



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL



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

## CARTA PATENTE N.º PI 0111992-3

*Patente de Invenção*

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito : PI 0111992-3

(22) Data do Depósito : 15/06/2001

(43) Data da Publicação do Pedido : 20/12/2001

(51) Classificação Internacional : C12Q 1/68; G01N 33/53; C07H 19/00; C07H 21/04

(30) Prioridade Unionista : 15/06/2000 US 09/594,839

(54) Título : Métodos para detectar um ácido nucleico alvo por captura de híbrido de tipo específico

(73) Titular : DIGENE CORPORATION, Sociedade Norte Americana. Endereço: 1201 Clopper road Gaithersburg, Maryland 20878, Estados Unidos (US).

(72) Inventor : JAMES ANTHONY. Endereço: 901 Red Cedar CT., Frederick, MD 21701, Estados Unidos. Cidadania: Norte Americana.; ATTLA LORINCZ. Endereço: 6 Chinaberry Court, North Potomac, MD 20878, Estados Unidos. Cidadania: Norte Americana.; INNA WILLIAMS. Endereço: 504 Car Ave., Rockville, MD 20850, Estados Unidos. Cidadania: Norte Americana.; JOHN TROY. Endereço: 10725 West Dr., #204, Fairfax, VA 22030, Estados Unidos. Cidadania: Norte Americana.; YANGLIN TANG. Endereço: 10621 Tuppence CT., Rockville, MD 20850, Estados Unidos. Cidadania: Norte Americana.

Prazo de Validade : 10 (dez) anos contados a partir de 04/11/2014, observadas as condições legais.

Expedida em : 4 de Novembro de 2014.

Assinado digitalmente por  
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira  
Diretor de Patentes

15 de Novembro  
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
de 1889

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA DETECTAR UM ÁCIDO NUCLEICO ALVO POR CAPTURA DE HÍBRIDO DE TIPO ESPECÍFICO"**.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5 Esta invenção se refere ao campo dos métodos de detecção de ácido nucleico em geral e mais particularmente se refere à detecção de ácidos nucleicos por método de captura de híbrido de alvo específico.

**FUNDAMENTO DA INVENÇÃO**

10 A detecção de sequências de ácido nucleico presentes em uma amostra biológica é importante para identificar e classificar microorganismos, diagnosticando doenças infecciosas, detectando e caracterizando anormalidades genéticas, identificando alterações genéticas associadas com câncer, estudando a suscetibilidade genética a doença, e avaliando a resposta a vários tipos de tratamento. Uma técnica comum para detectar e quantificar  
15 sequências de ácido nucleico específicas é a hibridização de ácido nucleico.

Vários métodos de hibridização estão disponíveis para a detecção e estudo de ácidos nucleicos. Em um método de hibridização tradicional, os ácidos nucleicos a serem identificados estão em uma solução ou afixados  
20 em um veículo sólido. Os ácidos nucleicos são detectados empregando sondas de ácido nucleico rotuladas que são capazes de hibridizarem-se para os ácidos nucleicos. Recentemente, novos métodos de hibridização foram desenvolvidos para aumentar a sensibilidade e especificidade da detecção. Um exemplo é o método de captura de híbrido descrito no Pedido de Patente  
25 U.S. nº de série 07/792.585. Embora estes novos métodos de hibridização ofereçam melhoras significantes sobre os métodos tradicionais, eles ainda necessitam da capacidade de completamente discriminarem-se entre as sequências de ácido nucleico altamente homólogas.

É portanto um objetivo da presente invenção fornecer um método  
30 de hibridização que não é apenas rápido e sensível, porém é também altamente específico e capaz de discriminar as sequências alvo de ácido nucleico altamente homólogas.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece um novo método de detecção de ácido nucléico, referido aqui como captura de híbrido de alvo específico ("TSHC"). TSHC é um método altamente específico e sensível que é capaz de discriminar e detectar seqüências alvo de ácido nucléico altamente ho-  
5 mólogas.

Em uma modalidade, o método refere-se a detecção de um áci- do nucléico alvo onde o ácido nucléico alvejado, que é de filamento único ou parcialmente de filamento único, é hibridizado simultaneamente, ou se-  
10 qüencialmente, em uma sonda de seqüência de captura e uma sonda de seqüência de sinal não-rotulada. Estas sondas hibridizam-se em regiões de não-sobreposição do ácido nucléico alvo e não umas às outras de modo que os híbridos de filamento duplo sejam formados. Os híbridos são captu- rados em uma fase sólida e detectados. Em uma modalidade preferida, um  
15 híbrido de DNA/RNA é formado entre o ácido nucléico alvo e a sonda de seqüência de sinal. Empregando este método, a detecção pode ser execu- tado, por exemplo, ligando-se um anticorpo rotulado capaz de reconhecer um híbrido de DNA/RNA ao híbrido de filamento duplo, desse modo detec- tando o híbrido.

Em outra modalidade, a sonda de seqüência de sinal emprega- da no método de detecção é uma molécula de ácido nucléico que compre- ende um dúplex de DNA/RNA e uma seqüência de ácido nucléico de fila-  
20 mento único que é capaz de hibridizar-se para o ácido nucléico alvo parci- almente de filamento único ou de filamento único. A detecção pode ser exe- cutada, por exemplo, ligando-se um anticorpo rotulado capaz de reconhecer a porção dúplex de DNA/RNA da sonda de seqüência de sinal, desse modo detectando o híbrido formado entre o ácido nucléico alvo, a sonda de se-  
25 qüência de captura e a sonda de seqüência de sinal.

Em ainda outra modalidade da invenção, a sonda de seqüência de sinal empregada no método de detecção é uma molécula que não con-  
30 têm seqüências que são capazes de hibridizarem para o ácido nucléico alvo parcialmente de filamento único ou de filamento único. As sondas em ponte

compreendendo seqüências que são capazes de hibridizarem para o ácido nucléico alvo bem como as seqüências que são capazes de hibridizarem para a sonda de seqüência de sinal são empregadas. Nesta modalidade, a sonda de seqüência de sinal compreende uma porção dúplex de DNA/RNA e uma porção de seqüência de DNA de filamento único contendo seqüências complementares às seqüências dentro da sonda em ponte. A sonda em ponte, que hibridiza igualmente o ácido nucléico alvo e a sonda de seqüência de sinal, portanto serve como um intermediário para conectar a sonda de seqüência de sinal ao ácido nucléico alvo e a sonda de seqüência de captura hibridizada para o ácido nucléico alvo.

Em outra modalidade do método de TSHC da invenção, sondas bloqueadoras compreendendo oligonucleotídeos complementares às sondas de seqüência de captura são empregadas no método para eliminar o excesso de sonda de seqüência de captura, desse modo reduzindo o sinal de base na detecção e aumentando a especificidade do ensaio.

A presente invenção também refere-se a novas sondas. Estas sondas são seqüências de ácido nucléico que podem funcionar em vários ensaios de hibridização, incluindo, por exemplo, o ensaio de TSHC.

#### BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO

A figura 1 é um diagrama esquemático ilustrando uma modalidade do método de captura de híbrido de alvo específico.

A figura 2 é um diagrama esquemático ilustrando uma modalidade do método de captura de híbrido de alvo específico.

A figura 3 é um diagrama esquemático ilustrando possíveis mecanismos de ação de uma modalidade que empregam sonda de seqüência de captura fundidas na detecção de captura de híbrido de alvo específico.

A figura 4 mostra a sensibilidade analítica e especificidade de detecção de captura de híbrido de alvo específico de HSV-1.

A figura 5 mostra a sensibilidade analítica e especificidade de detecção de captura de híbrido de alvo específico de HSV-2.

A figura 6A-6D mostra as várias modalidades do método positivo de captura de híbrido de alvo específico.

A figura 7 mostra a modalidade de sonda de deleção do método de captura de híbrido de alvo específico.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A presente invenção fornece um método de detectar a presença de ácidos nucleicos em amostras de testes. Mais especificamente, a invenção fornece um método sensível e altamente específico que é capaz de discriminar e detectar seqüências de ácido nucleico altamente homólogas. Usos preferidos para esta invenção são bem-conhecidos pelo versado na técnica e podem ser aplicados para a detecção e discriminação de uma variedade de mutações incluindo, porém não limitadas a inserções, deleções, inversões, seqüências repetidas, e múltiplas bem como um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNPs). Adicionalmente, esta invenção pode também ser de grupo específico para a deleção de alvos de ácido nucleico que compartilham elementos de seqüência similar.

15 Qualquer fonte de ácido nucleico, em forma purificada ou não-purificada, pode ser utilizada como a amostra de teste. Por exemplo, a amostra de teste pode ser um produto agrícola ou alimento, ou um tipo clínico veterinário ou humano. Tipicamente, a amostra de teste é um fluido biológico tal como urina, sangue, plasma, soro, saliva ou similar. Alternativa-  
20 mente, a amostra de teste pode ser um tipo de tecido suspeito de transportar um ácido nucleico de interesse. O ácido nucleico alvo na amostra de teste pode estar presente inicialmente como uma molécula discreta a fim de que a seqüência a ser detectada constitua o ácido nucleico inteiro, ou possa apenas ser um componente de uma molécula maior. Não é necessário que  
25 a seqüência de ácido nucleico a ser detectada esteja presente inicialmente em uma forma pura. A amostra de teste pode conter uma mistura complexa de ácidos nucleicos, dos quais o ácido nucleico alvo possa corresponder a um gene de interesse contido em RNA ou DNA genômico humano total ou uma porção da seqüência de ácido nucleico de um organismo patogênico  
30 cujo organismo é um componente menor de uma amostra clínica.

O ácido nucleico alvo em uma amostra de teste pode ser DNA ou RNA, tal como RNA mensageiro, de qualquer fonte, incluindo bactéria,

levedura, vírus, e as células ou tecidos de organismos mais elevados tal como plantas e animais. Os métodos para a extração e /ou purificação de tais ácidos nucléicos são bem-conhecidos na técnica. Os ácidos nucléicos alvos podem ser de filamento único ou filamento duplo. No presente método, é preferido que os ácidos nucléicos alvos sejam de filamento único ou de filamento único preparado por técnicas de desnaturação convencionais antes das etapas de hibridização do método. Em uma modalidade preferida, a técnica de desnaturação de base é empregada para desnaturar o DNA alvo de filamento duplo.

10 O termo "oligonucleotídeo" como o termo é empregado aqui refere-se a uma molécula de ácido nucléico compreendida de dois ou mais desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos. Um oligonucleotídeo desejado pode ser preparado por qualquer método adequado, tal como purificação de um ácido nucléico de ocorrência natural, por meios biológicos moleculares. Exemplos de oligonucleotídeos são sondas de ácido nucléico descritas aqui.

15 Sondas de ácidos nucléicos são seqüências de ácido nucléico detectáveis que hibridizam para seqüências de DNA ou RNA complementares em uma amostra de teste. A detecção da sonda indica a presença de uma seqüência de ácido nucléico particular na amostra de teste. Em uma modalidade, o método de captura de híbrido de alvo específico emprega duas etapas de sonda de ácido nucléico: sonda de seqüência de captura (CSP) e a sonda de seqüência de sinal (SSP). Uma sonda de seqüência de captura compreende uma seqüência de ácido nucléico que é capaz de hibridizar para região(ões) única(s) dentro de um ácido nucléico alvo e sendo capturado para uma fase sólida de hibridização para regiões dentro de um ácido nucléico alvo que são adjacentes às regiões únicas reconhecidas pela CSP. As seqüências de CSP e SSP são selecionadas de modo que elas não hibridizariam para a mesma região de um ácido nucléico alvo ou uma a outra.

30 Em adição, a CSP e SSP são selecionadas para hibridizarem para regiões do alvo dentro de 50.000 bases de cada. A distância entre a seqüência para que a CSP hibridiza dentro do ácido nucléico alvo e a se-

qüência para qual a SSP hibridiza é preferivelmente entre 1 a 50.000 bases, mais preferivelmente, a distância é menor do que 3.000 bases. Mais preferivelmente, a distância é menor do que 1.000 bases.

A CSP empregada no método de detecção pode ser DNA, RNA, 5 ácido nucléicos de peptídeo (PNAs), ácido nucléicos bloqueados (LNAs), ou outros análogos de ácido nucléico. Um "ácido nucléico bloqueado" como definido aqui é uma nova classe de análogos de oligonucleotídeo que formam dúplex com DNA e RNA complementares com alta seletividade e estabilidade térmica. A liberdade conformacional usual do anel furanose em nucleosídeos padrão é restrita em LNAs devido ao ligante de metileno conectando a posição 2'-O à posição 4'-C. PNAs são oligonucleotídeos em que a cadeia principal de fosfato de açúcar é substituída por uma cadeia principal de poliamida ou "pseudopeptídeo". Em uma modalidade preferida, a CSP é DNA. A CSP tem um comprimento mínimo de 6 bases, preferivelmente entre 10 15 a 100 bases longas, e mais preferivelmente entre 20 a 40 bases longas. A CSP é substancialmente complementar à seqüência dentro de um ácido nucléico alvo a qual ele hibridiza. A seqüência de uma CSP é preferivelmente pelo menos 75% complementar à região de hibridização alvo, mais preferivelmente, 100% complementar a esta seqüência. É também preferido 20 que a CSP contenha menos do que ou igual a 75% de identidade de seqüência, mais preferível menos do que 50% de identidade de seqüência, em seqüências não desejadas acreditadas estarem presentes em uma amostra de teste. A seqüência dentro de um ácido nucléico alvo em que uma CSP liga-se é preferivelmente 6 bases longas, mais preferivelmente 20-40 bases 25 longas. Pode também ser preferido que as seqüências as quais a CSP hibridiza sejam seqüências únicas ou seqüências de grupos específicos. As seqüências de grupos específicos são seqüências relacionadas múltiplas que formam grupos discretos.

Em uma modalidade, a CSP no método de detecção pode conter 30 uma ou mais modificações no ácido nucléico que permite a captura específica da sonda para uma fase sólida. Por exemplo, a CSP pode ser modificada rotulando-a com pelo menos um ligante por métodos bem-conhecidos por

aqueles versados na técnica incluindo, por exemplo, tradução de corte, incorporação química ou fotoquímica. Em adição, a CSP pode ser rotulada em posições múltiplas com um ou mais tipos múltiplos de rótulos. Por exemplo, a CSP pode ser rotulada com biotina, que liga-se a estreptavidina; ou digoxigenina, que liga-se à antidigoxigenina; ou 2,4-dinitrofenol (DNP), que liga-se ao anti-DNP. Fluorogênios podem também ser empregados para modificar as sondas. Exemplos de fluorogênios incluem fluoresceína e derivados, ficoeritrina, alo-ficocianina, ficocianina, rodamina, Texas Red ou outros fluorogênios proprietários. Os fluorogênios são geralmente ligados por modificação química e ligam-se a um anticorpo específico de fluorogênio, tal como antífluoresceína. Será entendido por aqueles versados na técnica que a CSP pode também ser rotulada por incorporação de uma base modificada contendo qualquer grupo químico reconhecido por anticorpos específicos. Outros rótulos e métodos de seqüências de nucleotídeo de rotulação para captura em uma fase sólida revestida com substrato são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Uma revisão de rótulos de ácido nucléico pode ser encontrada no artigo por Landegren, e outro, "DNA Diagnostics-Molecular Techniques and Automation", Science, 242:229-237 (1988), que é incorporado aqui por referência. Em uma modalidade preferida, a CSP é rotulada com biotina em ambas as extremidades 3' e a 5' da seqüência de nucleotídeo. Em outra modalidade, a CSP não é modificada porém é capturada em um matriz sólida devido às seqüências contidas na CSP capaz de hibridização para a matriz.

A SSP empregada no método de detecção pode ser um DNA ou RNA. Em uma modalidade particular da invenção, a SSP e o ácido nucléico alvo formam um híbrido de DNA/RNA. Portanto, nesta modalidade, se o ácido nucléico alvo é um DNA, então a SSP preferida é um RNA. Similarmente, se o ácido nucléico alvo é RNA, então a SSP preferida é um DNA. A SSP é geralmente pelo menos 15 bases longas. Entretanto, a SSP pode ser até ou maior do que 1000 bases longas. As SSPs mais longas são preferidas. A SSP pode compreender um fragmento de ácido nucléico único, ou fragmentos de ácido nucléico menores múltiplos cada do qual está preferível-



mente entre 15 a 100 bases de comprimento.

Em outra modalidade, a SSP empregada no método de detecção compreende um dúplex de DNA/RNA e uma seqüência de ácido nucléico de filamento único capaz de hibridizar para o ácido nucléico alvo (Fig. 6 A). A SSP pode ser preparada primeiro clonando-se uma seqüência de DNA de filamento único complementar às seqüências dentro do ácido nucléico alvo em um vetor de DNA de filamento único, em seguida hibridizando o RNA complementar à seqüência de vetor de DNA, M13 DNA é hibridizado para a seqüência M13 DNA no vetor para gerar um dúplex de DNA/RNA. A SSP resultante contém uma posição dupla de DNA/RNA bem como uma porção de filamento único capaz de hibridizar para seqüências dentro do ácido nucléico alvo. O DNA de filamento único deveria ser pelo menos 10 bases longas, e podem ser até ou maior do que 1000 bases longas. Alternativamente, a porção dúplex de DNA/RNA da SSP pode ser formada durante ou após a reação em que a porção de filamento único da SSP ser hibridizada para o ácido nucléico alvo. A SSP pode ser linear, circular, ou uma combinação de duas ou mais formas. A porção dúplex de DNA/RNA da SSP fornece sinais amplificados para a detecção de híbridos capturados empregando anticorpos anti-DNA/RNA como aqui descrito.

Em ainda outra modalidade, a SSP empregada no método de detecção é uma molécula que não contém seqüências que são capazes de hibridizarem para o ácido nucléico alvo. Nesta modalidade, as sondas em ponte compreendendo seqüências capazes de hibridizarem para o ácido nucléico alvo bem como as seqüências capazes de hibridizarem para a SSP são empregadas. As sondas em ponte podem ser DNA, RNA, ácido nucléicos de peptídeo (PNAs), ácido nucléicos bloqueados (LNAs), ou outros análogos de ácido nucléico. Em uma modalidade (Fig. 6B), a SSP compreende uma porção dúplex de DNA/RNA e uma porção de filamento único contendo seqüências complementares as seqüências dentro da sonda em ponte. A sonda em ponte, que é capaz de hibridizar para igualmente o ácido nucléico alvo e a SSP, portanto serve como um intermediário para conectar a SSP ao ácido nucléico alvo e a CSP hibridizada para o ácido nucléico

alvo. A SSP pode ser preparada como acima descrito. Em outra modalidade (Fig. 6C), a SSP empregada no método de detecção compreende múltiplos grupos de seqüências de repetição bem como uma seqüência de RNA de filamento único capaz de hibridizar para a sonda em ponte. Uma sonda de oligonucleotídeo de DNA contendo seqüências complementares à SSP para gerar a dupla de RNA/DNA necessária o sinal de amplificação. Em ainda outra modalidade (Fig. 6D), a sonda em ponte contém uma cauda poli(A) em adição às seqüências que são capazes de hibridizarem para o ácido nucléico alvo. A SSP empregada neste exemplo compreende seqüências de DNA poli(dT). A sonda em ponte portanto é capaz de hibridizar para a SSP por meio de sua cauda poli(A). Uma sonda de RNA compreendendo seqüências poli(A) pode ser empregada para hibridizar para as seqüências de DNA de poli(dT) restantes dentro da SSP para formar um dúplex de RNA/DNA. A SSP compreendendo seqüências poli(dT) e a sonda de RNA compreendendo seqüências poli(A) são preferivelmente 100 a 5.000 bases longas.

A SSP empregada no método de detecção da invenção pode ser não-modificada ou modificada quando com a CSP empregando os métodos acima descritos e /ou conhecidos na técnica. Em uma modalidade preferida, a SSP é uma sonda covalentemente não-modificada.

É entendido que SSPs e /ou CSPs múltiplas podem ser empregadas no método de detecção da invenção.

Em outra modalidade, uma sonda de oligonucleotídeo compreendendo seqüências complementares de duas ou mais regiões distintas do ácido nucléico alvo são fundidas juntas e empregadas como a sonda de seqüência de captura no método da invenção. Alternativamente uma sonda simples pode ser designada e produzida a qual contém seqüências complementares aos ácidos nucléicos únicos ou múltiplos. Este tipo de sonda é também referida aqui como uma CSP "fundida". Como mostrado no exemplo 5, a sonda de seqüência de captura fundida funciona tão eficazmente como a combinação de duas CSPs fundidas quando empregadas na mesma concentração.

Em uma outra modalidade desta invenção, "sondas de ácido

nucléico de deleção" podem ser empregadas em TSHC. A fim de minimizar o número de padrões de transcrição necessários para serem construídos, as sondas de ácido nucléico de deleção, por exemplo RNA, são designadas tal que 1) o comprimento da sonda empregado é maximizado; e 2) as sondas são impedidas de sobrepor-se com a região alvejada pela CSP. Estas sondas de deleção contem deleções internas no padrão de ácido nucléico empregado para gerar as sondas. Em adição, estas sondas de deleção hibridizam para os alvos de ácido nucléico criando "bolhas" de ácido nucléico não-hibridizado que é acessível para hibridização de CSP. Este método também fornece um meio muito conveniente para preparar sondas uma vez que o ácido nucléico para o alvo completo possa ser clonado em um vetor de transcrição e em seguida as seqüência podem ser removidas logo que elas foram identificadas como regiões úteis para a hibridização da CSP. Em adição, este método permite o uso de sondas de genoma inteiras de comprimento quase total que não sobrepõem (isto é não hibridiza para a mesma região) com as CSPs. Qualquer kit de mutagênese comercialmente disponível pode ser empregado para projetar deleções alvejadas dentro de um padrão de transcrição. Tipicamente, as deleções do padrão de ácido nucléico empregadas para a síntese de SSP são realizadas diretamente com o padrão clonado no vetor de transcrição. As deleções no padrão são feitas tal que as seqüências sobrepondo a região hibridizada pela CSP são removidas. As deleções podem ser tão pequenas quanto a região de CSP propriamente dita, porém geralmente e mais preferivelmente, aproximadamente 100 a 300 nucleotídeos nas extremidades 3' e 5' da região hibridizada pela CSP são deletados. (ver Figura 7).

As sondas de ácido nucléico da invenção podem ser produzidas por qualquer método adequado conhecido na técnica, incluindo por exemplo, por síntese química, o isolamento de uma fonte de ocorrência natural, produção recombinante e PCR assimétrico (McCabe, 1990 In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, CA., Academic Press, 76-83). Pode ser preferido para quimicamente sintetizar as sondas em um ou mais segmentos e subseqüentemente ligar os segmentos. Diversos mé-

todos de síntese química são descritos por Narang e outro (1979 *Meth. Enzymol.* 68:90), Brown e outro (1979 *Meth. Enzymol.* 68:109) e Caruthers e outro (1985 *Meth. Enzymol.* 154-287), que são incorporados aqui por referência. Alternativamente, métodos de clonagem podem fornecer um frag-

5      mento de ácido nucléico conveniente que pode ser isolado para uso como um iniciador promotor. Uma sonda de DNA de filamento duplo é primeiro apresentada filamento único empregando, por exemplo, métodos de desnatura-

10      ção convencionais antes da hibridização para os ácidos nucléicos alvos.

            A hibridização é conduzida sob condições de hibridização padrão bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Condições de reação para hibridização de uma sonda em uma seqüência de ácido nucléico variam de sonda para sonda, dependendo dos fatores tal como comprimento da sonda, o número de nucleotídeos G e C na seqüência, e a composição do tampão utilizado na reação de hibridização. Condições de hibridização mo-

15      deradamente severas são geralmente entendidas por aqueles versados na técnica como condições de aproximadamente 25°C abaixo da temperatura de fusão de um DNA de filamento duplo perfeitamente em pares de base. Especificidade mais elevada é geralmente obtida empregando-se condições de incubação tendo temperaturas mais elevadas, em outras palavras condi-

20      ções mais severas. Chapter 11 do manual de laboratório bem conhecido de Sambrook et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory Pressão, New York (1990) (que é incorporado aqui por referência), descreve as condições de hibridização para sondas de oligonucleotídeo em maiores detalhes, incluindo uma

25      descrição dos fatores envolvidos e o nível de rigorosidade necessária para garantir a hibridização com especificidade. A hibridização é tipicamente realizada em uma solução aquosa tamponada, para que as condições tal como temperatura, concentração de sal, e pH sejam selecionadas para fornecer rigorosidade suficiente tal que as sondas hibridizam-se especificamente

30      para suas seqüências de ácido nucléico alvos porém não qualquer outra seqüência.

            Geralmente, a eficiência de hibridização entre a sonda e o alvo

melhora sob as condições onde a quantidade da sonda adicionada é um excesso molar para o padrão, preferivelmente um excesso molar de 2 a  $10^6$ , mais preferivelmente excesso molar de  $10^3$  a  $10^6$ . A concentração de cada CSP fornecida para a captura eficiente é pelo menos 25 fmoles/ml (25 pM) na solução de hibridização final, preferivelmente entre 25 fmoles a  $10^4$  fmoles/ml (10 nM). A concentração de cada SSP é pelo menos 15 ng/ml na solução de hibridização final, preferivelmente de 150 ng/ml. A tabela A mostra a conversão de concentrações de SSP expressas em ng/ml para base molar.

10

TABELA A

CONVERSÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SSP DE ng/ml PARA fmoles/ml

Concentração de SSP em ng/ml	Concentração de SSP em fmoles/ml (pM)	
	SSP é um 3kb RNA	SSP é um 5kb RNA
15 ng/ml	15,1	9
150 ng/ml	151	90
600 ng/ml	606	364

Hibridização da CSP e da SSP para o ácido nucléico alvo pode ser executada simultaneamente ou seqüencialmente e em qualquer outra ordem. Em uma modalidade, a hibridização da CSP e hibridização da SSP para o ácido nucléico alvo são executadas simultaneamente. O híbrido formado é então capturado em uma fase sólida revestido com um substrato para que o ligando ligado à CSP ligue-se com especificação. Em outra modalidade, a hibridização da SSP para o ácido nucléico alvo é executada após a hibridização da CSP para o ácido nucléico alvo. Neste caso, a CSP pode ser imobilizada em uma fase sólida antes ou após a hibridização. Nesta modalidade, igualmente a CSP e o alvo pode ser ligado à fase sólida durante a reação de hibridização da SSP. Mais preferivelmente, a CSP e a SSP são hibridizadas para o ácido nucléico alvo, formando um complexo hibridizado, onde o referido complexo é então capturado em uma fase sólida revestido com um substrato para que o ligando ligado à CSP ligue-se com especificação.

A fim de identificar e detectar seqüências de polinucleotídeos específicas com sensibilidade e especificação adicionados, os ensaios podem ser designados tal que as condições são ideais para aumentar a detecção de sinal e reduzir a interferência do ambiente. Os métodos preferidos para obter o rigor adicionado inclui a etapa de captura aquecida TSHC e /ou através do uso de sondas bloqueadoras. Uma vez que a eficiência da captura do complexo hibridizado compreendendo CSP, SSP, e o ácido nucléico alvo é influenciado por várias condições de ensaio, uma captura aquecida pode ser útil para reduzir a falsa reatividade e detectar mutações de pelo menos um nucleotídeo. Preferivelmente, o método de captura aquecida é empregado para a detecção de polimorfismos de nucleotídeo simples. Resumidamente, o método de captura aquecida para capturar ou ligar o complexo hibridizado a uma fase sólida utiliza uma faixa elevada de temperaturas. A fim de imobilizar os alvos hibridizados da CSP seguindo a hibridização, a solução de hibridização é colocada em cavidades de uma placa de cavidade 96, por exemplo, e a placa é agitada durante 15 minutos a 2 horas em temperaturas variando de 20°C a 90°C agitando a 1100 rpms. Opcionalmente, a hibridização em temperatura ambiente durante 1 hora agitando a 1100 rpms pode ser preferida. As temperaturas de captura acima da temperatura ambiente podem ser preferidas para um nível adicionado de rigurosidade quando a hibridização (e "hibridização promíscua") ocorre durante a etapa de captura da placa. Outros meios para alcançar um grau elevado de especificação e sensibilidade é através do uso de sondas bloqueadoras.

Uma modalidade da invenção fornece um método de captura aquecida usando temperaturas elevadas para capturar uma SSP hibridizada e complexo de ácido nucléico alvo para uma CSP imobilizada para uma fase sólida, cada qual simultaneamente ou seqüencialmente, onde a temperatura elevada impede a hibridização não-específica da CSP de ocorrência durante a etapa de captura da placa. A temperatura elevada da mesma forma afeta a especificação da hibridização da SSP. A CSP usada na TSHC pode ser um ácido nucléico ou ácido nucléico modificado, preferivelmente DNA, que contém uma modificação que permite a captura em uma fase sólida. Um

exemplo de uma tal modificação é um rótulo de biotina e mais preferivelmente rótulos de biotina múltiplos. A CSP contém um mínimo de 6 pares de base, preferivelmente 16 a 50 bases com uma temperatura de fusão preferida ( $T_m$ ) acima de 65°C. As CSPs preferidas podem compreender seqüências complementares para seqüências únicas dentro da molécula alvo de ácidos nucléicos presentes na amostra, se bem que isto não é necessário para alvejar espécies de ácido nucléico múltiplo. Por exemplo, se uma família de gene é o alvo, a CSP pode preferivelmente compreender um elemento da seqüência comum a um ou mais membros da família do gene. Para a maioria das aplicações, a CSP preferivelmente contém no máximo 75% da identidade da seqüência e mais preferivelmente menos do que 50%, para os alvos não desejados suspeitos de estar presentes na amostra. O ensaio pode utilizar as CSPs que diferem em apenas um nucleotídeo simples e seletivamente detecta alvos que diferem em apenas um nucleotídeo simples. Este grau de discriminação pode ser facilitado usando-se a etapa de captura da placa aquecida. Quando a hibridização da CSP é executada na solução, as amostras são subseqüentemente reagidas com uma fase sólida durante a captura. Por exemplo, se uma CSP rotulada por biotina é usada, avidina ou alguma outra proteína de ligação de biotina pode ser usada para revestir a fase sólida para a captura. Outra modalidade desta invenção abrange a captura e hibridização simultânea, onde a hibridização é executada diretamente na fase sólida de captura, por exemplo, sobre uma placa de captura.

Em ainda outra modalidade desta invenção, o método de TSHC pode ser usado para distinguir e detectar alvos de ácido nucléico com SNPs. Este método de detecção Hibrid Capture Single Nucleotide Polymorphism (HC-SNP) pode detectar SNPs com especificação e sensibilidade elevadas. Um exemplo ilustrando a capacidade estendida da TSHC para distinguir e detectar alvos de ácido nucléico com SNPs é aqui descrito, onde os oligonucleotídeos de captura rotulados (CSP) são usados, em adição às sondas de seqüência de sinal (SSP), e uma molécula de ácido nucléico alvo. As CSPs podem hibridizar e capturar alvos de ácido nucléico para uma

superfície ou fase sólida (por exemplo, uma placa de cavidade 96). Os métodos de rotulagem são bem-conhecidos na técnica e podem da mesma forma ser empregados para facilitar a imobilização do ácido nucléico alvo.

Em um exemplo, uma captura de ácido nucléico alvo é obtida através da interação de afinidade elevada entre a biotina sobre a CSP e uma estreptavidina sobre a superfície sólida. Simultaneamente, uma sonda de seqüência de sinal de RNA (SSP) complementar a um alvo de DNA e que não sobrepõe-se com a região de captura é hibridizada para o alvo de DNA. Os híbridos de RNA/DNA são reconhecidos pelo anticorpo direcionado contra os híbridos de RNA/DNA rotulados com fosfatase alcalina. Neste exemplo, um substrato fosforilado quimiluminescente é então adicionado e subseqüentemente, o substrato ativado pode ser detectado e avaliado por um luminômetro. O sinal para as relações de ruído é determinado usando um conhecido controle negativo. Além disso, a concentração do alvo pode ser determinada usando-se conhecidas concentrações de moléculas alvo como calibradores. A especificação de ligar e capturar o híbrido para uma fase sólida é modulada, regulada ou ajustada por temperaturas maiores do que a temperatura ambiente, pela adição de sondas bloqueadoras, ou por temperaturas maiores do que a temperatura ambiente e a adição de sondas bloqueadoras. Para rigor adicional, as sondas bloqueadoras podem ser ou com ou sem o método de captura aquecida. Alternativamente, a etapa de captura pode ser executada em temperatura ambiente e pode opcionalmente utilizar sondas bloqueadoras.

Outra modalidade desta invenção ainda fornece um método de oligonucleotídeo bloqueador onde em muitos casos, previne a necessidade para uma etapa de captura aquecida. Isto pode ser obtido hibridizando-se os oligonucleotídeos bloqueadores para oligonucleotídeos de captura em temperatura ambiente, deste modo impede ainda a hibridização da CSP para alvos não desejados durante a etapa de captura. As sondas de captura podem preferivelmente requerer a presença de sondas bloqueadoras, que são complementares para a sonda de captura. O comprimento das sondas bloqueadoras pode variar de bloqueadores complementares para a CSP de



tamanho natural a bloqueadores complementares muito pequenos para apenas uma pequena porção da CSP. Por exemplo, as sondas bloqueadoras podem ser 4 - 10 pares de base mais curtos do que o comprimento da CSP. A presença das sondas bloqueadoras reduz a base e permite um maior grau de sensibilidade. A etapa de captura aquecida e as sondas bloqueadoras podem ser usadas ou separadamente ou juntamente, em que a especificação de ligar e capturar o híbrido para uma fase sólida é modulada, regulada ou ajustada por temperaturas maiores do que a temperatura ambiente, e a adição de sondas bloqueadoras.

10 Será entendido por aqueles versados na técnica que uma matriz ou fase sólida inclui, por exemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno, policarbonato ou qualquer material plástico sólido na forma de placas, lâminas, pratos, contas, partículas, micropartículas, xícaras, filamentos, lascas e tiras. Uma fase sólida da mesma forma inclui contas de vidro, tubos de teste  
15 de vidro e qualquer outro produto de vidro apropriado. Uma fase sólida funcionalizada tal como plástico ou vidro que tem sido modificada a fim de que a superfície contenha carboxila, amino, hidrazida, grupos de aldeído, derivados de nucleotídeo ou ácido nucléico pode da mesma forma ser usada. Qualquer fase sólida tal como micropartículas de vidro ou plástico, contas,  
20 tiras, tubos de teste, lâminas, filamentos, lascas ou placas de microtítulo pode ser usada.

Em uma modalidade preferida, a CSP é rotulada com biotina, e a fase sólida revestida por estreptavidina ou revestida por avidina é empregada para capturar o híbrido. Mais preferivelmente, as placas de microtítulo  
25 revestidas por estreptavidina são usadas. Estas placas podem ser revestidas de forma passiva ou covalentemente.

O híbrido capturado pode ser detectado por meios convencionais bem-conhecidos na técnica, tal como com um anticorpo monoclonal ou policlonal rotulado específico para o híbrido, um anticorpo específico para  
30 um ou mais ligandos ligados ao SSP, um anticorpo rotulado, ou uma modificação detectável na SSP propriamente dita.

Um método preferido de detecção detecta o híbrido capturado

usando-se um anticorpo capaz de ligar-se ao híbrido de RNA/DNA ( referidos aqui como o "anticorpo de RNA/DNA". Nesta modalidade, o anticorpo de anti-RNA/DNA é preferivelmente rotulado com uma enzima, uma molécula fluorescente ou um conjugado de biotina/avidina e não é radioativo. O rótulo pode ser detectado diretamente ou indiretamente por meios convencionais conhecidos na técnica tal como um colorímetro, luminômetro, ou um detector fluorescente. Um rótulo preferido é, por exemplo, fosfatase alcalina. Outros rótulos conhecidos por alguém versado na técnica pode da mesma forma ser empregado como um meio de detectar o híbrido de filamento duplo ligado.

A detecção do híbrido capturado é preferivelmente obtida ligando-se o anticorpo conjugado ao híbrido durante uma etapa de incubação. As superfícies são então lavadas para remover qualquer conjugado em excesso. Estas técnicas são conhecidas na técnica. Por exemplo, lavagens manuais podem ser executadas empregando ou um Eppendorf® Repeat Pipettor com um Combitip® de 50 ml (Eppendorf, Hamburg, Germany, uma seringa de repetição Corning (Corning, Corning, NY), uma bomba simples regulada por um variostato (*variostat*), ou por fluxo de gravidade de um reservatório com tubulação ligada. Os sistemas de lavagem de tubo comercialmente disponíveis disponibilizados por Source Scientific Systems (Garden Grove, CA) podem da mesma forma ser usados.

O conjugado ligado é subseqüentemente detectado por um método convencionalmente usado na técnica, por exemplo, colorimetria ou quimiluminescência como descrito em Coutlee, et al, *J. Clin. Microbiol.* 27:1002 - 1007 (1989). Preferivelmente, o conjugado de fosfatase alcalina ligado é detectado por quimiluminescência adicionado-se um substrato que pode ser ativado por fosfatase alcalina. Os substratos de quimiluminescência que são ativados por fosfatase alcalina são bem-conhecidos na técnica.

Em outra modalidade, o método de captura de híbrido específico alvo da invenção emprega sondas bloqueadoras em adição às CSP e SSP. Uma sonda bloqueadora compreende seqüências que são complementares às seqüências da CSP. A seqüência de uma sonda bloqueadora é preferi-

velmente pelo menos 75% complementar à seqüência da CSP, mais preferivelmente, 100% complementar à CSP. A adição das sondas bloqueadoras à mistura de reação de hibridização impede a CSP não-hibridizada de hibridizar para as seqüências de ácido nucléico de reação cruzada presentes no  
5 alvo e por este motivo aumenta a especificação da detecção.

A sonda bloqueadora é geralmente pelo menos 5 bases longas, preferivelmente 12 bases longas. A concentração da sonda bloqueadora na reação de hibridização é preferivelmente em excesso para aquelas de CSP e SSP. Preferivelmente, a sonda bloqueadora está presente em um excesso  
10 molar de 2 vezes, embora, possa estar presente em um excesso molar até 10.000 vezes. As sondas bloqueadoras podem ser DNA, RNA, ácidos nucléicos de peptídeo (PNAs) ou outros análogos de ácido nucléico.

Em uma modalidade, as sondas bloqueadoras complementares ao tamanho natural ou próximo ao tamanho natural da CSP são empregadas. Seguindo a reação na qual o híbrido entre CSP, SSP, e o ácido nucléico  
15 alvo é formado, uma ou mais sondas bloqueadoras podem ser adicionadas à reação e a hibridização é continuada durante um tempo desejado. Os produtos de hibridização são então detectados como acima descrito.

Em outra modalidade, as sondas bloqueadoras complementares a apenas uma porção da CSP e menores do que a CSP são usadas. Estas  
20 sondas bloqueadoras tem uma temperatura de fusão menor do que aquela da CSP. Preferivelmente, a temperatura de fusão da sonda bloqueadora é 10 graus menor do que aquela da CSP. Neste caso, a sonda bloqueadora é preferivelmente adicionada aos ácidos nucléicos alvo simultaneamente com  
25 a CSP e a SSP. Desde que a sonda bloqueadora tenha uma temperatura de fusão menor do que a CSP, a temperatura inicial para a hibridização é escolhida tal que a sonda bloqueadora não interfira com a hibridização da CSP para suas seqüências alvo. Entretanto, quando a temperatura das misturas de hibridização é ajustada abaixo da temperatura usada para a  
30 hibridização alvo, a sonda bloqueadora hibridiza para a CSP e efetivamente bloqueia a CSP de hibridizar para as seqüências de ácido nucléico de reação cruzada. Por exemplo, quando os produtos de hibridização são incuba-

dos em temperatura ambiente em uma placa de microtítulo revestida por estreptavidina durante a captura do híbrido, as sondas bloqueadoras podem ser adicionadas.

Os seguintes exemplos ilustram o uso do presente *kit* e ensaio de detecção e método de amplificação. Estes exemplos são oferecidos por meio de ilustração, e não são entendidos para limitar o escopo da invenção de qualquer maneira. Todas as referências aqui descritas são expressivamente incorporadas *in toto* por referência.

#### EXEMPLO 1

#### 10 PROTOCOLO DE ENSAIO DE CAPTURA DE HÍBRIDO ESPECÍFICO ALVO (TSHC)

Partículas virais de Herpes Simplex Vírus 1 (HSV-1) e Herpes Simplex Vírus 2 (HSV-2) de concentração conhecida (Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD) ou amostras clínicas foram diluídas empregando ou Negative Control Media (Digene Corp., Gaithersburg, MD) ou Negative Cervical Specimens (Digene). Várias diluições foram feitas e divididas em tubos de microcentrífuga individual. Metade do volume do Denaturation Reagent 5100-0431 (Digene) foi adicionado. As amostras de teste foram incubadas a 65°C durante 45 minutos para a desnaturação de ácidos nucléicos nas amostras.

Seguindo a desnaturação, uma solução de hibridização contendo sondas de seqüência de sinal (SSPs) (600 ng/ml cada) e sondas de seqüência de captura (CSPs) (2,5 pmoles/ml cada) foi adicionada à amostra, e incubada a 74°C durante 1 hora. As sondas bloqueadoras em uma solução contendo um volume de 4x Probe Diluent (Digene), um volume de Denaturation Reagent, e dois volumes do Negative Control Media foram então adicionadas à mistura de hibridização e incubadas a 74°C durante 15 minutos.

Em uma segunda série de experiências, seguindo a desnaturação de ácidos nucléicos, uma mistura de hibridização contendo SSPs (600 ng/ml cada), (2,5 pmoles/ml cada), e as sondas bloqueadoras (250 pmoles/ml cada) foi adicionada às amostras e incubada durante uma hora a 74°C.

Os tubos contendo as misturas de reação foram resfriados em

temperatura ambiente durante 5 minutos, e as alíquotas foram tomadas de cada tubo e transferidas para cavidades individuais de uma placa de captura de estreptavidina de cavidade 96 (Digene). As placas foram agitadas a 1100 rpms durante 1 hora em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram decantados e as placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem Hybrid Capture 2 (Digene) e brevemente invertidas para remover o tampão de lavagem residual. O reagente-1 de detecção de anticorpo de anti-RNA/DNA de fosfatase alcalina (DR-1; Digene) foi então adicionado a cada cavidade e incubado durante 30 minutos em temperatura ambiente (cerca de 20°C a 25°C). As cavidades foram então submetidas a múltiplas etapas de lavagem que incluem: 1) três lavagens com tampão de lavagem Sharp (Digene) em temperatura ambiente; 2) incubação da placa com o tampão de lavagem Sharp durante 10 minutos a 60°C em um bloco quente; 3) duas lavagens com o tampão de lavagem Sharp em temperatura ambiente; e 4) uma lavagem com o tampão de lavagem SNM (Digene) em temperatura ambiente. Seguindo a remoção do líquido residual, substrato luminescente 5100-0350 (Digene) foi adicionado a cada cavidade e incubado durante 15 minutos em temperatura ambiente. As cavidades individuais foram então lidas em um luminômetro de placa para obter o sinal de unidade de luz relativo (RLU).

Soluções contendo Meios de Controle Negativo ou Espécimes Cervicais Negativas de HSV conhecidas foram empregadas como controles negativos para as amostras de teste. O sinal para relação de ruído (S/N) foi calculado como a relação da RLU média obtida de uma amostra de teste para a RLU média do controle negativo. O sinal para a relação de ruído foi usado como a base para determinar a eficiência da captura e a detecção de ácidos nucleicos alvo. Um valor de S/N de 2 ou maior foi arbitrariamente designado como um sinal positivo ao mesmo tempo que um valor menor de S/N do que 2 foi considerado negativo. O coeficiente de variação (CV) que é uma determinação da variabilidade da experiência dentro de um grupo de amostras foi calculado tomando-se o desvio padrão das réplicas, dividindo-o pela média e multiplicando esse valor por 100 para obter um valor percentual.

As sondas de seqüência de captura e as sondas bloqueadoras usadas em experiências descritas nos Exemplos 2 - 13 foram sintetizadas empregando o método descrito por Cook et al (1988 Nucl. Acid. Res., 16: 4077-95). A menos que de outra maneira observado, as sondas de seqüência de captura usadas nas experiências aqui descritas foram rotuladas com biotinas em suas extremidades 5' e 3'.

As sondas de seqüência de captura usadas nas experiências descritas nos Exemplos 2 - 13 são sondas de RNA, porém esta invenção não limita-se ao SSPs compreendendo RNA. Estas sondas foram preparadas usando o método descrito por Yisraeli et al (1989, Methods in Enzymol., 180: 42 - 50).

#### EXEMPLO 2

As seguintes tabelas descrevem as várias sondas usadas nas experiências descritas nos Exemplos 3 a 13.

15

TABELA 1

#### CLONES HSV-1 DOS QUAIS AS SONDAS DE HSV-1 SÃO DERIVADAS

Nome do Clone	Vetor Hospedeiro	Sítio(s) de Clonagem	Tamanho de Inserção (pares de base)	Localização de Seqüência dentro de HSV-1
RH3	Dgx3	Hind III, Eco RI	5720	39850-45570
R10	Blue Script SK+	Eco RI	4072	64134-68206
RH5B	Blue Script SK+	Eco RV, Eco RI	4987	105108-110095
H19	Blue Script SK+	Hind III	4890	133467-138349

TABELA 2

#### CLONES HSV-2 DOS QUAIS AS SONDAS DE HSV-2 SÃO DERIVADAS

Nome do Clone	Vetor Hospedeiro	Sítio(s) de Clonagem	Tamanho de Inserção (pares de base)	Localização de Seqüência em HSV-2
E4A	Blue Script SK+	Bam HI	3683	23230-26914
E4B	Blue Script SK+	Bam HI Eco RI	5600	26914-32267
I8	Blue Script SK+	Hind III	2844	41624-44474
EI8	Dgx3	Hind III, Eco RI	3715	44474-48189
4L	Blue Script KS+	Bam HI, Eco RI	4313	86199-90512

**TABELA 3**  
**SONDAS DE SEQUÊNCIA DE CAPTURA PARA HSV-1**

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Localiza- ção dentro de HSV-1
TS-1	(TTATTATTA)CGTTCATGTTCGGCAAACA GCT CGT(TTATTATTA) [SEQ ID NO: 1]	24	105040- 105063
TS-2	(TTATTATTA)CGTCCTGGATGGCGATA CGGC (TTATTATTA) [SEQ ID NO: 2]	21	110316- 110336
VH-3	CGTCCTGGATGGCGATACGGC [SEQ ID NO: 3]	21	110316- 110336
NC-1	CGTTCATGTTCGGCAAACAGCTCGT [SEQ ID NO: 4]	24	105040- 105063
VH-4 (Fusão de VH3, NC-1)	CGTTCATGTTCGGCAA- CAGCTCGTCGTCCTGGATGGCGA- TACGGC [SEQ ID NO: 5]	45	105040- 105063; 110316- 110336
HZ-1	GATGGGGTTATTTTTCTAA- GATGGGGCGGGTCC [SEQ ID NO: 6]	34	133061- 133094
VH-2	TACCCCGATCATCA- GTTATCCTTAAGGT [SEQ ID NO: 7]	28	13 8367- 138394
FD-1	AAACCGTTCCATGACCGGA [SEQ ID NO: 8]	19	39281- 39299
RA-2	ATCGCGTGTTCCAGAGACAGGC [SEQ ID NO: 9]	22	39156- 39177
NC-2	CAACGCCCAAATAATA [SEQ ID NO:10]	17	46337- 46353
FD-2	GTCCCGGAaCCGATCTAGCG (note que pequeno capuz a é uma base mutada) [SEQ ID NO: 11]	20	45483- 45502
RA-4	CGAACCATAAACCATTCCCAT [SEQ ID NO:12]	22	46361- 46382
ON-3	CACGCCCGTGGTTCTGGAATTCGAC [SEQ ID NO: 13]	25	64105- 64129
HZ-2	(TTTATTA)GATGGGGTTATTTTTCTAA GATGGGGCGGGTCC [SEQ ID NO:14]	34	133061- 133094

TABELA 3 (Continuação)

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Localização dentro de HSV-1
ZD-1	GGTTATTTTTCTAAG [SEQ ID NO:15]	16	133064-133079
ZD-2	(ATTATT)GGTTATTTTTCTAAG(ATTATT) [SEQ ID NO: 16]	16	133 064-133079
F6R	ACGACGCCCTTGACTCCGATTCGTCA-TCCGGATGACTCCCT [SEQ ID NO: 17]	40	87111-87150
BRH19	ATGCGCCAGTGTATCAA-TCAGCTGTTTCGGGT [SEQ IQ NO: 18]	32	13 3223-133254
F15R	CAAACGTCCTGGAGACGGGTGAGTGTCCGGCGAGGACG [SEQ ID NO: 19]	38	141311-141348
VH-1	GTCCCCGACCCGATCTAGCG [SEQ ID NO: 20]	20	45483 - 45502
ON-4	GCAGACTGCGCCAGGAACGAGTA [SEQ ID NO: 21]	23	68404 - 68426
PZ-1	GTGCCACGCCCGTGGTTCTGGAATTCCGACAGCGA [SEQ ID NO: 22]	35	64105 - 64139
PZ-2	GCAGACTGCGCCAGGAACGAGTAGTTGGAGTACTG [SEQ ID NO: 23]	35	68404 - 68438
FG-2	AAGAGGTCCATTGGGTGGGGTTGATACGGGAAAGAC [SEQ ID NO: 24]	36	105069-105104
FG-3	CGTAATGCGGCGGTGCA-GACTCCCCTG [SEQ ID NO:25]	27	110620-110646
FG-4	CCAACTACCCCGATCATCAGTTATCC-TTAAGGTCTCTTG [SEQ ID NO: 26]	39	138362 - 138400
Hsv1-LF15R (SH-3)	(AAAAAAAA) CAAACGTCCTGGAGACGGGTGAGTGTCCGGCGAGGACG [SEQ ID NO: 27]	38	141311-141348
Hsv1-F15-2B (GZ-1)	CAAACGTCCTGGAGACGGGTGAGTGTCCGGCGAGGACG [SEQ ID NO:28]	38	141311-141348
Hsv1-F15-3B (GZ-2)	CAAACGTCC-bio-U-GGAGACGGGTGAGTG-bio-U-CGGCGAGGACG [SEQ ID NO: 29]	38	141311-141348



TABELA 4  
SONDAS BLOQUEADORAS PARA HSV-1

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Sonda de Captura para qual ela Hi- bridiza
EA-1	AGGAAAATAACCCCATC [SEQ ID NO:30]	18	HZ-1
EA-2	GACCCGCCCATCTTI [SEQ ID NO:31]	15	HZ-1
ZD-3	GGACCCGCCCATCTTAGGAAAA- TAAC CCCATC [SEQ ID NO:32]	34	HZ-1
NG-7	AAAATAACCCCA [SEQ ID NO:33]	13	HZ-1
NG-8	CGCCCATCTT [SEQ ID NO:34]	11	HZ-1
NG-4	CCATCTITAGGAAAA [SEQ ID NO:35J]	15	HZ-1
GP-1	ATAACTGATGATCGG [SEQ ID NO:36]	15	VH-Z
EA-3	CCACCCAATGGACCTC [SEQ ID NO: 37]	16	FG-2
EA-4	GTCTTTCCCGTATCAACC [SEQ ID NO: 38]	18	FG-2
EB-7	CGCCGCATTACG [SEQ ID NO: 39]	12	FG-3
EB-8	AGGGGAGTCTGC [SEQ ID NO:40]	12	FG-3
GP-3	CTGTTTGCCGACA [SEQ ID NO: 41]	13	VH-4
GP-4	TATCGCCATCCAG [SEQ ID NO: 42]	13	VH-4
EB-9	ATGATCGGGGTAGT [SEQ ID NO: 43]	14	FG-4
EB-10	AGAGACCTTAAGGATA [ISEQ ID NO:44]	16	FG-4
NG-1	ATITCCAGAACCACGG [SEQ ID NO:45]	15	ON-3
NG-2	TTCCAGAACCACG [SEQ ID NO:46]	13	ON-3
NG-3	TCCAGAACCAC [SEQ ID NO:47]	11	ON-4
GP-5	GTTCTGGCGCAG [SEQ ID NO: 48]	13	ON-4
GP-6	TTCCTGGCGCAG [SEQ ID NO: 49]	12	ON-4

TABELA 5  
SONDAS DE SEQÜÊNCIA DE CAPTURA PARA HSV-2

Son- da	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Localização dentro de HSV-2
NF-1	GCCCGCGCCGCCAGCAC- TACTTTC[SEQ ID NO:50]	24	41610-41587
FG- 1	AAACGTTGGGAGGTGTGTGCGTC- ATCCTG GAGCTA [SEQ ID NO:51]	35	48200-48234
LE-3	GACCAAACCGA- GTGAGGTTCTGTGT [SEQ ID NO:52]	26	48732-48757
NF-2	AAACGTTGGGAGGTGTGTGCGTCA [SEQ ID NO:53]	24	48200-48223
RA-3	TGCTCGTCACGAAGTCACTCATG [SEQ ID NO:54]	23	22756-22734
ON-2	CATTACTGCCCGCACCGGACC [SEQ ID NO :55]	21	23862-23842
LE-1	GCCGTGGTGTTCCTGAACACCAGG [SEQ ID NO:56]	24	27666-27643
LE-4	AGTCAGGGTTGCCCGACTTCGTCAC [SEQ ID NO:57]	25	22891-228 67
NF-3	CAGGCGTCCTCGGTCTCGGGCGGG GC [SEQ ID NO:58]	26	32847-32822
NF-4	CCCACGTCACCGGGGGCCCC [SEQ ID NO:59]	20	26743-26724
LE-2	GCCGGTCGCGTGCGACGCCCAAGG C [SEQ ID NO:60]	25	33130-33106
SG-3	CCGACGCGTGGGTATCTAGGGGG- TCG [SEQ ID NO: 61]	26	90559 -90534
SG-4	CGGGACGGCGAGCGGAAA- GTCAACGT [SEQ ID NO:62]	26	86194-86169

TABELA 6  
SONDAS BLOQUEADORAS PARA HSV-2

Nome da Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Sonda de Captura para qual ela Hibridiza
HX-4	GGCGCGGGC [SEQ 10 NO:633]	9	NF-1
HX-5	GAAAGTAGTGCTGGC [SEQ 10 NO:64]	15	NF-1
GP-7	TGCTGGCGGCG [SEQ LO NO:65]	11	NF-i
AZ-3	ACACCTCCCAACG [SEQ 10 NO:66]	13	FG-i
AZ-4	CTCCAGGATGACG [SEQ ID NO:67]	13	FG-i
GR-1	TCGGTTITGGTC [SEQ LO NO:68]	12	LE-3
GR-2	ACACAGAACCTCA [SEQ 10 NO:69]	13	LE-3
GP-8	CACACACCTCCCA [SEQ 10 NO :703]	13	NF-2
BR-10	CGACCCCCTAGATA [SEQ 10 NO:713]	14	SG-3
BR-11	CCACGCQTCGG [SEQ 10 NO:72]	11	SG-3
HX-6	ACG'1TGACTLTCCGC [SEQ 10 NO:73]	15	SG-4
BR-15	CGCCGTCCCG [SEQ 10 NO:74]	10	SG-4

TABELA 7  
SONDAS DE SEQÜÊNCIA DE CAPTURA PARA HPV

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Tipo de HPV e Localização de Seqüência
ZL-1	GTACAGATGGTACCGGGGTTGTA-GAAGTATCTG [SEQ ID NO:75]	33	HPV16 53 60-5392
ZL-4	CTGCAACAAGACATACA-TCGACCGGTCCACC [SEQ ID NO:76]	31	HPV16 495-525
DP-1	GAAGTAGGTGAGGCTGCATGTGAA-GTGGTAG [SEQ ID NO:77]	31	HPV16 5285-53 15
DP-4	CAGCTCTGTGCATAACTGTGGTAAC-TTTCTGGG [SEQ ID NO:78]	33	HPV16 128-160

TABELA 7 (Continuação)

Sonda	Seqüência	Tamanho (pa- res de base)	Tipo de HPV e Localiza- ção de Seqüência
SH-1	GAGGTCTTCTCCAACATGCTA- TGCAACGTCCTG [SEQ ID NO:79]	33	HPV31 505-537
SH-4	GTGTAGGTGCATGCTCTATAGGTACA- TCAGGCC [SEQ ID NO:80]	33	HPV31 5387-5419
VS-1	CAATGCCGAGCTTAGTTCA- TGCAATTTCCGAGG [SEQ ID NO:81]	33	HPV31 132-164
VS-4	GAAGTAGTAGTTGCAGACGCC- CTAAAGGTTGC [SEQ ID NO:82]	33	HPV31 5175-5207
AH-1	GAACGCGATGGTACAGGCAC- TGCAGGGTCC [SEQ ID NO:83]	30	HPV18 5308-5337
AH-2	GAACGCGATGGTACAGGCACTGCA [SEQ ID NO:84]	24	HPV18 5314-5337
AL-1	ACGCCACCCCAATGGAATGTACCC [SEQ ID NO:85]	24	HPV18 4451-4474
PA-4	TCTGCGTCGTTGGAGTCGTTCTGTC GTGCTC [SEQ ID NO:86]	32	HPV18 535-566
18- 1AB	CTTATTATTA)CTACATACATTGCCGCC ATGTTCCGCA [SEQ ID NO:87]	36	HPV18 1369-1395
18-2AB	(TTATTATA)TGTTGCCCTCTGTGCCCC- CGTTGT CTATAGCCTCCGT [SEQ ID NO:88]	46	HPV18 1406-1442
18-3AB	(TTATTATTA)GGAGCAGTGCCCAAAG ATTAAAGTTTGC [SEQ ID NO:89]	38	HPV18 7524-7552
18-4AB	(TTATTATTA)CACGGTGCTGGAATACG GTGAGG GGGTG [SEQ ID NO:90]	37	HPV18 3485-3512
18-5AB	(TTATTATTA)ACGCCACCCCAATGGAA TGTACCC [SEQ ID NO:91]	33	HPV18 4451-4474

TABELA 7 (Continuação)

Sonda	Seqüência	Tama- nho (pa- res de base)	Tipo de HPV e Localiza- ção de Se- qüência
18-6AB	(TTATTATTA)ATAGTATTGTGGTGTGTT TCTCAC AT [SEQ ID NO:92]	35	HPV18 8 1-106
18-7AB	(TTATTATTA)GTTGGAGTCGTTCTGT CGTG [SEQ ID NO:93]	30	HPV18 538-558
18-8AB	(TTATTATTA)CGGAATTTTCATTTTGGG GCTCT [SEQ ID NO:94]	31	HPV18 634-65 5
PE-1	GCTCGAAGGTCGTCTGCTGAGCTTTC TACTACT [SEQ ID NO:95]	33	HPV18 811-843
PZ-2	GCGCCATCCTGTAATGCACTTTTCCA- CAAAGC [SEQ ID NO:96]	32	HPV45 77-108
PZ.-5	TAGTGCTAGGTGTAGTGGACGCA- GGAGGTGG [SEQ ID NO:97]	31	HPV45 5295-5325
CS-1	GGTCACAACATGTATTA- ÇACTGCCCTCGGTAC[SEQ ID NO:98]	32	HPV45 500-531
CS-4	CCTACGTCTGCGAAGTCTTTCTTGCCG TGCC [SEQ ID NO:99]	31	HPV45 533-563
PF-1	CTGCATTGTCACTACTATCCCCAC- CACTACTTTG [SEQ ID NO: 100]	34	HPV45 1406-1439
PF-4	CCACAAGGCACATTCATACATACA- CGCACGCA [SEQ ID NO: 101]	32	HPV45 7243-7274
PA-1	GTTCTAAGGTCCTCTGCCGAGCTCTCT ACTGTA [SEQ ID NO:102]	33	HPV45 811-843
45-5AB	(TTATTATTA)TGCGGTTTTGGGGGTGCG ACGTGGA GGC [SEQ ID NO:103]	36	HPV45 3444-3470
45-6AB	(TTATTATTA)AGACCTGCCCCCTAAGG GTACATA GCC [SEQ ID NO:104]	36	HPV45 4443-4469

TABELA 7 (Continuação)

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Tipo de HPV e Localização de Seqüência
45-8AB	(TTATTATTA)CAGCATTGCAGCCTTTTT GTTACTTGCTTGTAATAGCTCC [SEQ ID NO: 105]	49	HPV45 1477-15 16
45-9AB	(TTATTATTA)ATCCTGTAATGCACTTTT CCACAA A [SEQ ID NO:106]	34	HPV45 79-103
45-10AB	(TTATTATTA)GCCTGGTCACAACATGT ATTAC [SEQ ID NO:107]	31	HPV45 514-535
45-11AB	(TTATTATTA)CAGGATCTAATTCATTCT GAGGTT [SEQ ID NO:108]	33	HPV45 633-656
ON-1	TGCGGTTTTGGGGGTCGA- CGTGGAGGC [SEQ ID NO: 109]	27	HPV45 3444-3470

TABELA 8

## SONDAS BLOQUEADORAS PARA HPV

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Sonda de Captura para qual ela Hibridiza
PV-FD-1	GCCTCCACGTCGAC [SEQ ID NO:110]	14	ON-1/45-5AB
PV-FD-2	CCCCAAAACCG [SEQ ID NO:111]	11	ON-1/45-5AB
PV-FD-3	GGTACATTCCATTGGG [SEQ ID NO:112]	16	18-5AB/AL-1
PV-FD-4	TGGGCGTTAATAATAA [SEQ ID NO:113]	16	18-5AB
AH-3	ACCATCGCGTTC [SEQ ID NO:114]	12	AH-2
AH-4	GGACCCTGCAGTGC [SEQ ID NO: 115]	14	AH-1

TABELA 8 (continuação)

Sonda	Seqüência	Tama- nho (pa- res de base)	Sonda de Captura para qual ela Hi- bridiza
AH-5	CTGTACCATCGCGTT3' [SEQ ID NO:116]	15	AH-1
AH-6	TGCAGTGCCTGT [SEQ ID NO:117]	12	AH-2
PZ-1	CCACCTCCTGCGT [SEQ ID NO:118]	13	PZ-5
PZ-3	ATTACAGGATGGCGC [SEQ ID NO: 119]	15	PZ-2
PZ-4	GCTTTGTGGAAAAGTG [SEQ ID NO: 120]	16	PZ-2
PZ-6	CCACTACACCTAGCACTA [SEQ ID NO: 121]	18	PZ-5
ZL-2	CAGATACTTCTACAACC [SEQ ID NO: 122]	17	ZL-1
ZL-3	CCGGTACCATCTGTAC [SEQ ID NO: 123]	16	ZL-1
ZL-5	GGTGGACCGGTCG [SEQ ID NO:124]	13	ZL-4
ZL-6	ATGTATGTCTTGTTGCAG [SEQ ID NO:125]	18	ZL-4
DP-2	CTACCACTTCACATGC [SEQ ID NO: 126]	16	DP-1
DP-3	AGCCTCACCTACTTC [SEQ ID NO: 127]	15	DP-1
DP-5	CCCAGAAAGTTACCAC [SEQ ID NO:128]	16	DP-4
DP-6	AGTTATGCACAGAGCT [SEQ ID NO:129]	16	DP-4
SH-2	CAGGACGTTGCATAGC [SEQ ID NO:130]	16	SH-1

TABELA 8 (continuação)

Sonda	Seqüência	Tama- nho (pa- res de base)	Sonda de Captura para qual ela Hi- bridiza
SH-3	ATGTTGGAGAAGACCTC [SEQ ID NO:131]	17	SH-1
SH-5	GGCCTGATGTACCTATA [SEQ ID NO:132]	17	SH-4
SH-6	GAGCATGCACCTACAC [SEQ ID NO:133]	16	SH-4
VS-2	CTCGGAAATTGCATG [SEQ ID NO:134]	15	VS-1
VS-3	AACTAAGCTCGGCATT [SEQ ID NO:135]	16	VS-1
VS-5	GCAACCTTTAGGGG [SEQ ID NO:136]	14	VS-4
VS-6	CGTCTGCAACTACTACTTC [SEQ ID NO: 137]	19	VS-4
CS-2	GTACCGAGGGCAGT [SEQ ID NO: 138]	14	CS-1
CS-3	GTAATACATGTTGTGACC [SEQ ID NO:139]	18	CS-1
CS-5	GGCACGGCAAGAAA [SEQ ID NO:140]	14	CS-4
CS-6	GACTTCGCAGACGTAGG [SEQ ID NO:141]	17	CS-4
PF-2	CAAAGTAGTGGTGGG [SEQ ID NO:142]	15	PF-1
PF-3	GATAGTAGTGACAATGCAG [SEQ ID NO:143]	19	PF-1
PF-5	TGCGTGCGTGTATGTA [SEQ ID NO:144]	16	PF-4
PF-6	TGAATGTGCCTTGTGG [SEQ ID NO:145]	16	PF-4



TABELA 8 (continuação)

Sonda	Seqüência	Tama- nho (pa- res de base)	Sonda de Captura para qual ela Hi- bridiza
PE-2	AGTAGTAGAAAGCTCAGC [SEQ ID NO:146]	18	PE-1
PE-3	AGACGACCTTCGAGC [SEQ ID NO: 147]	15	PE-1
PA-2	TACAGTAGAGAGCTCGG [SEQ ID NO: 148]	17	PA-1
PA-3	CAGAGGACCTTAGAAC [SEQ ID NO: 149]	16	PA-1
PA-5	GAGCACGACAGGAACG [SEQ ID NO: 150]	16	PA-4
PA-6	ACTCCAACGACGCAGA [SEQ ID NO:151]	16	PA-4

## EXEMPLO 3

EFEITO DA EXTENSÃO DE ROTULAÇÃO DE BIOTINA SOBRE EFICIÊN-  
CIA DE CAPTURA

5 Os testes foram conduzidos para determinar o número ideal de  
rótulos de biotina por sonda de seqüência de captura para detecção de  
TSHC. O método TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. A efici-  
ência do rotulado F15R de captura da sonda de seqüência de captura com  
uma, duas ou três biotinas, avaliadas por sinal para relação de ruído (S/N),  
10 foram testadas. A sonda de seqüência de sinal empregada foi H19. Como  
mostrado na Tabela 9, duas biotinas por sonda de seqüência de captura  
foram suficientes para eficácia de captura ideal. Maior do que um aumento  
de 50% em S/N foi observado empregando uma sonda de seqüência de  
captura com dois rótulos de biotina comparados à sonda de seqüência de  
15 captura rotulada por biotina de sinal. A adição de um terceiro rótulo de bioti-  
na para a sonda de seqüência de captura resultou em um decréscimo em

S/N relativo à sonda de seqüência de captura rotulada por duas biotinas.

**TABELA 9**

**EFEITO DA EXTENSÃO DE ROTULAGEM DE BIOTINA SOBRE A EFICIÊNCIA DE CAPTURA**

Nº de Biotinas	HSV-1/cavidade	RLU	CV	S/N
Uma	0	54	3%	1,0
Uma	$4,5 \times 10^3$	236	2%	4,4
Uma	$4,5 \times 10^4$	1861	3%	34,5
Uma	$4,5 \times 10^5$	15633	7%	289,5
Duas	0	46	3%	1,0
Duas	$4,5 \times 10^3$	296	10%	6,4
Duas	$4,5 \times 10^4$	2558	1%	55,6
Duas	$4,5 \times 10^5$	23369	4%	508,0
Três	0	44	22%	1,0
Três	$4,5 \times 10^3$	243	6%	5,5
Três	$4,5 \times 10^4$	1820	2%	51,4
Três	$4,5 \times 10^5$	18581	8%	422,3

5 **EXEMPLO 4**

**EFEITO DA DISTÂNCIA ENTRE A CSP E OS SÍTIOS ALVO DE SSP SOBRE A EFICIÊNCIA DE CAPTURA**

O efeito da distância entre a sonda de seqüência de captura (CSP) e sítios de hibridização de sonda de seqüência de sinal (SSP) em um ácido nucléico alvo de HSV-1 sobre a eficiência de captura foi avaliado. As CSPs que hibridizam para as seqüências de ácido nucléico de HSV-1 que são localizadas 0,2 quilobase, 3 quilobases, 18 quilobases, 36 quilobases, e 46 quilobases do sítio de hibridização de SSP foram testadas. O método TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. As eficiências de captura foram 100%, 50%, 30%, 19% e 7%, respectivamente (Tabela 10). Um declínio estável em eficiências de captura relativas foi observado como a distância aumentada de 0,2 quilobase a 46 quilobase.

TABELA 10  
EFEITO DE DISTÂNCIA ENTRE OS SÍTIOS ALVO SOBRE A EFICIÊNCIA  
DE CAPTURA

CSP	SSP	Distância entre o Sítio Alvo	Eficácia de Captura Relativa
BRH19	H19	0,2Kb	100%
F15R	H19	3Kb	50%
F6R	RH5B	18Kb	30%
F15R	RH5B	36Kb	19%
F6R	H19	46Kb	7%

#### EXEMPLO 5

#### 5 EFEITO DE SONDA DE SEQÜÊNCIA DE CAPTURA FUNDIDA SOBRE A DETECÇÃO DE TSHC DE HSV-1

A capacidade de ligação de placas de estreptavidina foi determinada ser de aproximadamente 2 pmoles de CSPs duplamente biotiniladas por cavidade. Uma vez que as CSPs são duplamente rotuladas por biotina, um máximo de 8 CSPs (2 CSPs por cavidade) é preferido a fim de não exceder a capacidade de ligação das cavidades). Qualquer aumento em sonda de seqüência de captura rotulada por biotina acima da capacidade resultou em um decréscimo em sinal, o assim chamado "efeito gancho". A fim de evitar este "efeito gancho" e ainda permitir o uso de mais do que quatro combinações de SSP-CSP, o efeito de sintetização de oligonucleotídeos que continham as seqüências de duas CSPs fundidas juntamente (sítios 5' e 3') foi testado. As sondas de seqüência de captura fundidas podem funcionar independentemente para direcionar a hibridização para os sítios de alvo único. Em outra modalidade, as sondas fundidas podem ligar-se a dois sítios alvo com a segunda hibridização favorecida, uma vez que ela é essencialmente uma reação uni-molecular com cinéticos de ordem zero uma vez que a sonda hibridizou para o primeiro sítio. A hibridização pode ser determinada por um ou ambos os mecanismos. As experiências prévias mostraram que duas CSPs, VH3 e NC-1, quando empregadas juntamente, produziram aproximadamente duas vezes o S/N como as CSPs individuais. As son-

das de seqüência de captura não fundidas VH-3 e NC-1 foram empregadas em 2,5 pmoles/ml cada para uma concentração total de 5 pmoles/ml, a sonda fundida VH-4 (fusão de VH-3 e NC-1) foi empregada em 2,5 pmole/ml. Como mostrado na Tabela 11, a sonda fundida foi tão eficiente quanto a combinação das duas sondas não fundidas. Portanto, a detecção de TSHC empregando-se sondas de seqüência de captura fundidas permite o número de seqüências de ácido nucléico alvejadas pela sonda de seqüência sinal serem pelo menos duplicadas sem exceder a capacidade de ligação de biotina da placa. A experiência também demonstra a falta de reatividade cruzada de HSV-2 em  $10^7$  genomas como mostrado pela S/N menor do que 2,0.

TABELA 11

COMPARAÇÃO DE SONDAS DE SEQÜÊNCIA DE CAPTURA FUNDIDAS VERSUS NÃO FUNDIDAS EM DETECÇÃO DE TSHC DE HSV-1

SSP	CSP	Partículas virais / ml	RLU	CV	S/N
RH5B	VH-3, NC-1	0	94	14%	1,0
RH5B	VH-3, NC-1	$10^4$ HSV-1	164	5%	1,7
RH5B	VH-3, NC-1	$10^5$ HSV-1	1003	4%	10,7
RH5B	VH-3, NC-1	$10^7$ HSV-2	125	6%	1,3
RH5B	VH-4 (fundida)	0	97	10%	1,0
RH5B	VH-4 (fundida)	$10^4$ HSV-1	181	3%	1,9
RHSB	VH-4 (fundida)	$10^8$ HSV-1	1070	2%	11,0
RH5B	VH-4 (fundida)	$10^7$ HSV-2	140	5%	1,4

## EXEMPLO 6

EFICIÊNCIA DE CAPTURA DE VÁRIAS CSPs E SSPs EM DETECÇÃO DE TSHC DE HSV-1

A eficiência de captura de sondas de seqüência de captura (CSPs) para cada uma das quatro sondas de seqüência sinal específica de HSV-1 (SSPs), H19, RH5B, RH3 e R10, na detecção de HSV-1 por TSHC foi avaliada. Os critérios empregados para designação das sondas de seqüência de captura foram: 1) o sítio de hibridização de CSP inclui-se em 1 kb ou 5' ou 3' do sítio de hibridização de SSP sobre a seqüência de ácido

nucléico HSV-1, preferivelmente dentro de 0,5 kb; e 2) as CSPs contêm seqüências que são únicas para HSV-1, com nenhuma distensão de homologia de seqüência para HSV-2 maior do que 10 bases. As CSPs foram designadas para alvejar as regiões 5' e 3' adjacentes ao sítio de hibridização de SSP, preferivelmente com uma 5' CSP e uma 3' CSP para cada SSP. O software Omiga ( Oxford Molecular Group, Campbell, CA) foi instrumental na identificação de tais sítios. A temperatura de fusão (  $T_m$  ) das CSPs foi designada ser entre 70°C e 85°C, para amoldar-se para a temperatura de hibridização de 70°C a 75°C empregada em Ensaio de Captura II de Híbrido (HCII) para HSV (Digene). O método TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. Onze CSPs (que ligam-se a 6 sítios diferentes) para H19, seis CSPs (que ligam-se a três sítios únicos) para RH5B, seis CSPs (que ligam-se a seis sítios únicos) para RH3, e duas CSP para R10 foram testadas. Como mostrado na Tabela 12, as sondas de seqüência de captura eficientes foram descobertas para sondas de seqüência sinal H19, RH5B e R10.

**TABELA 12**

**CSPs E SSPs PARA DETECÇÃO DE TSHC DE HSV-1**

SSP	CSP	Cap%	SSP	CSP	Cap %	SSP	CSP	Cap%
R10	ON-3	100%	RHSB	TS-1	50%	H19	HZ-1	50%
R10	ON-3	80%	RH5B	NC-1	75%	H19	HZ-2	20%
			RH5B	VH-4	130%	H19	ZD-1	40%
			RH5B	TS-2	25%	H19	ZD-2	20%
			RH5B	VH-3	50%	H19	BRH19	70%
						H19	VIH-2	70%
						H19	F15R	25%

**EXEMPLO 7**

**EFICIÊNCIA DE CAPTURA DE VÁRIAS CSPs E SSPs EM DETECÇÃO DE TSHC DE HSV-2**

A eficiência de captura de sondas de seqüência de captura (CSPs) para cada uma das quatro sondas de seqüência de sinal específica de HSV-2 (SSPs), E4A, E4B, Ei8, e i8, na detecção HSV-2 por TSHC foi

avaliada. As sondas de seqüência de captura específica de HSV-2 (CSPs) foram designadas com base nos mesmos critérios como as CSPs de HSV-1 exceto para a exigência de que elas sejam específicas de HSV-2. Quatro CSPs para E4A, três CSPs para E4B, e duas CSPs cada para Ei8 e i8 foram testadas. O método TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. Como mostrado na Tabela 13, as sondas de seqüência de captura eficiente foram encontradas para i8 e Ei8.

TABELA 13

CSPs E SSPs PARA DETECÇÃO DE TSHC DE HSV-2

SSP	CSP	Cap %	SSP	CSP	Cap %
i8	NF-1	100%	Ei8	NF-2	50%
			Ei8	LE-3	45%

10 EXEMPLO 8

EFEITO DE SONDAS BLOQUEADORAS SOBRE A DETECÇÃO DE HSV-1 E HSV-2

Em uma tentativa para reduzir a reatividade cruzada de TSHC ao mesmo tempo que permitindo a etapa de captura ocorrer em temperatura ambiente, métodos empregando sondas bloqueadoras foram desenvolvidos. As sondas bloqueadoras compreendem seqüências que são complementares para as sondas de seqüência de captura (CSPs) empregados para detecção. Estas experiências foram designadas para prevenir a hibridização não-específica das CSPs para os ácidos nucléicos não alvejados presentes na amostra sob as condições de menor rigorosidade, uma situação frequentemente encontrada durante a etapa de captura em temperatura ambiente.

Em um método, as sondas bloqueadoras que são complementares ao tamanho natural ou aproximadamente o tamanho natural da sonda de seqüências de captura foram empregadas. As sondas bloqueadoras foram adicionadas à mistura de reação em 10 vezes o excesso relativo à CSP após a hibridização da CSP e a SSP para a molécula de DNA alvo ocorrer. Uma vez que as sondas bloqueadoras têm temperatura de fusão similar como as CSPs, as CSPs foram hibridizadas para os ácidos nucléicos alvo

primeiro para prevenir a hibridização das sondas bloqueadoras para as CSPs antes da hibridização das CSPs para os ácidos nucleicos alvo ocorrer. Como mostrado na Tabela 14, a adição das sondas bloqueadoras resultou em uma redução dramática em reatividade cruzada ao mesmo tempo que estas sondas não tiveram nenhum efeito sobre a sensibilidade de detecção de HSV-1. O S/N para a detecção de HSV-2 de reação cruzada ( $10^7$  partículas virais/ml) diminuiu de 5,0 para 0,8 quando as sondas bloqueadoras foram empregadas.

Em outro método, as sondas bloqueadoras que são complementares para apenas uma porção das CSPs e são menores do que as CSPs foram empregadas. As sondas bloqueadoras foram designadas terem temperaturas de fusão acima da temperatura ambiente porém pelo menos  $10^\circ\text{C}$  abaixo da temperatura de hibridização de CSPs para os ácidos nucleicos alvo. Uma vez que estas sondas bloqueadoras hibridizam para as CSPs em temperatura abaixo da temperatura de hibridização de CSP para os ácidos nucleicos alvo, as sondas bloqueadoras podem ser adicionadas à reação no mesmo momento que a CSP e SSP sem afetar a eficiência de hibridização das CSPs para o ácido nucleico alvo. Estas sondas bloqueadoras mais curtas funcionam durante a etapa de captura em temperatura ambiente por hibridização para as CSPs nas temperaturas menores que são encontradas durante a etapa de captura de temperatura ambiente. Como mostrado na Tabela 15, a adição de sondas bloqueadoras simples ou mais curtas emparelhadas em 100 vezes o excesso relativo às CSPs resultou em uma redução dramática em reatividade cruzada, porém não teve nenhum efeito sobre a sensibilidade de detecção de HSV-1. A S/N para detectar HSV-2 de reatividade cruzada ( $10^7$  partículas virais/ml) sem as sondas bloqueadoras serem 10,6, porém foi reduzida para menos do que ou igual a 1,5 com a adição das sondas bloqueadoras.

Portanto, ambos os métodos utilizando sondas bloqueadoras fornecem uma redução substancial em reatividade cruzada. O segundo método utilizando sondas bloqueadoras com temperatura de fusão menor pode ser preferido por causa da adição de sondas bloqueadoras ao mesmo

tempo quando a sonda de seqüência de captura elimina a necessidade para uma etapa extra para o método de detecção.

TABELA 14

EFEITO DE SONDAS BLOQUEADORAS ADICIONADAS APÓS A HIBRIDIZAÇÃO DA SONDA DE CAPTURA SOBRE TSHC

5

SSF	CSP	100x a Sonda Bloqueadora	Partículas virais / ml	RLU	CV	S/N
H19	HZ-1	Nenhuma	0	66	7%	1,0
H19	HZ-1	Nenhuma	10 <sup>5</sup> HSV-1	246	5%	3,7
H19	HZ-1	Nenhuma	10 <sup>6</sup> HSV-1	1998	2%	30,3
H19	HZ-1	Nenhuma	10 <sup>7</sup> HSV-2	327	2%	5,0
H19	HZ-1	ZD-3	0	60	3%	1,0
H19	HZ-1	ZD-3	10 <sup>5</sup> HSV-1	267	4%	4,5
H19	HZ-1	ZD-3	10 <sup>6</sup> HSV-1	2316	6%	38,6
H19	HZ-1	ZD-3	10 <sup>7</sup> HSV-2	49	2%	0,8

TABELA 15

EFEITO DE SONDAS BLOQUEADORAS ADICIONADAS SIMULTANEAMENTE COM AS SONDAS DE CAPTURA SOBRE DETECÇÃO DE TSHC DE HSV-1

SSP	CSP	10x a Sonda Bloqueadora	Partícula viral / ml	RLU	CV	S/N
H19	HZ-1	Nenhuma	0	38	15%	1,0
H19	HZ-1	Nenhuma	10 <sup>4</sup> HSV-1	71	2%	1,9
H19	HZ-1	Nenhuma	10 <sup>5</sup> HSV-1	389	12%	10,2
H19	HZ-1	Nenhuma	10 <sup>7</sup> HSV-2	401	18%	10,6
H19	HZ-1	NG-4	0	39	8%	1,0
H19	HZ-1	NG-4	10 <sup>4</sup> HSV-1	82	5%	2,1
H19	HZ-1	NG-4	10 <sup>5</sup> HSV-1	411	18%	10,5
H19	HZ-1	NG-4	10 <sup>7</sup> HSV-2	57	15%	1,5
H19	HZ-1	FA-1,EA-2	0	37	0%	1,0
H19	HZ-1	EA-1,EA-2	10 <sup>4</sup> HSV-1	75	8%	2,0
H19	HZ-1	EA-1, EA-2	10 <sup>5</sup> HSV-1	419	8%	11,3
H19	HZ-1	EA-1,EA-2	10 <sup>7</sup> HSV-2	49	5%	1,3



TABELA 15 (continuação)

SSP	CSP	10x a Sonda Bloqueadora	Partícula viral / ml	RLU	CV	S/N
H19	HZ-1	NG-7,NG-8	0	42	10%	1,0
H19	HZ-1	NG-7,NG-8	10 <sup>4</sup> HSV-1	76	3%	1,8
H19	HZ-1	NG-7,NG-8	10 <sup>5</sup> HSV-1	471	5%	11,2
H19	HZ-1	NG-7, NG-8	10 <sup>7</sup> HSV-2	47	9%	101

## EXEMPLO 9

## A DETECÇÃO DE TSHC REDUZ A BASE DE VETOR

O ensaio TSHC elimina o problema de contaminação do vetor frequentemente associado com o ensaio de detecção de Captura II de Híbrido (HC II) (Digene). Como as sondas de seqüência sinal de RNA empregadas em HC II são geradas de padrões de vetor linearizado, qualquer DNA plasmídeo não linearizado restante resulta na produção de seqüências de sonda de RNA adicionais específicas para seqüências de vetor. No ensaio HC II, os híbridos de RNA/DNA que formam-se como um resultado destes traslados por meio de leitura são capturados sobre as placas revestidas de anticorpo e geram sinal. Ao contrário, no método TSHC, apenas aqueles híbridos de RNA/DNA que também hibridizam para as sondas de seqüência de captura são detectados. Conseqüentemente, qualquer detecção de seqüências relacionadas com o vetor é eliminada. Soube-se que plasmídeos SK+, pBR322, DgZ, e 1066 foram detectáveis em teste HC II de HSV (Digene) foram testados no ensaio TSHC empregando-se duas sondas de seqüência sinal de RNA 9H19 e RH5b) e duas sondas de seqüência de captura (VH-2 e VH-4). As fixações idênticas de sondas de RNA foram então empregadas no método HC II e o método TSHC para a detecção de HSV-1. O método de TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. Como mostrado na Tabela 16, ao mesmo tempo que a relação de sinal para ruído em HC II padrão variou de 14 para 48, a relação de sinal para ruído para o método TSHC foi menor do que 2 para todos os plasmídeos testados.

TABELA 16  
BASE DE VETOR EM DETECÇÃO DE TSHC V.HCII

Método	SSP	CSP	Alvos / ml	RLU	CV	S/N
TSHC	H19+R115B	VH-2+VH-4	0	94	6%	1,0
TSHC	H19+RH5B	VH-2+VH-4	4ngpBSSK+	137	7%	1,5
TSHC	H19+RH5B	VH-2+VH-4	2ngpBR322	99	6%	1,1
TSHC	H19+RH5B	VH-2+VH-4	4ngDgX	135	7%	1,4
TSHC	H19+RH5B	VH-2+VH-4	4ng1066	107	7%	1,1
HC II	H19+RH5B	Nenhuma	0	94	9%	1,0
HC II	H19+RH5B	Nenhuma	4ngpBSSK+	4498	3%	48,1
HC II	H19+RH5B	Nenhuma	2ngpBR322	1281	8%	13,7
HC II	H19+RH5B	Nenhuma	4ngDgX	2003	5%	21,4
HC II	H19+RH5B	Nenhuma	4ng 1066	1536	2%	16,4

#### EXEMPLO 10

#### SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE DETECÇÃO DE HSV-1 E HSV-2

#### 5 POR TSHC

A discriminação de sensibilidade e impressão para a detecção por TSHC de HSV-1 e HSV-2 foi estimada empregando-se o TSHC descrito no Exemplo 1. No ensaio por TSHC de HSV-1, as sondas de seqüência sinal H19 e RH5B, as sondas de seqüência de captura HZ-1, VH-2 e VH-4, e sondas bloqueadoras NG-7, NG-8, GP-3, GP-4 e GP-1 foram empregadas. No mesmo ensaio por TSHC de HSV-2, as sondas de seqüência sinal i8 e Ei8, sondas de seqüência de captura NF-1 e NF-2, e sondas bloqueadoras HX-4, HX-5 e GP-8 foram empregadas. As partículas virais de HSV-1 e HSV-2 foram diluídas em várias concentrações empregando-se a Solução de Controle Negativo. Como mostrado nas Figuras 4 e 5, ao mesmo tempo que  $10^4$  cópias de qualquer das duas HSV-1 ou HSV-2 (450 cópi-  
10 as/cavidade) foram detectadas nos respectivos ensaios, não houve virtualmente nenhuma detecção de HSV do tipo de reação cruzada em concentrações até e incluindo  $10^8$  cópias/ml (4.500.000 cópias/cavidade). Desse  
15 modo, os ensaios de TSHC de HSV-1 e HSV-2 podem distinguir os dois tipos de HSV em uma variação maior do que 10.000 vezes de discriminação ao mesmo tempo que mantendo excelente sensibilidade (450 VP/cavidade).  
20

O ensaio de TSHC de HSV-1 mostra uma variação linear de detecção variando de pelo menos  $2 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  VP/ml (Tabela 17). A especificidade do ensaio é excelente quando nenhuma reatividade cruzada for detectada (S/N é menos do que ou igual a 2) em amostras contendo HSV-2 em uma concentração tão elevada quanto  $2 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  partículas virais/ml. Similarmente, o ensaio de TSHC de HSV-2 também mostra excelente especificidade, onde nenhuma reatividade cruzada foi detectada em amostras contendo HSV-1 em uma concentração tão elevada quanto  $5 \times 10^7$  partículas virais/ml (Tabela 18). Os resultados similares foram obtidos da detecção por TSHC de HSV-2 empregando-se uma série de diluição de vírus de HSV-2 e HSV-1 (Tabela 19).

TABELA 17

ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE ANALÍTICA DO ENSAIO TSHC DE HSV1

Alvos	RLU	S/N
Controle Negativo	47	1,0
HSV2@ $5 \times 10^7$ VP/ml	57	1,2
HSV2 @ $2 \times 10^7$ VP/ml	43	0,9
HSV1 @ $5 \times 10^3$ VP/ml	201	4,3
HSV1@ $2 \times 10^3$ VP/ml	107	2,3

15

TABELA 18

ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE ANALÍTICA DO ENSAIO TSHC DE HSV-2

Alvos	RLU	S/N
Controle Negativo	40	1,0
HSV1@ $5 \times 10^7$ VP/ml	78	2,0
HSV1@ $2 \times 10^7$ VP/ml	55	1,4
HSV2@ $5 \times 10^3$ VP/ml	218	5,5
HSV2 @ $2 \times 10^3$ VP/ml	106	2,7

TABELA 19  
DETECÇÃO COM SONDAS HSV-2 EMPREGANDO-SE HSV-1 E HSV-2 DE  
DILUIÇÃO DIFERENTE

Alvos	RLU	S/N
Controle Negativo	43	1,0
HSV1 @5x10 <sup>7</sup> VP/ml	112	2,6
HSV1 @2x10 <sup>7</sup> VP/ml	57	1,3
HSV1 @2x10 <sup>7</sup> VP/ml	38	0,9
HSV1 @Lx10 <sup>6</sup> VP/ml	38	0,9
HSV1 @1x10 <sup>5</sup> VP/ml	33	0,8
HSV1 @lx10 <sup>4</sup> VP/ml	52	1,2
HSV1 @1x10 <sup>3</sup> V1/ml	43	1,0
HSV1 @ 1x10 <sup>2</sup> VP/rnl	39	0,9
HSV2 @1x10 <sup>7</sup> VP/ml	257173	5980,8
HSV2 @1x10 <sup>6</sup> VP/ml	28544	663,8
HSV2 @lx10 <sup>5</sup> VP/ml	3200	74,4
HSV2 @1x10 <sup>4</sup> VP/ml	266	6,2
HSV2 @5x10 <sup>3</sup> VP/lni	181	4,2
HSV2 @1x10 <sup>3</sup> VP/ml	62	1,4
HSV2 @1x10 <sup>2</sup> VP/ml	44	1,0

#### EXEMPLO 11

#### 5 TESTE DE ESPÉCIME CLÍNICA

Um grupo de espécime clínica de 64 membros foi testado quanto a HSV-1 e HSV-2 empregando-se ambos os métodos TSHC e HCII. O grupo incluiu 15 amostras contendo quantidades conhecidas de HSV-1 ou HSV-2, e 49 amostras conhecidas por serem negativas para HSV-1 e HSV-2 por teste de PCR. Consequentemente, as 15 amostras positivas foram "Supostas" para teste positivo em ambos os ensaios HCII e TSHC, e as 49 amostras negativas foram "Supostas" para teste negativo em ambos os testes HCII e TSHC. O método TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. Os resultados empregando-se o método HCII e o método TSHC são mostrados nas Tabelas 20 e 21, respectivamente. Das 49 amostras "Supostas" produzirem resultado negativo, 5 amostras testadas positivo e 44

amostras testadas positivo empregando-se o método HCII. Em comparação, todas as 49 amostras testadas negativo empregando-se o método TSHC. Portanto, o método TSHC é superior em especificidade ao método HCII na detecção de HSV-1 e HSV-2.

5

TABELA 20

RESULTADOS OBSERVADOS VERSUS ESPERADOS PARA A DETECÇÃO DE HCII DE HSV1 E HSV2

Resultado HCII	Resultado Esperado	
	Positivo	Negativo
Positivo	15	5
Negativo	0	44
Total	15	49

TABELA 21

RESULTADOS OBSERVADOS VERSUS ESPERADOS PARA A DETECÇÃO DE TSHC DE HSV1 E HSV2

10

Resultado TSHC	Resultado Esperado	
	Positivo	Negativo
Positivo	14	0
Negativo	1	49
Total	15	49

## EXEMPLO 12

EFEITO DE COMBINAÇÃO DE SONDAS EM DETECÇÃO DE TSHC DE HSV

O efeito de combinação grupos de sonda de seqüência sinal específica de HSV-1 e de sonda de seqüência de captura sobre a detecção de HSV-1 foi estimado. A detecção de TSHC de reatividade cruzada de HSV-1 e HSV-2 foi realizada separadamente com dois grupos diferentes de combinações de sonda de seqüência sinal de RNA/sonda de seqüência de captura biotinilada (Grupo #1: H19 mais Hz-1; e Grupo #2; RH5b mais o TS-1 e TS-2). O TSHC foi também realizado com ambos os grupos de sonda de seqüência sinal de RNA/sonda de seqüência de captura biotinilada combi-

15

20

nados para estimar o efeito de combinação de dois grupos de sonda sobre a sensibilidade e reatividade cruzada. O método TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. Os resultados mostrados na Tabela 22 demonstram claramente um efeito aditivo de combinação dos dois grupos de sonda para detecção de HSV-1 com nenhum aumento evidente em reatividade cruzada de HSV-2.

**TABELA 22**

**A SENSIBILIDADE É MELHORADA COMBINANDO-SE CSPs E SSPs ESPECÍFICAS DE HSV-1**

Sondas de Sequência de Captura	Sondas de Sequência Sinal	VP/ml	RLTJ	CV	S/N
HZ-1	H19	0	60	3%	1,0
HZ-1	H19	10 <sup>5</sup> HSV-1	267	4%	4,5
HZ-1	H19	10 <sup>6</sup> HSV-1	2316	6%	38,9
HZ-1	H19	10 <sup>7</sup> HSV2	49	2%	0,8
TS-1,TS-2	RH5B	0	78	6%	1,0
TS-1,TS-2	RH5B	10 <sup>5</sup> HSV-1	291	6%	3,8
TS-1,TS-2	RH5B	10 <sup>6</sup> HSV-1	2368	11%	30,6
TS-1,TS-2	RH5B	10 <sup>7</sup> HSV2	75	11%	1,0
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	0	70	12%	1,0
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 <sup>5</sup> HSV-1	457	10%	6,5
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 <sup>6</sup> HSV-1	4263	1%	60,9
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 <sup>7</sup> HSV2	67	6%	1,0

10 **EXEMPLO 13**

**DETECÇÃO DE TSHC DE HPV18 E HPV45**

A relativa sensibilidade e especificidade de detecção de TSHC e HCII de Papilomavírus Humano 18 (HPV 18) e Papilomavírus Humano 45 (HPV45) foi comparada. Estudos anteriores estabeleceram o HPV45 como o tipo de HPV maior reação cruzada ao HPV18, e inversamente, o HPV 18 como o tipo e HPV de maior reação cruzada ao HPV45. Neste estudo, a capacidade dos dois métodos para detectar o HPV18 e HPV45 foi avaliada empregando-se o DNA plasmídeo de HPV 18 e HPV45.

As sondas de sequência de captura (CSPs) para cada dos qua-

tro tipos de Papilomavírus humanos: HPV16, HPV18, HPV31, e HPV45, foram designadas. Os critérios empregados para designar as sondas de seqüência de captura onde: 1) os sítios de hibridização de CSP não sobre-  
põem-se com os sítios SSP; 2) as CSPs contêm seqüências únicas para um  
5 tipo de HPV com nenhuma distensão de homologia de seqüência para outros tipos de HPV maiores do que 12 bases; e 3) as CSPs são de suficiente comprimento a fim de serem capazes de hibridizarem eficazmente a 70°C.

As sondas bloqueadoras para cada CSP foram designadas tal que elas pudessem ser adicionadas simultaneamente com a CSP durante a  
10 hibridização para o ácido nucléico alvo. As sondas bloqueadoras têm uma temperatura de fusão de pelo menos 37°C, porém não maior do que 60°C, quando calculado pelo programa Oligo 5,0 (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN). Duas sondas bloqueadoras foram empregadas para cada oligonucleotídeo de captura para maximizar o efeito bloqueador durante a  
15 etapa de captura de placa de temperatura ambiente. Foi também desejado que as sondas bloqueadoras para cada CSP tivessem temperaturas de fusão similares.

As CSPs para cada dos tipos de HPV foram testadas quanto à eficiência de captura relativa e reatividade cruzada para outros tipos de  
20 HPV. As CSPs que forneceram a melhor combinação de sensibilidade e baixa reatividade cruzada foram empregadas para a detecção de HPV empregando-se TSHC.

Em detecção de TSHC e HCII de HPV18, o DNA de HPV18 foi empregado em uma concentração de 10 pg/ml. HPV45, empregado para  
25 teste de reatividade cruzada, foi empregado em 4 ng/ml. O método TSHC geral descrito no Exemplo 1 foi empregado. Como mostrado na Tabela 23, uma relação de sinal para ruído de 16,9 foi obtida para a detecção de TSHC de HPV18 comparado com a relação de 7,6 obtida para a detecção de HCII de HPV18. Por outro lado, a reatividade cruzada com HPV45 foi significan-  
30 temente reduzida empregando-se o método TSHC (S/N de 1,3 para TSHC comparado a S/N de 393,3 para HCII). Os resultados mostram claramente que comparado ao método HCII, o método TSHC para a detecção de

HPV18 foi superior igualmente em sensibilidade e especificidade. Os resultados obtidos em experiências comparando-se a detecção de TSHC e HCII de HPV45 demonstram que o método TSHC para a detecção de HPV45 é superior igualmente em sensibilidade e especificidade (Tabela 24).

5

**TABELA 23**  
DETECÇÃO DE TSHC DE HPV 18

Método	Alvo	SSP	CSP	S/N
TSHC	0	18L1	18-7L	1,0
	HPV18 (10 pg/ml)	18L1	18-7L	16,9
	HPV45(4ng/ml)	18L1	18-7L	1,3
HC II	0	18L1	nenhuma	1,0
	HPV18 (10 pg/ml)	18L1	nenhuma	7,6
	HPV45(4ng/ml)	18L1	nenhuma	393,3

**TABELA 24**  
DETECÇÃO DE TSHC DE HPV 45

Método	Alvo	SSP	CSP	S/N
TSHC	0	45L1	ON-1	1,0
	HPV45 (10 pg/ml)	45L1	ON-1	8,4
	HPV18 (4 ng/ml)	45L1	ON-1	1,6
HC II	0	45L1	nenhuma	1,0
	HPV45 (10 pg/ml)	45L1	nenhuma	8,2
	HPV18 (4 ng/ml)	45L1	nenhuma	494,0

#### EXEMPLO 14

#### 10 PROTOCOLO DE ENSAIO DE CAPTURA POSITIVA DE HÍBRIDO DE ALVO ESPECÍFICO

O vírus da Hepatite B foi empregado como o sistema modelo para o desenvolvimento do ensaio positivo (TSHC positivo) de captura de híbrido de alvo específico para a detecção de ácidos nucléicos alvo.

15

A hibridização no método TSHC positivo (Fig. 6A-6D) pode ser realizada em uma única etapa. No método de uma etapa, CSPs, SSPs contendo dupla de DNA/RNA pré-hibridizada, sondas em ponte (Fig. 6B-6D), e sondas bloqueadoras são adicionadas simultaneamente aos ácidos nucléi-



cos alvo. Se a hibridização for realizada em duas etapas, CSPs, SSPs sem a dupla DNA/RNA pré-hibridizada, sondas em ponte e sondas bloqueadoras são primeiro hibridizadas para o ácido nucléico alvo. As sondas de oligonucleotídeos complementares à seqüência de ácido nucléico ramificada única no SSP são então adicionadas à reação para formar as duplas de DNA/RNA. Os híbridos são então detectados empregando-se anticorpo anti-RNA/DNA como descrito no Exemplo 1.

Experiências foram realizadas para detectar HBV empregando-se o TSHC-positivo (Exemplos 15-18). O método mostrado na Figura 6A foi empregado. O DNA de plasmídeo do vírus de hepatite B humana (HBV adw2) de concentração conhecida (Digene Corp) foi diluído empregando-se Diluente de Amostra negativa de HBV (Digene). Várias diluições foram realizadas e calculadas as alíquotas em tubos individuais. O Diluente de Amostra negativa foi empregado como um controle negativo. Um meio volume do Reagente de desnaturação 5100-0431 (Digene) foi feito para as amostras de teste. As amostras de teste foram incubadas a 65°C durante 45 minutos para desnaturar os ácidos nucléicos nas amostras.

Seguindo a desnaturação da amostra de HBV, uma solução de hibridização contendo sondas de seqüência de captura (CSPs), sondas bloqueadoras, sonda de seqüência sinal compreendendo um dúplex M13 DNA/M13 RNA, e uma sonda em ponte de uma seqüência de DNA de filamento único ou parcialmente de filamento único capaz de hibridizar igualmente para seqüências SSP e HBV, foi adicionada às amostras, e incubada a 65°C durante 1 a 2 horas. Alternativamente, as amostras desnaturadas foram incubadas durante 1 hora com uma solução de hibridização contendo sondas de seqüência de captura (CSPs), sondas bloqueadoras e seqüências complementares de HBV contendo plasmídeo de M13 DNA durante 1 hora. Seguindo a incubação, M13 RNA foi adicionado à reação e a incubação foi contínua durante mais uma hora a 65°C.

Tubos contendo misturas de reação foram resfriados em temperatura ambiente durante 5 minutos e as alíquotas foram retiradas de cada tubo e transferidas para cavidades individuais de uma placa de estreptavidi-

na de cavidade 96 (Digene). As placas foram agitadas a 1100 rpms durante 1 hora em temperatura ambiente. A solução foi então decantada e as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem SNM (Digene). O anti-corpo DR-I anti-RNA/DNA de fosfatase alcalina (Digene) foi adicionado a cada cavidade e incubado durante 30 minutos em temperatura ambiente. O DR-1 (Digene) foi então decantado e as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem SNM (Digene). Seguindo a remoção do tampão de lavagem residual, o substrato luminescente (CDP-Star, Tropix Inc.) foi adicionado a cada cavidade e incubado durante 15 minutos em temperatura ambiente. As cavidades individuais foram lidas em um luminômetro de placa para obter sinais de unidade de luz relativa (RLU).

#### EXEMPLO 15

As seguintes tabelas descrevem as várias sondas testadas nas experiências descritas nos Exemplos 16 a 18.

15

TABELA 25

#### SONDAS DE SEQÜÊNCIA DE CAPTURA PARA HBV

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	Localização dentro de HBV	Filamento
HBV C1	GCTGGATGTGTCTGCGGCGTTT TATCAT (SEQ ID NO: 152)	28	374-401	Senso
HBV C2	ACTGTTCAAGCCTCCAAGCTG- CGCCTT (SEQ ID NO: 153)	27	1861- 1877	Senso
HBV C3	ATGATAAAACGCCGCAGACACA- TCCAGCGATA (SEQ ID NO: 154)	32	370-401	Anti-senso

TABELA 26

#### CLONES HBV/M13 DOS QUAIS SSPs SÃO PREPARADOS

Nome do clone	Vetor	Sítio de clonagem	Tamanho da inserção (pares de base)	Localização dentro de HBV
SA1	M13 mp 18	Eco RI, Hind III	35	194-228

TABELA 26 - (continuação)

Nome do clone	Vetor	Sítio de clonagem	Tamanho da inserção (pares de base)	Localização dentro de HBV
SA2	M13 mp 18	Eco RI, Hind III	34	249-282
SA1a	M13 mp 19	Eco RI, Hind III	35	194-228
SA2a	M13 mp 19	Eco RI, Hind III	34	249-282
SA4	M13 mp 19	Eco RI, Hind III	87	1521-1607

TABELA 27

## SONDAS BLOQUEADORAS DE HBV

Sonda	Seqüência	Tamanho (pares de base)	CSP para o qual ele hibridiza
B1	ATGATAAAACGCCG (SEQ ID NO: 155)	14	HBV C1
B2	CAGACACATCCAGC (SEQ ID NO: 156)	14	HBV C1
B3	AAGGCACAGCTTG (SEQ ID NO: 157)	13	HBV C2
B4	GAGGCTTGAACAGT (SEQ ID NO: 158)	14	HBV C2
B5	TATCGCTGGATGTGTC (SEQ ID NO: 159)	16	HBV C3
B6	TCGGCGTTTTATCATG (SEQ ID NO: 160)	16	HBV C3

## EXEMPLO 16

## 5 EFEITO DE SONDAS BLOQUEADORAS SOBRE DETECÇÃO DE TSHC-POSITIVO DE HBV

Durante a etapa de captura de temperatura ambiente, o excesso de SSP (dupla M13 RNA/HBV-M13 DNA) hibridizando não-especificamente para o CSP é imobilizado sobre a placa que resulta em sinais de base elevada. Em uma tentativa para reduzir o sinal de base, as sondas bloqueadoras foram empregadas em detecção de TSHC-positivo de HBV. As sondas bloqueadoras foram designadas serem muito menores do que as CSPs a fim de que elas sejam apenas capazes de hibridizar para as sondas de captura em temperaturas bem abaixo das temperaturas de hibridização empregadas no ensaio.

15 As fixações de sonda bloqueadora consistindo em dois oligonu-

cleotídeos separados que são complementares às CSPs foram empregadas. As sondas bloqueadoras foram adicionadas à mistura de hibridização em 10 vezes o excesso relativo às CSPs. Uma vez que as sondas bloqueadoras são muito menores do que as CSPs, elas não hibridizam com as CSPs na temperatura de hibridização alvo e portanto não interferem com a hibridização das CSPs para os ácidos nucléicos alvo. Seguindo a hibridização de CSP e ácidos nucléicos alvos, as amostras foram submetidas a uma etapa de temperatura ambiente durante a qual as sondas bloqueadoras hibridizam com o excesso de CSPs, desse modo prevenindo-as de hibridizarem para as SSPs. Como mostrado na Tabela 28, o uso das sondas bloqueadoras na reação de hibridização reduziu enormemente os sinais de base do ensaio.

**TABELA 28**

**EFEITO DE SONDAS BLOQUEADORAS SOBRE A DETECÇÃO DE HBV**

Sonda de Captura	Sonda Bloqueadora	Sinal de Base (RLU)
HBV C1	nenhuma	17892
HBV C1	B1,B2	424
HBV C2	nenhuma	9244
HBV C2	B3,B4	398

**EXEMPLO 17**

**EFEITO DO COMPRIMENTO DE SSP SOBRE A DETECÇÃO DE TSHC-POSITIVO DE HBV**

O efeito do comprimento da seqüência de DNA inserida no vetor M13 para gerar a SSP sobre a detecção de TSHC-Positivo de HBV foi estudado. Um controle positivo contendo 20 pg/ml de DNA de plasmídeo HBV foram empregados. Como mostrado na Tabela 29, o uso de uma seqüência complementar de HBV mais longa na SSP (87 pares de base) resultou em um aumento substancial em sinal de detecção. O efeito é improvável devido à condição de temperatura de hibridização subideal uma vez que o Tm das sondas mais curtas é de 15 graus acima da temperatura de hibridização. Como a dupla de DNA/RNA de M13 formada no SSP pode atuar para bloquear parcialmente a seqüência de DNA complementar na sonda de hibridi-

zação para as seqüências de HBV nos ácidos nucléicos alvo, seqüências complementares mais longas na SSP podem superar este bloqueio.

**TABELA 29**

**EFEITO DO COMPRIMENTO DA SEQÜÊNCIA COMPLEMENTAR NA SSP  
SOBRE A DETECÇÃO DE TSHC-POSITIVO DE HBV**

5

SSP	Tamanho da Seqüência de DNA Alvo de HBV em SSP (pares de base)	Tm da Seqüência de DNA Alvo de HBV em SSP	Temperatura de hibridização	Sinal (RLU)
SA1	35	83°C	65°C	1741
SA2	34	80°C	65°C	1857
SA4	87	108°C	65°C	7978

**EXEMPLO 18**

**TSHC-POSITIVO E DETECÇÃO DE HC II DE HBV**

A sensibilidade relativa de detecção de TSHC-Positivo e HC II (Captura II de Híbrido, Digene) de HBV foi comparada. Os padrões positivos de HBV de três diferentes concentrações foram testados nas experiências. Como mostrado na Tabela 30, os sinais obtidos durante o método de detecção de TSHC-Positivo foram aproximadamente duas vezes maiores do que aqueles obtidos empregando-se o método de detecção de HC II.

10

**TABELA 30**

**DETECÇÃO DE TSHC-POSITIVO E HC II DE HBV\***

15

Método	Controle	Concentração de HBV Alvo		
		10 pg/ml	20 pg/ml	100 pg/ml
HCII	48	2355	4225	21438
TSHC Plus	285	4856	7978	37689

**EXEMPLO 19**

**PREPARAÇÃO DE AMOSTRA PARA DETECÇÃO DE CAPTURA DE HÍBRIDO DE ALVO ESPECÍFICO DE SNPs**

Uma modalidade do método TSHC para detectar SNPs fornece o método SNP de Captura de Híbrido (HC-SNP0 que é demonstrado aqui empregando-se DNA de p53 como a molécula alvo e discriminando-se os

20

polimorfismos ou SNPs no códon 72 da região de codificação p53 (Kawajiri, e outro, Carcinogenesis. 14:1085 - 1089, 1993). Os dois polimorfismos de p53 no filamento de anti-senso no códon 72, são gCg, que codifica Arginina (Arg), e o códon 72 de p53, no filamento de anti-senso, gGg, que codifica Prolina (Pro). Os dois polimorfismos são referidos como p53Arg e p53Pro. Este é um SNP onde o método HC-SNP não está limitado a estes tipos específicos de sondas, rótulos de sonda, e alvos, porém pode também abranger o escopo total de variações descritas para o método TSHC.

Amostras compreendendo ou amplicons de PCR ou DNA genômico foram empregadas como o alvo para detecção de polimorfismo na modalidade HC-SNP. Empregar o DNA genômico pode ser particularmente benéfico para aplicações diagnósticas. Para a preparação de amplicons de PCR, dois primers foram empregados, por exemplo, o Primer Superior - 5'-AAGACCCAGGTCCAGATGAAG-3' (SEQ ID Nº: 161) e o Primer Inferior - 5'-AGAATGCAAGAAGCCCAGAC-3' (SEQ ID Nº: 162) (descrito por Klaes e outro, J. Mol. Med. 77:299 - 302, 1999). Estes Primers foram especificamente escolhidos para amplificação de uma região de exon 4 de p53 (182 pares de base), utilizando um programa compreendendo: a) 95°C durante 4 minutos; b) 94°C durante 40 segundos; c) 62°C durante 40 segundos; d) 72°C durante 40 segundos; e) 72°C durante 6 minutos; e f) 4°C para estocagem ou antes do uso, onde as etapas b - d são repetidas durante 25 a 45 ciclos dependendo da qualidade de padrão de DNA. Os amplicons de PCR foram então diluídos para 1:1000 ou 1:100 em TE (10 mM Tris; 1 mM de EDTA), pH 7,4, antes do teste. Exemplos não-limitantes de amostras de DNA genômico para a preparação de DNA genômico incluem, porém não estão limitados a, fluídos humanos, células, tecidos, e tecidos arquivais em blocos de parafina. O isolamento de DNA genômico foi realizado empregando-se os *kits* apropriados (Qiagen). Aproximadamente, 10 a 20 µg de DNA genômico por par de teste foram requeridos para detectar o polimorfismo direto desviando a etapa de amplificação de alvo.

Cada alvo de DNA foi testado com os oligos de captura específicos de p53-Arg e específicos de p53-Pro separadamente. As relações de

sinal para ruído (S/N) foram calculadas, e a relação de S/N específico de p53-Arg sobre S/N específico de p53-Pro foram empregadas para identificar o genótipo de amostra. Um exemplo dos resultados de teste de SNP para determinar os homozigotos (Arg/Arg ou Pro/pro) versus heterozigotos (Arg/Pro) é mostrado na Tabela 31. Os resultados destes testes foram confirmados por análise Wave (Transgenomic; Santa Clara, CA) e análise de seqüência de DNA.

#### EXEMPLO 20

#### MÉTODO DE CAPTURA DE HÍBRIDO ESPECÍFICA DO ALVO PARA DETECTAR SNPs

O DNA plasmídeo (p53-Arg e p53-Pro) foi preparado para culturas bacterianas empregando-se o Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc.; Valência, CA). O DNA genômico (HeLa, SiHa, e Jurkat) foi preparado das linhagens celulares empregando-se o DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Inc.). O DNA plasmídeo e DNA de amostra clínica foram amplificados empregando-se o método de PCR previamente descrito (45 ciclos). Antes do uso, o DNA amplificado por PCR foi diluído 1:1000 em TE, pH 7,4, e as amostras de DNA plasmídeo foram diluídas para 100 pg/ml em TE, pH 7,4. Cinco microlitros de DNA plasmídeo ou amplificado por PCR diluído foram empregados por teste. Cinqüenta microlitros de amostras de DNA genômico extraídas foram empregadas por teste contendo 5 µg, 7 µg, e 10 µg para HeLa, Jurkat, e SiHa, DNA genômico respectivamente. Cada amostra foi testada duas vezes independentemente para cada ensaio. O primeiro teste foi realizado empregando-se o CSP de p53-Arg e SSP de p53. O segundo teste foi realizado empregando-se o CSP p53-Pro e SSP de p53.

Uma mistura de água e DNA alvo em um volume final de 50 µl por cavidade, foi adicionada à microplaca de hibridização. O Reagente de desnaturação 5100-0431 (Digene) (25 µl) foram adicionados por cavidade. A placa foi revestida com um selante de placa e agitada durante 10 a 30 segundos a 1100 rpm sobre um agitador de placa. As reações foram desnaturadas a 65°C durante 25 minutos no aquecedor de microplaca I (Robbins Dcientific Corp.; Sunnyvale, CA). Durante a etapa de desnaturação,

as misturas de sonda foram preparadas. A mistura de sonda específica de p53-Arg consistiu de 15 pmoles/ml de CSP específica de Arg de 16 bases de comprimento, 600 ng/ml de SSP de p53, e 4X Diluente de Sonda (Digene). A mistura de sonda específica de p53-Pro consistiu de 15 pmoles/ml de CSP específica de Pro de 16 bases de comprimento, 600 ng/ml de SSP de p53, e 4X Diluente de Sonda (Digene). Cada mistura de sonda (25 µl cada) foi adicionada à amostra desnaturada. A placa foi revestida com um selante de placa e agitada durante 10 a 30 segundos a 1100 rpm empregando-se uma agitadora de placa. As amostras foram permitidas hibridizarem a 65°C durante 1 hora no aquecedor de microplaca. As amostras hibridizadas foram incubadas em temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos (para diminuir a temperatura da placa). As reações de hibridização foram transferidas para uma placa de estreptavidina (SA) de cavidade 96 (Digene), e cobertas com um selante de placa. Os híbridos foram capturados sobre a placa SA a 45°C durante 45 minutos com agitação a 900 rpm. A imobilização de alvos hibridizados por CSP pode ser realizada em solução de hibridização colocada em cavidades de uma placa de cavidade 96, por exemplo, e a placa é agitada durante 15 minutos a 2 horas em temperaturas variando de 20°C a 90°C, preferivelmente em temperatura ambiente durante 1 hora agitando a 1100 rmps. As temperaturas de captura acima da temperatura ambiente podem ser preferidas para níveis adicionados de rigurosidade quando a hibridização (e "hibridização promíscua") ocorre durante a etapa de captura de placa. O sobrenadante foi decantado e 100 µl por cavidade de DR-1 (Digene) foram adicionados para a detecção de híbridos de RNA/DNA capturados. A placa foi incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos sem agitação. O sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada duas vezes com Tampão de Lavagem Sharp de temperatura ambiente. As cavidades foram então reenchidas com o Tampão de Lavagem Sharp e a placa foi incubada a 60°C durante 10 minutos. A placa foi então lavada duas vezes com Tampão de Lavagem Sharp de temperatura ambiente, e uma vez com o Tampão de Lavagem de Captura 2 de Híbridos de temperatura ambiente. A placa foi manchada de tampão de lavagem residual (empregando-se *kimtowels*). Um



substrato fosforilado quimiluminescente, DR-2 (100 µl/cavidade) foi adicionado e as reações foram incubadas em temperatura ambiente durante 15 minutos sem agitação. O substrato ativado foi avaliado e analisado empregando-se um liminômetro de placa (Veja a Tabela 31).

5

TABELA 31

## DADOS DE GENÓTIPO DE HC-SNP

P53 DNA alvo	S/N empregando-se o oligo de captura específica de Arg	S/N empregando-se o oligo de captura específico de Pro	Relação Arg/Pro	Genótipo
P53-ArgDNA, 100 pg/ml	98,9	4,5	21,91	Arg homozigoto
P53-Pro DNA, 100 pg/ml	10,2	68,0	0,15	Pro homozigoto
P53-Arg/Pro DNA, 100 pg/ml	56,4	54,1	1,04	Arg/Pro heterozigoto
P53-Arg PCR	1350,1	7,9	170,90	Arg homozigoto
P53-Pro PCR	88,0	1093,8	0,08	Pro homozigoto
P53-Arg/Pro PCR	874,3	506,5	1,73	Arg/Pro heterozigoto
DNA de HeLa, 5 µg por cavidade	10,8	7,0	1,54	Arg/Pro heterozigoto
DNA de SiHa, 10 µg por cavidade	3,8	15,5	0,25	Pro homozigoto
DNA de Jurkat, 7 µg por cavidade	23,2	1,6	14,5	Arg homozigoto
Amostra Clínica 1 de PCR	162,6	106,2	1,53	Arg/Pro heterozigoto
Amostra Clínica 2 de PCR	51,9	652,5	0,08	Pro homozigoto
Amostra Clínica 3 de PCR	345,3	2,3	150,13	Arg homozigoto

A descrição acima de várias modalidades preferidas foi apresentada para os propósitos de ilustração e descrição. Não destina-se a ser exaustiva ou limitativa das formas precisas descritas. As modificações ou variações óbvias são possíveis à luz dos ensinamentos acima mencionados.

- 5 As modalidades descritas foram escolhidas e descritas para fornecer ilustrações e sua aplicação prática para desse modo possibilitar alguém versado na técnica utilizar as várias modalidades e com várias modificações quando são adaptadas ao uso particular contemplado. Todas as tais modificações e variações incluem-se no sistema como determinado pelas reivindicações anexas quando interpretado de acordo com a amplitude para a qual elas são razoavelmente, legalmente e eqüitativamente intituladas.
- 10

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Qiagen Gaithersburg, Inc.

<120> MÉTODOS PARA DETECTAR UM ÁCIDO NUCLEICO ALVO POR CAPTURA DE HÍBRIDO DE TIPO ESPECÍFICO

<130> 2912943-001190

<150> US 09/594 839

<151> 15/06/2000

<150> PCT/US2001/019353

<151> 15/06/2001

<160> 162

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 1

ttattattac gttcatgtcg gcaaacagct cgtttattat ta

42

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 2

ttattattac gtcttgatg gcgatacggc ttattatta

39

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 3

cgctctggat ggcgatacgg c

21

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 4

cgttcatgtc ggcaaacagc togt

24

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 5

cgttcatgtc ggcaaacagc togtogtoct ggatggcgat acggc

45

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 6

gatgggggta tttttcctaa gatggggcgg gtcc

34

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 7

tacccccgatc atcagttatc cttaaggt

28

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 8

aaaccgttcc atgaccgga

19

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 9

atcgcgtggt ccagagacag gc

22

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 10

caacgcccaa aataata

17

<210> 11

<211> 20

<212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 11  
 gtccccgaac cgatctagcg 20  
  
 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 12  
 cgaaccataa accattcccc at 22  
  
 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 13  
 cacgcccgtg gttctggaat togac 25  
  
 <210> 14  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 14  
 tttattagat ggggttattt ttcttaagat ggggcgggtc c 41  
  
 <210> 15

<211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 15  
 ggttattttt cctaag 16

<210> 16  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 16  
 attattgggtt atttttccta agattatt 28

<210> 17  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 17  
 acgagccct tgactccgat tcgtcatcgg atgactccct 40

<210> 18  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 18  
 atgcgccagt gtatcaatca gctgtttcgg gt 32

<210> 19  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 19  
 caaaacgtcc tggagacggg tgagtgtcgg cgaggacg 38

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 20  
 gtccccgacc cgatctagcg 20

<210> 21  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 21  
 gcagactgcg ccaggaacga gta 23

<210> 22  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 22  
 gtgcccacgc ccgtggttct ggaattcgac agcga 35



<210>	23	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	23	
	gcagactgcg ccaggaacga gtagttggag tactg	35
<210>	24	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	24	
	aagaggtcca ttgggtgggg ttgatacggg aaagac	36
<210>	25	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	25	
	cgtaatgcfg cggtgcagac tcccctg	27
<210>	26	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	26	
	ccaactacce cgatcatcag ttatccttaa ggtctcttg	39

<210> 27  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 27  
 aaaaaaaaaac aaaacgtcct ggagacgggt gagtgtcggc gaggacg 47

<210> 28  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 28  
 caaaacgtcc tggagacggg tgagtgtcgg cgaggacg 38

<210> 29  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 29  
 caaaacgtcc ggagacgggt gagtgcggcg aggacg 36

<210> 30  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 30

aggaaaaata accccatc	18
<210> 31	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 31	
gacccgcccc atctt	15
<210> 32	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 32	
ggacccgccc catcttagga aaaataaacc catc	34
<210> 33	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 33	
aaaaataacc cca	13
<210> 34	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	

<400> 34  
cgccccatct t 11

<210> 35  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 35  
ccatcttagg aaaaa 15

<210> 36  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 36  
ataactgatg atcgg 15

<210> 37  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 37  
ccacccaatg gacctc 16

<210> 38  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 38  
gtcttttcccg tatcaacc 18

<210> 39  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 39  
cgccgcatta cg 12

<210> 40  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 40  
aggggagtct gc 12

<210> 41  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 41  
ctgtttgccg aca 13

<210> 42  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 42

tatcgccatc cag

13

<210> 43

<211> 14

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 43

atgatcgggg tagt

14

<210> 44

<211> 16

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 44

agagacctta aggata

16

<210> 45

<211> 15

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 45

attccagaac cacgg

15

<210> 46

<211> 13

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 46

ttccagaacc acg

13

<210> 47

<211> 11

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 47

tccagaacca c

11

<210> 48

<211> 13

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 48

gttcctggcg cag

13

<210> 49

<211> 12

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 49

ttcctggcgc ag

12

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 50

gcccgcgccg ccagcactac tttc

24

<210> 51

<211> 35

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 51

aaacgttggg aggtgtgtgc gtcatoctgg agcta

35

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 52

gaccaaaacc gaggtagggt ctgtgt

26

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 53

aaacgttggg aggtgtgtgc gtca

24

<210> 54

<211> 23

<212> DNA



<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 54

tgctcgtcac gaagtcactc atg

23

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 55

cattactgcc cgcaccggac c

21

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 56

gccgtggtgt tcctgaacac cagg

24

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 57

agtcagggtt gcccgacttc gtcac

25

<210> 58

<211> 26

<212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 58  
 caggcgtcct cggctctcggg cggggc 26  
  
 <210> 59  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 59  
 cccacgtcac cggggggcccc 20  
  
 <210> 60  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 60  
 gccggtcgcg tgcgacgccc aaggc 25  
  
 <210> 61  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 61  
 ccgacgcgtg ggtatctagg gggctcg 26  
  
 <210> 62

<211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 62  
 cgggacggcg agcggaaagt caacgt 26

<210> 63  
 <211> 9  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 63  
 ggcgcgggc 9

<210> 64  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 64  
 gaaagtagtg ctggc 15

<210> 65  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 65  
 tgctggcggc g 11

<210> 66  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 66  
 acacctccca acg 13

<210> 67  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 67  
 ctccaggatg acg 13

<210> 68  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 68  
 tcggttttgg tc 12

<210> 69  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 69  
 acacagaacc tca 13

<210> 70  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 70  
 cacacacctc cca 13

<210> 71  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 71  
 cgacccccta gata 14

<210> 72  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 72  
 ccacgcgctcg g 11

<210> 73  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 73  
 acggttgactt tccgc 15

<210> 74  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 74  
 cgccgtcccg 10

<210> 75  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 75  
 gtacagatgg taccgggggtt gtagaagtat ctg 33

<210> 76  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 76  
 ctgcaacaag acatacatcg accggtccac c 31

<210> 77  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 77

gaagtaggtg aggctgcatg tgaagtggta g 31

<210> 78  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 78  
 cagctctgtg cataactgtg gtaactttct ggg 33

<210> 79  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 79  
 gaggtcttct ccaacatgct atgcaacgtc ctg 33

<210> 80  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 80  
 gtgtaggtgc atgctctata ggtacatcag gcc 33

<210> 81  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 81  
caatgccgag cttagttcat gcaatttccg agg 33

<210> 82  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 82  
gaagtagtag ttgcagacgc cctaaaggt tgc 33

<210> 83  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 83  
gaacgcgatg gtacaggcac tgcagggctcc 30

<210> 84  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 84  
gaacgcgatg gtacaggcac tgca 24

<210> 85  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico



<400> 85	
acgcccaccc aatggaatgt accc	24
<210> 86	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 86	
tctgcgtcgt tggagtcggt cctgtcgtgc tc	32
<210> 87	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 87	
ttattattac tacatacatt gccgccatgt tcgcca	36
<210> 88	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 88	
ttattattat gttgccctct gtgcccccggt tgtctatagc ctccgt	46
<210> 89	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 89

ttattattag gagcagtgcc caaaagatta aagtttgc

38

<210> 90

<211> 37

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 90

ttattattac acggtgctgg aatacgggtga gggggtg

37

<210> 91

<211> 33

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 91

ttattattaa cgcccacca atggaatgta ccc

33

<210> 92

<211> 35

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 92

ttattattaa tagtattgtg gtgtgtttct cacat

35

<210> 93

<211> 30

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 93  
ttattattag ttggagtcgt tcctgctgtg 30

<210> 94  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 94  
ttattattac ggaatttcat tttggggctc t 31

<210> 95  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 95  
gctcgaaggc cgtctgctga gctttctact act 33

<210> 96  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 96  
gcgccatcct gtaatgcact tttccacaaa gc 32

<210> 97  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 97

tagtgctagg tgtagtggac gcaggaggtg g

31

<210> 98

<211> 32

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 98

ggtcacaaca tgtattacac tgcocctoggt ac

32

<210> 99

<211> 31

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 99

cctacgtctg cgaagtcttt cttgocgtgc c

31

<210> 100

<211> 34

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 100

ctgcattgtc actactatcc ccaccactac tttg

34

<210> 101

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 101

ccacaaggca cattcataca tacacgcacg ca

32

<210> 102

<211> 33

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 102

gttctaaggt cctctgccga gctctctact gta

33

<210> 103

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 103

ttattattat gcggtttttg gggtcgacgt ggaggc

36

<210> 104

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 104

ttattattaa gacctgcccc ctaaggttac atagcc

36

<210> 105

<211> 49

<212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 105  
 ttattattac agcattgcag cctttttggt acttgcttgt aatagctcc 49  
  
 <210> 106  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 106  
 ttattattaa tctgtaatg cacttttcca caaa 34  
  
 <210> 107  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 107  
 ttattattag cctggtcaca acatgtatta c 31  
  
 <210> 108  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 108  
 ttattattac aggatctaata tcattctgag gtt 33  
  
 <210> 109

<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 109  
 tgcggttttg ggggtcgacg tggaggc 27

<210> 110  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 110  
 gcctccacgt cgac 14

<210> 111  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 111  
 ccccaaaacc g 11

<210> 112  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico  
  
 <400> 112  
 ggtacattcc attggg 16

<210> 113  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 113  
 tgggcgtaa taataa 16

<210> 114  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 114  
 accatcgcgt tc 12

<210> 115  
 <211> 14  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 115  
 ggaccctgca gtgc 14

<210> 116  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 116  
 ctgtaccatc gcggtt 15



<210> 117  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 117  
tgcagtgctt gt 12

<210> 118  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 118  
ccacctcttg cgt 13

<210> 119  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 119  
attacaggat ggcgc 15

<210> 120  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 120  
gctttctgga aaagtg 16

<210> 121  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 121  
ccactacacc tagcacta 18

<210> 122  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 122  
cagataacttc tacaacc 17

<210> 123  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 123  
ccggtaccat ctgtac 16

<210> 124  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 124

ggtggaccgg tcg	13
<210> 125	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 125	
atgtatgtct tgttgacg	18
<210> 126	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 126	
ctaccacttc acatgc	16
<210> 127	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	
<400> 127	
agcctcacct acttc	15
<210> 128	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Sonda de Ácido Nucléico	

<400> 128  
cccagaaagt taccac 16

<210> 129  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 129  
agttatgcac agagct 16

<210> 130  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 130  
caggacgttg catagc 16

<210> 131  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 131  
atgttggaga agacctc 17

<210> 132  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial

<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 132  
ggcctgatgt acctata 17

<210> 133  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial  
  
<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 133  
gagcatgcac ctacac 16

<210> 134  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial  
  
<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 134  
ctcggaaatt gcatg 15

<210> 135  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial  
  
<220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 135  
aactaagctc ggcatt 16

<210> 136  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial  
  
<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 136

gcaaccttta gggg

14

<210> 137

<211> 19

<212> DNA

<213> Seqüência Artifical

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 137

cgtctgcaac tactacttc

19

<210> 138

<211> 14

<212> DNA

<213> Seqüência Artifical

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 138

gtaccgaggg cagt

14

<210> 139

<211> 18

<212> DNA

<213> Seqüência Artifical

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 139

gtaatacatg ttgtgacc

18

<210> 140

<211> 14

<212> DNA

<213> Seqüência Artifical

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 140

ggcacggcaa gaaa

14

<210> 141

<211> 17

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 141

gacttcgcag acgtagg

17

<210> 142

<211> 15

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 142

caaagtagtg gtggg

15

<210> 143

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 143

gatagtagtg acaatgcag

19

<210> 144

<211> 16

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 144

tgcgtgcgtg tatgta

16

<210> 145

<211> 16

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 145

tgaatgtgcc ttgtgg

16

<210> 146

<211> 18

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 146

agtagtagaa agctcagc

18

<210> 147

<211> 15

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 147

agacgacctt cgagc

15

<210> 148

<211> 17

<212> DNA



<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 148

tacagtagag agctcgg

17

<210> 149

<211> 16

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 149

cagaggacct tagaac

16

<210> 150

<211> 16

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 150

gagcacgaca ggaacg

16

<210> 151

<211> 16

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 151

actccaacga cgcaga

16

<210> 152

<211> 28

- <212> DNA  
<213> Seqüência Artificial
- <220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico
- <400> 152  
gctggatgtg tctgogcgt tttatcat 28
- <210> 153  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial
- <220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico
- <400> 153  
actgttcaag cctccaagct gogcctt 27
- <210> 154  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial
- <220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico
- <400> 154  
atgataaaac gccgcagaca catccagoga ta 32
- <210> 155  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Seqüência Artificial
- <220>  
<223> Sonda de Ácido Nucléico
- <400> 155  
atgataaaac gccg 14
- <210> 156

<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	156	
	cagacacatc cagc	14
<210>	157	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	157	
	aaggcacagc ttg	13
<210>	158	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	158	
	gaggcttgaa cagt	14
<210>	159	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Sonda de Ácido Nucléico	
<400>	159	
	tatcgctgga tgtgtc	16

<210> 160  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Sonda de Ácido Nucléico

<400> 160  
 tcggcgTTTT atcatg

16

<210> 161  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Iniciador Sintético

<300>  
 <301> Kleas, et al.  
 <303> Molecular Medicine  
 <304> 77  
 <306> 299-302  
 <307> 1999

<400> 161  
 aagaccCagg tccagatgaa g

21

<210> 162  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência Artificial

<220>  
 <223> Iniciador Sintético

<300>  
 <301> Kleas, et al.  
 <303> Molecular Medicine  
 <304> 77  
 <306> 299-302  
 <307> 1999

<400> 162

agaatgcaag aagcccagac

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

### Código de Controle

#### Campo 1



A5850828D759580E

#### Campo 2



97E97612C211E346

### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P119474 20804495\_1.txt
- Data de Geração do Código: 26-03-2014
- Hora de Geração do Código: 08:33:54
- Código de Controle:
  - Campo 1: A5850828D759580E
  - Campo 2: 97E97612C211E346

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar um ácido nucleico alvo, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5 (a) hibridizar um ácido nucleico alvo de filamento único com uma sonda de sequência de captura e uma sonda de sequência sinal para formar um complexo híbrido compreendendo híbridos de filamento duplo entre a referida sequência de captura e uma porção do ácido nucleico alvo, em que a sonda de sequência de captura e a sonda de sequência sinal são se hibridizam a regiões não sobrepostas dentro do ácido nucleico alvo e não hibridizam entre si em que a sonda sinal não é rotulada; e
- 10 (b) adicionar uma sonda bloqueadora à reação de hibridização, em que a referida sonda bloqueadora hibridiza com o excesso de sondas de sequência de captura não hibridizadas;
- (c) capturar a sonda de sequência de captura:porção alvo do referido
- 15 complexo híbrido para formar um complexo híbrido preso; e
- (d) detectar o complexo híbrido preso de filamento duplo, detectando assim o ácido nucleico alvo.

2. Método para detectar um ácido nucleico alvo, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 20 (a) hibridizar um ácido nucleico alvo de filamento único com uma sonda de sequência de captura imobilizada e uma sonda de sequência sinal para formar um complexo híbrido compreendendo híbrido de filamento duplo entre as referidas sondas de sequências de captura imobilizadas e uma porção do ácido nucleico alvo, e entre a referida sonda de sequência
- 25 sinal e uma porção do ácido nucleico alvo, em que a sonda de sequência de captura e a sonda de sequência sinal hibridizam com as regiões não sobrepostas dentro do ácido nucleico alvo e não hibridizam entre si;
- (b) adicionar uma sonda bloqueadora à reação de hibridização, em que a
- 30 referida sonda bloqueadora hibridiza com o excesso de sondas de sequência de captura não hibridizadas; e
- (c) detectar o complexo híbrido preso de filamento duplo, detectando as

sim o ácido nucleico alvo.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência de captura é modificada com pelo menos um ligante.

5 4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência sinal não é rotulada.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o ligante é a biotina.

10 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência de captura é linear tendo uma extremidade de 5' e 3', sendo que ambas as extremidades 5' e 3' são biotiniladas.

15 7. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência de captura e a sonda de sequência sinal hibridizam com regiões do ácido nucleico alvo, sendo que as regiões estão separadas por menos de 3 quilobases.

8. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência de captura e a sonda de sequência sinal hibridizam com regiões do ácido nucleico alvo, sendo que as regiões estão separadas por menos de 500 pares de bases.

20 9. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência de captura é uma fusão de duas ou mais sequências complementares a diferentes regiões do ácido nucleico alvo ou a diferentes moléculas alvo.

25 10. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o híbrido de filamento duplo formado é um híbrido de DNA/RNA.

11. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de formar um DNA de filamento único antes da etapa de hibridização.

30 12. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a hibridização da sonda de sequência de captura e a sonda de sequência sinal até o ácido nucleico alvo é realizada sequencialmente.



13. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a etapa (a) e a etapa (b) são realizadas simultaneamente.

14. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sonda bloqueadora apresenta temperatura de fusão menor do que aquela da sonda de sequência de captura.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o híbrido é preso sobre uma fase sólida.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a fase sólida é revestida com estreptavidina.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a fase sólida é uma microplaca.

18. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é realizada em temperatura ambiente.

19. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o híbrido de filamento duplo preso é detectado empregando-se um anticorpo que reconhece o híbrido.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o híbrido é um híbrido de DNA/RNA.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o anticorpo reconhece um híbrido de DNA/RNA e é rotulado com fosfatase alcalina.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o híbrido formado na etapa (a) é capturado em uma fase sólida.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a fase sólida é revestida com estreptavidina.

24. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a fase sólida é uma microplaca.

25. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a sonda bloqueadora é adicionada à reação de hibridização após a hibridização das sondas de sequência de captura ao ácido nucleico alvo.

26. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pe-

lo fato de que a sonda bloqueadora apresenta temperatura de fusão menor do que aquela da sonda de sequência de captura.

27. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência sinal compreende um duplex DNA/RNA e  
5 uma sequência de ácido nucleico de filamento único que hibridiza com o ácido nucleico alvo.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o duplex DNA/RNA é um duplex de M13 DNA - M13 RNA.

29. Método para detectar um ácido nucleico alvo, caracterizado  
10 pelo fato de que compreende:

- (a) hibridizar um ácido nucleico alvo de filamento único com uma sonda de sequência de captura, uma sonda em ponte e uma sonda de sequência sinal para formar um complexo híbrido compreendendo híbridos de filamento duplo entre a referida sonda de sequência de captura e uma  
15 porção do ácido nucleico alvo e entre a referida sonda em ponte e uma porção do ácido nucleico alvo, em que a sonda de sequência de captura e a sonda em ponte hibridizam com regiões não sobrepostas dentro do ácido nucleico alvo e não hibridizam entre si, e a sonda de sequência sinal hibridiza com a sonda em ponte e não hibridiza com o ácido  
20 nucleico alvo e com a sonda de sequência de captura;
- (b) adicionar uma sonda bloqueadora à reação de hibridização, sendo que a referida sonda bloqueadora hibridiza com o excesso de sondas de sequência de captura não hibridizadas;
- (c) ligar o híbrido a uma fase sólida para formar um híbrido de filamento duplo preso; e  
25
- (d) detectar o híbrido de filamento duplo preso, detectando assim o ácido nucleico alvo.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência sinal compreende um duplex de  
30 DNA/RNA e uma um ácido nucleico de filamento único que hibridiza com a sonda em ponte.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pe-

lo fato de que o duplex DNA/RNA é um duplex de M13 DNA - M13 RNA.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a dupla de DNA/RNA é um híbrido formado entre sequências de repetição dentro da sonda de sequência sinal e uma molécula de ácido nucleico tendo sequências complementares às sequências de repetição.

33. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a sonda em ponte compreende ainda uma cauda poli(A).

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a sonda de sequência sinal compreende uma sequência de DNA poli(dT) de filamento único que hibridiza com a cauda poli(A) da sonda em ponte, e um dúplice de DNA/RNA formado entre as sequências poli(dT) na sonda de sequência sinal e uma molécula de ácido nucleico tendo sequências poli(A).

Captura de híbrido de alvo específico

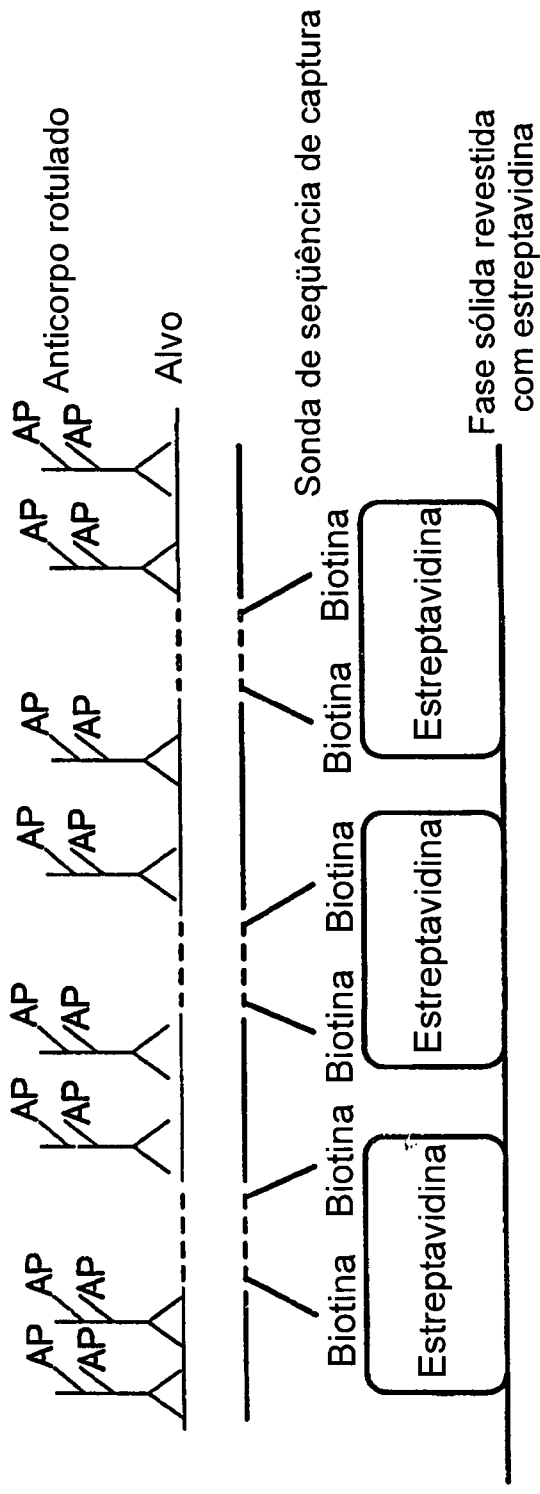


FIG. 1

Captura de híbrido de alvo específico  
utilizando a sonda bloqueadora  
(Versão de hibridização simultânea)

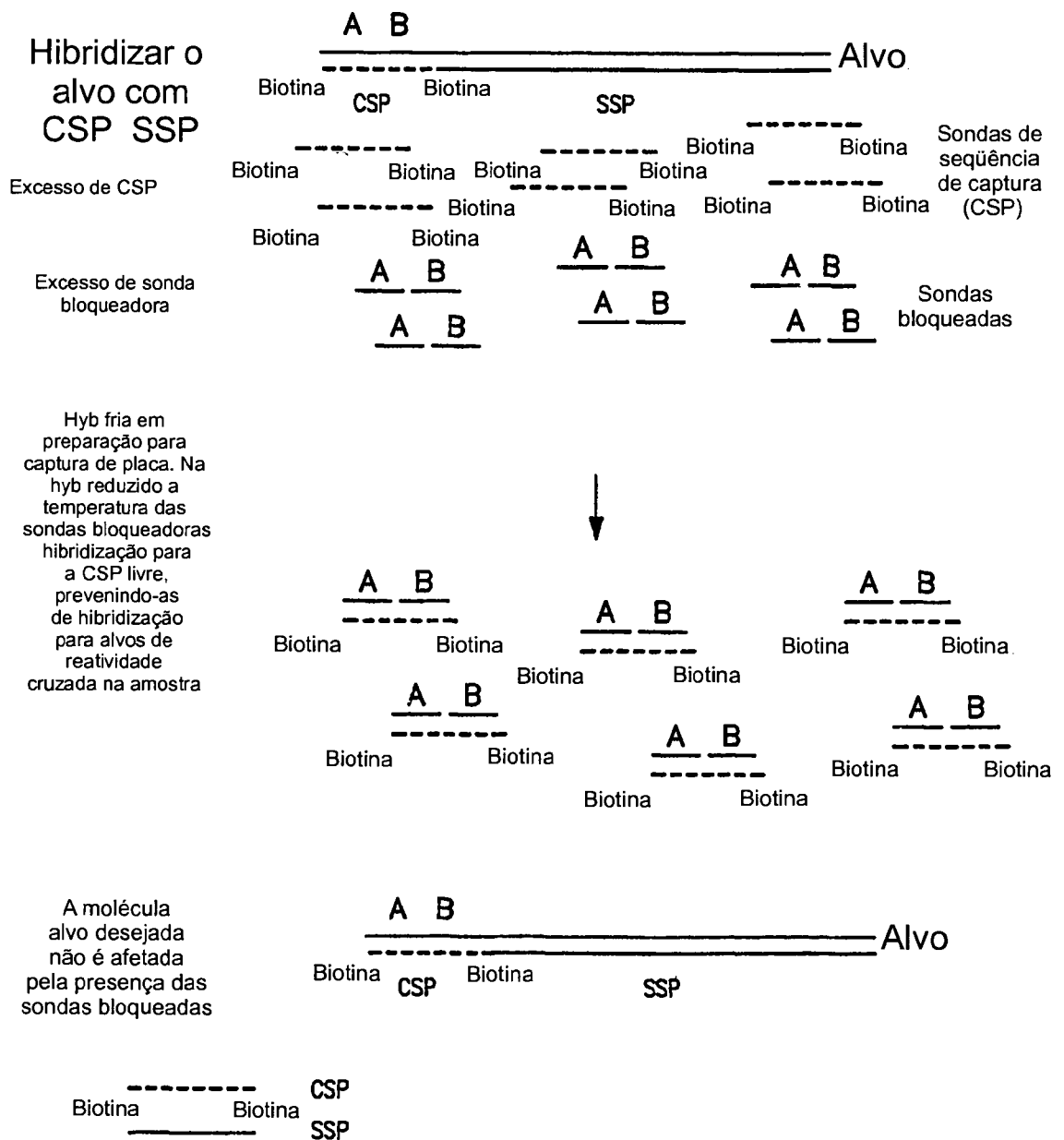


FIG. 2

TSHC com sondas de seqüência da captura "fundidas" (CSP)

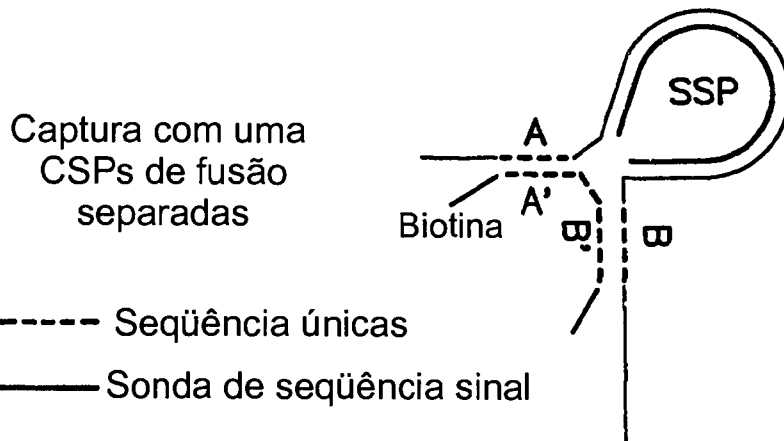
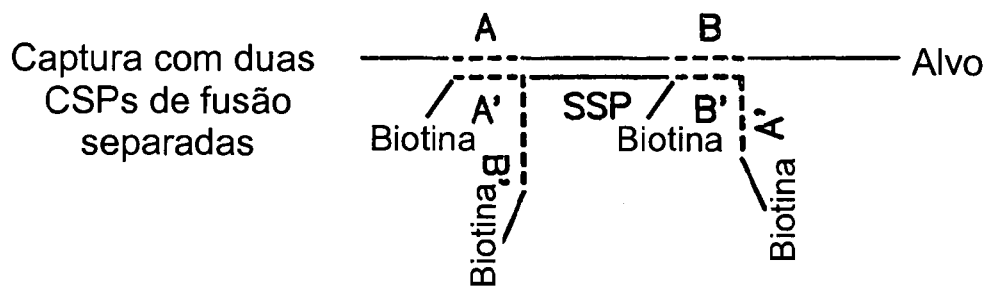
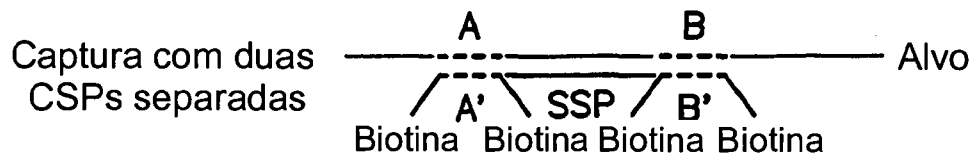


FIG. 3

Sensibilidade analítica e reatividade cruzada de TSHC de HSV-1

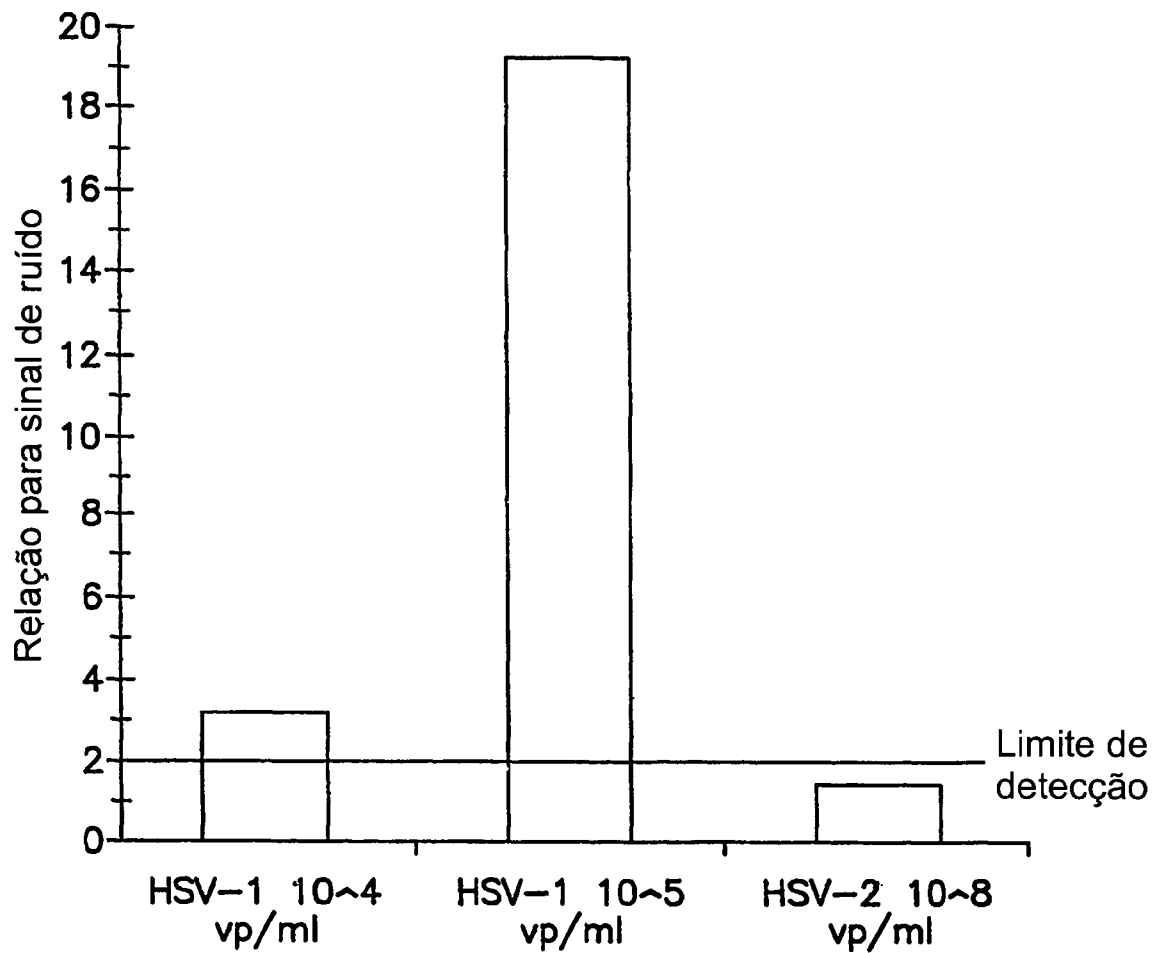


FIG. 4

Sensibilidade analítica e reatividade cruzada de TSHC de HSV-1

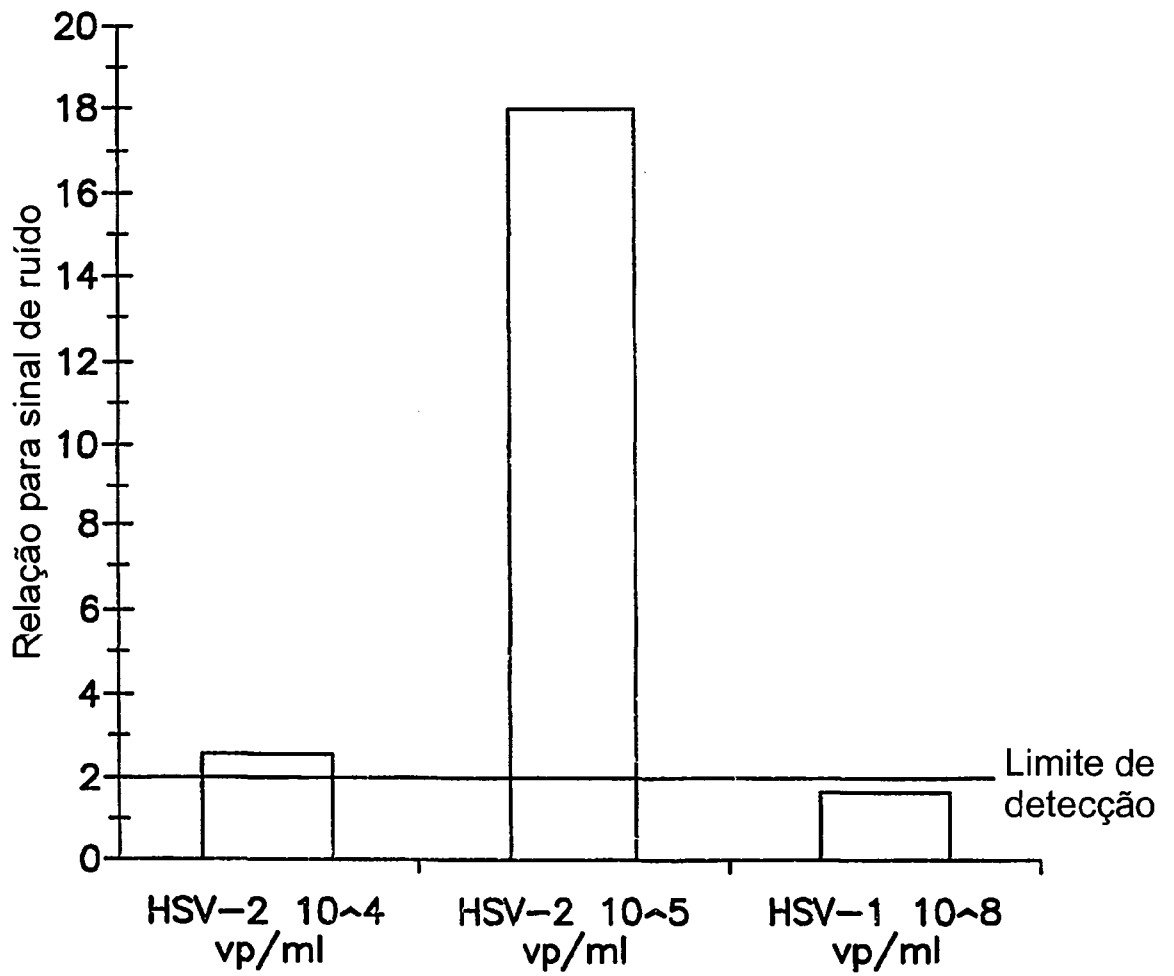


FIG. 5



Versão 1 de TSHC-positivo

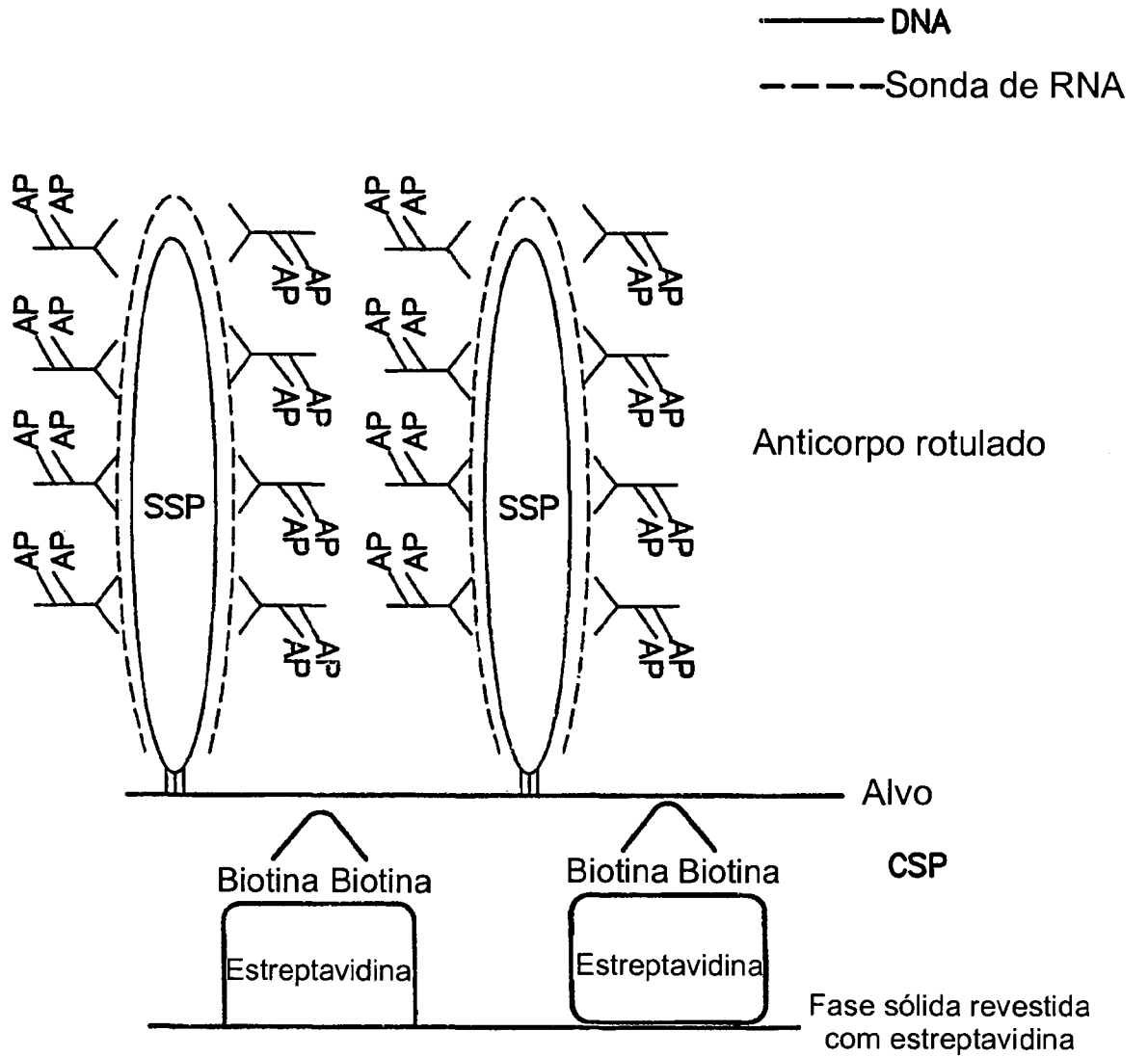


FIG. 6A

Versão 2 de TSHC-positivo

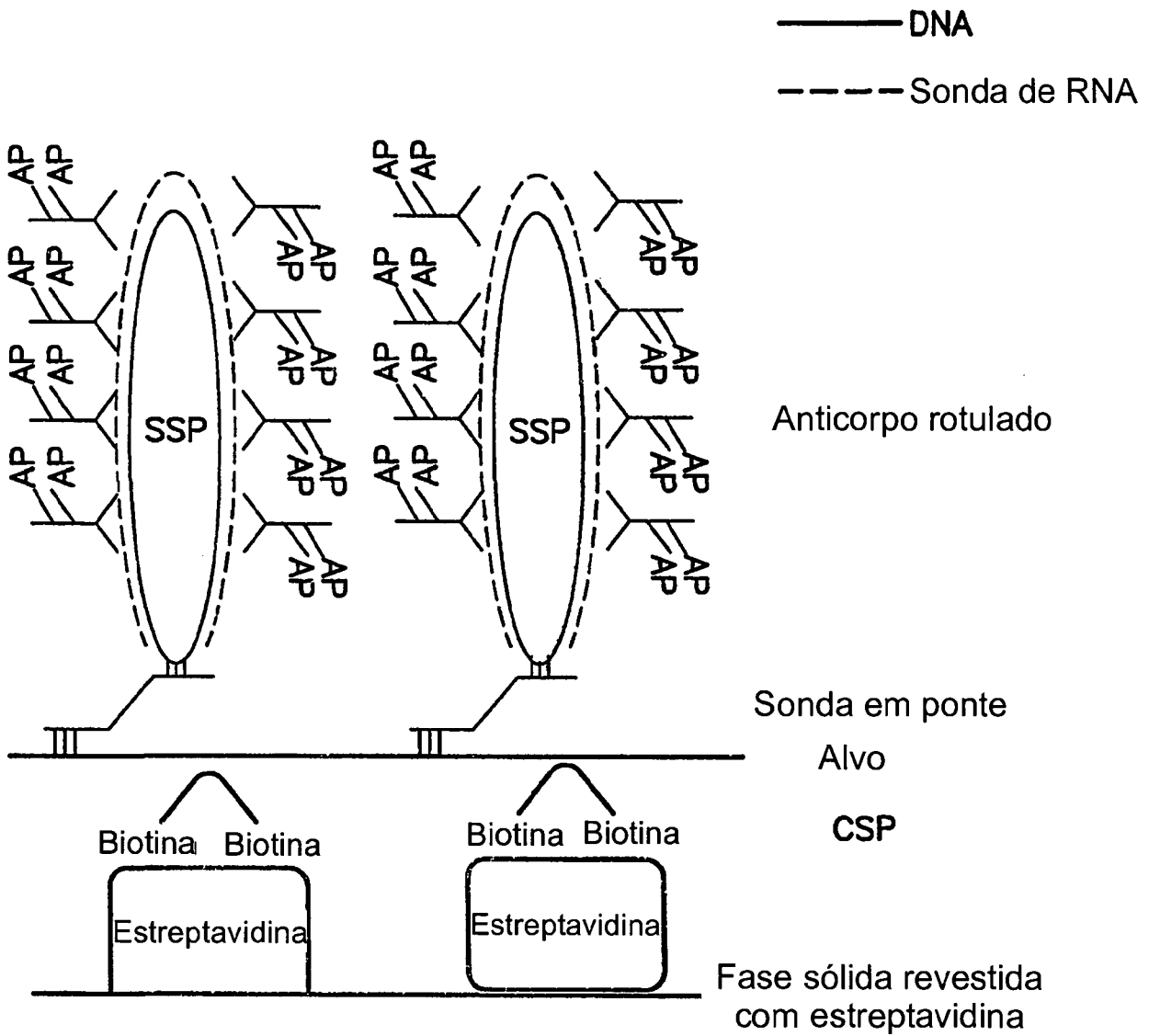


FIG. 6B

Versão 3 de TSHC-positivo

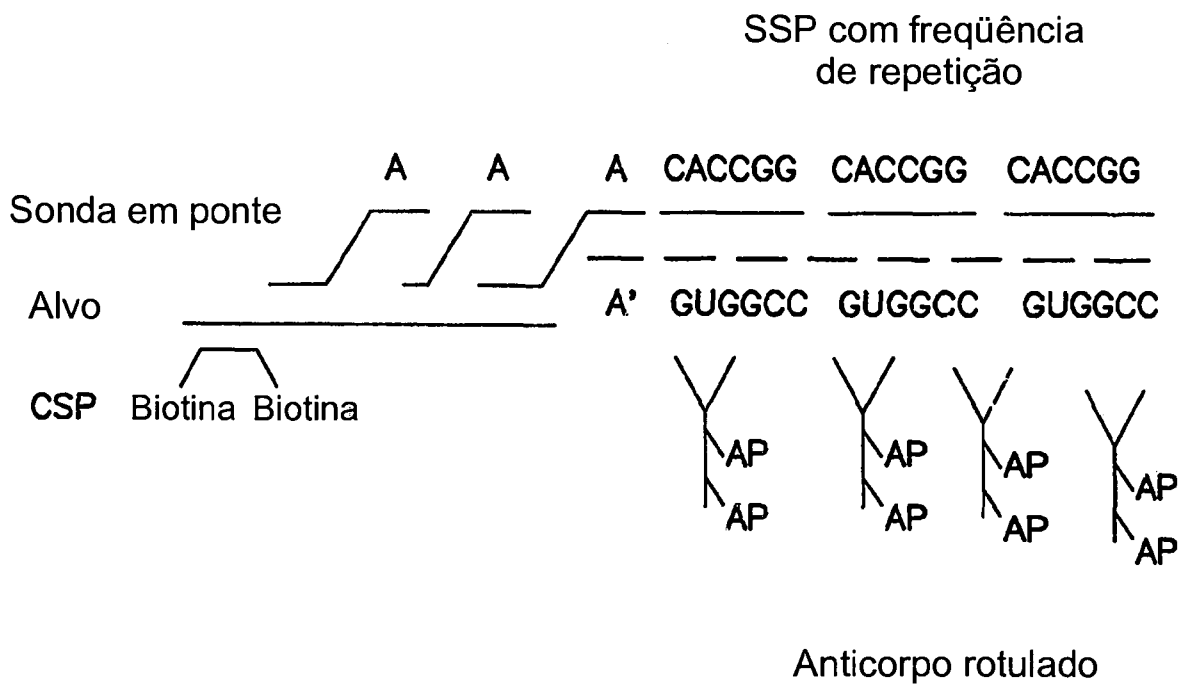


FIG. 6C

Versão 4 de TSHC-positivo

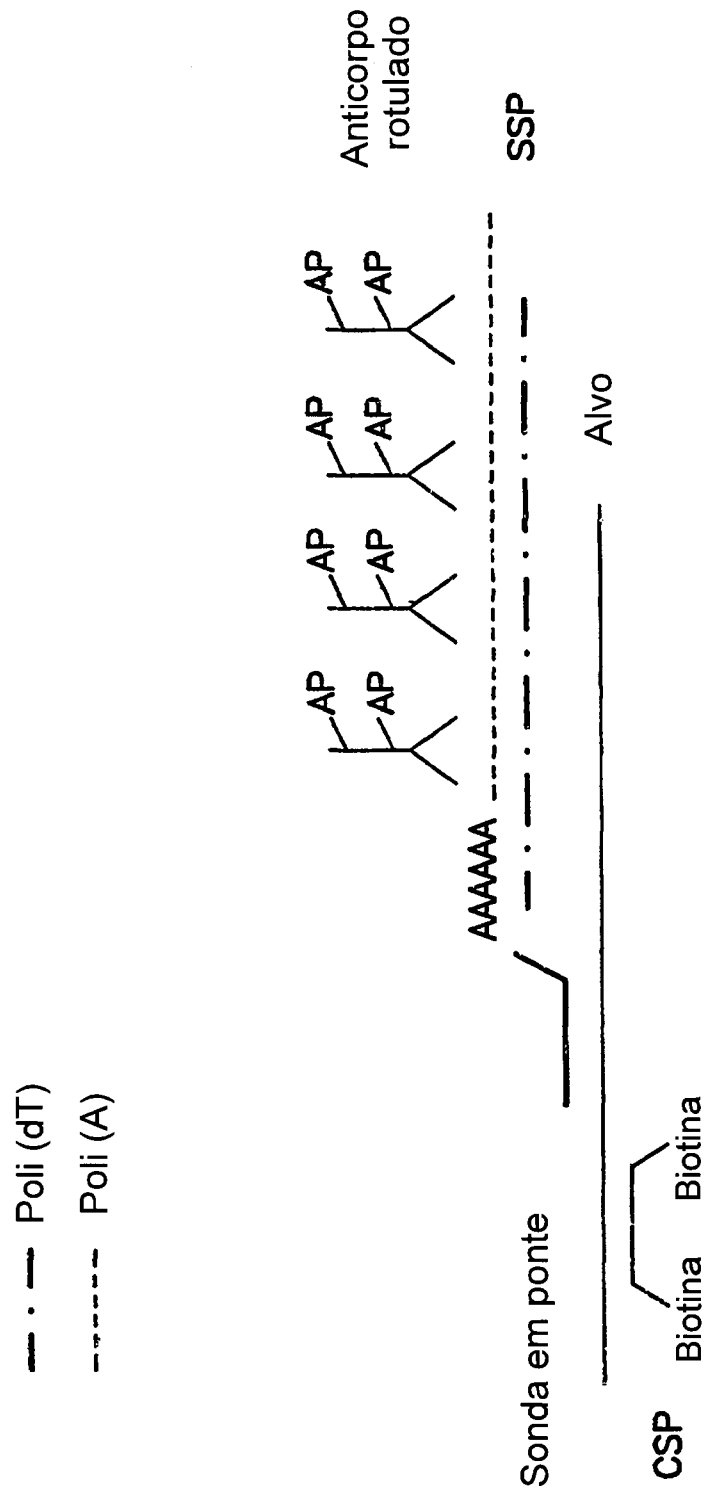


FIG. 6D

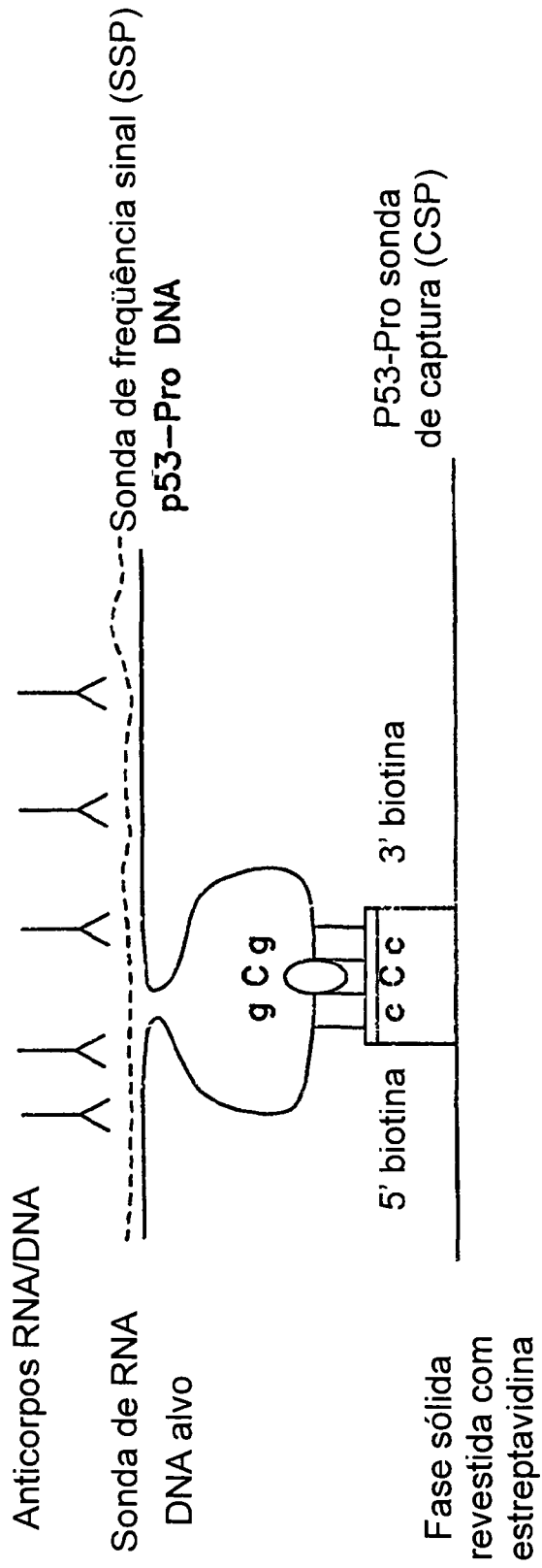


FIG. 7

## **RESUMO**

**Patente de Invenção: "DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS POR MÉTODO DE CAPTURA DE HÍBRIDO DE TIPO ESPECÍFICO".**

5 A captura de híbrido de alvo específico (TSHC) provê um método de detecção de ácido nucléico que é não apenas rápido e sensível, porém é também altamente específico e capaz de discriminar as seqüências alvo de ácido nucléico altamente homólogas. O método produz híbridos de DNA/RNA que podem ser detectados por diversos métodos.