



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020009782-9 A2



(22) Data do Depósito: 21/11/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2020

(54) Título: MÉTODOS DE PCR ASSIMÉTRICA

(51) Int. Cl.: C12Q 1/686.

(30) Prioridade Unionista: 22/11/2017 US 15/820,475.

(71) Depositante(es): SAFEGUARD BIOSYSTEMS HOLDINGS LTD..

(72) Inventor(es): NICOLAAS SMIT; SONJA BEDNAR; HOLGER KLAPPROTH; KEVIN BOYNTON.

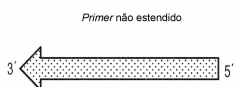
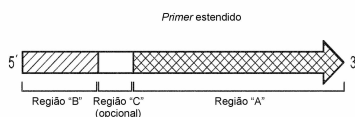
(86) Pedido PCT: PCT EP2018082086 de 21/11/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/101796 de 31/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 15/05/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a um método de amplificação por PCR assimétrica para preparação do produto de fita simples, e primers e kits úteis para o mesmo.

PAR DE PRIMERS ASSIMÉTRICOS



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**MÉTODOS DE PCR ASSIMÉTRICA**”.

1. Antecedentes da invenção

[0001] A reação em cadeia da polimerase (PCR) é amplamente utilizada para amplificar trechos de DNA, incluindo DNA genômico bem como de cDNA obtido por transcrição reversa de RNA, em ensaios para fins diagnósticos e outros. A PCR é uma série repetida de etapas de desnaturação, ou dissociação (*melting*) de fitas, para criar moldes de fita simples; anelamento de *primers* (iniciadores); e extensão de *primers* por uma DNA polimerase termicamente estável tal como a DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq).

[0002] Um protocolo típico de PCR em três etapas (ver *PCR PROTOCOLS, a Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.* eds., Academic Press (San Diego, Califórnia (EUA) 1990, Capítulo 1) pode incluir desnaturação, ou dissociação de fitas, a 93-95 °C por mais de 5 segundos, anelamento de *primers* a 55-65 °C por 10-60 segundos e extensão de *primers* por 15-120 segundos a uma temperatura na qual a polimerase é altamente ativa, por exemplo, 72 °C para Taq DNA polimerase. Um protocolo típico de PCR em duas etapas pode diferir por ter a mesma temperatura para o anelamento e para a extensão de *primers*, por exemplo, 60 °C ou 72 °C. Para PCR em três etapas ou duas etapas, a amplificação envolve a ciclagem da mistura de reação através da série de etapas anterior inúmeras vezes, tipicamente 25-40 vezes. No decorrer da reação, os tempos e temperaturas das etapas individuais na reação podem não ser alterados de ciclo para ciclo, ou podem ser alterados em um ou mais pontos no decorrer da reação para promover eficiência ou incrementar a seletividade.

[0003] Além do par de *primers* e do ácido nucleico alvo, uma mistura de reação PCR contém tipicamente cada um dos quatro desoxirribonu-

cleotídeos 5' trifosfatos (dNTPs), tipicamente em concentrações equimolares, uma polimerase termoestável, um cátion bivalente (tipicamente Mg^{2+}) e um agente de tamponamento. Uma transcriptase reversa é tipicamente incluída para alvos RNA, a menos que a polimerase possua essa atividade. O volume de tais reações é tipicamente 25-100 μ L. Sequências alvo múltiplas podem ser amplificadas na mesma reação. No caso de amplificação de cDNA, a PCR é precedida por uma reação separada para transcrição reversa do RNA em cDNA, a menos que a polimerase usada na PCR possua a atividade de transcriptase reversa. O número de ciclos para uma determinada amplificação por PCR depende de diversos fatores incluindo: a) a quantidade do material de partida, b) a eficiência da reação e c) o método e sensibilidade de detecção ou análise subsequente do produto. As condições de ciclagem, as concentrações de reagentes, o desenho de *primers* e aparelhos adequados para reações cíclicas típicas de amplificação são bem conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Ausubel, F. *Current Protocols in Molecular Biology* (1988), Capítulo 15: “*The Polymerase Chain Reaction*”, J. Wiley (New York, N.Y. (EUA))).

[0004] Idealmente, cada fita de cada molécula de amplicon hibridiza-se (referido como “ligar-se” a) com um *primer* em uma extremidade e serve como molde para uma rodada subsequente de síntese. A taxa de geração de produtos da extensão de *primers*, ou amplicons, é, assim, exponencial, dobrando durante cada ciclo. Os amplicons incluem fitas positivas (+) e negativas (-), as quais se hibridizam entre si para formar fitas duplas.

[0005] As reações PCR são projetadas tipicamente para ser simétricas, ou seja, para produzir cópias de fitas duplas utilizando um *primer forward* (senso) e um *primer reverse* (antissenso), concebidos para que suas “temperaturas de dissociação”, ou “ T_m ”, sejam iguais ou dentro de

poucos °C uma da outra. Programas de computador, *software*, comumente usados para o desenho de *primers* advertem para evitarem diferenças grandes de T_m e que disponham de recursos automáticos para igualarem T_m .

[0006] Para diferenciar a PCR típica dos métodos de PCR assimétrica aqui descritos, a PCR típica é referida no presente como PCR “simétrica”. A PCR simétrica resulta, assim, em um aumento exponencial de uma ou mais moléculas de amplicon de fita dupla, e ambas as fitas de cada amplicon acumulam-se em quantidades iguais durante cada rodada de replicação. A eficiência da amplificação exponencial via PCR simétrica declina, no final, e a taxa de acúmulo do amplicon desacelera e para. A análise cinética da PCR simétrica revela que as reações são compostas por a) uma fase de amplificação não detectada (ciclos iniciais) durante a qual ambas as fitas da sequência alvo aumentam exponencialmente, mas a quantidade do produto assim acumulada até o momento é abaixo do nível detectável do método de detecção especificamente em uso; b) uma fase de amplificação detectada (ciclos adicionais) durante a qual ambas as fitas da sequência alvo continuam a aumentar em paralelo e a quantidade do produto é detectável; c) uma fase de platô (ciclos terminais) durante a qual a síntese de ambas as fitas do amplicon para gradualmente e a quantidade de produto não aumenta mais. As reações simétricas desaceleram e param por causa das concentrações crescentes de fitas complementares do amplicon que hibridizam entre si (voltam a se anelar), e isso faz com os *primers* separados não consigam competir e hibridizar-se com suas respectivas fitas alvo. Tipicamente, as reações são executadas por tempo suficiente para garantir o acúmulo de uma quantidade detectável de produto, sem considerar o número exato de ciclos necessários para alcançar esse objetivo.

[0007] Uma técnica que encontrou uso limitado para produção de

DNA fita simples diretamente em uma reação PCR é de “PCR assimétrica”. Gyllensten and Erlich, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 7652-7656 (1988); Gyllensten and Erlich, 1991, Patente U.S. Nº 5 066 584. A PCR assimétrica tradicional diferente da PCR simétrica pelo fato de um dos *primers* ser adicionado em quantidade limitadora, tipicamente 1/100º a 1/5º da concentração do outro *primer*. O amplicon dupla fita acumula-se durante os ciclos iniciais de temperatura, como na PCR simétrica, mas um *primer* é esgotado, tipicamente depois de 15-25 ciclos de PCR, dependendo do número de moldes iniciais. A amplificação linear de uma fita ocorre durante os ciclos subseqüente, utilizando o *primer* que não foi esgotado. Os *primers* utilizados em reações PCR assimétrica relatados na literatura são frequentemente os mesmos *primers* conhecidos para PCR simétrica. Poddar (Poddar, 2000, *Mol. Cell Probes* 14: 25-32) comparou PCR simétrica e assimétrica na amplificação de um substrato de adenovírus por um ensaio de ponto final que incluiu 40 ciclos térmicos. Ele relatou que uma razão para *primers* de 50:1 era ótima e que os ensaios de PCR assimétrica exibiam sensibilidade melhor, que, no entanto, decrescia significativamente para soluções com substrato diluído que supostamente continham números menores de moléculas alvo.

[0008] Assim, há necessidade de métodos melhorados de amplificação por PCR assimétrica que sejam capazes de detectar moléculas alvo presentes em baixas quantidades em uma amostra, por exemplo, em aplicações diagnósticas.

2. Sumário da invenção

[0009] A presente invenção refere-se a métodos melhorados de PCR assimétrica e *primers* e kits úteis para a mesma.

[0010] Os métodos de PCR assimétrica da invenção incluem uma fase exponencial e uma fase linear. Durante a fase exponencial, as duas

fitas do ácido nucleico alvo são amplificadas. Durante a fase linear, apenas uma das fitas é amplificada, resultando em excesso de uma única fita do ácido nucleico alvo.

[0011] Os métodos de PCR assimétrica conseguem o excesso de uma única fita através do uso de pares de *primers* de comprimentos e temperaturas de dissociação, sendo o *primer* mais longo designado no presente como o “*Primer Estendido*” e o *primer* mais curto designado no presente como o “*Primer Não Estendido*”. O *Primer Estendido* possui uma temperatura de dissociação mais elevada do que o *Primer Não Estendido* e pode ser utilizado amplificar seletivamente uma única fita do ácido nucleico alvo por meio de ciclos de PCR nos quais a etapa de anelamento é realizada a uma temperatura maior do que a temperatura de dissociação do *Primer Não Estendido*, mas menor do que a temperatura de dissociação do *Primer Estendido*. A amplificação seletiva dá origem a uma mistura de produtos da PCR que é enriquecida com a fita alvo a ser sondada em um ensaio subsequente de detecção.

[0012] Os *Primers Estendidos* contêm, além da sequência complementar ao ácido nucleico alvo, uma extensão 5' contendo uma sequência que é complementar à parte de ligação ao alvo do mesmo *primer*. Sem estarem vinculados à teoria, os inventores acreditam que o uso da extensão 5' permite a hibridização intramolecular ou intermolecular de moléculas do *Primer Estendido* e impede a ligação arbitrária ou não específica desses *primers* mais longos a moléculas de DNA presentes na reação PCR no início da reação PCR. Isso, por sua vez, impede a amplificação não específica do DNA e evita “ruído” no produto da PCR, o que pode ser problemático quando se amplifica um alvo que está presente em baixas quantidades em uma amostra biológica.

[0013] Outro aspecto desta invenção constitui kits de reagentes para execução dos procedimentos de PCR assimétrica aqui descritos.

3. Breve descrição dos desenhos

[0014] Figura 1: ilustra um par de *primers* úteis para os métodos de PCR assimétrica da invenção, compreendendo um *Primer* Não Estendido, o qual pode ser um *primer* tradicional utilizado em processos de PCR simétrica, e um *Primer* Estendido composto por uma região “A”, que é complementar ao ácido nucleico alvo, uma região “B” que inclui uma Repetição Direta ou Repetição Invertida de pelo menos uma parte da região “A”, e uma região “C” opcional, que pode incluir uma sequência espaçadora e/ou parte ou todo o sítio de reconhecimento para a endonuclease de restrição.

[0015] Figura 2A-2C: A Figura 2A ilustra a hibridização intermolecular de *Primers* Estendidos que ocorre quando a região “B” contém uma Repetição Invertida de pelo menos uma parte da região “A”. A Figura 2B ilustra a hibridização intramolecular de *Primers* Estendidos que ocorre quando a região “B” contém uma Repetição Direta de pelo menos uma parte da região “A”. A Figura 2C ilustra a hibridização intramolecular de *Primers* Estendidos que ocorre quando a região “B” contém uma Repetição Invertida de pelo menos uma parte da região “A”. De preferência, a região de complementaridade entre a região “A” e a região “B” é em ou próximo à extremidade 5’ da região “A”.

[0016] A Figura 3 ilustra a etapa de desnaturação em uma reação PCR assimétrica da invenção. Na etapa de desnaturação, uma mistura de reação PCR (tipicamente contendo uma amostra biológica contendo ou em risco de conter um ácido nucleico alvo, um Par de *Primers* Assimétricos, uma DNA polimerase termoestável e reagentes da PCR) é aquecida até acima do ponto de dissociação do ácido nucleico alvo, resultando na desnaturação do ácido nucleico alvo (se presente) e do *Primer* Estendido no Par de *Primers* Assimétricos de modo a formar fitas simples.

[0017] A Figura 4 ilustra a etapa de anelamento da fase exponencial

das reações PCR assimétrica da invenção, a qual ocorre abaixo da temperatura de dissociação do *Primer* Não Estendido. Tanto o *Primer* Não Estendido como o *Primer* Estendido no Par de *Primers* Assimétricos hibridizam-se com as suas respectivas fitas complementares. A Figura 4 mostra o anelamento (também designado hibridização ou ligação) ao DNA alvo, como ocorre nos ciclos iniciais da PCR, mas em ciclos subsequentes, o anelamento provavelmente ocorre entre *primers* e sequências complementares nos produtos da PCR. Por causa das regiões “B” e “C” opcional no *Primer* Estendido, os principais da PCR terão as sequências ou seus complementos, conforme representadas na Figura 5B e na Figura 6.

[0018] Figuras 5A-5B: A Figura 5A e a Figura 5B ilustram a etapa de extensão da fase exponencial das reações PCR assimétrica da invenção, durante a qual a DNA polimerase termoestável estende o DNA dos *primers* utilizando o DNA complementar como molde. A região de extensão é representada em linhas tracejadas. O molde, na Figura 5A, é uma fita do DNA alvo e, na Figura 5B, é uma fita do produto da PCR obtido com o Par de *Primers* Assimétricos e o DNA alvo.

[0019] A Figura 6 ilustra a etapa de anelamento e extensão simultâneos da fase linear das reações PCR assimétrica da invenção, a qual ocorre acima da temperatura de dissociação do *Primer* Não Estendido e abaixo da temperatura de dissociação do *Primer* Estendido, usando a Fita 2 de Produto da PCR como molde. Isso resulta na amplificação assimétrica da Fita 2 de Produto da PCR, resultando em excesso de moléculas da Fita 2 de Produto da PCR em relação a moléculas da Fita 1 de Produto da PCR no final da reação PCR.

[0020] Figura 7A-7B: A Figura 7A mostra a sequência do RNA ribossômico 17S de *Solanum lycopersicum*, com uma região alvo de 160 bases mostrada em negrito que é amplificada utilizando o Par de *Primers* Assimétricos mostrado na Figura 7B. A Figura 7B mostra um Par

de *Primers* Assimétricos úteis para a amplificação da região de 160 bases mostrada em negrito na Figura 7A, com a região “A” do *Primer* Estendido mostrada em texto regular e a região “B” (que é uma Repetição Invertida da parte com sublinhado duplo da região “A”) mostra no texto em negrito. Esse *Primer* Estendido não contém a região “C” opcional.

[0021] A Figura 8 mostra os resultados de um estudo para otimizar o número de ciclos exponenciais e lineares nos métodos de PCR assimétrica da invenção utilizando *primers* de *S. aureus* e sondas. A intensidade do sinal é medida em unidades arbitrárias (“a.u.”).

[0022] A Figura 9 mostra os resultados de um estudo para comparar o limite de detecção de alvos com número baixo de cópias através dos métodos de PCR assimétrica da invenção *versus* PCR tradicional (simétrica) PCR utilizando *primers* de *S. aureus* e sondas. A intensidade do sinal é medida em unidades arbitrárias (“a.u.”).

4. Descrição detalhada da invenção

4.1 Definições

[0023] *Primer* estendido: *Primer* de PCR que contém (a) uma região “A” em sua extremidade 3’ que possui pelo menos 75% de identidade de sequência com uma região correspondente da Fita 1 Alvo ou pelo menos 75% de complementaridade de sequência com uma região correspondente na Fita 2 Alvo; (b) uma região “B” em sua extremidade 5’ que compreende uma sequência que é complementar a pelo menos uma parte da região “A”; e (c) uma região “C” opcional posicionada entre as regiões “A” e “B”.

[0024] *Primer* não estendido: *Primer* de PCR que consiste essencialmente em uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75% de identidade de sequência com uma região correspondente na Fita 2 Alvo ou pelo menos 75% de complementaridade de sequência a uma região correspondente na Fita 1 Alvo. O termo “consistir essencialmente em”

quando em referência ao *Primer Não Estendido* significa que a sequência de nucleotídeos não pode conter mais do que 3 nucleotídeos adicionais 5' na região de complementaridade (pelo menos 75%) à sequência alvo.

[0025] Par de *primers*: Par de *primer forward* e *reverse* (cada qual pode ser uma mistura de *primers* com variações na sequência para refletir possíveis variações na sequência alvo) que é capaz de hibridizar-se com e iniciar uma reação de polimerização de DNA a partir de fitas diferentes da mesma molécula de ácido nucleico dentro de uma região com menos de 5.000 pares de base. Em certas modalidades, o par de *primers* é capaz de hibridizar-se com e iniciar uma reação de polimerização de DNA a partir de fitas diferentes da mesma molécula de ácido nucleico dentro de uma região com menos de 2.500 pares de base ou menos de 1.500 pares de base.

[0026] Par de *primers* assimétricos: Par de *primers* que consiste em um *Primer Estendido* e um *Primer Não Estendido*.

[0027] Temperatura de dissociação (T_m): a temperatura à qual metade de um duplex de DNA se dissociará para tornar-se fita simples. As T_m de *primers* lineares compostos por desoxirribonucleotídeos (DNA) foram comumente calculadas pelo método do “percentual de GC” (*PCR PROTOCOLS, a Guide to Methods and Applications*, Innis et al. eds., Academic Press (San Diego, Califórnia (EUA) 1990) ou o método de “2 (A+T) mais 4 (G+C)” (Wallace et al., 1979, *Nucleic Acids Res.* 6 (11):3543-3557) ou o método do “Vizinho mais próximo” (Santa Lucia, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1460-1465; Allawi and Santa Lucia, 1997, *Biochem.* 36:10581-10594). Para fins das reivindicações, a T_m de um DNA é calculada de acordo com o método do “Vizinho mais próximo”, e bases não naturais (por exemplo, 2-desoxi-inosina) são tratadas como adeninas.

[0028] *Primer*. Oligonucleotídeo de DNA com pelo menos 12 nucleotídeos e um grupo hidroxila livre em sua terminação 3'. Os *primers* podem incluir nucleotídeos naturais e não naturais (por exemplo, nucleotídeos contendo bases universais como 3-nitropirrol, 5-nitroindol ou 2-desoxi-inosina, sendo preferida 2-desoxi-inosina). A menos que o contexto indique o contrário, o termo “*primer*” também se refere a uma mistura de moléculas de *primers* que é criada quando bases mistas são incluídas no desenho e construção dos *primers* para que possam se hibridizar com sequências variantes nas moléculas do ácido nucleico alvo. As variantes de sequências alvos podem ser variantes entre espécies ou da mesma espécie. A nomenclatura padrão para bases mistas é mostrada na Tabela 1:

Tabela 1	
Nomenclatura de bases mistas	
R	A, G
Y	C, T
M	A, C
K	G, T
S	C, G
W	A, T
H	A, C, T
B	C, G, T
V	A, C, G
D	A, G, T
N	A, C, G, T

[0029] De preferência, cada *primer* não contém mais do que três bases mistas na região de complementaridade ao ácido nucleico alvo. Em algumas modalidades, um *primer* contém zero, uma, duas ou três bases mistas na região de complementaridade ao ácido nucleico alvo.

[0030] *Primer* genérico: *Primer* cuja sequência consiste essencialmente na região “B” do *Primer* Estendido. De preferência, os métodos de amplificação assimétrica do DNA da invenção são realizados na ausência de *Primers* Genéricos.

[0031] Repetição direta: No contexto da região “B” de um *Primer* Estendido, “Repetição Direta” significa uma sequência de nucleotídeos que é o complemento direto de uma parte da região “A” (ou seja, possui a sequência complementar na mesma ordem de 5’ para 3’).

[0032] Repetição invertida: No contexto da região “B” de um *Primer* Estendido, “Repetição Invertida” significa uma sequência de nucleotídeos que é o complemento invertido de uma parte da região “A” (ou seja, possui a sequência complementar na ordem oposta 5’ para 3’).

[0033] Reagentes da PCR: a menos que o contexto indique de outra forma, o termo “Reagentes da PCR” refere-se aos componentes de uma reação PCR que não o ácido nucleico molde, a polimerase termoestável e os *primers*. Os Reagentes da PCR incluem tipicamente dNTPs (e podem incluir dNTPs marcados, por exemplo, marcados por fluorescência, além de dNTPs não marcados), tampões e sais contendo cátions bivalentes (por exemplo, $MgCl_2$).

[0034] Fita 1 Alvo: Fita 1 Alvo refere-se à fita em um ácido nucleico alvo fita dupla à qual um *Primer* Não Estendido em um Par de *Primers* Assimétricos é complementar.

[0035] Fita 2 Alvo: Fita 2 Alvo refere-se à fita em um ácido nucleico alvo fita dupla à qual a região “A” em um *Primer* Estendido em um Par de *Primers* Assimétricos é complementar.

[0036] Fita 1 de Produto da PCR: Fita 1 de Produto da PCR refere-se à fita em um produto fita dupla da PCR, produzida a partir do ácido nucleico alvo e um Par de *Primers* Assimétricos, que é complementar ao *Primer* Não Estendido do Par de *Primers* Assimétricos.

[0037] Fita 2 de Produto da PCR: Fita 1 [sic] de Produto da PCR

refere-se à fita em um produto fita dupla da PCR, produzida a partir do ácido nucleico alvo e um Par de *Primers* Assimétricos, que é complementar ao *Primer* Estendido do Par de *Primers* Assimétricos.

[0038] Correspondente: Em relação a duas fitas de ácido nucleico de comprimento diferente que compartilham identidade ou complementaridade de sequência, o termo “correspondente” refere-se à região de sobreposição ou complementaridade de sequência em ambas as fitas, conforme indicado pelo contexto.

[0039] Aproximadamente: Em referência a um número inteiro, o termo “aproximadamente” amplia o número inteiro para incluir os valores fracionados até menos 0,50 e até mais 0,49. Por exemplo, uma temperatura de “aproximadamente 68°C” significa uma temperatura de 67,50°C – 68,49°C e uma identidade de sequência de “aproximadamente 95%” significa um percentual de identidade de sequência de 94,50% - 95,49%.

[0040] Cerca de: Quando usado em um contexto quantitativo, o termo “cerca de” deve ser interpretado no sentido de incluir até 10% acima do valor afirmado e até menos de 10% do valor afirmado. No contexto de uma faixa, o termo “cerca de” deve ser interpretado no sentido de incluir valores até 10% acima do limite superior e até 10% abaixo do limite inferior da faixa afirmada.

[0041] Amostra de ácido nucleico: Significa uma amostra que pode ser uma fonte de ácido nucleico alvo ou uma amostra simulada usada como controle negativo não contendo o ácido nucleico alvo ou nenhum ácido nucleico (por exemplo, para medir ou detectar contaminação ou amplificação não específica). A amostra de ácido nucleico não precisa conter necessariamente o DNA alvo, por exemplo, no caso de uma amostra diagnóstica, a amostra poderia ser uma amostra biológica com suspeita ou em risco de conter um ácido nucleico alvo, por exemplo, conforme descrito na Seção 4.3.

4.2. Desenho de *primers*

4.2.1. *Primer* Estendido

[0042] A região “A” do *Primer* Estendido possui pelo menos 75% de identidade de sequência com uma região correspondente na Fita 1 Alvo. Em certas modalidades, a região “A” do *Primer* é pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% idêntica à região correspondente na Fita 1 Alvo. Em ainda outras modalidades, a região “A” do *Primer* possui 100% de identidade de sequência com a região correspondente da Fita 1 Alvo.

[0043] Em outras palavras, em várias modalidades, a região “A” do *Primer* Estendido possui pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência com o complemento da região correspondente na Fita 2 Alvo. Tipicamente, quanto mais quaisquer erros de pareamento 5’ existam entre onde a sequência do *primer* e a sequência alvo estão posicionadas, mais provavelmente estes deverão ser tolerados durante a reação PCR. O técnico no assunto pode desenhar facilmente sequências de *primers* que exibem menos de 100% de identidade de sequência com a fita alvo, mas que ainda possam amplificar eficientemente o DNA alvo.

[0044] A sequência na região “B” que é complementar a pelo menos uma parte da região “A” pode ser uma Repetição Direta ou Repetição Invertida. Quando a região “B” contiver uma Repetição Direta de uma parte da região “A”, moléculas diferentes do *Primer* Estendido podem hibridizar-se uma com a outra de modo intermolecular, conforme mostrado na Figura 2B. Quando a região “B” contiver uma Repetição Invertida de uma parte da região “A”, moléculas do *Primer* Estendido podem hibridizar-se de modo intramolecular, conforme mostrado na Figura 2C, ou com outra de modo intermolecular, conforme mostrado na Figura 2A.

[0045] A parte da região “A” à qual uma sequência na região “B” é complementar, de preferência, está em ou próximo (por exemplo, em

até 1, 2 ou 3 nucleotídeos de distância) à extremidade 5' da região "A", ou seja, em ou próximo a onde a região "A" junta-se à região "B" (ou a região "C" quando uma região "C" está presente).

[0046] A região "B" do *Primer* Estendido tem, de preferência, 6 a 12 nucleotídeos de comprimento, ou seja, tem, de preferência, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 nucleotídeos de comprimento. Em modalidades específicas, a região "B" do *Primer* Estendido tem de 8 a 10 nucleotídeos de comprimento, ou seja, tem 8, 9 ou 10 nucleotídeos de comprimento.

[0047] A região "C", quando presente em um *Primer* Estendido, tem de preferência 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, ou seja, tem, de preferência, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 nucleotídeos de comprimento.

[0048] A T_m do *Primer* Estendido é de preferência (mas não necessariamente) entre aproximadamente 68°C e aproximadamente 80°C. Em modalidades em particular, a T_m do *Primer* Não Estendido é entre aproximadamente 72°C e aproximadamente 78°C, por exemplo, aproximadamente 72°C, aproximadamente 73°C, aproximadamente 74°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 76°C, aproximadamente 77°C ou aproximadamente 78°C.

[0049] A região "C" opcional posicionada entre as regiões "A" e "B" pode atuar como um espaçador entre as regiões "A" e "B" para permitir que o *Primer* Estendido forme uma alça do tipo grampo de cabelo (*hair-pin*) e/ou introduzir uma sequência para endonuclease de restrição (de preferência, uma sequência *6-cutter* (cortadora de 6)) no produto da PCR. A sequência para endonuclease de restrição pode estar inteiramente dentro da região "C" ou ser formada por toda ou uma parte da região "C" junto com sequências flanqueadoras 5' e/ou 3' das regiões "B" e "A", respectivamente. Para minimizar a interferência na hibridização com o ácido nucleico alvo, a região "C" de preferência não é complementar à Fita 1 Alvo ou Fita 2 Alvo.

[0050] A T_m do *Primer* Estendido é, de preferência, pelo menos

aproximadamente 6°C mais alta do que a T_m do *Primer* Não Estendido. De preferência, o *Primer* Estendido tem uma T_m que é aproximadamente 15°C a 30°C mais alta do que a T_m do *Primer* Não Estendido.

[0051] A T_m da região “A” do *Primer* Estendido, de preferência, não é mais do que aproximadamente 3°C maior ou menor do que a T_m da parte do *Primer* Não Estendido (pelo menos 75%) complementar ao alvo (excluindo quaisquer extensões 5'), ou seja, a T_m da região no *primer forward* que se hibridiza com o alvo, de preferência, não é mais do que aproximadamente 3°C maior ou menor do que a T_m da região no *primer reverse* que se hibridiza com o alvo, e vice-versa.

[0052] A região “A” do *Primer* Estendido tem, de preferência, pelo menos 12 nucleotídeos de comprimento e, de preferência, varia entre 12 e 30 nucleotídeos e mais preferivelmente de 14-25 nucleotídeos. Em certas modalidades, a região “A” do *Primer* Estendido tem 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos de comprimento.

4.2.2. *Primer* Não Estendido

[0053] O *Primer* Não Estendido possui uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75% de identidade de sequência com uma região correspondente na Fita 2 Alvo. Em certas modalidades, o *Primer* Não Estendido possui uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% de identidade de sequência com a região correspondente na Fita 2 Alvo. Em ainda outras modalidades, o *Primer* Não Estendido possui uma sequência de nucleotídeos tendo 100% de identidade de sequência com a região correspondente da Fita 2 Alvo.

[0054] Em outras palavras, em várias modalidades, o *Primer* Não Estendido possui uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% ou 100% de identidade de sequência com o complemento da região 1 correspondente na Fita 2 Alvo. Tipicamente, quantos mais erros

de pareamento 5' existam entre onde a sequência do *primer* e a sequência alvo estão posicionadas, mais provavelmente estes deverão ser tolerados durante a reação PCR. O técnico no assunto pode desenhar facilmente sequências de *primers* que exibem menos de 100% de identidade de sequência com a fita alvo, mas que ainda possam amplificar eficientemente o DNA alvo.

[0055] O *Primer* Não Estendido pode ter ainda uma cauda 5' de 1, 2 ou 3 nucleotídeos.

[0056] A T_m do *Primer* Não Estendido é de preferência (mas não necessariamente) entre aproximadamente 50°C e aproximadamente 62°C. Em modalidades em particular, a T_m do *Primer* Não Estendido é entre aproximadamente 59°C e aproximadamente 62°C, por exemplo, aproximadamente 59°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 61°C ou aproximadamente 62°C.

[0057] A T_m do *Primer* Não Estendido é, de preferência, pelo menos aproximadamente 6°C menor do que a T_m do *Primer* Estendido. De preferência, o *Primer* Não Estendido possui uma T_m que é aproximadamente 15°C a 30°C menor do que a T_m do *Primer* Estendido.

[0058] A T_m da região do *Primer* Não Estendido (pelo menos 75%) complementar ao alvo (excluindo quaisquer extensões 5') de preferência não é mais do que aproximadamente 3°C maior ou menor do que a T_m da região "A" do *Primer* Estendido, ou seja, a T_m da região no *primer forward* que se hibridiza com o alvo, de preferência, não é mais do que aproximadamente 3°C maior ou menor do que a T_m da região no *primer reverse* que se hibridiza com o alvo, e vice-versa.

[0059] O *Primer* Não Estendido tem, de preferência, pelo menos 12 nucleotídeos de comprimento e, de preferência, varia entre 12 e 30 nucleotídeos e mais preferivelmente de 14-25 nucleotídeos. Em certas modalidades, o *Primer* Não Estendido tem 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucleotídeos de comprimento.

4.2.3. *Primer* genérico

[0060] Em alguns métodos de PCR assimétrica, por exemplo, conforme descritos na Patente U.S. Nº 8 735 067 B2, além do par de *primer forward* e *reverse*, um terceiro *primer* “genérico” é utilizado, cuja sequência é semelhante a uma cauda oligonucleotídica 5’ adicionada a um dos *primers*. o *primer* genérico destina-se a participar na reação de amplificação depois do ciclo inicial da PCR para “equilibrar” a eficiência da amplificação de alvos diferentes em uma reação multiplex de amplificação.

[0061] Sem estarem vinculados à teoria, os inventores acreditam que a inclusão de um *primer* genérico como descrito na Patente U.S. Nº 8 735 067, o qual, no contexto da presente invenção teria uma sequência consistindo essencialmente na sequência da região “B” do *Primer Estendido* (tais *primers* genéricos designados no presente como “*Primers Genéricos*”), reduziria a eficiência da amplificação utilizando o Par de *Primers Assimétricos* da invenção. Desse modo, os métodos de amplificação assimétrica do DNA da invenção são preferivelmente realizados na ausência de *Primers Genéricos*.

[0062] Em uma modalidade relacionada, os métodos de amplificação assimétrica do DNA da invenção utilizam um único Par de *Primers Assimétricos* por região alvo, ou seja, não incluem quaisquer *primers* adicionais, sendo reconhecido que um *primer* individual pode ser uma mistura da molécula do *primer* com sequências estritamente relacionadas resultantes da inclusão de bases mistas em certas posições no *primer*. Por uma questão de clareza e para que não existam dúvidas, essa modalidade não exclui o uso de uma pluralidade de Pares de *Primers Assimétricos* em uma reação multiplex de amplificação, desde que um único Par de *Primers Assimétricos* seja usado para cada amplicon.

4.3 Sequências alvo e preparação de amostras

[0063] Os métodos de PCR da invenção podem ser utilizados para amplificar ácidos nucleicos de fontes biológicas ou ambientais. As moléculas alvos podem ser de células e tecidos de todas as classes taxonômicas, incluindo vírus, bactéria e eucariotos, procariotos, protistas, plantas, fungos e animais de todos os filos e classes. Os animais podem ser vertebrados, mamíferos, primatas e, especialmente, humanos. Sangue, soro, plasma, tecido, células, saliva, escarro, urina, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, leite, lágrimas, fezes, suor, sêmen, células inteiras, constituintes celulares e esfregaços celulares são fontes adequados de moléculas alvo.

[0064] Em certas modalidades específicas, as moléculas do ácido nucleico alvo são de patógenos, por exemplo, bactérias, vírus ou fungos, que podem ser encontrados no sangue, urina ou líquido peritoneal humano. Os exemplos de tais patógenos incluem, entre outros, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis*, *Staphylococcus aureus* (incluindo *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina e resistentes à meticilina (MRSA)), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, *Bacillus anthracis*, *Nocardia* sp., *Actinomyces* sp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella species*, *Pneumocystis jiroveci*, vírus influenza A, citomegalovírus, rinovírus, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium amycolatum*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* CI 4413, *Serratia marcescens*, *Streptococcus equi* e *Candida albicans*.

[0065] As moléculas do ácido nucleico alvo são preferivelmente de DNA, mas podem ser também de RNA. No caso de moldes de RNA, a reação PCR pode ser precedida por uma reação de transcrição reversa

para gerar moléculas de cDNA para uso como moléculas alvo na reação PCR. A reação de transcrição reversa pode ser realizada na mesma mistura de reação ou em uma mistura de reação separada da reação PCR. Métodos de transcrição reversa são bem conhecidos na técnica.

[0066] As moléculas do ácido nucleico alvo podem ser obtidas por transcrição reversa (se RNA), extraídas e/ou purificadas de amostras biológicas ou ambientais antes da incorporação na mistura inicial da PCR.

[0067] Em algumas modalidades, as moléculas do ácido nucleico alvo são extraídas por um processo de *bead beating* (lise mecânica) como descrito na Publicação da Patente U.S. Nº 20170218356, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

4.4. Reação PCR

4.4.1. A mistura inicial da reação

[0068] A mistura inicial da reação PCR inclui:

- Amostra de ácido nucleico;
- Par de *Primers* Assimétricos;
- DNA polimerase termoestável; e
- Reagentes da PCR.

[0069] Amostra de ácido nucleico: A amostra de ácido nucleico pode incluir uma amostra biológica ou amostra ambiental ou uma amostra derivada das mesmas, por exemplo, DNA extraído ou purificado das mesmas. A amostra biológica pode ser, por exemplo, sangue, soro, plasma, tecido, células, saliva, escarro, urina, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, leite, lágrimas, fezes, suor, sêmen, células inteiras, constituintes celulares, esfregaço celular ou um extrato ou derivado dos mesmos. A amostra de ácido nucleico pode também ser uma amostra de controle positivo ou negativo. Uma amostra de ácido nucleico de con-

trole negativo pode não conter ácido nucleico ou ser de um ácido nucleico sabidamente não contendo sequências com as quais o Par de *Primers* Assimétricos hibridiza.

[0070] Par de *Primers* Assimétricos: A concentração inicial do *Primer* Estendido e do *Primer* Não Estendido na reação PCR pode variar cada de 200 nM a 6 μ M. O *Primer* Estendido e o *Primer* Não Estendido podem não ser incluídos em quantidades equimolares na reação PCR inicial, por exemplo, em concentrações variando entre cerca de 200 nM e 1 μ M cada, por exemplo, em concentrações de 500 nM cada. Alternativamente, o *Primer* Estendido e o *Primer* Não Estendido podem ser incluídos em quantidades não equimolares na reação PCR inicial. Em certas modalidades, a concentração inicial do *Primer* Estendido, de preferência, excede a concentração do *Primer* Não Estendido, por exemplo, em excesso molar de aproximadamente 2 vezes a 30 vezes. Deste modo, em certos aspectos, a concentração do *Primer* Estendido varia entre aproximadamente 1 μ M e 6 μ M e a concentração do *Primer* Não Estendido varia entre aproximadamente 50 nM e 200 nM.

[0071] O Par de *Primers* Assimétricos pode ser desenhado para amplificar ácido nucleico a partir de qualquer fonte e, para aplicações diagnósticas, o Par de *Primers* Assimétricos pode ser desenhado para amplificar o DNA de patógenos tais como aqueles identificados na Seção 4.3.

[0072] O Par de *Primers* Assimétricos pode ser desenhado de modo que seja capaz de amplificar sequências conservadas de ácido nucleico presentes em muitas espécies simultaneamente, por exemplo, a sequência ribossômica 16S altamente conservada em bactérias.

[0073] DNA polimerase termoestável: As polimerases termoestáveis que podem ser usadas nas reações PCR assimétrica da invenção incluem, entre outras, Vent (*Tli/Thermococcus Litalis*), Vent exo-, Deep Vent, Deep Vent exo-, Taq (*Thermus aquaticus*), Hot Start Taq, Hot Start

uma transcriptase reversa e vários aditivos tais como um conservante. Os *primers* e a amostra de ácido nucleico tipicamente não são incorporados na mistura mestre de PCR, mas incorporados na mistura inicial da reação PCR pouco antes de iniciar a reação PCR.

[0076] Os métodos da invenção incluem ainda a etapa inicial de formar a mistura inicial da reação antes de ser iniciada a termociclagem, combinando os componentes da mistura inicial da reação em um recipiente de PCR, tal como um tubo de PCR.

4.4.2. As condições para a reação PCR

[0077] Um conjunto ilustrativo de ciclos assimétricos para uso nos métodos de PCR assimétrica da invenção é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2				
Fase	Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	Desnaturação inicial	90-100°C, de preferência, 95°C	0-5 minutos, de preferência, 2 minutos	0-1
Fase exponencial	Desnaturação	90-100°C, de preferência, 95°C	15-25 segundos, de preferência, 20 segundos	20-40, de preferência, 30-37 (por exemplo, 35)
	Anelamento	58°C	12-18 segundos, de preferência, 15 segundos	
	Extensão	72°C	30-50 segundos, de preferência, 40 segundos	
Fase linear	Desnaturação	90-100°C, de preferência, 95°C	15-25 segundos, de preferência, 20 segundos	15-25, de preferência, 20
	Anelamento e extensão simultâneos	72°C	40-60 segundos, de preferência, 50 segundos	
Extensão ampliada	Extensão ampliada	72°C	0-5 minutos, de preferência, 2 minutos	0-1

[0078] As faixas de números de ciclos mostradas na Tabela 2 podem ser usadas para qualquer Par de *Primers* Assimétricos, e o número ótimo de ciclos dependerá do número de cópias do DNA alvo na mistura

inicial da PCR: quanto maior o número inicial de cópias, menor o número de ciclos necessários na fase exponencial para produzir uma quantidade suficiente de produtos da PCR para servir como moldes na fase linear. A otimização do número de ciclos é rotineira para o técnico no assunto.

[0079] As temperaturas mostradas na Tabela 2 são especialmente úteis quando a T_m do *Primer* Estendido for superior a 72°C (por exemplo, 75-80°C) e a T_m do *Primer* Não Estendido for acima de 58°C, mas abaixo de 72°C (por exemplo, 60-62°C) e quando a DNA polimerase termoestável for ativa a 72°C.

[0080] Os tempos de ciclos, especialmente os tempos para extensão, podem ser variados de acordo com as temperaturas de dissociação dos *primers* e o comprimento do produto da PCR, com produtos mais longos da PCR demandam tempos mais longos para extensão. Uma regra de ouro é que a etapa de extensão deve ser de pelo menos 60 segundos por 1.000 bases de amplicon. A etapa de extensão pode ser ampliada na fase linear para proporcionar tempo adicional ao anelamento.

4.5. Detecção de produtos da PCR

[0081] A Fita 2 de Produto da PCR, que é o produto da PCR de fita simples obtido pelos métodos aqui descritos, pode ser marcada com marcações fluorescentes para detecção.

[0082] A marcação fluorescente pode ser realizada pela incorporação de nucleotídeos marcados por fluorescência durante a PCR e/ou pelo uso de *primers* marcados para PCR.

[0083] Os exemplos de grupos fluorescentes adequados incluem FITC, EDANS, Texas red, 6-joe, TMR, Alexa 488, Alexa 532, "BODIPY FL/C3", "BODIPY R6G", "BODIPY FL", Alexa 532, "BODIPY FL/C6", "BODIPY TMR", 5-FAM, "BODIPY 493/503", "BODIPY 564", "BODIPY 581", Cy3, Cy5, R110, TAMRA, Texas red e x-Rodamina.

[0084] Os grupos fluorescentes podem ser ligados aos dNTPs, especialmente aqueles contendo citosina como base (ácido citidílico, citidina 5'-fosfato, citidina 5'-difosfato, citidina 5'-trifosfato ou um polímero destas ou um polímero contendo ácido citidílico).

[0085] A posição para marcação dos dNTPs pode ser na base (grupo amino), grupo fosfato (grupo OH) ou porção desoxirribose (grupo 2'- ou 3'-OH). A posição preferida é qualquer uma na base.

[0086] Do mesmo que outros nucleotídeos, os dNTPs marcados por fluorescência podem ser incorporados em ambas as fitas de um amplícon de PCR em sítios aleatórios, tipicamente sítios dC, e estendidos pela DNA polimerase.

[0087] dNTPs fluorescentes estão disponíveis comercialmente em forma altamente concentrada e podem ser adicionados à mistura da reação PCR sem ajustar a concentração de cada dNTP não marcado. Para a maioria das amplificações por PCR, a relação típica dNTP/dNTPs fluorescente é entre 100:1 e 1000:1. Assim, dNTPs marcados por fluorescência podem ser incluídos entre os reagentes da PCR na quantidade (molar) de 0,1% a 1% dos dNTPs não marcados.

[0088] A detecção de produtos da PCR marcados por fluorescência (por exemplo, a Fita 2 do Produto simples fita que é produzida em excesso nos métodos da invenção) pode ser conseguida através de hibridização a moléculas de sonda, por exemplo, moléculas de sonda ligadas a um microarranjo. Um sistema de microarranjo adequado aproveita-se das redes poliméricas reticuladas tridimensionais, conforme descritas na Patente U.S. Nº 9 738 926, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

4.6. Kits

[0089] A presente invenção provê ainda kits adequados para executar os métodos de PCR assimétrica aqui descritos. Os kits incluem tipicamente pelo menos um Par de *Primers* Assimétricos. Além disso,

os kits da invenção podem incluir moléculas de sonda, uma DNA polimerase, dNTPs não marcados, dNTPs marcados, tampões, soluções de sais ou qualquer combinação destes. Alguns dos reagentes (por exemplo, a DNA polimerase, dNTPs, sal e/ou tampão) podem ser previamente combinados na forma de uma mistura mestre.

5. Exemplos

[0090] Uma reação PCR inicial foi criada com um Par de *Primers* Assimétricos desenhados para amplificar uma região com 506-bp do gene 16S de *S. aureus* 16S (não incluindo sequências dos *primers*), utilizando um *Primer* Estendido para *primer forward* e um *Primer* Não Estendido para o *primer reverse*. A amostra de ácido nucleico era de DNA humano fortificado com um número conhecido de cópias do DNA genômico de *S. aureus* (o DNA alvo para esses estudos). O *primer forward* (com Tm calculada de 68,1°C) foi marcado com Cy5 na extremidade 5-*prime* e continha uma “A” (com Tm calculada de 64,09°C), uma região “B” complementar à extremidade 5’ da região “A” e nenhuma região “C” como um espaçador entre as regiões “A” e “B”. O *primer reverse* incluiu uma inosina que poderia ser pareada como base com qualquer outra base na sequência alvo. Dependendo da base complementar alvo, a Tm do *Primer reverse* variou de 60-61,9°C. A reação PCR inicial foi submetida ao seguinte ciclo de PCR:

- um período de desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C,
- ciclos exponenciais, cada qual consistindo em 20s de desnaturação a 95°C, 15s de anelamento a 58°C e 40s de extensão a 72°C;
- ciclos lineares, cada qual consistindo em 20s de desnaturação a 95°C e então anelamento/extensão simultâneos a 72°C e
- finalmente, um período ampliado de 2 minutos de extensão a 72°C.

[0091] No Experimento 1, os números de moléculas do DNA alvo e

dos ciclos exponenciais e lineares foram variados para otimizar os números de ciclos exponenciais e lineares para o número de cópias do ácido nucleico alvo. A quantidade de *reverse* (*Primer Não Estendido*) incluído foi determinada de modo que o *Primer Não Estendido* não tivesse esgotado ou quase esgotado no final da fase exponencial e muito poucas moléculas do *Primer Não Estendido* permanecessem na fase linear da PCR assimétrica. Os resultados desses cálculos são mostrados na Tabela 3:

Concentração do <i>primer reverse</i>	Moléculas do <i>primer reverse</i> /L	Moléculas do <i>primer reverse</i> em 20 µL de reação	Nº de ciclos necessários para consumir completamente o <i>primer</i>		
			1 cópia genômica	10 cópias genômicas	100 cópias genômicas
0,1	$6,02^{+16}$	$1,20^{+12}$	40,1	36,8	33,5
0,2	$1,20^{+17}$	$2,41^{+12}$	41,1	37,8	34,5
0,5	$3,01^{+17}$	$6,02^{+12}$	42,4	39,1	35,8

[0092] O total do produto da PCR obtido no Experimento 1 foi quantificada por hibridização em um microarranjo. Os resultados são mostrados na Figura 8.

[0093] No Experimento 2, a quantidade do produto da PCR obtido com diferentes concentrações do molde, usando PCR assimétrica e PCR simétrica, foi comparado, utilizando 500 nM de cada uma das sondas *forward* e *reverse* na reação PCR. Para reação assimétrica, os números de ciclos exponenciais e lineares utilizados foram 35 e 20, respectivamente. Na reação simétrica, não foram usados ciclos lineares.

[0094] A quantidade de produto da PCR foi detectada por hibridização em um microarranjo. Os resultados são mostrados na Figura 9. O valor de R^2 acima de 0,95 indica que, em cada caso, a linha de regressão é um ajuste válido para os dados.

6. Modalidades específicas

[0095] A presente invenção é exemplificada pelas modalidades específicas abaixo.

1. Um método para a produção de amplicons fita simples de DNA via uma reação em cadeia da polimerase (PCR) assimétrica, compreendendo as etapas de:

(a) submeter uma mistura inicial a uma primeira fase de ciclagem térmica sob condições para amplificação por PCR, a dita mistura inicial compreendendo:

- (i) uma amostra de ácido nucleico;
- (ii) um Par de *Primers* Assimétricos,
- (iii) uma DNA polimerase termoestável e
- (iv) Reagentes da PCR,

em que a primeira fase da ciclagem térmica compreende ciclagem através de pelo menos três temperaturas, as ditas três temperaturas compreendendo: (1) uma primeira temperatura acima da T_m de um ácido nucleico alvo para desnaturação, (2) uma segunda temperatura abaixo da T_m do *Primer* Não Estendido para anelamento dos *primers*, e (3) uma terceira temperatura adequada para extensão pela DNA polimerase termoestável,

produzindo, assim, uma mistura intermediária, a dita mistura intermediária compreendendo amplicons de DNA estendidos a partir do *Primer* Não Estendido e do *Primer* Estendido se o ácido nucleico alvo estiver presente na amostra;

(b) submeter a mistura intermediária à segunda fase de ciclagem térmica, a dita segunda fase compreendendo a ciclagem através de: (1) uma quarta temperatura acima da T_m dos amplicons de DNA para desnaturação, (2) uma quinta temperatura que é (i) abaixo da T_m do *Primer* Estendido, (ii) acima da T_m do *Primer* Não Estendido e (iii) adequada para extensão pela DNA polimerase termoestável,

produzindo, assim, uma mistura final, a dita mistura final compreendendo amplicons fita simples de DNA se o ácido nucleico alvo estiver presente na amostra.

2. O método da modalidade 1, em que a etapa (a) é precedida por período de desnaturação inicial.

3. O método da modalidade 2, em que a desnaturação inicial é realizada na primeira temperatura.

4. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 3, em que a etapa (b) é seguida por um período de extensão adicional.

5. O método da modalidade 4, em que a extensão adicional é realizada na quinta temperatura.

6. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 5, em que a primeira e a quarta temperatura são iguais.

7. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 6, em que a terceira e a quinta temperatura são iguais.

8. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 7, em que a região "B" do *Primer* Estendido é o complemento de uma repetição invertida de pelo menos uma parte da região "A".

9. O método da modalidade 8, em que a região "B" tem pelo menos 4 nucleotídeos de comprimento.

10. O método da modalidade 8 ou modalidade 9, em que a região "B" é 3 nucleotídeos mais curta do que a região "A".

11. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 7, em que a região "B" do *Primer* Estendido é o complemento de uma repetição direta de pelo menos uma parte da região "A".

12. O método da modalidade 11, em que a região "B" do *Primer* Estendido tem pelo menos 4 nucleotídeos de comprimento.

13. O método da modalidade 11 ou modalidade 12, em que a região "B" do *Primer* Estendido é 3 nucleotídeos mais curta do que a região "A".

14. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 11, em que a região "B" do *Primer* Estendido tem 7 a 15 nucleotídeos de comprimento.

15. O método da modalidade 14, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 6 a 12 nucleotídeos de comprimento.

16. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 8 a 10 nucleotídeos de comprimento.

17. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 6 nucleotídeos de comprimento.

18. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 7 nucleotídeos de comprimento.

19. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 8 nucleotídeos de comprimento.

20. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 9 nucleotídeos de comprimento.

21. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 10 nucleotídeos de comprimento.

22. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 11 nucleotídeos de comprimento.

23. O método da modalidade 15, em que a região “B” do *Primer* Estendido tem 12 nucleotídeos de comprimento.

24. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 23, em que o *Primer* Não Estendido não tem uma cauda estendida 5’.

25. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 23, em que o *Primer* Não Estendido tem uma cauda estendida 5’ de 3 nucleotídeos ou menos.

26. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 25, em que o *Primer* Não Estendido tem 12 a 35 nucleotídeos de comprimento.

27. O método da modalidade 26, em que o *Primer* Não Estendido tem 15 a 25 nucleotídeos de comprimento.

28. O método da modalidade 26, em que o *Primer* Não Estendido tem 18 a 20 nucleotídeos de comprimento.

29. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 28, em

que a região "A" do *Primer* Estendido tem 12 a 35 nucleotídeos de comprimento.

30. O método da modalidade 29, em que a região "A" do *Primer* Estendido tem 15 a 25 nucleotídeos de comprimento.

31. O método da modalidade 29, em que a região "A" do *Primer* Estendido tem 18 a 20 nucleotídeos de comprimento.

32. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 31, em que o *Primer* Estendido compreende uma região "C".

33. O método da modalidade 32, em que a região "C" tem 1-8 nucleotídeos de comprimento.

34. O método da modalidade 32 ou modalidade 33, em que a região "C", isoladamente ou em combinação com os nucleotídeos que flanqueiam a região "A" e/ou "B", forma um sítio de reconhecimento para uma endonuclease de restrição.

35. O método da modalidade 34, em que a endonuclease de restrição é uma *6-cutter*.

36. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 35, em que a T_m do *Primer* Estendido é maior do que a T_m do *Primer* Não Estendido em pelo menos 8°C.

37. O método da modalidade 36, em que a T_m do *Primer* Estendido é maior do que a T_m do *Primer* Não Estendido em 10°C a 30°C.

38. O método da modalidade 37, em que a T_m do *Primer* Estendido é maior do que a T_m do *Primer* Não Estendido em 15°C a 30°C.

39. O método da modalidade 38, em que a T_m do *Primer* Estendido é maior do que a T_m do *Primer* Não Estendido em 12°C a 20°C.

40. O método da modalidade 39, em que a T_m do *Primer* Estendido é maior do que a T_m do *Primer* Não Estendido em 13°C a 17°C.

41. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 40, em que a T_m do *Primer* Estendido varia entre 68°C e 80°C.

42. O método da modalidade 41, em que a T_m do *Primer* Estendido é entre 73°C e 77°C.

43. O método da modalidade 42, em que a T_m do *Primer* Estendido é 75°C.

44. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 43, em que a T_m do *Primer* Não Estendido varia entre 50°C e 62°C.

45. O método da modalidade 44, em que a T_m do *Primer* Não Estendido é entre 58°C e 62°C.

46. O método da modalidade 45, em que a T_m do *Primer* Não Estendido é 60°C.

47. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 46, em que a T_m da região "A" do *Primer* Estendido varia entre 50°C e 62°C.

48. O método da modalidade 47, em que a T_m da região "A" do *Primer* Estendido é entre 58°C e 62°C.

49. O método da modalidade 48, em que a T_m da região "A" do *Primer* Estendido é 60°C.

50. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 49, em que a T_m da região "A" do *Primer* Estendido e a T_m do *Primer* Não Estendido não variam mais do que 3°C.

51. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 50, em que a primeira temperatura é 95°C.

52. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 51, em que a segunda temperatura é 58°C.

53. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 52, em que a terceira temperatura é 72°C.

54. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 53, em que a quarta temperatura é 95°C.

55. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 54, em que a quinta temperatura é 72°C.

56. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 55, em

que os amplicons de DNA estendidos a partir do *Primer* Não Estendido e do *Primer* Estendido na mistura intermediária hibridizam-se entre si para formar amplicons fita dupla de DNA.

57. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 56, em que os amplicons de DNA, produzidos pela reação PCR, variam de 100 a 2.500 nucleotídeos de comprimento.

58. O método da modalidade 57, em que os amplicons de DNA, produzidos pela reação PCR, variam de 200 a 2.000 nucleotídeos de comprimento.

59. O método da modalidade 57, em que os amplicons de DNA, produzidos pela reação PCR, variam de 250 a 1.500 nucleotídeos de comprimento.

60. O método da modalidade 57, em que os amplicons de DNA, produzidos pela reação PCR, variam de 300 a 1.000 nucleotídeos de comprimento.

61. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 60, em que a amostra de ácido nucleico é uma amostra de ácido nucleico em teste.

62. O método da modalidade 61, em que a amostra de ácido nucleico em teste contém ou está em risco de conter ou é suspeita de conter moléculas do ácido nucleico alvo.

63. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 60, em que a amostra de ácido nucleico é uma amostra de ácido nucleico controle.

64. O método da modalidade 63, em que a amostra de ácido nucleico controle é uma amostra de controle positivo conhecida por conter molécula(s) de ácido nucleico alvo.

65. O método da modalidade 63, em que a amostra de ácido nucleico controle é uma amostra de controle positivo conhecida por conter moléculas do ácido nucleico alvo.

66. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 65, que é uma reação PCR multiplex.

67. O método da modalidade 66, em que a mistura inicial compreende pelo menos dois Pares de *Primers* Assimétricos.

68. O método da modalidade 67, em que a mistura inicial compreende dois, três ou quatro Pares de *Primers* Assimétricos.

69. O método de qualquer uma das modalidades 61 to 68, em que a mistura inicial compreende ainda *primers* controle.

70. O método da modalidade 69, em que os *primers* controle são complementares a uma sequência alvo que é diferente da(s) sequência(s) alvo à(s) qual/quais o(s) Par(es) de *Primers* Assimétricos(s) é/são complementar(es).

71. O método da modalidade 69 ou modalidade 70, em que os *primers* controle são *primers* padrão.

72. O método da modalidade 69 ou modalidade 70, em que os *primers* controle um Par de *Primers* Assimétricos.

73. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 72, em que a PCR é realizada na ausência de um *Primer* Genérico.

74. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 73, em que a primeira fase compreende 20-40 rodadas de ciclagem térmica.

75. O método da modalidade 74, em que a segunda fase compreende 30-37 rodadas de ciclagem térmica.

76. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 75, em que a primeira fase resulta em amplificação exponencial de ambas as fitas do ácido nucleico alvo.

77. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 76, em que a segunda fase compreende 15-25 rodadas de ciclagem térmica.

78. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 77, em que a segunda fase resulta em amplificação linear de uma única fita do ácido nucleico alvo.

79. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 78, em que a concentração do *Primer* Estendido e do *Primer* Não Estendido na mistura inicial variam entre 200 nM e 6 μ M.

80. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 79, em que a concentração do *Primer* Estendido e do *Primer* Não Estendido na mistura inicial são iguais.

81. O método da modalidade 80, em que a concentração do *Primer* Estendido e do *Primer* Não Estendido na mistura inicial variam entre 100 nM e 1000 nM.

82. O método da modalidade 81, em que a concentração do *Primer* Estendido e do *Primer* Não Estendido na mistura inicial variam entre 250 nM e 750 nM.

83. O método da modalidade 82, em que a concentração do *Primer* Estendido e do *Primer* Não Estendido na mistura inicial são aproximadamente 500 nM.

84. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 79, em que as concentrações do *Primer* Estendido e do *Primer* Não Estendido na mistura inicial são diferentes.

85. O método da modalidade 84, em que a concentração do *Primer* Estendido na mistura inicial varia entre 1 μ M e 6 μ M.

86. O método da modalidade 84 ou modalidade 85, em que a concentração do *Primer* Não Estendido na mistura inicial varia entre 50 nM e 200 nM.

87. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 86, em que o *Primer* Estendido é marcado.

88. O método da modalidade 87, em que o *Primer* Estendido é marcado em sua extremidade 5'.

89. O método da modalidade 87 ou modalidade 88, em que a marcação é um fluoróforo.

90. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 89, em

que o Par de *Primers* Assimétricos compreende sequências complementares a sequências bacterianas.

91. O método da modalidade 90, em que as sequências bacterianas são sequências de DNA de 16S.

92. O método da modalidade 90, em que as sequências bacterianas são sequências bacterianas de DNA da região interna transcrita.

93. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 89, em que o Par de *Primers* Assimétricos compreende sequências complementares a sequências do DNA de fungos.

94. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 93, em que a amostra é uma amostra biológica.

95. O método da modalidade 94, em que a amostra biológica é de sangue ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo.

96. O método da modalidade 94, em que a amostra biológica é de líquido de diálise peritoneal ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo.

97. O método da modalidade 94, em que a amostra biológica é de urina ou uma amostra processada, extraída ou fracionada da mesma.

98. O método da modalidade 94, em que a amostra biológica é de escarro ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo.

99. O método da modalidade 94, em que a amostra biológica é um esfregaço de ferida ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo.

100. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 93, em que a amostra é uma amostra ambiental.

101. O método de qualquer uma das modalidades 1 a 100, o

qual compreende ainda detectar o amplicon fita simples da PCR.

102. O método da modalidade 101, o qual compreende hibridizar o amplicon fita simples da PCR com uma molécula de sonda e detectar a hibridização do amplicon com a molécula de sonda.

103. O método da modalidade 102, em que a molécula de sonda é marcada.

104. O método da modalidade 103, em que a molécula de sonda é marcada com um fluoróforo.

105. O método de qualquer uma das modalidades 102 a 104, em que a molécula de sonda é complementar a pelo menos uma parte do *Primer* Estendido.

106. O método da modalidade 105, em que a molécula de sonda tem pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento.

107. O método da modalidade 105 ou modalidade 106, em que a molécula de sonda possui uma região de complementaridade a pelo menos 8 nucleotídeos da região "A" do *Primer* Estendido.

108. O método de qualquer uma das modalidades 102 a 104, em que a molécula de sonda é complementar a pelo menos uma parte do *Primer* Não Estendido.

109. O método da modalidade 108, em que a molécula de sonda tem pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento.

110. O método da modalidade 108 ou modalidade 109, em que a molécula de sonda possui uma região de complementaridade a pelo menos 8 nucleotídeos da região "A" do *Primer* Estendido.

[0096] Embora várias modalidades específicas tenham sido ilustradas e descritas, será reconhecido que várias alterações podem ser efetuadas sem, contudo, se afastar do espírito e âmbito da invenção.

7. Citação de referências

[0097] Todas as publicações, patentes, pedidos de patentes e outros documentos citados neste pedido de patente são ora incorporados,

em suas totalidades, por referência para todos os efeitos, na mesma medida em que o seriam se cada publicação, patente, pedido de patente ou outro documento tivesse sido individualmente indicado para ser incorporado por referência para todos os efeitos. Em caso de incoerência entre os ensinamentos de uma ou mais das referências ora incorporadas e a presente invenção, os ensinamentos do presente relatório descritivo prevalecerão.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de amplicons fita simples de DNA via uma reação em cadeia da polimerase (PCR) assimétrica, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) submeter uma mistura inicial a uma primeira fase de ciclagem térmica sob condições para amplificação por PCR, a dita mistura inicial compreendendo:

- (i) uma amostra de ácido nucleico;
- (ii) um Par de *Primers* Assimétricos,
- (iii) uma DNA polimerase termoestável e
- (iv) Reagentes da PCR,

em que a primeira fase de ciclagem térmica compreende a ciclagem através de pelo menos três temperaturas, as ditas três temperaturas compreendendo:

(1) uma primeira temperatura acima da T_m do ácido nucleico alvo para desnaturação,

(2) uma segunda temperatura abaixo da T_m do *Primer* Não Estendido para anelamento de *primers* e

(3) uma terceira temperatura adequada para extensão pela DNA polimerase termoestável,

produzindo, assim, uma mistura intermediária, a dita mistura intermediária compreendendo amplicons de DNA estendidos a partir do *Primer* Não Estendido e do *Primer* Estendido se o ácido nucleico alvo estiver presente na amostra;

(b) submeter a mistura intermediária a uma segunda fase de ciclagem térmica, a dita segunda fase de ciclagem térmica compreendendo a ciclagem através de:

(1) uma quarta temperatura acima da T_m dos amplicons fita dupla de DNA para desnaturação,

(2) uma quinta temperatura que é:

(i) abaixo da T_m do *Primer* Estendido,
(ii) acima da T_m do *Primer* Não Estendido e
(iii) adequada para extensão pela DNA polimerase termoestável,

produzindo, assim, uma mistura final, a dita mistura final compreendendo amplicons fita simples de DNA se o ácido nucleico alvo estiver presente na amostra.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (a) é precedida por um período de desnaturação inicial, opcionalmente em que a desnaturação inicial é realizada na primeira temperatura.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é seguida por um período de extensão adicional, opcionalmente em que a extensão adicional é realizada na quinta temperatura.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira e a quarta temperatura são iguais e/ou a terceira e a quinta temperatura são iguais.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região "B" do *Primer* Estendido é o complemento de uma repetição invertida de pelo menos uma parte da região "A" ou é o complemento de uma repetição direta de pelo menos uma parte da região "A".

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o *Primer* Não Estendido não tem uma cauda estendida 5' ou tem uma cauda estendida 5' de 3 nucleotídeos ou menos.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o *Primer* Estendido compreende uma região "C", opcionalmente em que a região "C", isoladamente ou em combinação com os nucleotídeos que flanqueiam a região "A" e/ou "B", forma um sítio de

reconhecimento para uma endonuclease de restrição.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a T_m do *Primer* Estendido é maior do que a T_m do *Primer* Não Estendido em pelo menos 8°C.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a T_m da região "A" do *Primer* Estendido e a T_m do *Primer* Não Estendido não variam mais do que 3°C.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

- (a) a primeira temperatura é 95°C;
- (b) a segunda temperatura é 58°C;
- (c) a terceira temperatura é 72°C;
- (d) a quarta temperatura é 95°C;
- (e) a quinta temperatura é 72°C; ou
- (f) qualquer combinação de (a)-(e).

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os amplicons de DNA estendidos a partir do *Primer* Não Estendido e do *Primer* Estendido na mistura intermediária hibridizam-se entre si para formar amplicons fita dupla de DNA.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra de ácido nucleico é uma amostra de ácido nucleico em teste.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra de ácido nucleico é uma amostra de ácido nucleico controle.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é uma reação PCR multiplex.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a PCR é realizada na ausência de um *Primer* Genérico.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que a primeira fase resulta em amplificação exponencial de ambas as fitas do ácido nucleico alvo e/ou a segunda fase resulta em amplificação linear de uma única fita do ácido nucleico alvo.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o Par de *Primers* Assimétricos compreende sequências complementares a sequências bacterianas ou sequências do DNA de fungos.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra biológica, opcionalmente em que a amostra biológica é:

(a) de sangue ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo;

(b) de líquido de diálise peritoneal ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo;

(c) de urina ou uma amostra processada, extraída ou fracionada da mesma;

(d) de escarro ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo; ou

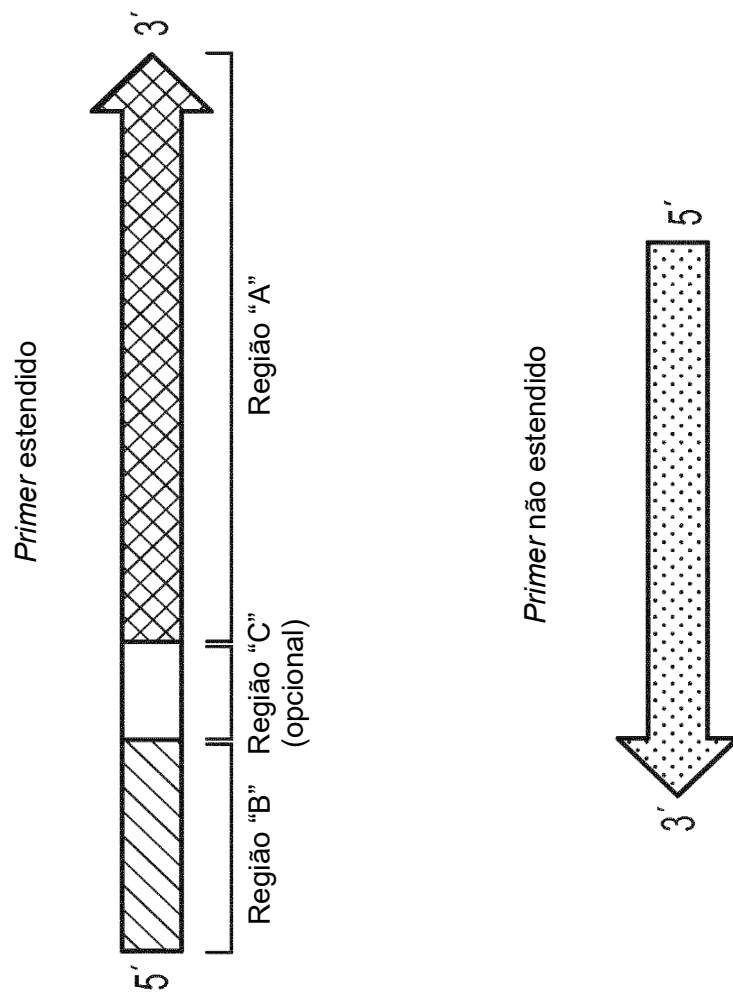
(e) do esfregaço de uma ferida ou uma amostra processada, extraída ou fracionada do mesmo.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra ambiental.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda detectar o amplicon fita simples da PCR.

Figura 1

PAR DE PRIMERS ASSIMÉTRICOS



Hibridização intermolecular de *primers* estendidos

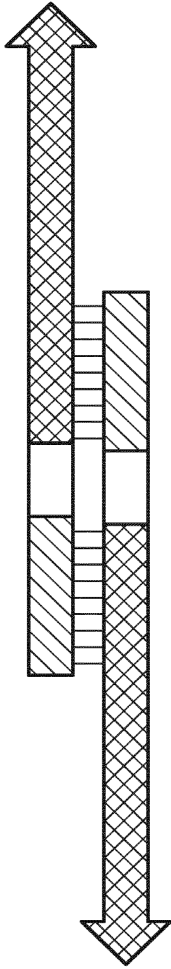


Figura 2A

Figura 2B

Hibridização intramolecular de *primers* estendidos

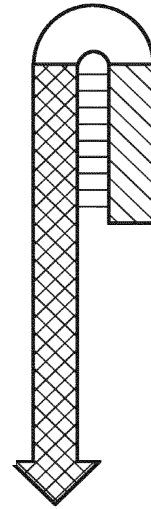
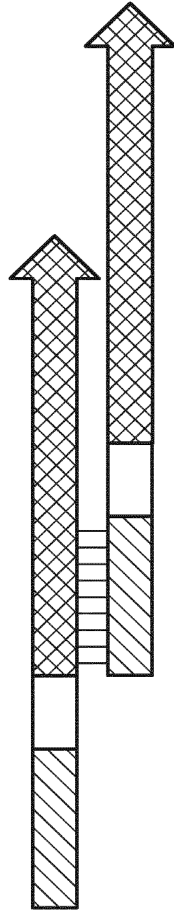


Figura 2C

Figura 3

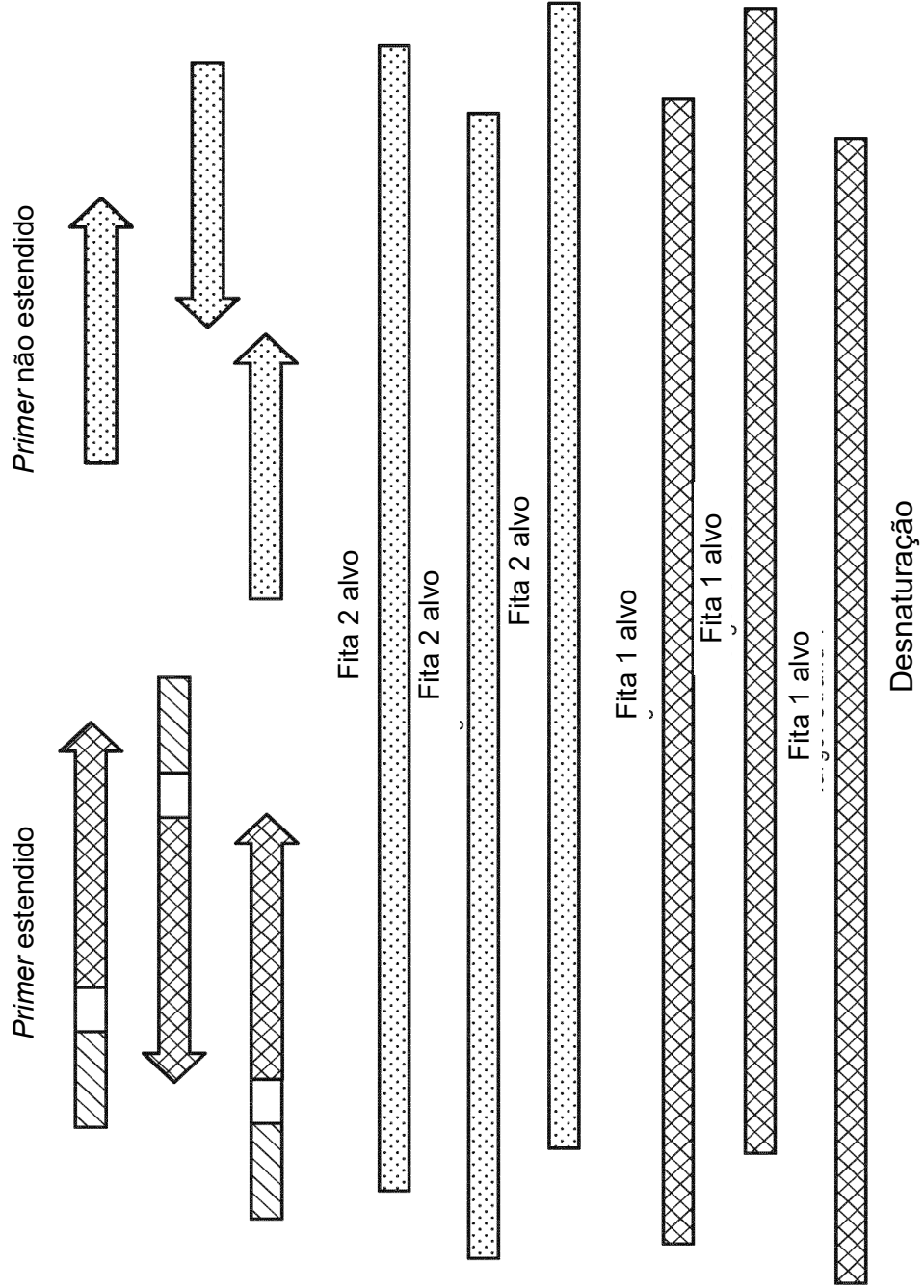


Figura 4

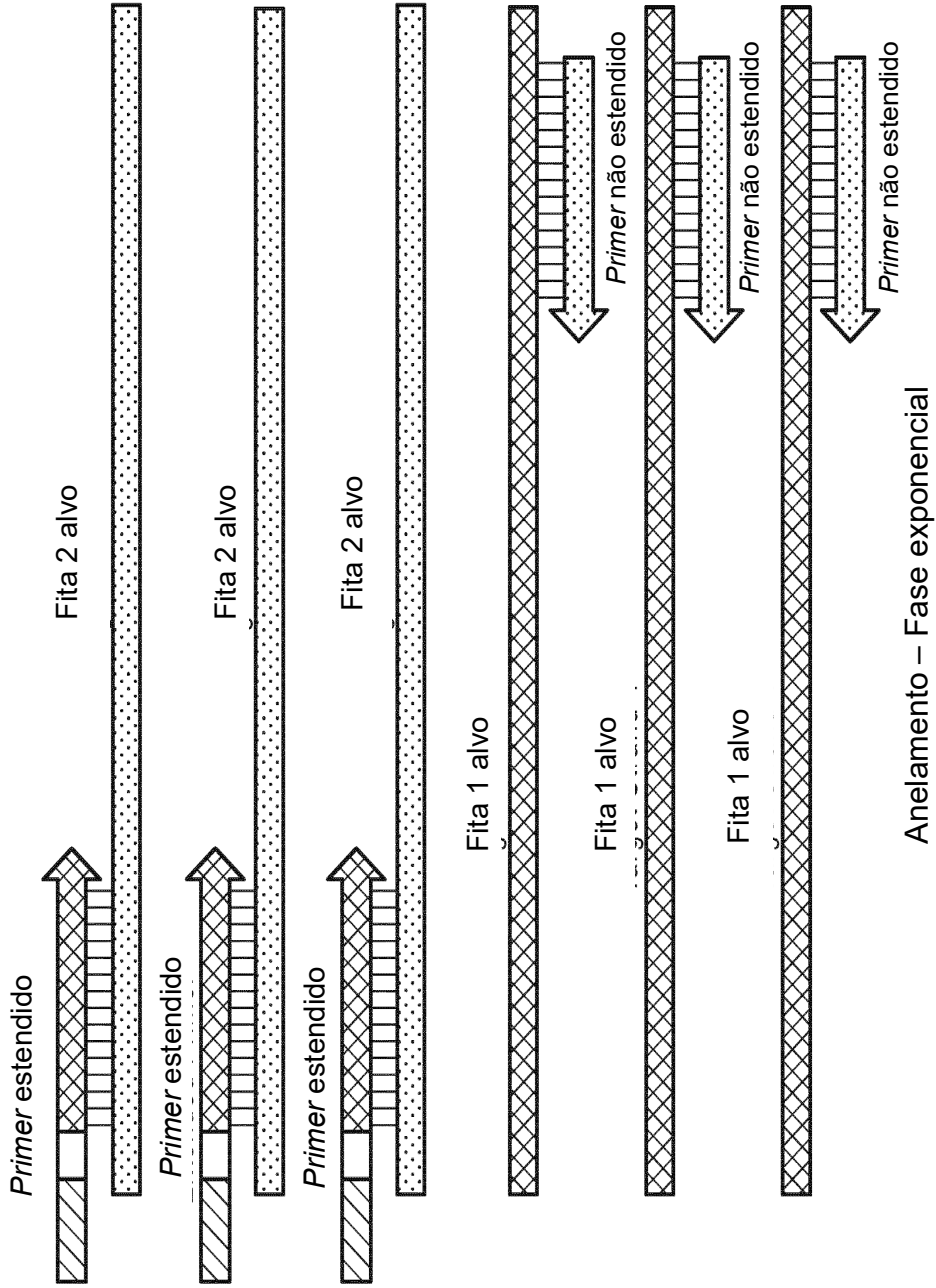
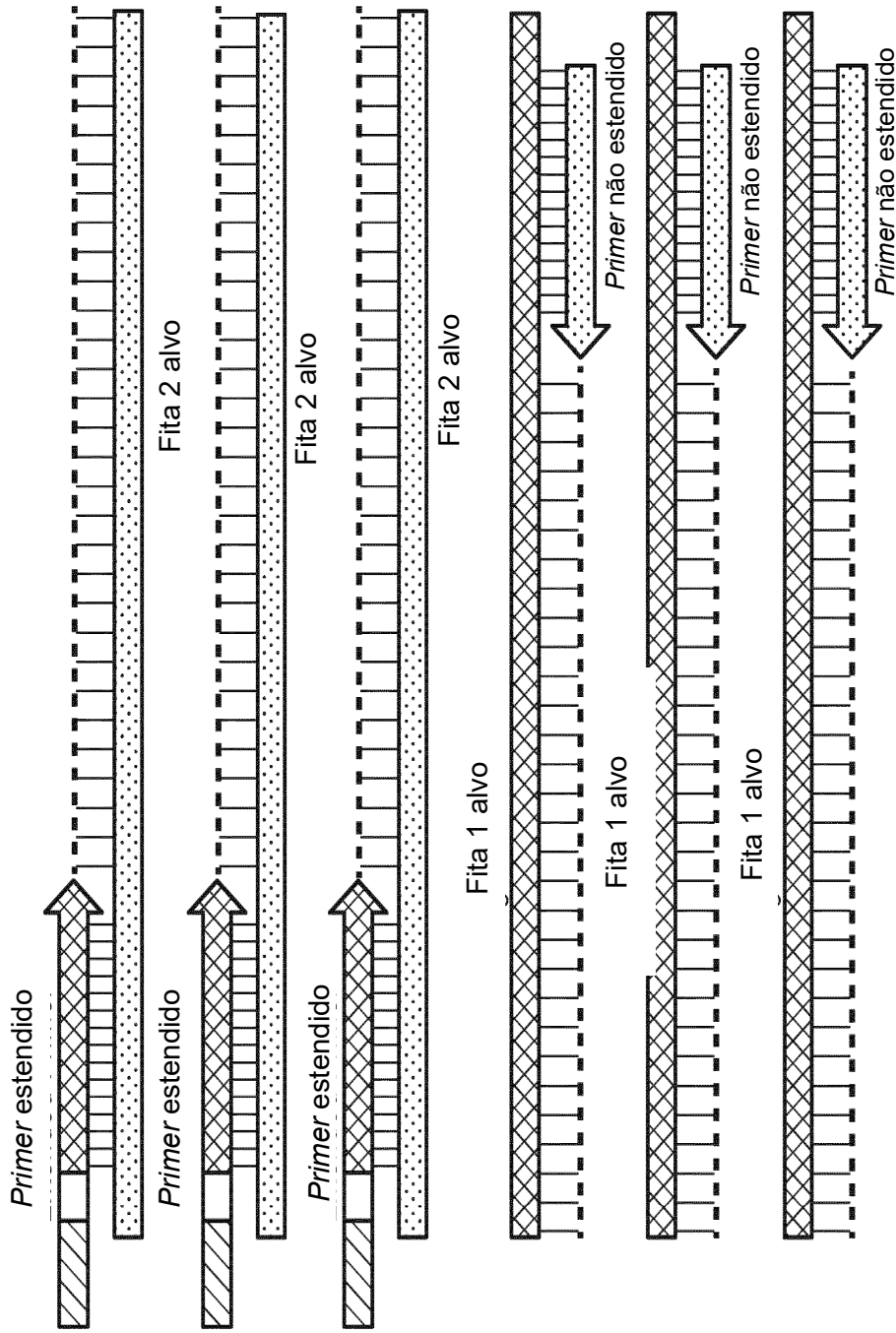
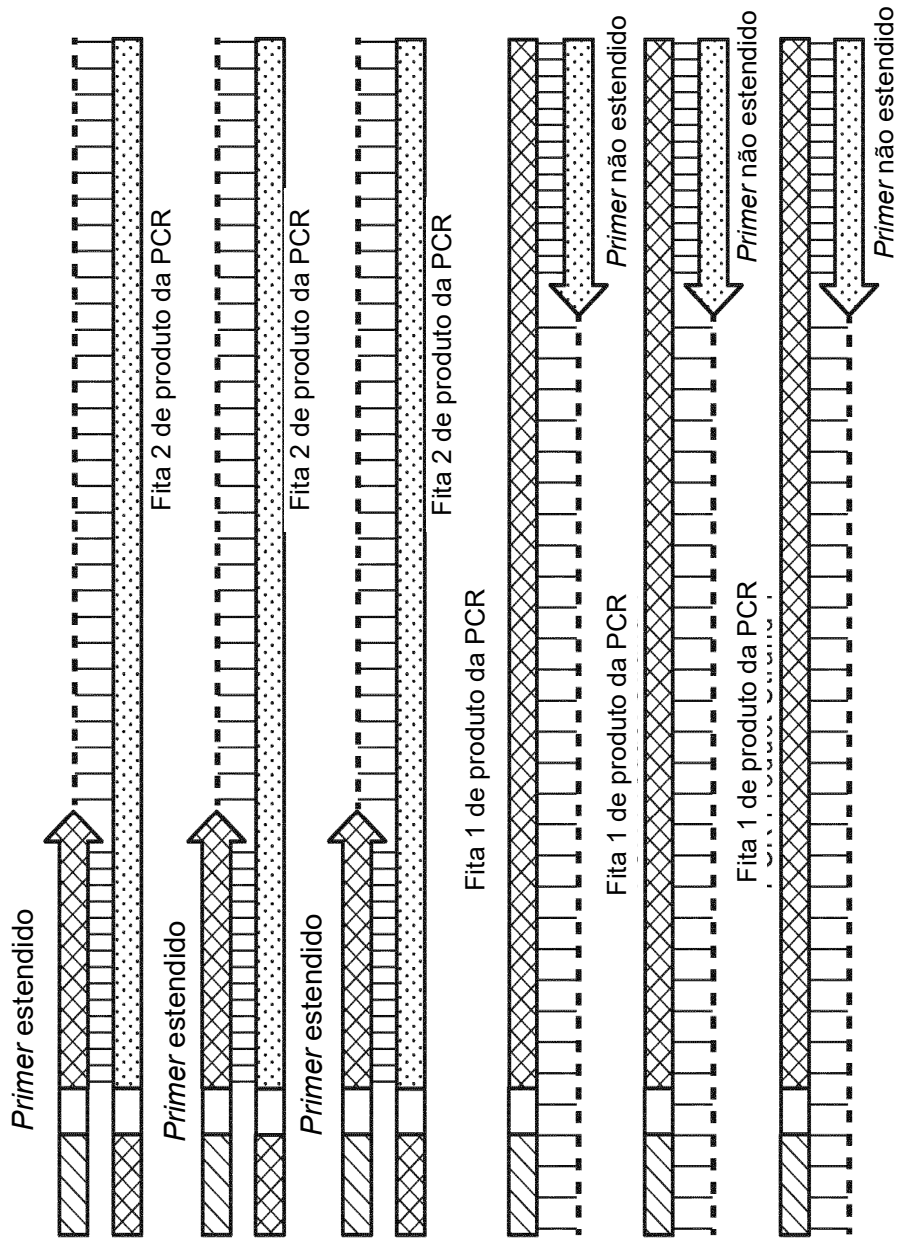


Figura 5A



Anelamento – Fase exponencial (a partir do ácido nucleico alvo)

Figura 5B



Anelamento – Fase exponencial (a partir do produto da PCR)

Figura 6

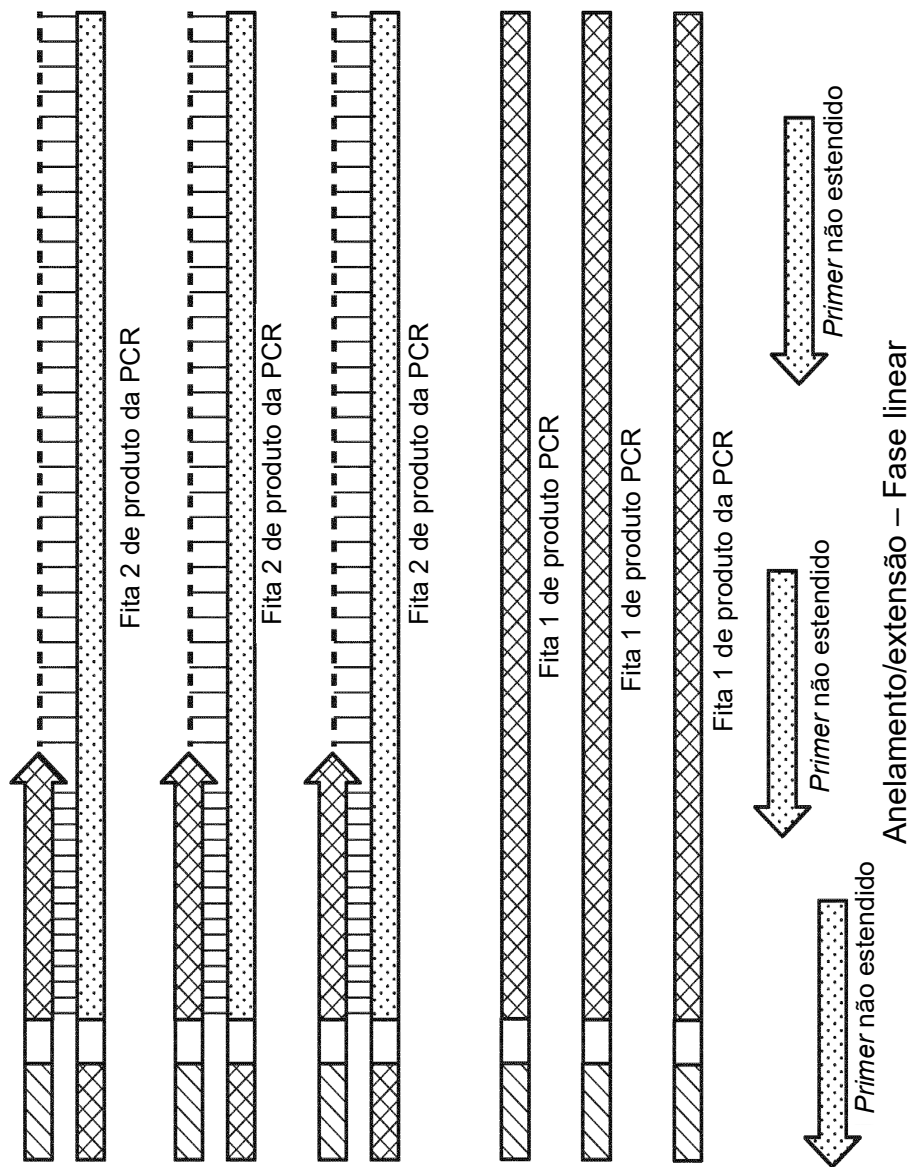


Figura 7A

TACCTGGTTGATCCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAAGCCATGCATGTGTAAAGTATGAAC
AAATTCAGACTGTGAAAACCTGGGAATGGCTCATTAATAAGTTAGTT**TGTTGATGGTATCTACTACTC**
GGATAACCCGTAGTAATCTAGAGCTAATACGTGCCAACAAACCCCGACTTCTGGAAGGGATGCATTTATTA
GATAAAAGGTCGACCGGGCTCTGCTGCTGCGATGATTCATGATAACTCGACGGATCGCACGGCCATCGT
GCCGGCGACGCATCATTCAAATTTCTGCCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCATCCATGGTGG
TGACGGGTGACGGAGAAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCACATCCAAAGGA
AGCAGCAGGGCGCAAAATTACCCAAATCCTGACACGGGGAGGTAGTGACAAATAAATAACAATACCCGGCT
CTATGATCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAAACGAGGATCCATTTGGAGGGCAAGTCTG
GTGCCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATAATTTAAAGTTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG
TTGGACTTTGGGATGGCCGGCCGGTCCGCCCTAGGTGTGCACCCGGTCTCGTCCCTTCTGTCCGGCGA
TGCCTCCTGGCTTAAATGGCCGGGTCTGCCCTCCGGCTGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGTCAA
AGCAAGCCTACGCTCTGTATACATTAGCATGGGATAACATATAGGATTTCCGGTCCATTACGTTGGCCT
TCGGGATCGGAGTAAATGATTAACAGGGACAGTCGGGGGCAATTCGTATTTCAATAGTCAGAGGTGAAATTC
TGGATTTATGAAAGACGAAACAACCTGCCAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCAATTAACAAGAACGAAAGT
TGGGGCTCGAAAGACGATCAGATACCGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACCCAGGATCGGGCGGA
TGTTCCTTTAGGACTCCGGCCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTTGGTTCCGGGGGAGTATGGTC
GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAAATGACGGAAAGGCCACCACAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAAATTTGACT
CAACACGGGAAACTTACAGGTCAGACATAGTAAGGATTGACAGACTGAGAGCTCTTTCTTGATTTA
TGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAAACGAGA
CCTCAGCCTGCTAACTAGCTATGCGGAGGTATCCCTTCGGGCCAGCTCTTAGAGGGACTAGCCCTTTA
GGCCGGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGCTGTGTGATGCCCCTTAGATGTTCTGGGCCACCGCCGCTACAC
TGATGATTTCAACGAGCTTATAGCCTTGCCGACAGGCCCGGGTAACTTTGAAATTTCACTCGTGTGGGG
ATAGATCATTGCAATTTGGTCTTCAACGAGGAAATTCCTAGTAAGCCGAGTCAATCAGCTCCGCTTGAC
TACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCCTCGCTCCTACCGATTGAATGATCCGGTGAAATGTTCCGGAT
CGCGCGACGTGGGGGTTTCGTGCCCGCGACGTCCGGGAGAGTCCATTTGAACCTTATCATTTAGAGGAA
GGAGAAATCGTAAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTTCCGGGAAAGGATCATT

Figura 7B

Primer forward estendido

CAT CAA ACA TG TTT GAT GGT ATC TAC TAC TCG GAT AAC CG

Primer reverse não estendido

GCG ATC CGT CGA GTT ATC ATG AAT C

Figura 8

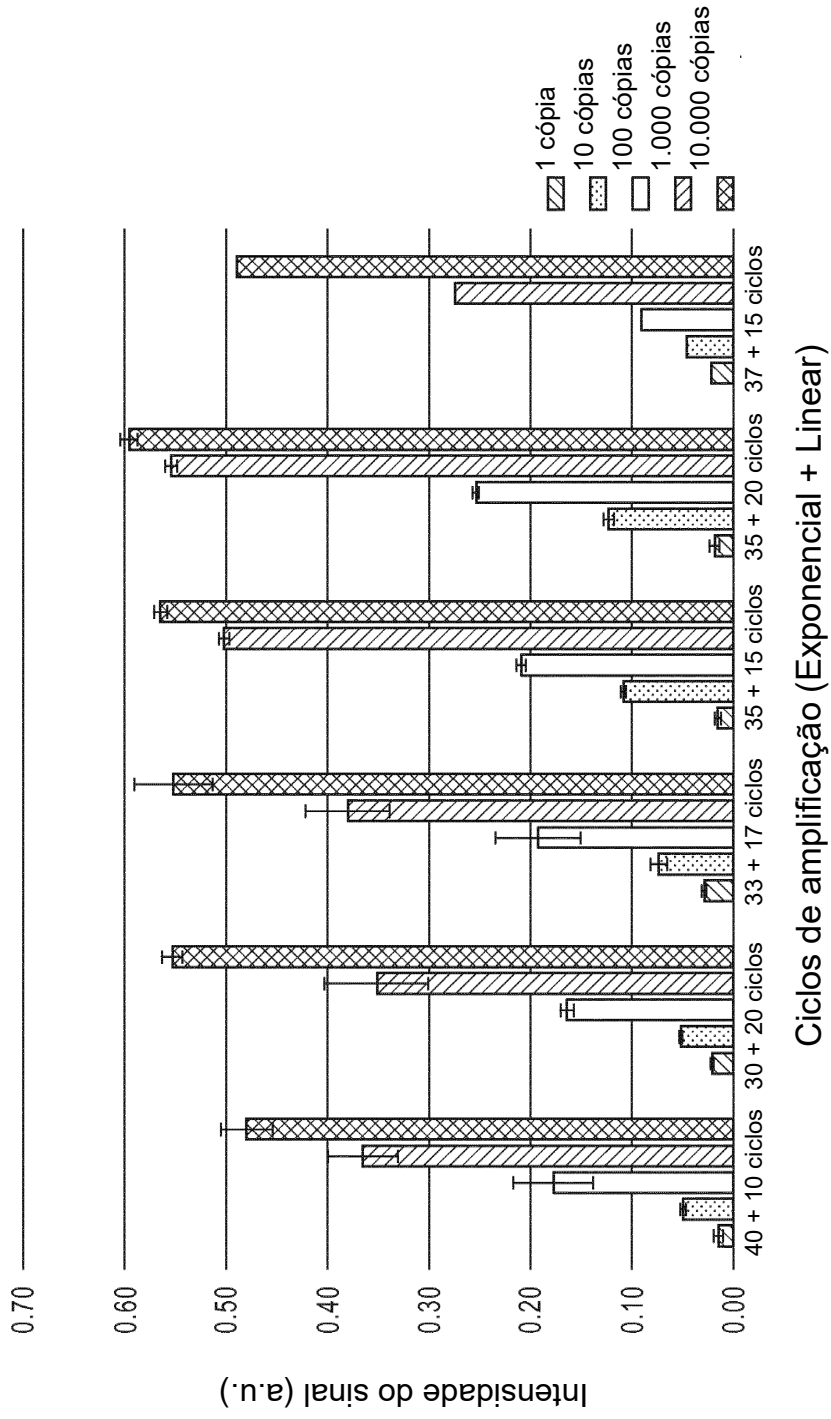
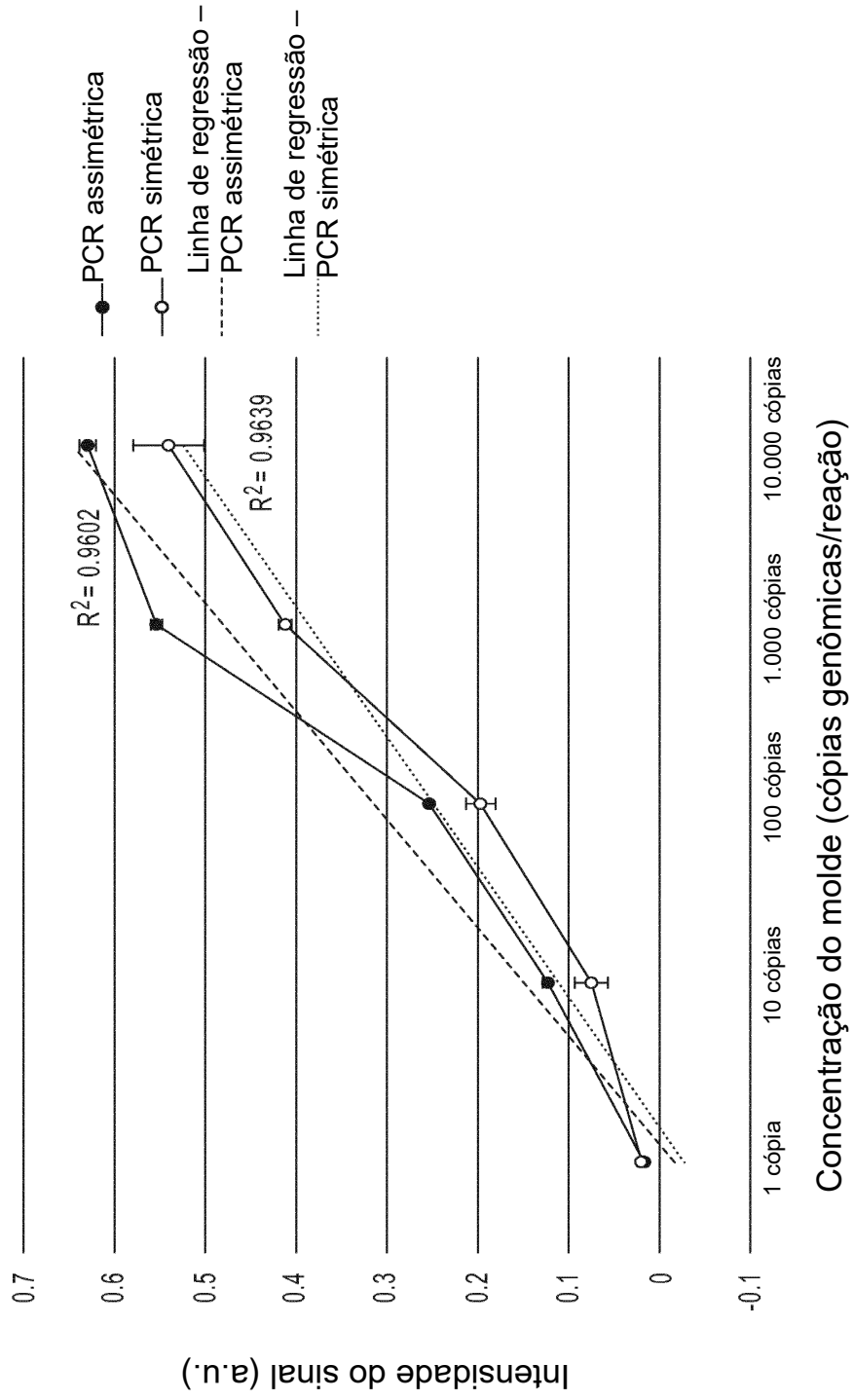


Figura 9



RESUMO

Patente de Invenção: **“MÉTODOS DE PCR ASSIMÉTRICA”**.

A presente invenção refere-se a um método de amplificação por PCR assimétrica para preparação do produto de fita simples, e *primers* e kits úteis para o mesmo.