitamente tendo uma temperatura de fusão que está ainda acima do duplex rico em AT formado corretamente. Portanto, o projeto de famílias de sequências de oligonucleotídeos que podem ser usadas em reações de hibridização multiplexadas deve incluir a consideração pelas propri-

edades termodinâmicas dos oligonucleotídeos e a formação de duplex que reduzirá ou eliminará o comportamento de hibridização cruzada dentro do grupo de oligonucleotídeos projetado.

Existem diversas abordagens diferentes para selecionar as sequências de marca e antimarca para uso em ensaios de hibridização multiplexada. A seleção das sequências que podem ser usadas como códigos postais ou marcas em um arranjo endereçável foi descrita na literatura de patentes em uma abordagem realizada por Brenner e colaboradores (Patente U.S. 5.654.413, incorporada neste documento por referência). Chetverin e col. (WO 93/17126, Patentes U.S. Nºs 6.103.463 e 6.322.971, incorporadas neste documento por referência) divulgam arranjos de oligonucleotídeos binários, divididos em partes, para classificar e examinar os ácidos nucleicos. Estes arranjos têm uma sequência de nucleotídeos constante unida a uma sequência de nucleotídeos variável, adjacente, ambas ligadas a um suporte sólido por uma porção de ligação covalente. Os parâmetros usados no projeto das marcas com base em subunidades são discutidos em Barany e col. (WO 9731256, incorporado neste documento por referência). Um método de sequenciamento multíplex foi descrito na Patente U.S. 4.942.124, incorporada neste documento por referência. Este método utiliza pelo menos dois vetores que diferem um do outro em uma sequência de marca.

A Patente U.S. 7.226.737, incorporada neste documento por referência, descreve um grupo de 210 marcas e antimarcas para hibridização não cruzada. O Pedido Publicado U.S. Nº 2005/0191625, incorporado neste documento por referência, divulga uma família de 1168 sequências de marcas com uma capacidade demonstrada de hibridizar corretamente com as suas sequências complementares, com mínima hibridização cruzada. O Pedido U.S. Nº 60/984.982, incorporado neste documento por referência, descreve o uso de marcas, antimarcas, e complexos de captura na amplificação das sequências de ácidos nucleicos.

Uma população de sequências de marcas ou antimarcas de oligonucleotídeos pode ser conjugada a uma população de primers ou outras sequências de polinucleotídeos em diversos modos diferentes, incluindo,

porém não-limitados à síntese química direta, acoplamento químico, ligação, amplificação, e similares. As marcas das sequências que têm sido sintetizadas com as sequências-alvo de primers específicas podem ser usadas para a extensão enzimática do primer sobre o alvo, por exemplo, na amplificação por PCR. Uma população de sequências de marcas ou antimarcas de oligonucleotídeos pode ser conjugada a um suporte sólido através de, por exemplo, químicas de superfícies sobre a superfície do suporte.

Conforme discutido acima, um primer de um par de primers usado em uma reação de amplificação compreende uma sequência de marca. Após a extensão inicial do primer que compreende a sequência de marca, o produto da extensão com marcas pode servir como um molde para o outro primer do par primers. Seria indesejável, entretanto, para a extensão sobre tal molde continuar através da região da marca, visto que isto poderia interferir com a hibridização da sequência de marca com a sequência de antimarca da sonda. Desse modo, pode ser posicionado um bloqueador entre a sequência específica para o alvo e a sequência de marca do primer. As porções de bloqueadores impedem que a polimerase estenda até a região da sequência de marca, o que permite que a sequência de marca permaneça como fita simples durante a amplificação e, portanto, livre para hibridizar com a sua sequência de antimarca complementar no complexo de captura.

Uma porção de bloqueador refere-se a qualquer porção que, quando ligada (por exemplo, covalentemente ligada) entre uma primeira sequência de nucleotídeos e uma segunda sequência de nucleotídeos, seja efetiva para inibir e preferivelmente impedir a extensão da primeira ou da segunda sequência de nucleotídeos, porém não de ambas, a primeira e a segunda sequência de nucleotídeos. Existem diversos nucleotídeos que podem ser usados como porções de bloqueadores. Os exemplos não-limitativos de porções de bloqueadores incluem os alquilenos de cadeias retas de C6-20 e o iSp18 (que é um hexa-etilenoglicol de 18 átomos). As porções de bloqueadores podem incluir, por exemplo, pelo menos uma porção de desóxi ribofuranosil naftaleno ou ribofuranosil naftaleno, que pode ser ligada aos nucleotídeos adjacentes via uma ligação de 3'-furanosila ou, pre-

ferivelmente, via uma ligação de 2'-furanosila. Uma porção de bloqueador pode ser uma sequência de oligonucleotídeos que está na orientação oposta à sequência específica para o alvo. Desse modo, em certos aspectos da invenção, a sequência de marca de um primer pode ser tanto a marca quanto o bloqueador, onde a sequência específica para o alvo está na orientação de 5' para 3', porém a sequência de marca está na orientação de 3' para 5'. Nesta orientação, a sequência de marca não é capaz de ser estendida pela enzima polimerase. As diversas porções de bloqueadores e o seu uso são descritos na Patente U.S. 5.525.494, que é incorporada neste documento por referência.

Se não for usada uma porção de bloqueador, podem ser realizadas etapas para permitir a hibridização da sequência de marca com a sequência de antimarca. Por exemplo, um antiprimer com marcas pode substituir o primer com marcas e bloqueado na amplificação. Em cujo caso, a polimerase é deixada estender até a região da sequência de antimarca, criando a sequência de marca complementar. O produto de amplificação de fita dupla que contém uma região de antimarca/marca é então desnaturado antes da hibridização com a antimarca acoplada ao substrato sólido.

7. Primers Unidos às Partículas

Em certas modalidades da invenção, podem ser usados primers que estejam, eles próprios, unidos à superfície da partícula magneticamente responsiva. Em tais modalidades, as sondas de hibridização unidas aos glóbulos não seriam requeridas para capturar os amplicons, visto que os amplicons seriam sintetizados sobre os glóbulos. Tipicamente, somente um primer de cada par de primers seria unido à partícula. O outro primer do par de primers seria de "flutuação livre". Tais primers podem também exibir propriedades que os permitem serem espectralmente distinguíveis com a extensão, tais como com primers que também atuam como marcas moleculares, em consequência do que se observa uma mudança no sinal na extensão do primer que altera a proximidade de um fluoroforo e um repressor. Outras químicas de detecção, tais como a marcação do primer de flutuação livre, a incorporação de dNTPs marcados no amplicon, ou a utilização de agentes

de intercalação de DNA, podem também ser usadas com estas modalidades.

8. Sondas de Hidrólise

Um outro método de detecção dos ácidos nucleicos beneficia-se da atividade de exonuclease de algumas polimerases. Nesta modalidade, um par de fluoroforo e repressor, ou um par de FRET pode ser modificações de uma única sonda que está unida a uma partícula (por exemplo, um glóbulo). Um destes fluorocromos pode também estar unido à superfície do glóbulo magnético, com o outro fluorocromo estando unido à sonda que está afixada à superfície da partícula, de modo tal que ambos os fluorocromos interajam em virtude de sua estreita proximidade espacial um do outro. Na hibridização da sequência-alvo com a sonda, um outro primer está localizado a jusante da sonda, de modo tal que, na extensão do primer, a porção repressora (ou porção fluorescente) seja clivada, produzindo uma mudança mensurável no sinal.

9. SimpleProbes®

As outras modalidades podem incorporar o uso de SimpleProbes® ou sondas que sejam equivalentes às SimpleProbes®, as quais estão unidas aos glóbulos para o propósito de visualizar os dados em tempo real. Estas sondas são descritas na Patente U.S. Nº 6.635.427. As SimpleProbes® podem ser unidas às microesferas superparamagnéticas usando um ligador de C12 modificado com amino ou por alguns outros ligadores, ou uma outra interação de ligação covalente. Pela união destas sondas aos glóbulos, os glóbulos podem estar presentes durante a reação PCR, de modo tal que, por ligação às sequências-alvo pretendidas, seja formado um produto de fita dupla, permitindo a detecção e a análise das sequências de ácidos nucleicos em um formato de PCR em tempo real altamente multiplexada.

10. Imuno-PCR

A Imuno-PCR pode ser usada para detectar um antígeno, célula, endosporo, ou qualquer outra molécula ou proteína de interesse que possa ser detectada por um anticorpo, onde o dito anticorpo está ligado a uma

sequência de ácidos nucleicos. Os métodos existentes de Imuno-PCR são descritos na Patente U.S. Nº 5.665.539; Sano, T. e col., Science, 258:120-122 (1992); e Sims, PW e col., Anal Biochem. 281:230-232 (2000), cada um dos quais é incorporado por referência. Os métodos existentes, entretanto, estão limitados na capacidade de multiplexação de detectar da Imuno-PCR em tempo real. Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um método que pode aumentar bastante a capacidade de multiplexação de detectar da Imuno-PCR em tempo real, primeiramente ligando os anticorpos ou os aptâmeros de captura a uma partícula que seja de natureza magnética (por exemplo, superparamagnética), onde a partícula é capaz de reagir e ligar-se à molécula-alvo de interesse. Esta partícula não necessita estar codificada para ser espectralmente identificável. Após ocorrer a reação, ou durante a reação, ou antes da reação, as partículas magnéticas, as quais podem ser nanopartículas ou micropartículas, podem ser levadas para a câmara de detecção e amplificação. As partículas, as quais estão ligadas aos anticorpos ou aptâmeros de captura, podem ser atraídas para a superfície da câmara por aplicação de um campo magnético. Estas partículas e as moléculas ligadas ou, de outro modo, unidas a elas podem sofrer um procedimento de lavagem, o qual pode incluir fluir um volume de solução aquosa sobre as partículas, as quais são mantidas no local por forças magnéticas, removendo por lavagem a molécula-alvo em excesso, se for preciso.

Um anticorpo de detecção ou aptâmero de detecção pode ser introduzido na câmara de reação e deixado reagir e ligar-se à molécula-alvo, a qual também está ligada pelo anticorpo ou aptâmero de captura, o qual está, por sua vez, ligado às partículas magnéticas. O anticorpo de detecção ou o aptâmero de detecção está ligado a uma sequência de ácidos nucleicos, a qual é capaz de formar um produto de ácido nucleico amplificável. O anticorpo de detecção não precisa ser introduzido enquanto na câmara de detecção, a qual é capaz de aplicação de um campo magnético, porém pode ser introduzido em um vaso de reação separado, e então subsequentemente introduzido no vaso de reação, o qual é capaz de aplicação de um campo magnético. O anticorpo de detecção não precisa ser introduzido com a mo-

lécula-alvo ou o complexo de alvo/captura/partícula antes de um procedimento de lavagem. Assim que o complexo de alvo/captura/partícula ou o complexo de alvo/captura/partícula/detecção (complexo de sanduíche de captura) for introduzido na câmara de detecção, a qual é capaz de aplicação de um campo magnético, este complexo pode ser atraído para a superfície da câmara, se as partículas já não tiverem sido atraídas para a superfície da câmara em qualquer número de diversas derivações dos métodos de formar ou lavar o complexo de alvo/captura/partícula, ou quaisquer partes delas que não tenham sido inteiramente transformadas em complexos. Uma vez atraído para a superfície da câmara, este complexo pode ser lavado por qualquer número de reagentes ou tampões ou soluções aquosas conhecidas na técnica para efetuar tal. Os tampões que podem comumente ser usados podem incluir, porém não estão limitados pela utilização de tampão de PBS, BSA, PBS/BSA, água, PCR, etc. A lavagem neste caso pode melhorar o ensaio por remoção do anticorpo ou aptâmero de detecção em excesso, o que pode aumentar a especificidade. O anticorpo de captura ou o aptâmero de captura não necessitam estar unidos a uma partícula capaz de ser atraída para uma superfície, se a lavagem não for desejada.

O complexo de sanduíche de captura pode ser usado em uma reação PCR ou reação PCR em tempo real na qual os glóbulos magnéticos codificados estejam presentes. Nesta modalidade, o complexo de sanduíche de captura ou a pluralidade de complexos de sanduíche de captura teria sido introduzida em uma câmara de detecção, a qual é capaz de ciclagem térmica, tendo sido atraída e mantida em uma superfície da câmara por um campo magnético para efetuar um procedimento de lavagem. Após a lavagem, os glóbulos codificados, os quais estão acoplados com as sondas de ácidos nucleicos adequadas para a detecção dos alvos de ácidos nucleicos, seriam introduzidos nela em um meio também compreendendo todos os reagentes e componentes necessários para efetuar uma Reação em Cadeia por Polimerase ou outro método de amplificação de ácido nucleico. A solução também conteria qualquer número de reagentes necessários para a detecção multiplexada de PCR em tempo real, conforme descrito em outras modalida-

des aqui. Por exemplo, a pluralidade de anticorpos de detecção ou aptâmeros de detecção está ligada às sequências de ácidos nucleicos que são compreendidas de diferentes combinações de sequências, de modo a permitir a detecção multiplexada das sequências de ácidos nucleicos, de modo tal que a detecção de tal pluralidade de sequências possa estar relacionada de novo à detecção ou quantificação da molécula-alvo em virtude de sua associação com o anticorpo de detecção ou o aptâmero de detecção.

Por exemplo, assim que o complexo de sanduíche de captura e os reagentes da PCR, bem como os glóbulos magnéticos codificados, tiverem sido combinados, os métodos subsequentes podem incluir qualquer número de modalidades para a amplificação e a detecção multiplexadas descritas neste documento. Por exemplo, em uma modalidade, a presente invenção proporciona um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, compreendendo: (a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, um agente de marcação, e uma pluralidade de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada; (b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação marcados para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers; (c) hibridizar os produtos de amplificação marcados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados; (d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação marcados hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara; (e) detectar os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação marcados; (f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e (g) repetir as etapas (b) até (f)

pelo menos uma vez; em que a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada. Em certos aspectos da invenção, as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 a 40 vezes.

11. Análogos de Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos usados nos métodos descritos neste documento podem incluir os isômeros de nucleotídeos ou os análogos de bases, tais como os "Ácidos Nucleicos Bloqueados" ou outros. Uma sequência de ácidos nucleicos pode compreender, ou ser composta inteiramente de, um análogo de um nucleotídeo de ocorrência natural. Os análogos de nucleotídeos são bastante conhecidos na técnica. Um exemplo não-limitativo é um "acido nucleico de peptídeo", também conhecido como um "PNA", "análogo de ácido nucleico à base de peptídeo" ou "PENAN", descrito nas Patentes U.S. N°s 5.786.461, 5.891.625, 5.773.571, 5.766.855, 5.736.336, 5.719.262, 5.714.331, 5.539.082, e no WO 92/20702, cada um dos quais é incorporado neste documento por referência. Os ácidos nucleicos de peptídeos geralmente têm especificidade de sequência, propriedades de ligação, e resistência à degradação enzimática aumentadas em comparação com as moléculas tais como o DNA e o RNA (Egholm e col., 1993; PCT/EP/01219). Um ácido nucleico de peptídeo geralmente compreende um ou mais nucleotídeos ou nucleosídeos que compreendem uma porção de base, uma porção de ligador de base que não é um açúcar de 5 carbonos, e/ou uma porção de cadeia principal que não é uma porção de cadeia principal de fosfato. Os exemplos das porções de ligadores de bases descritas para os PNAs incluem os átomos de nitrogênio aza, as cadeias de amido e/ou ureído (ver, por exemplo, a Patente U.S. 5.539.082). Os exemplos das porções de cadeias principais descritas para os PNAs incluem uma porção de cadeia principal de aminoetilglicina, poliamida, polietila, politioamida, polissulfinamida ou polissulfonamida.

Um outro exemplo não-limitativo é um ácido nucleico bloqueado ou "LNA". Um monômero de LNA é um composto bicíclico que é estruturalmente similar aos nucleosídeos de RNA. Os LNAs têm uma conformação de furanose que está limitada por um ligador de metileno que conecta a posição

2'-O à posição 4'-C, como descrito em Koshkin e col., 1998 a e 1998b e Wahlestedt e col. 2000.

Ainda um outro exemplo não-limitativo é um "ácido nucleico de poliéter", descrito na Patente U.S. 5.908.845, incorporada neste documento por referência. Em um ácido nucleico de poliéter, uma ou mais bases estão ligadas aos átomos de carbono quirais em uma cadeia principal de poliéter.

12. Hibridização

Conforme usado neste documento, "hibridização", "hibridiza" ou "capaz de hibridizar" é entendido significar a formação de uma molécula de fita dupla ou tripla ou uma molécula com natureza de fita dupla ou tripla parcial. O termo "anelar", conforme usado neste documento, é sinônimo de "hibridizar". O termo "hibridização", "hibridiza" ou "capaz de hibridizar" inclui os termos "condições severas" ou "alta severidade" e os termos "baixa severidade" ou "condições de baixa severidade".

Conforme usado neste documento, as "condições severas" ou a "alta severidade" são aquelas condições que permitem a hibridização entre, ou dentro de, uma ou mais fitas de ácidos nucleicos contendo sequências complementares, porém impedem a hibridização de sequências não complementares. Tais condições são bastante conhecidas para aqueles versados na técnica, e são preferidas para aplicações que requeiram alta seletividade. As condições severas podem compreender as condições de baixo teor de sal e/ou altas temperaturas, tais como proporcionadas por NaCl a cerca de 0,02 M até cerca de 0,15 M, em temperaturas de cerca de 50°C até cerca de 70°C. Entende-se que a temperatura e a concentração iônica de uma severidade desejada são determinadas, em parte, pelo comprimento dos ácidos nucleicos particulares, pelo comprimento e teor de bases das sequências-alvo, pela composição de carga dos ácidos nucleicos, e pela presença ou concentração de formamida, cloreto de tetrametilamônio ou outros solventes em uma mistura de hibridização.

Entende-se também que estas faixas, composições e condições para a hibridização são mencionadas como forma de exemplos não-limitativos somente, e que a severidade desejada para uma reação de hibri-

dização particular é frequentemente determinada empiricamente por comparação com um ou mais controles positivos ou negativos. Os exemplos não-limitativos de condições de baixa severidade incluem a hibridização efetuada em torno de 0,15 M até cerca de 0,9 M de NaCl, em uma faixa de temperaturas de cerca de 20°C a cerca de 50°C. Obviamente, está dentro da habilidade de alguém na técnica modificar adicionalmente as condições de baixa ou alta severidade, para adaptar uma aplicação particular.

E. PARTÍCULAS CODIFICADAS

Embora certas modalidades sejam descritas neste documento em relação às microesferas (isto é, glóbulos) codificadas, é para ser entendido que os subsistemas de iluminação, os sistemas, e os métodos podem também ser usados com outras partículas, tais como as micropartículas, o ouro ou as outras nanopartículas de metais, os pontos quânticos, ou os nanopontos. As partículas são preferivelmente superparamagnéticas. Os exemplos de microesferas, glóbulos, e partículas são ilustrados nas Patentes U.S. N°s 5.736.330 para Fulton, 5.981.180 para Chandler e col., 6.057.107 para Fulton, 6.268.222 para Chandler e col., 6.449.562 para Chandler e col., 6.514.295 para Chandler e col., 6.524.793 para Chandler e col., e 6.528.165 para Chandler, que são incorporadas por referência neste documento.

A excitação dos corantes ou dos fluorocromos dentro ou sobre a superfície das partículas codificadas pode ser efetuada por luz de laser, luz de diodo, lâmpada de arco voltaico, calor, emissão radioativa, quimioluminescência, eletroluminescência, quimioeletroluminescência, ou qualquer outro método conhecido para aqueles versados na técnica.

Em certas modalidades, a presente invenção é usada em conjunção com as tecnologias Luminex® xMAP® e MagPlex®. A tecnologia Luminex xMAP permite a detecção dos produtos de ácidos nucleicos imobilizados sobre as microesferas fluorescentemente codificadas. Pela coloração das microesferas com 10 intensidades diferentes de cada um de dois fluorocromos espectralmente distintos, são produzidas 100 populações fluorescentemente distintas de microesferas. Estas populações (grupos) individuais podem representar sequências de detecção individuais e a magnitude de

hibridização sobre cada grupo pode ser detectada individualmente. A magnitude da reação de hibridização é medida usando um terceiro relator, que é tipicamente um terceiro fluoroforo espectralmente distinto. A molécula relatora sinaliza o grau da reação unindo-se às moléculas sobre as microesferas. Visto que tanto as microesferas quanto as moléculas relatoras estão marcadas, o processamento do sinal digital permite a tradução dos sinais em dados quantitativos, em tempo real, para cada reação. A tecnologia Luminex é descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. 5.736.330, 5.981.180, e 6.057.107, todas as quais são especificamente incorporadas por referência. As microesferas Luminex® MagPlex® são microesferas superparamagnéticas que são fluorescentemente codificadas usando a tecnologia xMAP® discutida acima. As microesferas contêm grupos carboxila de superfície para a união covalente dos ligantes (ou biomoléculas).

F. KITS

A presente invenção também proporciona kits contendo componentes para uso com os métodos de amplificação e detecção descritos neste documento. Quaisquer dos componentes descritos aqui podem ser combinados em um kit. Em certas modalidades, os kits compreendem uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação de uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada. Em certas modalidades, o kit também compreende um agente de marcação. Em certas modalidades, os kits compreendem sondas que não estão unidas aos glóbulos magnéticos codificados. Em algumas modalidades, o kit compreende uma câmara de formação de imagens, a qual pode ser uma câmara de formação de imagens disponível, para uso em um sistema de formação de imagens.

Os componentes dos kits podem ser acondicionados em meios aquosos ou na forma liofilizada. Os meios de recipientes dos kits geralmente incluirão pelo menos um frasco pequeno, tubo de teste, frasco, garrafa, se-

ringa ou outros meios de recipientes, nos quais um componente pode ser colocado, e de preferência, adequadamente dividido em alíquotas. Onde houver mais do que um componente no kit, o kit também geralmente conterá um segundo, terceiro ou outros recipientes adicionais nos quais os componentes adicionais podem ser separadamente colocados. Entretanto, as diversas combinações de componentes podem estar compreendidas em um frasco pequeno. Os kits da presente invenção também tipicamente incluirão o acondicionamento para conter os diversos recipientes em confinamento rigoroso para a venda comercial. Tal acondicionamento pode incluir o acondicionamento em papelão ou em plástico moldado por injeção ou sopro, no qual os frascos pequenos, as garrafas, etc. desejados são retidos.

Quando os componentes do kit forem proporcionados em uma ou mais soluções líquidas, a solução líquida pode ser uma solução aquosa, com uma solução aquosa estéril sendo particularmente preferida. Entretanto, certos componentes do kit podem ser proporcionados como pó(s) seco(s). Quando os reagentes e/ou os componentes forem proporcionados como um pó seco, o pó pode ser reconstituído pela adição de um solvente adequado. Considera-se que o solvente possa também ser proporcionado em um outro meio de recipiente.

O kit pode também incluir instruções para empregar os componentes do kit. As instruções podem incluir variações que podem ser implementadas.

G. EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar as modalidades preferidas da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que se seguem representam técnicas descobertas pelo inventor que funcionam bem na prática da invenção e, assim, podem ser consideradas constituir os modos preferidos para a sua prática. Entretanto, aqueles versados na técnica devem, considerando a presente descrição, apreciar que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e, ainda, obter-se um resultado semelhante ou similar, sem sair do espírito e do escopo da invenção.

I. Exemplo 1: A Estabilidade das Microesferas Magnéticas Sob as Condições de Ciclagem da PCR

Este estudo demonstra a forte estabilidade das microesferas superparamagnéticas Luminex nas condições de ciclagem da PCR. Ele também demonstra que um amplicon pode ser capturado e detectado em diversos estágios da reação PCR, à medida que a sua concentração aumenta. Este estudo também mostra que um sistema de duas sondas é um projeto viável para a detecção por PCR em tempo real usando microesferas magnéticas. As sondas de hibridização (US 2001/6174670) também utilizam um sistema de duas sondas.

Projeto Experimental: Um sistema de duas sondas foi usado para detectar a geração de um amplicon de gene Fator V enquanto na presença de microesferas magnéticas, que foram acopladas com sondas de nucleotídeos específicas para os alvos. Uma sonda específica para o alvo (Sonda FV Ano) foi unida ao grupo de sondas 22. Esta sonda não estava fluorescentemente marcada. Uma outra sonda foi incluída na mistura, que não estava unida a um grupo de glóbulos, porém era específica para o alvo, e marcada com um fluoroforo Cy3 sobre a extremidade de 3'. Um segundo glóbulo (grupo de glóbulos 27), acoplado a uma sequência de oligonucleotídeos que não é específica para o alvo, foi também adicionado como um controle negativo.

Um coquetel da PCR foi preparado usando os reagentes e as concentrações a seguir.

		1X
(Invitrogen)	10X Tampão	5 µl
(Invitrogen)	dNTP (10mM)	1 µl
(Invitrogen)	$MgCl_2$ (50mM)	8 µl
(IDT DNA)	Primer	1 µl
UCLA #25	Molde genômico	1 µl
(Invitrogen)	Marca de Platina	0,4 µl
(IDT DNA)	Sonda B	0,66 µl
13-60022	Glóbulo 22	3 µl

		1X
13-60027	Glóbulo 27	3 µl
Ambion	H_2O	27,6 µl

Os primers foram usados em concentrações assimétricas otimizadas, onde o primer amplificando a sequência-alvo (FV Rev) estava em uma concentração final de 400 nM, comparado com o primer forward (FV Fwd52), que estava em uma concentração final de 50 nM no coquetel da PCR. A concentração de cloreto de magnésio nesta reação foi otimizada em uma concentração maior do que normalmente seria esperada daqueles versados na técnica. Porque uma câmara de detecção aquecível não estava disponível, um experimento de prova de conceito foi gerado de modo tal que o coquetel da PCR fosse preparado, excluindo o molde genômico. O coquetel foi dividido em 16 volumes iguais de 48 µL cada. O molde genômico foi adicionado a cada uma destas alíquotas e elas foram removidas do termociclador Perkin Elmer 9700 em diferentes números de ciclos da reação PCR. Imediatamente com a remoção das alíquotas do termociclador, e sem nenhuma adição de reagente adicional às reações individuais, as alíquotas foram colocadas sobre um aquecedor separado, a 95°C por 30 segundos, e então a 52°C por 3 minutos. As alíquotas foram então imediatamente analisadas sobre um instrumento Luminex 100 sem quaisquer modificações adicionais. Ambos os grupos de microesferas Luminex Magplex adicionados estavam em uma concentração de aproximadamente 5000 microesferas por reação.

As condições de ciclagem para esta reação eram como a seguir:

Etapa de Desnaturação Térmica; 95°C por 5 min.

Etapas de Ciclagem (para 43 ciclos): 95°C por 30 s, 45°C por 45 s, 72°C por 45 s.

As sequências de oligonucleotídeos usadas neste estudo foram ordenadas a partir de IDT e são como a seguir:

Primers:

FV Rev: TGTTATCACACTGGTGCTAAAAAGG (SEQ ID NO: 1)

FV Fwd 52: ACTACAGTGACGTGG (SEQ ID NO: 2)

Sondas:

Sonda B curta: /3Cy3sp/ATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTA (SEQ ID NO: 3)

Sonda FV Ano: /5AmMC12/TCTGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCT/3InvdT/ (SEQ ID NO: 4)

AT-29: /5AmMC12/AAAGAAAGGATTTGTAGTAAGATT (SEQ ID NO: 5)

A sequência de gene genômica Fator V Leiden (gi:2769646 e gi:488109) é mostrada na figura 13.

O dado na Tabela 1 mostra um aumento no sinal à medida que o número de ciclos na reação PCR aumenta. O dado mostra um aumento no sinal para o grupo de glóbulos específicos (22), e nenhum aumento significativo no sinal para o grupo de glóbulos não específicos (27). O sinal aqui é mostrado como Intensidade Fluorescente Mediana (MFI) a partir do Analisador Luminex. Esta MFI foi obtida por medição do sinal do relator a partir de aproximadamente 100 glóbulos magnéticos individualmente acoplados e cálculo da média.

Tabela 1:

Nº do Ciclo	MFI para o Glóbulo 22	MFI para o Glóbulo 27
0	5	5,5
3	7	4
6	13	8
9	10	10,5
12	11	8
15	7	3
18	11	11,5
21	19	8
24	27	15,5
27	35,5	12
30	45	11
33	48,5	8
36	47	13,5
39	47	16,5
43	47	14

Nº do Ciclo	MFI para o Glóbulo 22	MFI para o Glóbulo 27
43	49	11,5

O dado na Tabela 1 é graficamente representado na figura 14. Conforme pode ser visto na figura 14, o formato da curva a partir do grupo de glóbulos 22 é o formato que se esperaria a partir de uma reação PCR em tempo real típica. Esta curva mostra a linha de base, a exponencial, e as fases de platô indicativas de uma reação PCR.

Os glóbulos foram acoplados às sondas de captura usando o seguinte protocolo:

1. Levar uma alíquota nova de pó EDC daPierce secado, a -20°C, para a temperatura ambiente.

2. Suspender novamente o oligonucleotídeo substituído com amina ("sonda" ou oligo de "captura") até 1 mM (1 nanomol/μL) em dH_2O.

3. Suspender novamente as microesferas Luminex não acopladas, de estoque, de acordo com as instruções descritas na Folha de Informação de Produto fornecida com as microesferas.

4. Transferir 5,0 x 10^6 das microesferas de estoque para um tubo de microcentrífuga USA Scientific.

5. Transformar as microesferas de estoque em precipitado por microcentrifugação a ≥ 8000 x g por 1-2 minutos.

6. Remover o sobrenadante e suspender novamente as microesferas transformadas em precipitado em 50 μL de MES a 0,1 M, pH 4,5, por redemoinho e sonicação por aproximadamente 20 segundos.

7. Preparar uma diluição a 1:10 do oligo de captura a 1 mM em dH_2O (0,1 nanomol/μL).

8. Adicionar 2 μL (0,2 nanomol) do oligo de captura diluído a 1:10 às microesferas suspensas novamente e misturar por redemoinho.

9. Preparar uma solução nova de 10 mg/mL de EDC em dH2O. (Observação: Retornar o pó EDC ao dessecativo para reutilizar para a segunda adição de EDC.)

10. Uma por uma para cada reação de acoplamento, adicionar 2,5 μL de EDC a 10 mg/mL novo às microesferas (25 μg ou ≅ $[0,5\ \mu g/\mu L]_{final}$)

e misturar por redemoinho.

11. Incubar por 30 minutos na temperatura ambiente no escuro.

12. Preparar uma segunda solução nova de 10 mg/mL de EDC em dH_2O. (Observação: A alíquota de pó EDC deve agora ser descartada.)

13. Uma por uma para cada reação de acoplamento, adicionar 2,5 μL de EDC a 10 mg/mL novo às microesferas e misturar por redemoinho.

14. Incubar por 30 minutos na temperatura ambiente, no escuro.

15. Adicionar 1,0 mL de Tween-20 a 0,02% às microesferas acopladas.

16. Transformar as microesferas acopladas em precipitado por microcentrifugação a ≥ 8000 x g por 1-2 minutos.

17. Remover o sobrenadante e suspender novamente as microesferas acopladas em 1,0 mL de SDS a 0,1% por redemoinho.

18. Transformar as microesferas acopladas em precipitado por microcentrifugação a ≥ 8000 x g por 1-2 minutos.

19. Remover o sobrenadante e suspender novamente as microesferas acopladas em 100 μL de TE, pH 8,0, por redemoinho e sonicação, por aproximadamente 20 segundos.

20. Enumerar as microesferas acopladas por hemacitômetro:

a. Diluir as microesferas acopladas, suspensas novamente, a 1:100 em dH_2O.

b. Misturar completamente por redemoinho.

c. Transferir 10 μL para o hemacitômetro.

d. Contar as microesferas dentro dos 4 cantos grandes da grade do hemacitômetro.

e. Microesferas/μL - (Soma das microesferas nos 4 cantos grandes) x 2,5 x 100 (fator de diluição).

f. Observação: o máximo é 50.000 microesferas/μL.

21. Armazenar as microesferas acopladas, refrigeradas a 2-8°C, no escuro.

2. Exemplo 2: Detecção da amplificação usando Primers com Marcas

O exemplo a seguir demonstra que pode ser medido um sinal de

amplificação do ácido nucleico em tempo real usando o método do primer com marca. Este exemplo também demonstra que estas medições podem ser efetuadas usando um sistema de formação de imagens que compreende uma câmara de formação de imagens de quartzo e um imã, que pode ser movido adjacente à câmara de formação de imagens de quartzo para atrair magneticamente as partículas superparamagnéticas para uma superfície bidimensional da câmara, oposta a um detector de dispositivo de cargas acopladas (CCD) (ver, por exemplo, as figuras 1 e 2), na presença da, e sem modificação na, solução da Reação em Cadeia por Polimerase, e que as suas medições são comparáveis ao sistema Luminex 200. O sistema de formação de imagens que compreende a câmara de quartzo e o imã pode ser considerado um sistema de formação de imagens "estática", visto que o detector obtém uma imagem das partículas e de quaisquer moléculas ligadas a elas enquanto elas estão imobilizadas sobre a superfície da câmara pelo campo magnético. Em contraste, o sistema Luminex 200 pode ser considerado um sistema de "fluxo", visto que as partículas não estão imobilizadas durante a detecção.

Projeto Experimental:

Neste projeto, dois primers foram usados, onde um dos primers foi modificado com um fluoroforo Cy3 em sua extremidade de 5'. O outro primer foi modificado com um espaçador Carbon18 posicionado entre a região específica para o alvo e uma sequência de marca complementar a uma sequência de sonda específica (antimarca) unida a uma microesfera superparamagnética. Neste caso, o primer LUA-MEU tinha uma sequência de marca sobre o lado 5' do espaçador C18 (iSp18 - IDT) que era complementar à sequência de sonda *Bead ME tf* que estava acoplada ao grupo de glóbulos 43. Neste estudo, os grupos de primers foram projetados para amplificar uma região da sequência de gene MTHFR Exon 7. Dois grupos de microesferas Luminex MagPlex (Grupos de glóbulos) foram incluídos no coquetel da PCR, durante a reação PCR. A sonda unida ao Grupo de glóbulos 43 era complementar à sequência de marca em 5' sobre o primer LUA-MEU-TF, enquanto a sonda acoplada ao Grupo de glóbulos 12 não era comple-

mentar à sequência de marca do primer nesta reação e, desse modo, serviu como um controle negativo. Ambos os grupos de microesferas Luminex Magplex adicionados estavam em uma concentração de aproximadamente 5000 microesferas por reação.

Um coquetel da PCR foi preparado usando as concentrações e os reagentes a seguir:

	1x vol. µL	
Mistura Máster	25	Mistura Máster HotStar TAQ Plus 2X, Qiagen
H_2O	21	RNASE SEM Água, Qiagen
Primer	1	IDT
Molde	1	Amostra de DNA Humano Purificado da UCLA
Glóbulos	2	Microesferas Luminex Magplex
total	50	

As condições de ciclagem para esta reação eram como se segue:

Etapa de Desnaturação Térmica: 95°C por 5 min.

Etapas de Ciclagem (para 36 ciclos): 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 30 s.

As sequências de oligonucleotídeos usadas neste experimento foram ordenadas a partir de IDT e eram como se segue:

Primers:

LUA-MEU-TF:

CAAACAAACATTCAAATATCA-

ATC/iSp18/CAAGGAGGAGCTGCTGAAGATG (SEQ ID NO: 16)

LUA-MED-TF:

/5Cy3/CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG (SEQ ID NO: 17)

Sondas:

Grupo de Glóbulos 43: Glóbulo ME tf:

/5AmMC12/GATTGATATTTGAATGTTTGTTTG (SEQ ID NO: 18)

Grupo de Glóbulos 12: W12822:

/5AmMC12/ CAA CAG TGG AGG AAA GCC/3InvdT/ (SEQ ID NO: 19)

Sequência-alvo:

MTHFR Exon 7 (MRE7) [gi:17444393] 112 bp
GGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGGAGGAGCTCACCAGTGAAG[A]AA
GTGTCTTTGAAGTCTTTGTTCTTCCTCCTCGACGACTTCTACACCCCCCT
CCTCGAGTGGTCACTTC[T]TTCACAGAAACTTCAGAAACAAGAATACCTCT
CGGGAGAACCAAACCGGAATGGTCACAAAGTGA (SEQ ID NO: 20)

Neste experimento, as concentrações dos primers e as concentrações de Cloreto de Magnésio não necessitaram ser otimizadas. Isto foi devido à natureza do projeto dos primers de amplificação, onde o produto amplificado contém uma projeção de fita simples correspondendo à sequência de marca. O espaçador C18 bloqueia a extensão pela polimerase, de modo tal que a sequência de marca complementar à sonda sobre o grupo de glóbulos 43 não possa servir como um molde para a síntese da segunda fita. Desse modo, a sequência de marca de fita simples sobre a extremidade de 5' do produto de amplificação foi capaz de hibridizar com a sonda, sem competição de uma fita complementar reversa, conforme ocorre no modelo de hibridização direta.

Neste estudo foi preparado um coquetel da PCR, sem o molde, para ser um volume mais do que suficiente a ser dividido em alíquotas para 32 tubos de PCR separados, em um volume de 50 uL cada. Este coquetel da PCR incluiu os dois grupos de microesferas Luminex MagPlex. Uma vez misturadas e divididas em alíquotas, 16 das reações PCR foram misturadas com o DNA genômico, e 16 tubos foram mantidos como reações sem moldes (nt) para servir como controles negativos da PCR. 8 amostras positivas e 8 amostras negativas foram analisadas usando o instrumento Luminex LX200. Adicionalmente, 8 amostras positivas e 8 negativas foram analisadas usando o instrumento de formação de imagens "estática" descrito acima. Em cada caso de um grupo de 8 amostras, cada amostra foi removida do termociclador em diversos estágios da reação PCR. Estas amostras foram removidas do termociclador nos seguintes ciclos: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35. As reações foram armazenadas temporariamente na temperatura ambiente, no escuro, até que a ciclagem térmica fosse completada.

Então as amostras foram colocadas sobre um aquecedor a

95°C, por 1 minuto, seguido por 10 minutos a 37°C.

As amostras foram também corridas sobre um Gel do Sistema Reliant Gel, Nº do Cat. 54929, para checar a especificidade da amplificação.

Os dados obtidos a partir do instrumento de formação de imagens "estática" estão incluídos na Tabela 2:

Tabela 2

	Regiões dos Glóbulos					
	43	12	43	12		
	Contagem	Contagem	RP1 Mediano	RP1 Mediano	Poço	Ciclos
Reações Sem Moldes	111	177	234	232	A-1	0
	196	130	239	237	B-1	5
	150	109	229	225	C-1	10
	177	135	233	235	D-1	15
	194	123	248	248	E-1	20
	181	128	251	246	F-1	25
	207	125	245	250	G-1	30
	161	129	254	253	H-1	35
DNA genômico adicionado	201	115	241	239	A-2	0
	160	112	242	239	B-2	5
	173	117	245	245	C-2	10
	162	89	244	242	D-2	15
	164	114	241	242	E-2	20
	175	138	246	243	F-2	25
	199	124	265	228	G-2	30
	167	118	306	223	H-2	35

Para o instrumento de formação de imagens "estática", cada amostra foi distribuída para a câmara de formação de imagens de quartzo e os glóbulos magnéticos codificados foram atraídos para a parte de trás da câmara e mantidos no local durante a análise. Este dado mostra os valores medianos representativos a partir dos comprimentos de ondas do relator.

Ambos os grupos de glóbulos foram capazes de classificar usando os comprimentos de ondas de classificação sem nenhum problema. Observem o aumento no sinal nos ciclos 30 e 35 a partir do grupo de glóbulos 43. Este aumento no sinal é correlativo com os dados do gel em relação ao tamanho e à intensidade da amplificação.

Dados obtidos do Instrumento Luminex 200 (Tabela 3) usando uma definição da amostra idêntica às amostras que foram analisadas sobre o instrumento de formação de imagens "estática" (Tabela 2).

Tabela 3

Tipo de Dados: Mediano

	Posição	Ciclos	Glóbulo 12 mediano	Glóbulo 43 mediano	Eventos Totais
Reações Sem Moldes	1(1,A1)	0	5	4	253
	2(1,B1)	5	0	6,5	230
	3(1,C1)	10	3,5	6	243
	4(1,D1)	15	5	3,5	212
	5(1,E1)	20	3	4	233
	6(1,F1)	25	0	2	245
	7(1,G1)	30	5,5	8	261
	8(1,H1)	35	4,5	0	268
DNA genômico adicionado	9(1,A2)	0	4	4,5	240
	10(1,B2)	5	4,5	4	239
	11(1,C2)	10	5	5	218
	12(1,D2)	15	6,5	7	217
	13(1,E2)	20	4,5	0	239
	14(1,F2)	25	6,5	7	228
	15(1,G2)	30	0,5	26	232
	16(1,H2)	35	4	51	224

Os dados correlacionam-se com os dados a partir do gel em relação ao tamanho e à intensidade da amplificação. Foi também mostrado um padrão similar de aumento do sinal usando o formato de sistema de forma-

ção de imagens "estática".

3. Exemplo 3: Multíplex de 8

Neste exemplo, o método de Hibridização Direta foi usado com 8 grupos de primers e 14 grupos de glóbulos. Um excesso de grupos de glóbulos foi usado para mostrar que os produtos de amplificação não hibridizam de modo não específico com os grupos de glóbulos contendo sondas não relacionadas.

Foi preparado um coquetel da PCR incluindo os seguintes reagentes:

Tabela 4

		1x vol.µL	45
Hotstart plus 2x, Qiagen	Mistura Máster	25	1125
H_2O sem nuclease da Ambion	H_2O	17	765
8 plex ordenados de IDT	Primer	1	45
Amostra Coriell 13033	Molde	1	45
Microesferas Luminex MagPlex	Glóbulos	3	135
$MgCl_2$ a 50mM, Qiagen		3	135
	total	50	2250

Este coquetel, incluindo as microesferas Luminex MagPlex com as sequências de sondas unidas a elas, foi dividido em alíquotas para 40 tubos PCR a 50 µL cada. Então 20 das reações tiveram aproximadamente 100 ng de DNA genômico adicionados a elas. Estas reações passaram por ciclos sobre um termociclador iCycler da BioRad. Os primers foram projetados para amplificar regiões específicas do gene CFTR de fibrose cística. As sequências dos primers para cada um dos 8 grupos de primers usados para esta reação estão incluídas na Tabela 5, incluindo as concentrações finais em cada reação de 50 µL.

Tabela 5: Composições dos Primers

Grupo	Nome	modificação	sequência	escala	bp	purificação	Conc. Final (nM)
1	E20U	Nenhuma	TTG AGA CTA CTG AAC ACT GAA GG	100 nmol	23	dessalinizar	75

Grupo	Nome	modificação	sequência	escala	bp	purificação	Conc. Final (nM)
			(SEQ ID NO: 21)				
1	CE20D	/5Cy3/	TTC TGG CTA AGT CCT TTT GC (SEQ ID NO: 22)	100 nmol	20	HPLC	125
2	E11U	Nenhuma	TCA GAT TGA GCA TAC TAA AAG TGA C (SEQ ID NO: 23)	100 nmol	25	dessalinizar	75
2	CE11D	/5Cy3/	GAA CTA TAT TGT CTT TCT CTG CAA AC (SEQ ID NO: 24)	100 nmol	26	HPLC	125
3	E11U2	Nenhuma	AAG TTT GCA GAG AAA GAC AAT ATA G (SEQ ID NO: 25)	100 nmol	25	dessalinizar	100
3	CE11D2	/5Cy3/	GAA TGA CAT TTA CAG CAA ATG C (SEQ ID NO: 26)	100 nmol	22	HPLC	200
4	E4U	Nenhuma	TTT GTA GGA AGT CAC CAA AGC (SEQ ID NO: 27)	100 nmol	21	dessalinizar	75
4	CE4D	/5Cy3/	GAG CAG TGT CCT CAC AAT AAA GAG (SEQ ID NO: 28)	100 nmol	24	HPLC	125
5	CE21U	/5Cy3/	TGC TAT AGA AAG TAT TTA TTT TTT CTG G (SEQ ID NO: 29)	100 nmol	28	HPLC	125
5	E21D	Nenhuma	AGC CTT ACC TCA TCT GCA AC (SEQ ID NO: 30)	100 nmol	20	dessalinizar	75
6	CE7U	/5Cy3/	GAA CAG AAC TGA AAC TGA CTC G (SEQ ID NO: 31)	100 nmol	22	HPLC	200
6	E7D3	Nenhuma	CAG GGA AAT TGC CGA GTG (SEQ ID NO: 32)	100 nmol	18	dessalinizar	100
7	CC7U	/5Cy3/	GAC TTG TCA TCT TGA TTT CTG G (SEQ ID NO: 33)	100 nmol	22	HPLC	125
7	C7D	Nenhuma	TTT GGT GCT AGC TGT AAT TGC (SEQ ID NO: 34)	100 nmol	21	dessalinizar	75

Grupo	Nome	modificação	sequência	escala	bp	purificação	Conc. Final (nM)
8	BE9U	/5Cy3/	TCA CTT CTT GGT ACT CCT GTC C (SEQ ID NO: 35)	100 nmol	22	HPLC	125
8	E9D	Nenhuma	CAA AAG AAC TAC CTT GCC TGC (SEQ ID NO: 36)	100 nmol	21	dessalinizar	75

As condições de ciclagem para esta reação foram como se seguem:

Etapa de Desnaturação Térmica: 95°C por 10 min.

Etapas de Ciclagem (para 36 ciclos): 94°C por 30 s, 56°C por 90 s, 72°C por 90 s.

Foram removidas amostras individuais da PCR em diversos ciclos durante a reação PCR. Estes tubos foram removidos durante a etapa a 56°C em seus números de ciclos respectivos. Ambas as amostras "sem molde" e "positivas de moldes" foram removidas simultaneamente nos seguintes números de ciclos: 5, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 30, 36, e 36 novamente. Estas amostras que foram removidas do termociclador foram armazenadas no escuro, na temperatura ambiente, até o término de todos os 36 ciclos. Sem nenhuma modificação adicional nas amostras em relação à adição de reagentes, estas amostras foram aquecidas para 95°C por 1 minuto, e então incubadas a 44°C por 15 minutos e então analisadas sobre um instrumento Luminex 200 e sobre um sistema de formação de imagens "estática", conforme descrito acima. Embora uma câmara de detecção aquecível não estivesse disponível na hora, o projeto deste experimento mostra que é possível efetuar esta reação em tempo real, se os procedimentos gerais descritos neste documento forem adaptados à análise em uma câmara de detecção capaz de ciclagem térmica.

Os grupos de glóbulos usados nas reações e as sondas que foram acopladas a eles estão contidos na Tabela 6.

Tabela 6:

Grupo de Glóbulos	Nome	Modificação	Sequência	Escala	bp	Purificação	Grupo-Alvo de Primers
12	W12822	/5AmMC12/ /3InvdT/	CAA CAG TGG AGG AAA GCC (SEQ ID NO: 37)	100 nmol	18	dessalinizar	1
19	G1717	/5AmMC12/ /3InvdT/	TTG GTA ATA GGA CAT CTC CA (SEQ ID NO: 38)	100 nmol	20	dessalinizar	2
18	R560	/5AmMC12/ /3InvdT/	CTT TAG CAA GGT GAA TAA CT (SEQ ID NO: 39)	100 nmol	20	dessalinizar	3
20	R117	/5AmMC12/ /3InvdT/	AGG AGG AAC GCT CTA TCG CG (SEQ ID NO: 40)	100 nmol	20	dessalinizar	4
22	N1303	/5AmMC12/ /3InvdT/	GGG ATC CAA GTT TTT TCT AA (SEQ ID NO: 41)	100 nmol	20	dessalinizar	5
25	1078T2	/5AmMC12/ /3InvdT/	CAC CAC AAA GAA CCC TGA (SEQ ID NO: 42)	100 nmol	18	dessalinizar	6
36	A455	/5AmMC12/ /3InvdT/	CCA GCA ACC GCC AAC AAC TG (SEQ ID NO: 43)	100 nmol	20	dessalinizar	8
38	3659C2	/5AmMC12/ /3InvdT/	TTG ACT TGG TAG GTT TAC (SEQ ID NO: 44)	100 nmol	18	dessalinizar	nenhum
35	G278952	/5AmMC12/ /3InvdT/	TGG AAA GTG AGT ATT CCA TGT C (SEQ ID NO: 45)	100 nmol	22	dessalinizar	nenhum
37	2184A7	/5AmMC12/ /3InvdT/	GAA ACA AAA AAA CAA TC (SEQ ID NO: 46)	100 nmol	17	dessalinizar	nenhum
39	G18982	/5AmMC12/ /3InvdT/	TAT TTG AAA GGT ATG TTC TTT G (SEQ ID NO: 47)	100 nmol	22	dessalinizar	nenhum
42	G31202	/5AmMC12/ /3InvdT/	CTT CAT CCA GGT ATG TAA AAA T (SEQ ID NO: 48)	100 nmol	22	dessalinizar	nenhum
44	G85	/5AmMC12/ /3InvdT/	ATT TGA TGA AGT ATG TAC CTA T (SEQ ID NO: 49)	100 nmol	22	dessalinizar	nenhum
43	C3849	/5AmMC12/ /3InvdT/	GTC TTA CTC GCC ATT TTA AT (SEQ ID NO: 50)	100 nmol	20	dessalinizar	7

As sequências de genes de Fibrose Cística (SEQ ID NO: 8-15) usadas neste experimento são dadas na figura 15. Os resultados a partir da reação foram confirmados por análise sobre um gel.

O dado foi coletado usando um instrumento Luminex 200, enquanto a 44°C. O dado coletado é representado na Tabela 7. Todas as amostras positivas de moldes, cujos valores são distinguíveis do ruído, estão sombreadas na Tabela 7. Podem ser usadas técnicas adicionais de otimização, conhecidas para aqueles versados na técnica, para modificar as condições de reação e melhorar adicionalmente a razão de sinal para ruído. Os grupos de glóbulos cujos valores de MFI eram esperados serem específicos para o alvo para o amplicon elevaram-se acima do ruído concernente a parte final da reação. Os grupos de glóbulos cujas sondas eram esperadas serem não específicas ou negativas não se elevaram.

Tabela 7

Amostra	Analito 12	Analito 18	Analito 19	Analito 20	Analito 22	Analito 25	Analito 35	Analito 36	Analito 37	Analito 38	Analito 39	Analito 42	Analito 43	Analito 44	Evento Total
Branca	6	0	2	4	2	3	3	2	2	2	4	1	3	3	148
5-	30	22,5	28	18	25	22	28,5	27	26	18	27	26	31	29	1892
5+	30	34	44	17	34	27	38	43	24,5	39,5	39	33	29,5	37	2012
8-	30	16	17	20	13	21	23	15	25,5	27	29,5	22	24	19,5	2069
8+	30,5	29,5	29,5	34	25,5	25	31	31	25	42	36,5	31	24	27	1905
12-	20	13,5	5	16	21,5	16,5	15	14	18	32,5	21	9,5	7	22	1747
12+	46	29	21	24	34	47	28,5	20	33,5	61,5	22	41	21	37	2023
16-	64	39	19	27,5	55	29	27	58	41,5	62,5	68	37,5	36	46	1734
16+	52	47	45	21	34	39,5	48	28,5	39,5	48	49,5	49	45	34	2256
20-	32	18,5	33	45,5	24	23,5	26	27,5	31,5	27	20	28,5	33	35,5	1832
20+	50	37	32	44	47,5	38	24,5	40	34	63	64	36	31,5	56,5	1806
24-	43	35	39,5	32,5	29	33	46,5	32	24	27	33,5	26	20	33	1789
24+	56	34,5	27	41	34	25,5	14	54	19	14	21,5	14	19	14	1852
28-	23	40,5	30	29,5	16,5	19	21	42,5	0	15	25	15	17	24,5	2026
28+	78	101,5	72	66,5	54	78	20	134	19	21	31,5	17	37	26,5	1938
30-	46	23,5	40	23	35	25,5	29	34	6,5	17,5	34	18,5	10,5	29	1867
30+	102	120	82	77	107	84	28	140	25,5	59,5	48	51,5	47,5	46	1838
32-	13	13	24,5	17	20,5	19,5	14	28	23	20	10,5	25	14	20,5	1673
32+	158	119	116	18,5	115	87	35	189	26	43	33	49	89	36	1844
36-	48,5	18,5	31	24	17,5	34	33	33	20	44	34	41	16	32,5	1757
36+	184	120	120	109,5	153	83	54	230	31,5	36	65,5	49	94	43	1790

O dado foi coletado usando o sistema de formação de imagens "estática", enquanto a 44°C. O dado líquido coletado usando o sistema de formação de imagens "estática" é representado na Tabela 8. Todas as amostras positivas cujos valores são distinguíveis do ruído estão destacadas na Tabela 8. O dado bruto a partir do sistema de formação de imagens "estática" que foi usado para criar a Tabela 8 é representado na Tabela 9. A Tabela 8 foi calculada obtendo-se a MFI média a partir de pontos de dados de todos os grupos de glóbulos com amostras negativas de moldes para todos os ciclos e subtraindo-se esta média de todos os pontos de dados. No caso onde a soma resultante deste cálculo foi negativa, todos os números negativos foram convertidos em zero. Alguns dos números de ciclos menores continham resultados falsos, que podem ser considerados valores atípicos.

Tabela 8

		Grupos de Glóbulos													
		12	18	19	20	22	25	35	36	37	38	39	42	43	44
Ciclo	pos/neg	RP1 Líquido Mediano													
36	-	0	0	0	0	0	0	0	5	5	2	12	0	0	0
36	+	169	121	121	138	123	78	24	214	16	28	17	16	91	17
36	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	+	214	152	146	133	158	107	39	263	28	42	27	38	109	12
30	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	+	126	164	80	74	130	72	11	206	34	22	25	9	26	11
28	-	0	0	8	0	4	9	29	14	25	22	21	4	16	17
28	+	74	143	40	54	88	66	0	161	13	4	12	17	40	8
24	-	13	34	28	23	34	19	34	41	35	57	33	39	21	33
24	+	93	71	71	63	45	78	54	125	49	74	55	71	53	60
20	-	38	30	52	66	53	62	77	76	56	89	58	64	59	54
20	+	48	53	69	32	28	42	59	71	62	62	82	65	33	57
16	-	9	0	9	0	0	0	7	9	29	11	27	7	9	4
16	+	0	0	4	0	1	0	0	10	26	16	9	12	12	19
12	-	11	7	2	6	0	0	0	7	0	19	23	17	0	15
12	+	36	50	54	61	49	59	57	71	77	67	102	103	92	85
8	-	16	35	51	54	26	29	22	44	38	34	32	32	33	37
8	+	38	46	58	39	51	33	47	46	81	63	69	47	50	54
5	-	16	44	35	34	26	27	49	39	74	78	56	53	50	57
5	+	8	32	23	17	0	8	33	29	25	30	34	22	28	23

O dado bruto a partir do sistema de formação de imagens "estática" que foi usado para criar a Tabela 8 é representado na Tabela 9.

Tabela 9

		Grupos de Glóbulos													
		12	18	19	20	22	25	35	36	37	38	39	42	43	44
Ciclo	pos/neg	RP1 Líquido Mediano													
36	+	562	514	514	531	516	471	417	607	409	421	410	409	484	410
36	-	387	376	392	377	368	375	364	398	398	395	405	373	377	388
36	-	230	241	221	238	230	224	233	232	241	232	222	226	229	237
36	+	607	545	539	526	551	500	432	656	421	435	420	431	502	405
30	-	361	358	368	375	370	362	383	371	367	392	382	385	366	389
30	+	519	547	473	467	523	465	404	599	427	415	418	402	419	404
28	-	389	388	401	381	397	402	422	407	418	415	414	397	409	410
28	+	467	536	433	447	481	459	380	554	406	397	405	410	433	401
24	-	406	427	421	416	427	412	427	434	428	450	426	432	414	426
24	+	486	464	464	456	438	471	447	518	442	467	448	464	446	453
20	-	431	423	445	459	446	455	470	469	449	482	451	457	452	447
20	+	441	446	462	425	421	435	452	464	455	455	475	458	426	450
16	-	402	392	402	392	387	373	400	402	422	404	420	400	402	397
16	+	381	383	397	383	394	388	389	403	419	409	402	405	405	412
12	-	404	400	395	399	388	380	384	400	388	412	416	410	387	408
12	+	429	443	447	454	442	452	450	464	470	460	495	496	485	478
8	-	409	428	444	447	419	422	415	437	431	427	425	425	426	430
8	+	431	439	451	432	444	426	440	439	474	456	462	440	443	447
5	-	409	437	428	427	419	420	442	432	467	471	449	446	443	450
5	+	401	425	416	410	387	401	426	422	418	423	427	415	421	416

Todas as composições e métodos descritos e reivindicados neste documento podem ser preparados e executados, sem experimentação indevida, considerando a presente descrição. Embora as composições e os métodos desta invenção tenham sido descritos em termos de certas modalidades, será aparente para aqueles versados na técnica que podem ser aplicadas variações às composições e aos métodos e nas etapas ou na sequência de etapas dos métodos descritos neste documento, sem sair do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será aparente que certos agentes que sejam tanto química quanto fisiologicamente relacionados podem substituir os agentes descritos neste documento, enquanto que resultados iguais ou similares seriam atingidos. Todos os substitutos e modificações similares, aparentes para aqueles versados na técnica, são considerados estarem dentro do espírito, escopo e conceito da invenção, conforme definida pelas reivindicações em anexo.

REFERÊNCIAS

As referências a seguir, na medida em que elas proporcionem detalhes de procedimentos ilustrativos, ou outros detalhes suplementares àqueles descritos neste documento, são especificamente incorporadas aqui por referência.

Patente U.S. 4.942.124
Patente U.S. 4.996.143
Patente U.S. 5.210.015
Patente U.S. 5.432.272
Patente U.S. 5.436.134
Patente U.S. 5.487.972
Patente U.S. 5.525.494
Patente U.S. 5.532.129
Patente U.S. 5.538.848
Patente U.S. 5.539.082
Patente U.S. 5.565.322
Patente U.S. 5.654.413
Patente U.S. 5.656.493

Patente U.S. 5.658.751
Patente U.S. 5.665.539
Patente U.S. 5.714.331
Patente U.S. 5.716.784
Patente U.S. 5.719.262
Patente U.S. 5.736.330
Patente U.S. 5.736.336
Patente U.S. 5.766.855
Patente U.S. 5.773.571
Patente U.S. 5.786.461
Patente U.S. 5.866.336
Patente U.S. 5.891.625
Patente U.S. 5.908.845
Patente U.S. 5.925.517
Patente U.S. 5.981.180
Patente U.S. 5.994.056
Patente U.S. 6.030.787
Patente U.S. 6.046.807
Patente U.S. 6.057.107
Patente U.S. 6.103.463
Patente U.S. 6.139.800
Patente U.S. 6.174.670
Patente U.S. 6.268.222
Patente U.S. 6.322.971
Patente U.S. 6.366.354
Patente U.S. 6.411.904
Patente U.S. 6.449.562
Patente U.S. 6.514.295
Patente U.S. 6.524.793
Patente U.S. 6.528.165
Patente U.S. 6.592.822
Patente U.S. 6.635.427

Patente U.S. 6.939.720

Patente U.S. 7.205.105

Patente U.S. 7.226.737

Publicação de Patente U.S. 2000/6103476

Publicação de Patente U.S. 2000/6140054

Publicação de Patente U.S. 2000/6140496

Publicação de Patente U.S. 2000/6150097

Publicação de Patente U.S. 2001/6171785

Publicação de Patente U.S. 2001/6174670

Publicação de Patente U.S. 2001/6174670

Publicação de Patente U.S. 2001/6270967

Publicação de Patente U.S. 2003/6569627

Publicação de Patente U.S. 2003/6617106

Publicação de Patente U.S. 2005/0164219

Publicação de Patente U.S. 2005/0191625

Publicação de Patente U.S. 2005/0233335

Publicação de Patente U.S. 2006/0019253

Publicação de Patente U.S. 2006/0211028

Publicação de Patente U.S. 2006/0211028

Publicação de Patente U.S. 2007/0020672

Publicação de Patente U.S. 2007/7205105

Patente U.S. Série 11/270.786

Patente U.S. Série 11/534.166

Bengtsson e col., *Nucleic Acids Res.*, 31:e45, 2003.

Bernard e col., *Am. J. Pathol.*, 153:1055– 1061, 1998.

Bernard e col., *Anal. Biochem.*, 255:101–107, 1998.

Bustin e col., *J. Biomol. Tech.*, 15:155-166, 2004.

Bustin, *J. Mol. Endocrinol.*, 29(1):23–39, 2002.

Cardullo e col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8790-8804, 1988.

Chen e col., *J. Virol. Methods*, 122(1):57-61, 2004.

Dorak, Em: *Real-time PCR*, Bios Advanced Methods, 1ª Ed., Taylor e Francis, 2006.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra compreendendo:

(a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, um agente de marcação, e uma primeira pluralidade de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada;

(b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação marcados para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers;

(c) hibridizar os produtos de amplificação marcados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados;

(d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação marcados hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara;

(e) detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir dos produtos de amplificação marcados;

(f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e

(g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

onde a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, adicionalmente compreendendo correlacionar o sinal a partir do produto de amplificação marcado com a concentração do alvo de ácido nucleico na amostra.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a pluralidade de pares de primers é adicionalmente definida como entre 8 a 500 pares

de primers distintos.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente de marcação é unido a um primer de cada um dos pares de primers.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a câmara é uma câmara de quartzo.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente de marcação é um corante fluorescente.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente de marcação é um par de transferência de energia de ressonância de fluorescência.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, adicionalmente compreendendo combinar na câmara uma segunda pluralidade de sondas complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, em que a segunda pluralidade de sondas não está imobilizada sobre a pluralidade de glóbulos magnéticos codificados e adicionalmente onde a segunda pluralidade de sondas é complementar a diferentes regiões sobre a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos do que a primeira pluralidade de sondas.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que um membro de um par de transferência de energia de ressonância de fluorescência está unido à primeira pluralidade de sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados e o outro membro do par de transferência de energia de ressonância de fluorescência está unido à segunda pluralidade de sondas que não estão imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente de marcação é um par de fluoroforo e repressor.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente de marcação é um agente de intercalação de DNA.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os glóbulos magnéticos codificados são codificados com corantes fluorescentes.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, onde os glóbulos magnéticos codificados são codificados com diferentes intensidades fluorescentes.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, em que os glóbulos magnéticos codificados são codificados com diferentes comprimentos de ondas de emissão fluorescentes.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os glóbulos magnéticos codificados são superparamagnéticos.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a aplicação do campo magnético compreende colocar um ímã permanente adjacente à superfície da câmara.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a aplicação do campo magnético compreende ativar um eletroímã adjacente à superfície da câmara.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o campo magnético é aplicado durante uma fase de anelamento de primer do ciclo de amplificação.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o campo magnético é aplicado durante uma fase de extensão de primer do ciclo de amplificação.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o campo magnético é aplicado após o ciclo de amplificação.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a detecção dos glóbulos magnéticos codificados e dos produtos de amplificação marcados compreende formar uma imagem dos comprimentos de ondas fluorescentes emitidos a partir dos glóbulos magnéticos codificados e dos produtos de amplificação marcados.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a remoção do campo magnético compreende remover um ímã permanente de uma posição adjacente à superfície da câmara.

23. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a remoção do campo magnético compreende desativar um eletroímã adjacente à superfície da câmara.

24. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as etapas (b) até (f) são repetidas entre 10 e 40 vezes.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a pluralidade de sondas compreende um grupo hidroxila em 3' bloqueado.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o grupo hidroxila em 3' é bloqueado com um grupo fosfato.

27. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o grupo hidroxila em 3' é bloqueado com um dT invertido em 3'.

28. Método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra, compreendendo:

(a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de marcas moleculares complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, em que as marcas moleculares são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada marca molecular seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada;

(b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers;

(c) hibridizar os produtos de amplificação com as marcas moleculares imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados;

(d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as marcas moleculares imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara;

(e) detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir das marcas moleculares;

(f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e

(g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

onde a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada.

29. Método de amplificar e detectar um alvo de ácido nucleico em uma amostra, compreendendo:

(a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo o alvo de ácido nucleico, um par de primers para iniciar a amplificação do alvo de ácido nucleico, e um grupo de sondas complementar ao alvo de ácido nucleico, em que o grupo de sondas compreende uma primeira sonda imobilizada sobre um glóbulo magnético, e uma segunda sonda compreendendo uma marca;

(b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para o alvo de ácido nucleico amplificado com o par de primers;

(c) hibridizar os produtos de amplificação com o grupo de sondas;

(d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair o glóbulo magnético e os produtos de amplificação hibridizados com a sonda imobilizada sobre o glóbulo magnético codificado para a superfície da câmara;

(e) detectar um sinal a partir da segunda sonda hibridizada com os produtos de amplificação;

(f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e

(g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

onde o alvo de ácido nucleico na amostra é amplificado e detectado.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o glóbulo magnético é um glóbulo magnético codificado.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, adicionalmente definido como um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, compreendendo:

(a) combinar na câmara uma amostra compreendendo uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, e uma pluralidade de grupos de sondas complementar à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, em que cada grupo de sondas compreende uma primei-

ra sonda imobilizada sobre um glóbulo magnético codificado de modo tal que a identidade da primeira sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada, e uma segunda sonda compreendendo uma marca;

(b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers;

(c) hibridizar os produtos de amplificação com os grupos de sondas;

(d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara;

(e) detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir da segunda sonda hibridizada com os produtos de amplificação;

(f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e

(g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

onde a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada.

32. Método de amplificar e detectar um alvo de ácido nucleico em uma amostra, compreendendo:

(a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo o alvo de ácido nucleico, um par de primers para iniciar a amplificação do alvo de ácido nucleico, um dNTP acoplado a uma molécula repressora, e uma sonda fluorescentemente marcada, complementar ao alvo de ácido nucleico, onde a sonda está imobilizada sobre um glóbulo magnético;

(b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação do alvo de ácido nucleico, os produtos de amplificação compreendendo moléculas repressoras;

(c) hibridizar os produtos de amplificação com a sonda imobili-

zada sobre o glóbulo magnético;

(d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair o glóbulo magnético e os produtos de amplificação hibridizados com a sonda imobilizada sobre o glóbulo magnético codificado para a superfície da câmara;

(e) detectar um sinal a partir da sonda marcada, onde uma diminuição no sinal a partir da sonda marcada indica a hibridização da sonda marcada com os produtos de amplificação compreendendo as moléculas repressoras;

(f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e

(g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

em que o alvo de ácido nucleico na amostra é amplificado e detectado.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, em que o glóbulo magnético é um glóbulo magnético codificado.

34. Método de acordo com a reivindicação 32, adicionalmente definido como um método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, compreendendo:

(a) combinar na câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, um dNTP acoplado a uma molécula repressora, e uma pluralidade de sondas fluorescentemente marcadas, complementares à pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, em que as sondas estão imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada;

(b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação compreendendo moléculas repressoras para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers;

(c) hibridizar os produtos de amplificação com as sondas imobili-

zadas sobre os glóbulos magnéticos codificados;

(d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara;

(e) detectar um sinal a partir dos glóbulos magnéticos codificados e um sinal a partir das sondas marcadas, em que uma diminuição no sinal a partir das sondas marcadas indica hibridização das sondas marcadas com os produtos de amplificação compreendendo as moléculas repressoras;

(f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e

(g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

onde a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada.

35. Método de amplificar e detectar uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos em uma amostra compreendendo:

(a) combinar em uma câmara uma amostra compreendendo a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos; uma pluralidade de pares de primers para iniciar a amplificação da pluralidade de alvos de ácidos nucleicos, onde cada par de primers compreende um primeiro primer compreendendo uma sequência específica para o alvo, uma sequência de marca 5' da sequência específica para o alvo, e um bloqueador entre a sequência específica para o alvo e a sequência de marca, e um segundo primer compreendendo uma sequência específica para o alvo; um agente de marcação; e uma pluralidade de sondas complementares às sequências de marca da pluralidade de pares de primers, onde as sondas são imobilizadas sobre uma pluralidade de glóbulos magnéticos codificados de modo tal que a identidade de cada sonda seja conhecida do glóbulo magnético codificado sobre o qual ela está imobilizada;

(b) efetuar um ciclo de amplificação para formar produtos de amplificação com marcas e marcados para cada uma pluralidade de alvos de ácidos nucleicos amplificados com a pluralidade de pares de primers;

(c) hibridizar os produtos de amplificação com marcas e marcados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados;

(d) aplicar um campo magnético a uma superfície da câmara para atrair os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação com marcas e marcados hibridizados com as sondas imobilizadas sobre os glóbulos magnéticos codificados para a superfície da câmara;

(e) detectar os glóbulos magnéticos codificados e os produtos de amplificação com marcas e marcados;

(f) remover o campo magnético da superfície da câmara antes de efetuar um ciclo de amplificação adicional; e

(g) repetir as etapas (b) até (f) pelo menos uma vez;

onde a pluralidade de alvos de ácidos nucleicos na amostra é amplificada e detectada.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, em que o agente de marcação é uma molécula relatora unida ao segundo primer do par de primers.

37. Método de acordo com a reivindicação 35, em que o agente de marcação é um corante de intercalação.

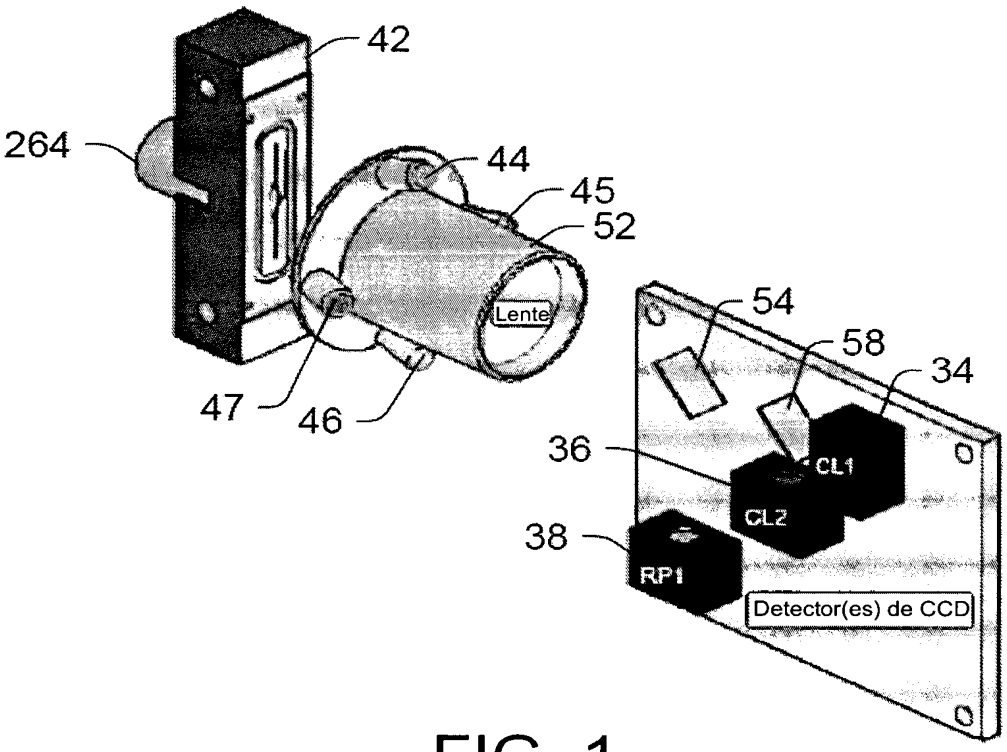
42
264
44
45
52
Lente
54
58
34
36
CL1
CL2
38
RP1
Detector(es) de CCD
47
46

FIG. 1

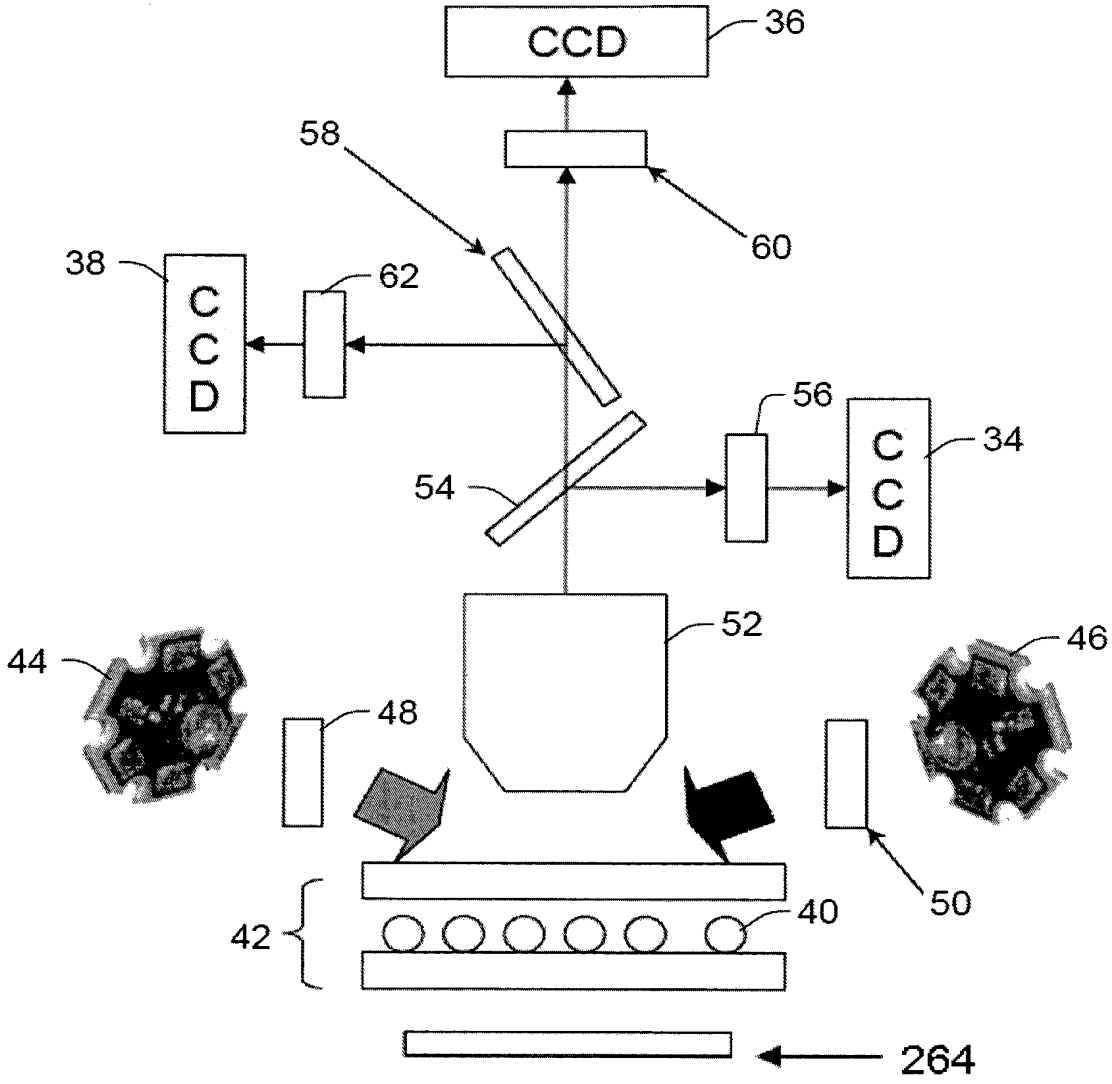

FIG. 2

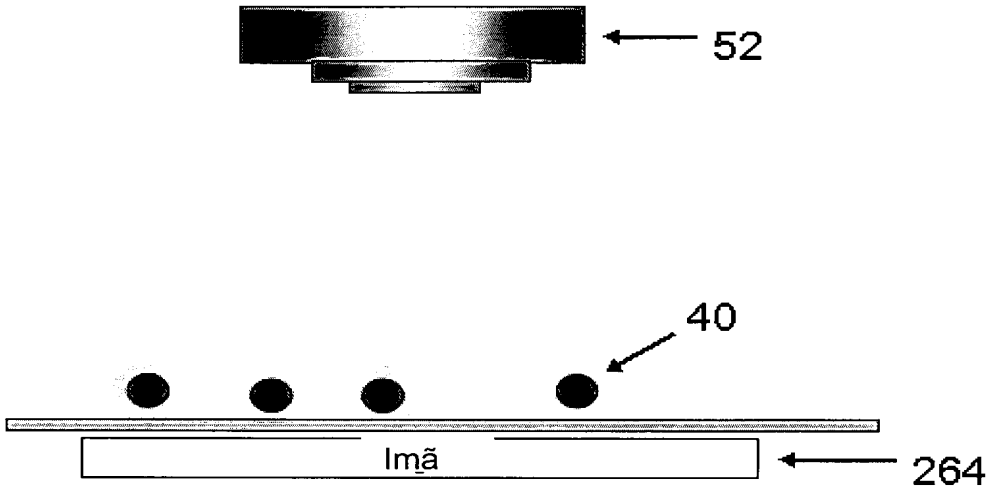

FIG. 3

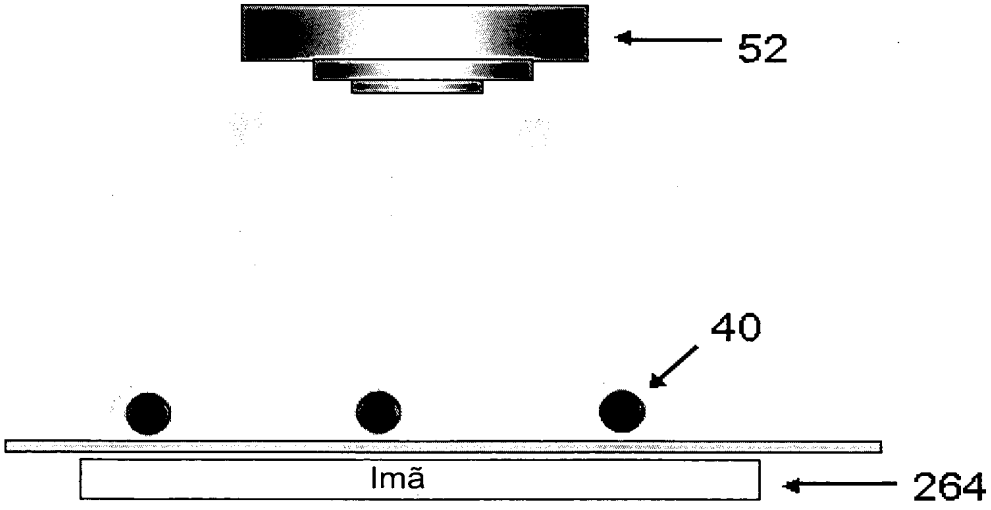

FIG. 4

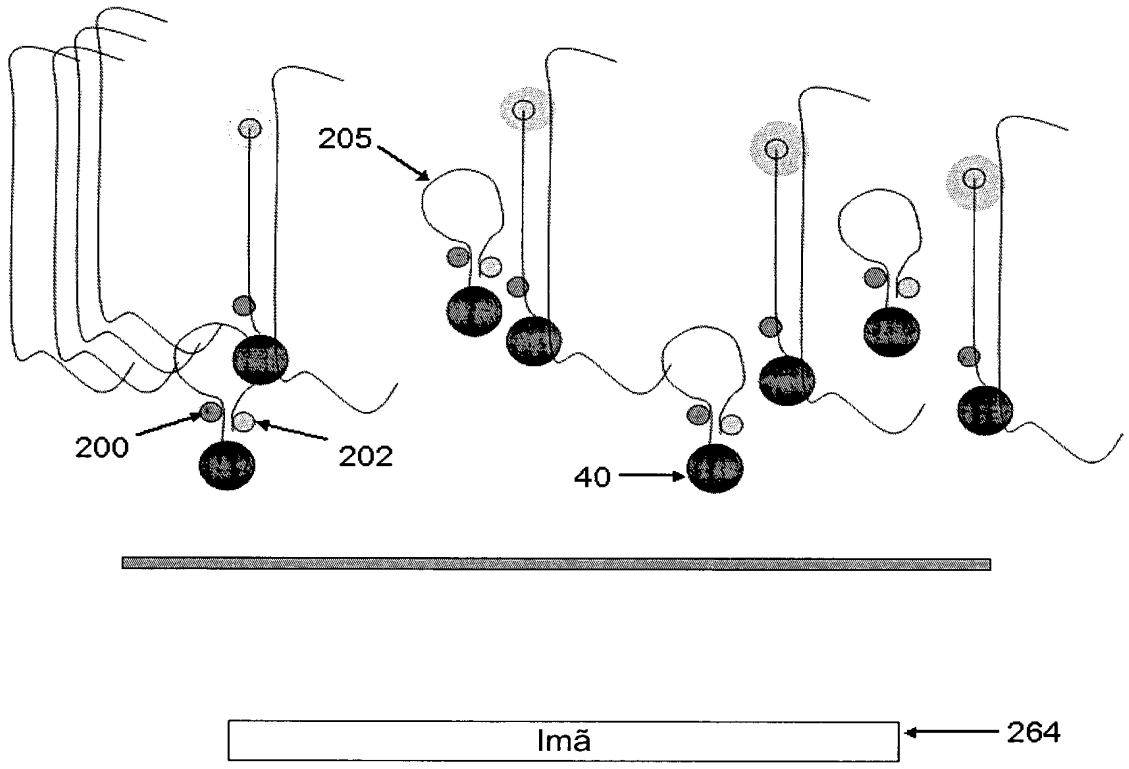

FIG. 5

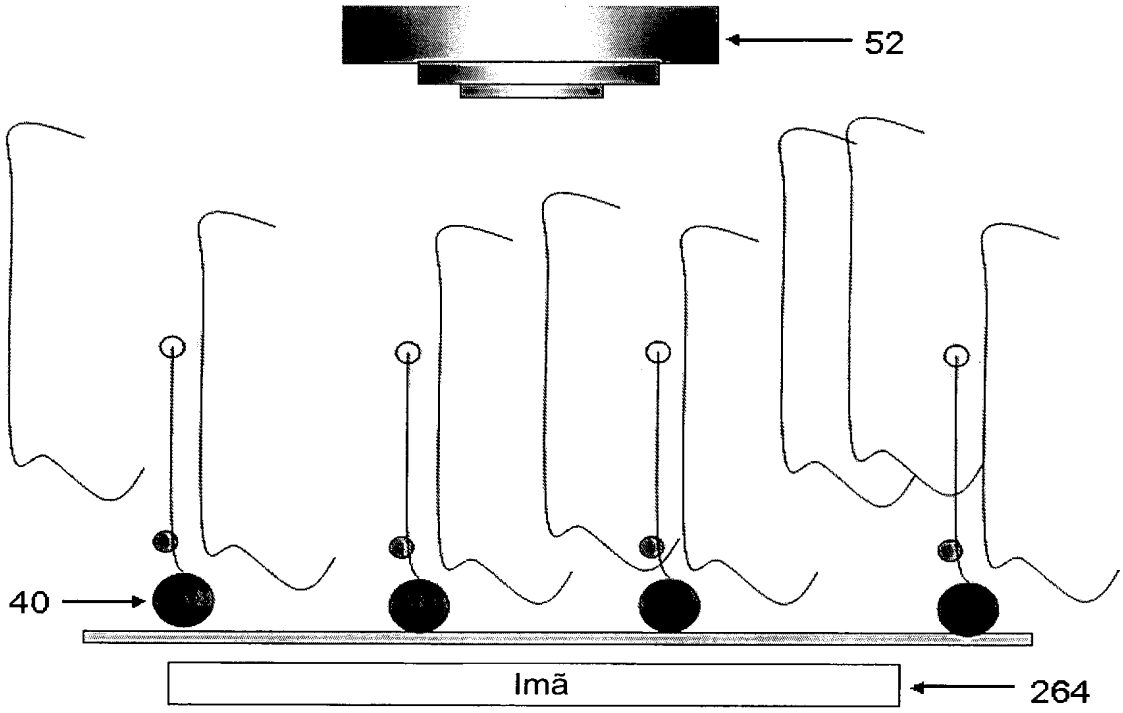

FIG. 6

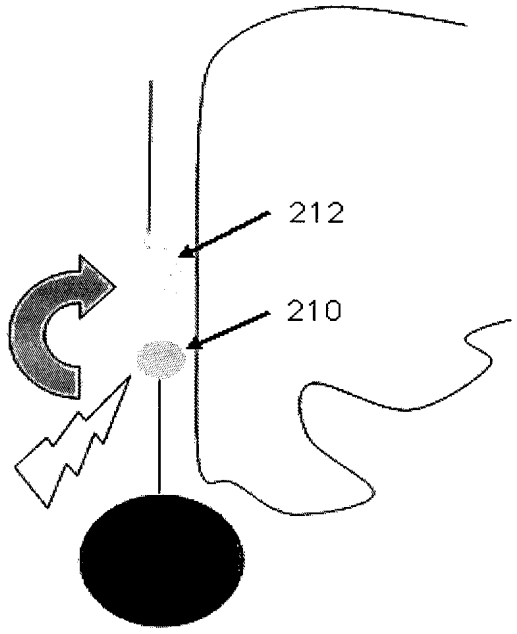

FIG. 7

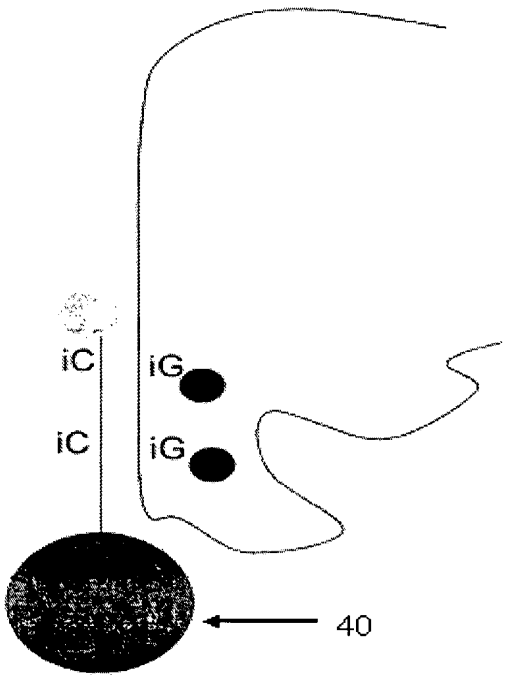

FIG. 8

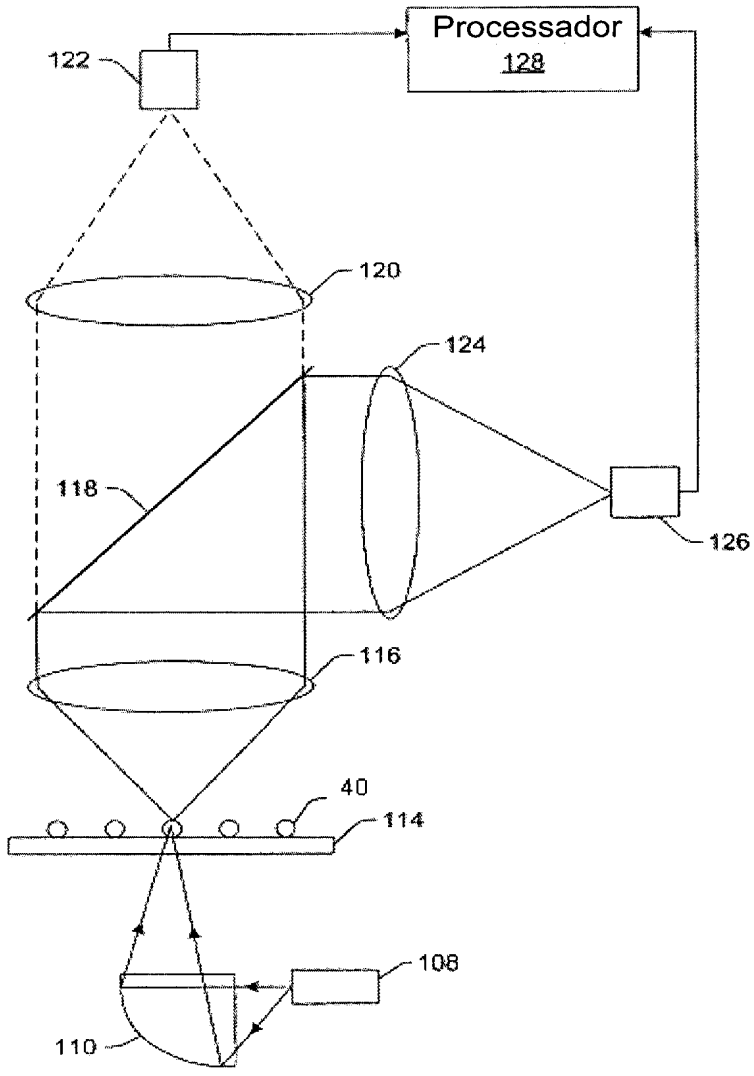

FIG. 9

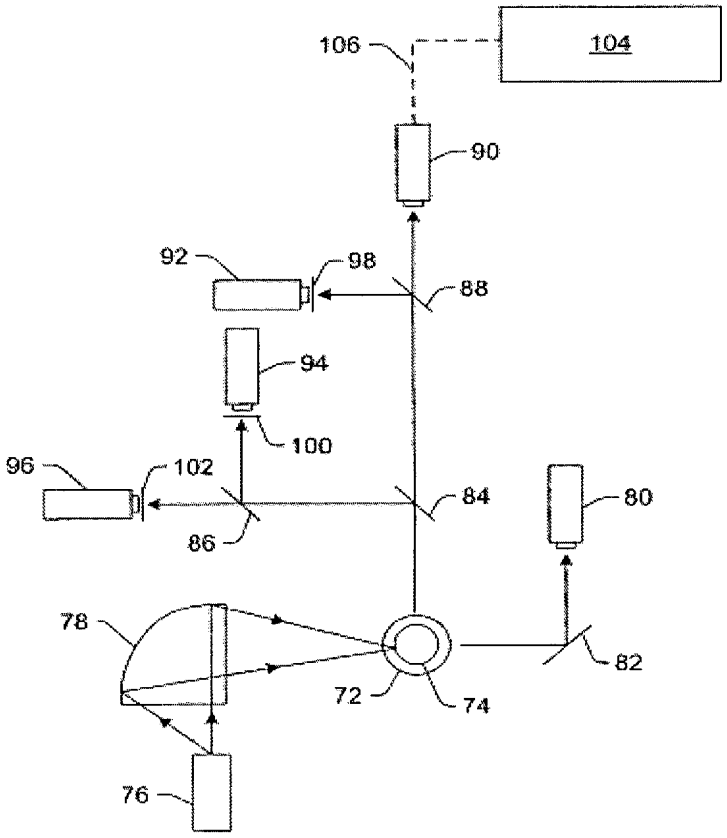

FIG. 10

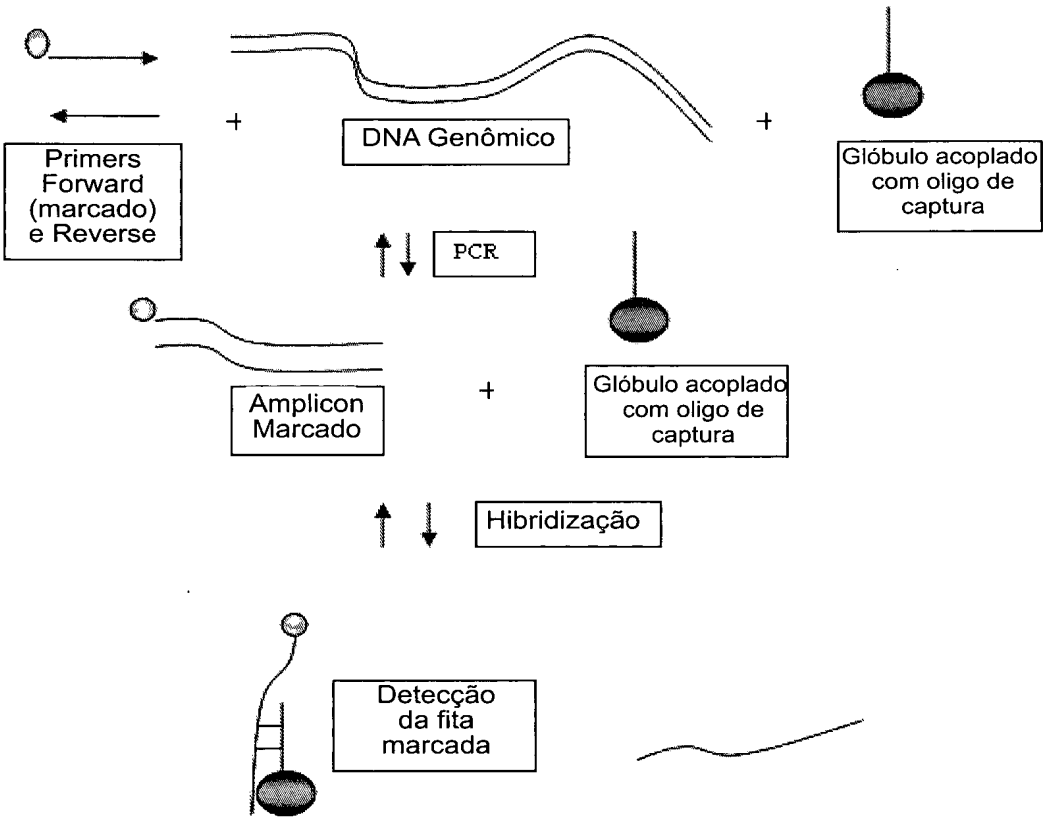
Primers Forward (marcado) e Reverse
+
DNA Genômico
+
Glóbulo acoplado com oligo de captura
PCR
Amplicon Marcado
+
Glóbulo acoplado com oligo de captura
Hibridização
Detecção da fita marcada

FIG. 11

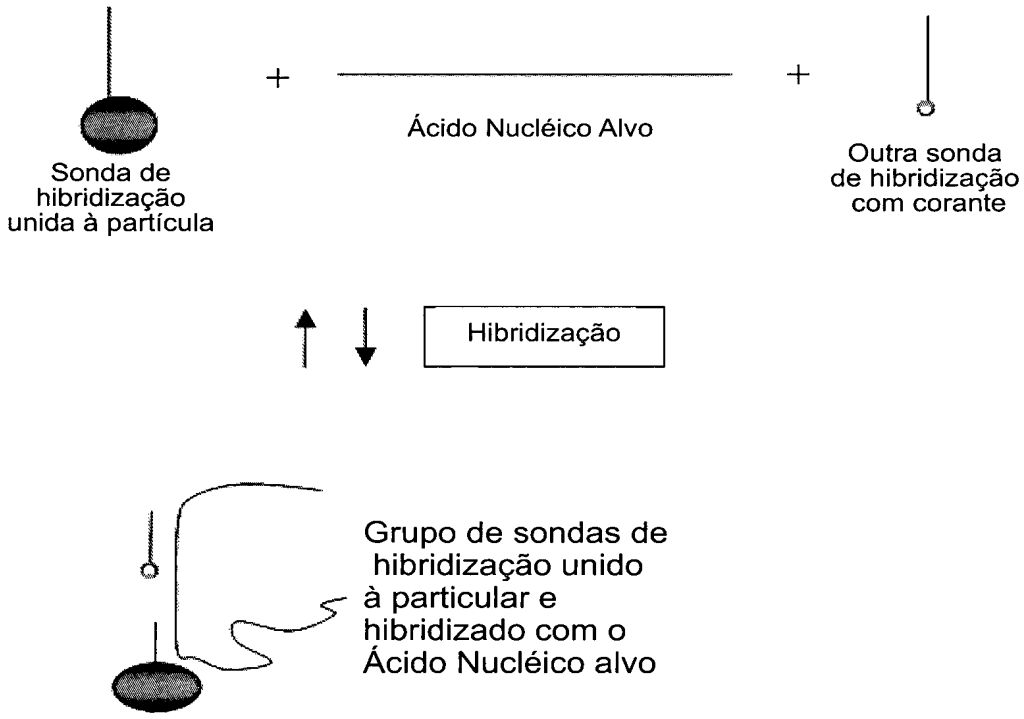
Sonda de hibridização unida à partícula
Ácido Nucléico Alvo
Outra sonda de hibridização com corante
Hibridização
Grupo de sondas de hibridização unido à particular e hibridizado com o Ácido Nucléico alvo

FIG. 12

A sequência de gene genômica Fator V Leiden:

Fator V Leiden (FVL) **[gi:2769646 and gi:488109]**

```
          v         v         v         v         v         v         v
CACAGAAAATGATGCCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACATCGCC
70
GTGTCTTTTACTACGGGTCACGAATTGTTCTGGTATGATGTCACTGCACCTGTAGTACTCTCTGTAGCGG
          v         v         v         v         v         v         v
TCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCGAGGAATACAGGTATTTT
140
AGACCCGATTATCCTGATGAAGATTAGACATTCTCGTCTAGGGACCTGTCCGCTCCTTATGTCCATAAAA
          v         v         v         v         v         v         v
GTCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAA
210
CAGGAACTTCATTGGAAAGTCTTTAAGACTCTTAAAGAAGACCGATCTTGTACAATCCAGAGGACCGATT
          v         v         v         v         v         v         v
ATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTAATTGTCAAGTAGTCCTTTTTAGCACCAGTGTGATAACAT
280
TATTACCCCGTAAAGGAAGTTCTCTTGTCATTAACAGTTCATCAGGAAAAATCGTGGTCACACTATTGTA

          v         v
TTATTCTTTTTTTTTTTTG (SEQ ID NO. 6)    300
AATAAGAAAAAAAAAAAAC (SEQ ID NO. 7)
```

FIG. 13

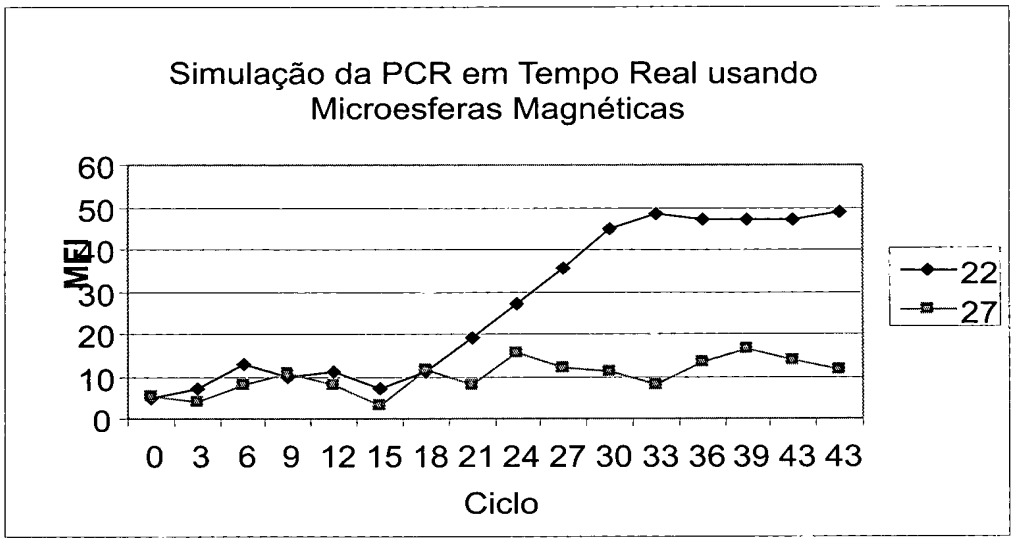
Simulação da PCR em Tempo Real usando Microesferas Magnéticas
60
50
40
30
20
10
0
MEI
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 43 43
Ciclo
22
27

FIG. 14

CFTR EXON 20
CAGCTTTTTTGAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGG
ATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACAGGTGAGCAAAA
GGACTTAGCCAGAAAAAAGGCAACT (SEQ ID NO: 8)
CFTR INTRON 10
TCAAATTCAGATTGAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTTTCTATTTTTGGTAATAGGAC
ATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCAC (SEQ ID
NO: 9)
CFTR EXON 11
ATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGT
GGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGGTGAATAACTAATTATTGGTCTAGCAAG
CATTTGCTGTAAATGTCATTCATGTAAAA (SEQ ID NO: 10)
CFTR EXON 4
TCCCCTTTTGTAGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCT
TCCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTTAT
GCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCCA (SEQ ID NO: 11)
CFTR EXON 21
TTTTTTGCTATAGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACTTGGATCCCTATG
AACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTAAGGCTGCTAACT (SEQ
ID NO: 12)
CFTR EXON 7
TTTTATAGAACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAATAGC
TCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATC
AAAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATCTCATTC (SEQ ID NO: 13)
CROMOSSOMO 7q31.2
AATTTCAGTTGACTTGTCATCTTGATTTCTGGAGACCACAAGGTAATGAAAAATAATTACA
AGAGTCTTCCATCTGTTGCAGTATTAAAATGGCGAGTAAGACACCCTGAAAGGAAATGTT
CTATTCATGGTACAATGCAATTACAGCTAGCACCAAATTCAACACTGT (SEQ ID NO: 14)
CFTR EXON 9
TAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGA
CAGTTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGGTAGTTCTTTTGTTCTTCACTA
T (SEQ ID NO: 15)

FIG. 15

RESUMO

Patente de Invenção: **"SISTEMAS E MÉTODOS PARA A ANÁLISE MULTÍPLEX DE PCR EM TEMPO REAL"**.

A presente invenção proporciona métodos e sistemas para medições em tempo real da PCR com capacidade de multiplexação. Certas modalidades referem-se aos métodos e aos sistemas que utilizam microesferas superparamagnéticas fluorescentemente codificadas para a imobilização dos produtos de amplificação durante o processo de PCR, e uma câmara de formação de imagem de um dispositivo de medição que é também capaz de ciclagem térmica controlável para auxiliar o processo de PCR.

Egholm e col., *Nature,* 365(6446):566-568, 1993.

Espy e col., *Clin. Microbiol. Rev.*, 19(1):165-256, 2006.

Guo e col., *Nat. Biotechnol.*, 4:331–335, 1997.

Higuchi e col., *Biotechnol.*, 10: 412-417, 1992.

Higuchi e col., *Biotechnol.*, 11:1026- 1030, 1993.

Ishiguro e col., *Anal. Biochemistry*, 229(2): 207- 213, 1995.

Johnson e col., *Nucl. Acids Res.*, 32:1937–1941, 2004.

Koshkin e Dunford, *J. Biol. Chem.*, 273(11):6046-6049, 1998a.

Koshkin e Wengel, *J. Org. Chem.*, 63(8):2778-2781, 1998b.

Lay e Wittwer, *Clin. Chem.*, 1997; 43: 2262– 2267, 1997.

Morrison e col., *Anal. Biochem.,* 183:231-244, 1989.

Morrison e col., *Biochemistry,* 32:3095–3104, 1993.

Moser e col., *Nucl. Acids Res.*, 31:5048–5053, 2003.

Mueller e col., *Current Protocols in Mol. Biol.*; 15:5,:1993.

Nazarenko e col., *Nucleic Acids Res.*, 25(12):2516- 2521, 1997.

Nazarenko e col., *Nucleic Acids Res.*, 30(9):37, 2002.

Nygren e col., *Biopolymers*, 46:39-51, 1998.

Pedido PCT PCT/EP/01219

Pedido PCT WO 92/20702

Pedido PCT WO 93/17126

Pedido PCT WO 9731256

Sano, T. e col., *Science*, 258:120–122, 1992.

Santalucia e col., *Biochemistry*; 38:3468-3477, 1999.

Sherrill e col., *J. Am. Chem. Soc.*, 126:4550–4556, 2004.

Sims, PW e col., *Anal Biochem.* 281:230–232, 2000.

Wahlestedt e col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 97(10):5633-5638, 2000.

Whitcombe e col., *Nat. Biotechnol.,* 17:804-807, 1999.

Wilhelm e Pingoud, *Chem. BioChem.*, 4:1120- 1128, 2003.

Wittwer e col., *Biotechniques*, 22:130-138, 1997.

Zipper e col., *Nucleic Acids Res.*, 32(12):103, 2004.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> WHITMAN, DOUGLAS F.

COLLINS, CHARLES J.

<120> SISTEMAS E MÉTODOS PARA A ANÁLISE MULTÍPLEX DE PCR EM TEMPO REAL

<130> LUMN:025WO

<140> PCT/US2007/087492

<141> 13-12-2007

<150> 60/869,742

<151> 13-12-2006

<160> 50

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 1

tgttatcaca ctggtgctaa aaagg 25

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 2

actacagtga cgtgg 15

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 3

ataatggggc atttccttca agagaacagt a 31

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 4

tctggctaga acatgttagg tctcctggct 30

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 5

aaagaaagga tttgtagtaa gatt 24

<210> 6

<211> 300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

cacagaaaat gatgcccagt gcttaacaag accatactac agtgacgtgg acatcatgag 60

agacatcgcc tctgggctaa taggactact tctaatctgt aagagcagat ccctggacag 120

gcgaggaata caggtatttt gtccttgaag taacctttca gaaattctga gaatttcttc 180

tggctagaac atgttaggtc tcctggctaa ataatggggc atttccttca agagaacagt 240

aattgtcaag tagtcctttt tagcaccagt gtgataacat ttattctttt ttttttttg 300

<210> 7

<211> 300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gtgtctttta ctacgggtca cgaattgttc tggtatgatg tcactgcacc tgtagtactc 60

tctgtagcgg agacccgatt atcctgatga agattagaca ttctcgtcta gggacctgtc 120

cgctccttat gtccataaaa caggaacttc attggaaagt ctttaagact cttaaagaag 180

accgatcttg tacaatccag aggaccgatt tattaccccg taaaggaagt tctcttgtca 240

ttaacagttc atcaggaaaa atcgtggtca cactattgta aataagaaaa aaaaaaaaac 300

<210> 8

<211> 145

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cagctttttt gagactactg aacactgaag gagaaatcca gatcgatggt gtgtcttggg 60

attcaataac tttgcaacag tggaggaaag cctttggagt gataccacag gtgagcaaaa 120

ggacttagcc agaaaaaagg caact 145

<210> 9

<211> 114

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

tcaaattcag attgagcata ctaaaagtga ctctctaatt ttctattttt ggtaatagga 60

catctccaag tttgcagaga aagacaatat agttcttgga gaaggtggaa tcac 114

<210> 10

<211> 149

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atctccaagt ttgcagagaa agacaatata gttcttggag aaggtggaat cacactgagt 60

ggaggtcaac gagcaagaat ttctttagca aggtgaataa ctaattattg gtctagcaag 120

catttgctgt aaatgtcatt catgtaaaa 149

<210> 11

<211> 160

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

tccccttttg taggaagtca ccaaagcagt acagcctctc ttactgggaa gaatcatagc 60

ttcctatgac ccggataaca aggaggaacg ctctatcgcg atttatctag gcataggctt 120

atgccttctc tttattgtga ggacactgct cctacaccca 160

<210> 12

<211> 118

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

ttttttgcta tagaaagtat ttatttttttc tggaacattt agaaaaaact tggatcccta 60

tgaacagtgg agtgatcaag aaatatggaa agttgcagat gaggtaaggc tgctaact 118

<210> 13

<211> 165

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ttttatagaa cagaactgaa actgactcgg aaggcagcct atgtgagata cttcaatagc 60

tcagccttct tcttctcagg gttctttgtg gtgtttttat ctgtgcttcc ctatgcacta 120

atcaaaggaa tcatcctccg gaaaatattc accaccatct cattc 165

<210> 14

<211> 169

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

aatttcagtt gacttgtcat cttgatttct ggagaccaca aggtaatgaa aaataattac 60

aagagtcttc catctgttgc agtattaaaa tggcgagtaa gacaccctga aaggaaatgt 120

tctattcatg gtacaatgca attacagcta gcaccaaatt caacactgt 169

<210> 15

<211> 123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

taatttctca cttcttggta ctcctgtcct gaaagatatt aatttcaaga tagaaagagg 60

acagttgttg gcggttgctg gatccactgg agcaggcaag gtagttcttt tgttcttcac 120

tat 123

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 16

caaacaaaca ttcaaatatc aatccaagga ggagctgctg aagatg 46

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 17

cactttgtga ccattccggt ttg 23

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 18

gattgatatt tgaatgtttg tttg 24

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 19

caacagtgga ggaaagcc 18

<210> 20

<211> 180

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

ggaggagctg ctgaagatgt ggggggagga gctcaccagt gaagaaagtg tctttgaagt 60

ctttgttctt cctcctcgac gacttctaca ccccctcct cgagtggtca cttctttcac 120

agaaacttca gaaacaagaa tacctctcgg gagaaccaaa ccggaatggt cacaaagtga 180

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 21

ttgagactac tgaacactga agg 23

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 22

ttctggctaa gtccttttgc 20

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 23

tcagattgag catactaaaa gtgac 25

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 24

gaactatatt gtctttctct gcaaac 26

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 25

aagtttgcag agaaagacaa tatag 25

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 26

gaatgacatt tacagcaaat gc 22

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 27

tttgtaggaa gtcaccaaag c 21

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 28

gagcagtgtc ctcacaataa agag 24

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 29

tgctatagaa agtatttatt ttttctgg 28

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 30

agccttacct catctgcaac 20

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 31

gaacagaact gaaactgact cg 22

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 32

cagggaaatt gccgagtg 18

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 33

gacttgtcat cttgatttct gg 22

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 34

tttggtgcta gctgtaattg c 21

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 35

tcacttcttg gtactcctgt cc 22

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 36

caaaagaact accttgcctg c 21

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 37

caacagtgga ggaaagcc 18

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 38

ttggtaatag gacatctcca 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 39

ctttagcaag gtgaataact 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 40

aggaggaacg ctctatcgcg 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 41

gggatccaag ttttttctaa 20

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 42

caccacaaag aaccctga 18

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 43

ccagcaaccg ccaacaactg 20

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 44

ttgacttggt aggtttac 18

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 45

tggaaagtga gtattccatg tc 22

<210> 46

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 46

gaaacaaaaa aacaatc 17

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 47

tatttgaaag gtatgttctt tg 22

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 48

cttcatccag gtatgtaaaa at 22

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 49

atttgatgaa gtatgtacct at 22

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sintético

<400> 50

gtcttactcg ccattttaat 20