



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

(11) (21) **PI 0105740-5 A**



(22) Data de Depósito: 29/11/2001
(43) Data de Publicação: **08/08/2006**
(RPI 1857)

(51) Int. Cl⁷.:
C12Q 1/68

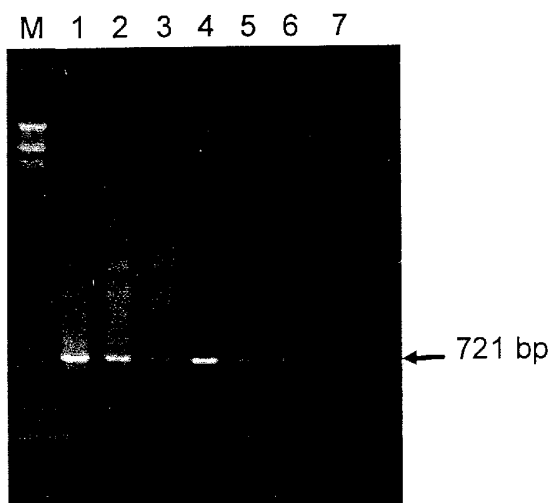
(54) Título: **MÉTODO, KIT E INICIADORES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE NUCLEOTÍDEOS ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE TIPO NESTED EM UM ÚNICO TUBO DE REAÇÃO**

(71) Depositante(s): Fundação Oswaldo Cruz (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Frederico Guilherme Coutinho Abath, Roberto Pereira Werkhauser, Fábio Lopes de Melo

(74) Procurador: Bhering, Almeida & Associados

(57) Resumo: "MÉTODO, KIT E INICIADORES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE NUCLEOTÍDEOS ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE TIPO NESTED EM UM ÚNICO TUBO DE REAÇÃO". O objetivo da presente invenção é eliminar o risco de contaminação cruzada das misturas reacionais a serem utilizadas nos dois estágios da Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested através de um método simples e eficaz, onde não há comprometimento da especificidade e da sensibilidade do sistema quanto à amplificação e identificação da sequência específica de nucleotídeos. O método é caracterizado pela realização da PCR tipo Nested em um único tubo de reação, no qual os iniciadores internos são fixados, por evaporação, na face interna da tampa do tubo até o término da primeira fase de amplificação, quando é promovido o seu contato com a mistura reacional e, portanto, tem início a segunda etapa de amplificação. Adicionalmente, a invenção está relacionada a um kit para uso na amplificação e identificação de sequências de nucleotídeos específicas de seres humanos, plantas, animais e outros organismos unicelulares e pluricelulares. A invenção inclui ainda iniciadores específicos para Plasmodium SP. e Schistosoma sp.



**"MÉTODO, KIT E INICIADORES PARA A IDENTIFICAÇÃO
DE SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE NUCLEOTÍDEOS ATRAVÉS DA REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE TIPO NESTED
EM UM ÚNICO TUBO DE REAÇÃO"**

7/10

5 Campo da Invenção

A presente invenção se relaciona a um método para desenvolver a Reação em Cadeia da Polimerase Dupla com iniciadores internos e externos (PCR tipo Nested) em um único tubo de reação, onde os iniciadores internos da
10 segunda etapa de amplificação apenas entram em contato com a mistura reacional após o término da primeira etapa de amplificação, o que evita prejuízos à especificidade e sensibilidade do sistema quanto à amplificação e identificação da seqüência específica de nucleotídeos.
15 Adicionalmente, a invenção descreve um kit para uso na amplificação e identificação de seqüências de nucleotídeos específicas de seres humanos, plantas, animais e outros organismos unicelulares e pluricelulares. A invenção inclui ainda iniciadores específicos para *Plasmodium sp.* e
20 *Schistosoma sp.*

Fundamentos da Invenção

A detecção de seqüências específicas de nucleotídeos possui uma notável importância em diversas áreas, a exemplo da saúde, da medicina forense e da alimentação. Dentre as
25 várias aplicações relacionadas a este conhecimento, encontra-se a observação de contaminações de alimentos por microrganismos patogênicos, a verificação da predisposição genética à determinadas doenças e o próprio diagnóstico de enfermidades.

Porém, as baixas concentrações iniciais do material genético se constituem em um dos maiores problemas relacionados à identificação de seqüências de ácidos nucleicos. Neste sentido, o surgimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornou possível, a partir de concentrações iniciais ínfimas, a amplificação de seqüências alvos de DNA ou RNA, obtendo-se quantidades suficientemente elevadas a ponto de possibilitar sua detecção. Assim, esta técnica passou a ser empregada com as mais variadas finalidades e, dentre elas, incluem-se as aplicações diagnósticas.

Os documentos US 4.683.202 e US 4.683.195 descrevem o processo denominado Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o qual consiste de três etapas básicas: a) a desnaturação dos filamentos moldes de nucleotídeos a uma temperatura elevada; b) o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores com os filamentos moldes na posição 3' da seqüência de interesse, na temperatura de hibridização; c) extensão, na presença da enzima adequada e de nucleotídeos, dos filamentos a partir da posição 3' dos iniciadores, a fim de replicar a seqüência molde desejada. Todas estas etapas são repetidas de forma cíclica (pelo menos um ciclo é realizado), onde os produtos de um ciclo constituem-se nos moldes para o ciclo seguinte. Logo, a seqüência alvo é amplificada exponencialmente.

Contudo, a sensibilidade do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) torna-se crítica quando o alvo a ser amplificado é uma seqüência de nucleotídeos rara, a exemplo de ácidos nucleicos do vírus HIV em um indivíduo soro

positivo, mas que ainda não tenha desenvolvido a doença, e de amostras forenses contendo quantidades ínfimas de ácido nucléico ou de DNA parcialmente degradado. A dificuldade na detecção de uma seqüência rara está intimamente associada à elevada razão entre a seqüência não alvo e aquela de real interesse. Assim, torna-se necessária a discriminação entre a seqüência não alvo e a seqüência desejada, o que está intimamente associado às condições de reação e à especificidade dos iniciadores utilizados.

10 Neste sentido, a PCR tipo *Nested* tem sido desenvolvida como uma alternativa à PCR convencional para a amplificação de seqüências de nucleotídeos raras, apresentando uma maior sensibilidade de detecção da seqüência alvo e uma elevada especificidade para evitar a amplificação de seqüências não
15 específicas.

Basicamente, a PCR tipo *Nested* caracteriza-se por utilizar dois processos seqüenciais de amplificação. O primeiro consiste na amplificação de toda a seqüência alvo, através do emprego de um conjunto de iniciadores externos, geralmente um par. Em relação ao segundo passo, este inclui apenas a amplificação da seqüência interna (a de real interesse) do produto do estágio anterior, mediante a utilização de iniciadores internos (na maioria dos casos, também é usado um par). Ambos os processos são realizados
20 pelo menos uma vez.

Entretanto, apesar das vantagens sobre a Reação em Cadeia da Polimerase convencional, a PCR tipo *Nested* apresenta problemas que exercem grande influência em relação à contaminação das soluções contendo a seqüência

alvo a ser amplificada. Na área de diagnóstico de doenças, por exemplo, esta contaminação pode ser a responsável pela obtenção de resultados falso-positivos.

Para a efetiva amplificação de uma seqüência de nucleotídeos de interesse através da utilização da PCR tipo *Nested*, torna-se necessário impedir a atuação dos iniciadores do primeiro estágio quando da realização do segundo processo de amplificação, de forma que apenas os iniciadores internos atuem nesta fase do processo. Por este motivo, a Reação em Cadeia da Polimerase tipo *Nested* tem sido tradicionalmente realizada em dois tubos de reação, ou melhor, em dois sistemas reacionais.

Desta forma, após a primeira fase de amplificação, o tubo reacional é aberto, com o objetivo de transferir os produtos desta etapa para um outro tubo, no qual ocorrerá a segunda reação de PCR, e onde será utilizado um par de iniciadores diferentes da etapa anterior. Porém, durante a transferência da mistura reacional para um segundo tubo, o risco de contaminação desta mistura com amplicons gerados anteriormente é consideravelmente elevado.

Diversas alternativas têm sido apresentadas a fim de minimizar este problema. Dentre as propostas incluem-se a diluição do produto resultante do primeiro estágio, e a adição de apenas uma pequena fração do mesmo na segunda fase da PCR tipo *Nested* (Rimstad, E., Hornes, E., Olsvik, O. e Hyllseth, B., 1990. Identification of a Double-Stranded RNA Virus by Using Polymerase Chain Reaction and Magnetic Separation of the Synthesized DNA Segments. J. Clin. Microbiol. 28: 2275 - 2778. Welch, D., Lee, C. H. e

Larsen, S. H., 1990. Detection of Plasmid DNA from all *Chlamydia trachomatis* serovars with a Two-Step Polymerase Chain Reaction. Appl. Env. Microbiol. 56: 2494 - 2498).

5 Todavia, tais propostas ainda não eliminam a possibilidade de contaminação da solução por amplicons resultantes da primeira fase da PCR tipo Nested.

Com o objetivo de minimizar esses riscos de contaminação, alguns sistemas para PCR tipo Nested utilizando um único tubo de reação têm sido desenvolvidos.

10 Em geral, esses métodos para PCR tipo Nested enquadram-se dentro de dois grupos principais: a) aquele que emprega pares de iniciadores com temperaturas de anelamento diferentes (Tang X., Bartlett, S.M., Smith, W.J., Lee, C.H., 1997. A Single-Tube Nested PCR for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. Journal of Clinical Microbiology 35: 1597-1599; Homan, W., Gorkom, T.V., Kan, Y.Y., Jolanda, H., 1999. Characterization of *Cryptosporidium parvum* in Human and Animal Feces by Single-Tube Nested Polymerase Chain Reaction and Restriction Analysis. Parasitol. 85: 707-712; Ylitalo, N., Bergstrom, T., Gyllensten, U., 1995. Detection of Genital Human Papillomavirus by Single-Tube Nested PCR and Type-Specific Oligonucleotide Hybridization. Journal of Clinical Microbiology 33: 1822-1828; Herrmann, B., Nystrom, T. Wessel, H., 1996. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* from Air-dried Genital Sample by Single-Tube Nested PCR. Journal of Clinical Microbiology 34: 2548-2551;

25 Chan, C., Yuen, K., Chan, K., Yam, W., Yim, K., 1996. Single-Tube "Nested-PCR" in the Diagnosis of Tuberculosis. J. Clin. Pathol. 49: 290-294); b) aquele que utiliza a

12/10/1992

12/10

separação física dos componentes dos primeiro e segundo estágios da PCR tipo *Nested* por uma camada de óleo mineral (Féray, C., Samuel, C., Thiers, V., Gigou, M., Pichon, F., Bismuth, A., Reynes, M., Maisonneuve, P., Bismuth, H. e Bréchet, C. 1992. Reinfection of Liver Graft by Hepatitis C Virus After Liver Transplantation. J. Clin. Invest. 89: 1361-1365). Contudo, o primeiro grupo restringe bastante a seleção de pares de iniciadores, pois exige que os pares sejam construídos especificamente para este propósito, e com temperaturas de anelamento bastante diferentes, o que se torna inviável quando o objetivo é a amplificação de segmentos de DNA com poucas seqüências apropriadas para os desenhos dos iniciadores. Em relação ao segundo grupo, a separação física apenas por uma camada de óleo mineral não é eficiente, pois não impede que os iniciadores internos contaminem a mistura reacional da primeira fase de amplificação.

O documento US 5.340.728 apresenta um método para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase tipo *Nested* em um único tubo. Neste método, o volume total da primeira fase da reação é empregado na segunda fase de amplificação, na qual não há remoção dos iniciadores externos da mistura reacional. Paralelamente, as concentrações e o tempo de anelamento dos iniciadores externos e internos são controlados durante o primeiro e o segundo estágios de amplificação. Porém, em virtude da presença constante dos iniciadores internos, estes também podem ser utilizados na primeira etapa da PCR tipo *Nested*, o que pode acarretar prejuízos para a especificidade do método.

Uma alternativa apresentada para a resolução do problema é mencionada no documento US 5.556.773, o qual também está associado à realização da PCR tipo *Nested* em um único tubo, mas onde a mistura reacional (tampão, 5 nucleotídeos, enzimas e iniciadores internos) necessária para a segunda fase da PCR tipo *Nested* é seqüestrada fisicamente do meio reacional contendo os iniciadores externos, permanecendo em uma determinada localização do tubo de reação até o final da primeira etapa de 10 amplificação. Paralelamente, é empregada uma concentração de iniciadores externos muito reduzida, a fim de que os mesmos sejam completamente consumidos e, portanto, não ocorra contaminação da mistura para a segunda fase da reação.

15 De acordo com este mesmo documento, a separação física pode ser realizada de diversas formas. Um exemplo é a fixação da mistura reacional da segunda fase da PCR tipo *Nested* em agarose com elevada temperatura de fusão, e mediante a colocação da mesma em uma porção do tubo (câmara 20 central) mantida sob refrigeração e acima do meio reacional da primeira etapa de amplificação. Em uma outra concretização, a separação ocorre através da selagem, com o auxílio de uma membrana frágil, da mistura reacional líquida da segunda etapa da PCR tipo *Nested* na câmara 25 central do tubo de reação. Desta forma, antes da segunda fase, o tubo é centrifugado e a agarose é fundida ou a membrana utilizada é rompida, liberando a mistura reacional com os iniciadores internos para o prosseguimento da dita amplificação. Adicionalmente, este método também relata a

colocação de tubos de diâmetros bastante reduzidos no interior dos tubos de reação, além do emprego de bulbos ("conta-gotas") na parte superior dos tubos reacionais, como outras alternativas para a obtenção da separação física desejada para a mistura reacional líquida a ser empregada na segunda fase de amplificação.

Contudo, o método proposto pelo documento US 5.556.773 apresenta uma série de desvantagens. Em primeiro lugar, o seqüestro da mistura reacional completa, e necessária à segunda etapa de amplificação, certamente adiciona complexidade ao processo, tendo em vista, por exemplo, as diferenças de estabilidade entre os seus componentes (tampão, nucleotídeos, enzimas e iniciadores internos). Um outro fator que agrega complexidade ao método é a exigência de adaptação de câmaras, membranas, tubos ou qualquer outro tipo de dispositivo aos microtubos comuns, os quais são normalmente utilizados e perfeitamente ajustáveis aos termocicladores comerciais disponíveis para reações de amplificação de seqüências de nucleotídeos. Além disso, a exigência de placas de resfriamento, quando do emprego do gel de agarose, acarreta uma outra desvantagem, visto que poucos modelos de termocicladores contêm placa resfriadora em contato com a parte superior dos tubos. E mais ainda, particularmente nos casos do emprego de gel de agarose ou de membranas, o método tem a desvantagem adicional de introduzir um elemento estranho (agarose ou o material constituinte da membrana) à mistura reacional da PCR tipo *Nested*, o que também compromete a eficiência da reação.

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de um método de Reação em Cadeia da Polimerase tipo *Nested*, para a amplificação e identificação de seqüências específicas de nucleotídeos, no qual haja a eliminação da ameaça de contaminação do meio reacional a ser utilizado em cada fase da amplificação, assegurando sim a utilização dos iniciadores externos e internos apenas nas respectivas etapas em que são solicitados, mas sem agregar complexidade excessiva ao sistema a ponto de comprometer a eficiência da reação e inviabilizar a utilização dos termocicladores disponíveis no mercado.

Sumário da Invenção

O objetivo da presente invenção é eliminar o risco de contaminação cruzada das misturas reacionais a serem utilizadas nos dois estágios da Reação em Cadeia da Polimerase tipo *Nested* através de um método simples e eficaz, onde não há comprometimento da especificidade e da sensibilidade do sistema quanto à amplificação e identificação da seqüência específica de nucleotídeos.

Uma primeira concretização da presente invenção diz respeito a um método para a amplificação e identificação de seqüências específicas de nucleotídeos que emprega a PCR tipo *Nested* em um único tubo de reação, onde há uma concentração limitante de iniciadores externos, e no qual somente os iniciadores internos são seqüestrados do meio reacional por uma forma física que não utiliza um elemento estranho à mistura reacional e nem exige adaptações aos microtubos comuns, apenas sendo liberados após o término da

15/

B. 010744

primeira fase de amplificação. O método da presente invenção se caracteriza pelas etapas de:

- 5 (a) fixar, por evaporação, os iniciadores internos na face interna da tampa do tubo de reação;
- (b) introduzir, no tubo reacional, os ácidos nucleicos a serem processados, os iniciadores externos, assim como os reagentes e aditivos necessários ao prosseguimento das duas fases de amplificação características da PCR tipo *Nested*;
- 10 e acrescentar uma camada de óleo mineral sobre a mistura reacional;
- (c) fechar o tubo reacional;
- (d) executar a primeira fase de amplificação da seqüência de nucleotídeos específica;
- 15 (e) após o término da amplificação correspondente à etapa (d), promover o contato dos iniciadores internos com a mistura reacional;
- (f) executar a segunda fase de amplificação da seqüência de nucleotídeos específica;
- 20 (g) separar e analisar os produtos de amplificação da etapa (f) por técnicas apropriadas.

16f

Numa segunda concretização, a invenção está relacionada a um kit para uso na amplificação e identificação de seqüências de nucleotídeos específicas de seres humanos, plantas, animais e outros organismos unicelulares e pluricelulares.

Breve Descrição da Figuras

FIGURA 1: Ilustra as etapas a serem realizadas para o início da PCR tipo *Nested* em um único tubo de acordo com a

presente invenção. (A) representa a fixação, através de evaporação, da solução aquosa de iniciadores na face interna do microtubo. Em seguida, a mistura de reação é introduzida (B), sendo o tubo fechado (C), para o início da PCR tipo *Nested* em um único tubo. (1) Tampa do microtubo; (2) Face interna da tampa; (3) Adição da mistura de reação.

FIGURA 2: Mostra a seqüência da subunidade pequena do gene codificando rRNA de *Plasmodium falciparum* (GenBank número de acesso M19172).

FIGURA 3: Mostra a seqüência da subunidade pequena do gene codificando rRNA de *Schistosoma mansoni* (GenBank número de acesso x53047).

FIGURA 4: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR tipo *Nested* em um único tubo para detecção de DNA de *Schistosoma sp.*

FIGURA 5: Eletroforese em gel de agarose mostrando que a PCR tipo *Nested* em um único tubo amplifica especificamente DNA de *Schistosoma sp.*

FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção de uma PCR simples com os iniciadores internos SCHFO17 e SCHRE19 para detecção de DNA de *Schistosoma sp.*

FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR tipo *nested* em um único tubo, para *Plasmodium sp.*

FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose mostrando o limite de detecção de uma PCR simples com os iniciadores GJ1 e HR842 para detecção de DNA de *Plasmodium sp.*

Descrição Detalhada da Invenção

O objetivo da presente invenção é alcançado pela realização da Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested em um único tubo, o qual permanece fechado ao longo de todo o processo.

A contaminação cruzada é evitada através da imobilização reversível dos iniciadores internos na face interna da tampa dos microtubos comumente utilizados nos termocicladores comerciais, sem a utilização de membranas ou qualquer outro elemento estranho ao meio reacional, enquanto que os outros reagentes e catalisadores necessários tanto à primeira quanto à segunda etapa de amplificação (tampão, nucleotídeos, enzimas e iniciadores externos) permanecem no seio do meio reacional. Logo, o processo da presente invenção envolve apenas a imobilização de oligonucleotídeos internos, os quais são componentes químicos mais estáveis que os desoxirribonucleotídeos e, principalmente, as enzimas relacionadas a *Taq* polimerase. Assim, cada iniciador apenas é utilizado na etapa de amplificação onde é exigido e a estabilidade dos outros componentes da mistura reacional não é ameaçada. Desta forma, a eficiência da reação não é prejudicada.

O método da presente invenção se caracteriza pelas etapas de:

- (a) fixar, por evaporação, os iniciadores internos na face interna do tubo de reação;
- (b) introduzir, no tubo reacional, os ácidos nucléicos a serem processados, os iniciadores externos, assim como os reagentes e aditivos

18/

necessários ao prosseguimento das duas fases de amplificação características da PCR tipo *Nested*; e acrescentar uma camada de óleo mineral sobre a mistura reacional;

19/

- 5 (c) fechar o tubo reacional;
- (d) executar a primeira fase de amplificação da seqüência de nucleotídeos específica;
- (e) após o término da amplificação correspondente a etapa (d), promover o contato dos iniciadores
- 10 internos com a mistura reacional;
- (f) executar a segunda fase de amplificação da seqüência de nucleotídeos específica;
- (g) separar e analisar os produtos de amplificação da etapa (f) por técnicas apropriadas.

15 No que diz respeito aos ácidos nucléicos adicionados ao meio reacional da presente invenção, os mesmos são representados por moléculas de DNA ou RNA de diferentes pesos moleculares, desde fragmentos até longas cadeias de nucleotídeos. Adicionalmente, podem ser constituídos por

20 cadeias de filamentos duplos ou simples, sendo naturais, sintéticas ou recombinantes.

Em relação à extração das moléculas de ácidos nucléicos utilizados nesta invenção, a mesma pode ser realizada de acordo com técnicas já disponíveis no estado

25 da técnica. Como exemplo de fontes naturais de ácidos nucléicos, encontram-se os organismos unicelulares e pluricelulares (bactérias, fungos, leveduras, algas, actinomicetos, protozoários, helmintos, vírus e etc.),

assim como o sangue e as células de tecidos do homem, dos animais e das plantas.

Quanto aos iniciadores empregados no método da Reação em Cadeia da Polimerase tipo *Nested* apresentado por esta invenção, os mesmos se constituem em oligonucleotídeos constituídos por dois ou mais desoxiribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, sejam estes naturais ou sintéticos.

Cada iniciador é, preferencialmente, construído de forma a ser substancialmente complementar a uma fita de seqüência que flanqueia a seqüência de nucleotídeos alvo, a ser amplificada e detectada. Neste sentido, um iniciador pode ser denominado equivalente se funcionalmente os polímeros correspondentes puderem desempenhar o mesmo papel, sem serem idênticos, frente à utilização ou aplicação considerada. As seqüências equivalentes podem ser resultado da variabilidade, ou seja, qualquer modificação, espontânea ou induzida, em uma seqüência, seja ela substituição e/ou deleção e/ou inserção de nucleotídeos, e/ou extensão e/ou encurtamento da seqüência em uma de suas extremidades. Uma variabilidade não natural pode resultar de técnicas de engenharia genética.

Tanto os iniciadores externos quanto os internos precisam ser suficientemente longos a ponto de possibilitar a síntese de produtos da amplificação. O exato comprimento dos iniciadores depende de diversos fatores, incluindo temperatura, a fonte dos mesmos e o seu uso ou aplicação.

Entretanto, em uma preferida concretização da presente invenção, os iniciadores contêm de 15-25 nucleotídeos.

O conjunto de iniciadores empregados nesta invenção é representado, preferencialmente, por um par de iniciadores externos, além de um par de iniciadores internos.

Adicionalmente, esta invenção ressalta que os iniciadores externos são utilizados em quantidades limitantes, de forma que estejam exauridos quando do início da segunda etapa de amplificação.

Em uma preferida concretização da presente invenção, a proporção entre iniciadores externos e internos é de, aproximadamente, 1:10.

Os outros reagentes e aditivos necessários à condução da PCR tipo *Nested* de acordo com esta invenção são aqueles normalmente utilizados na técnica de amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase, por exemplo, substâncias para a manutenção do tampão apropriado para a amplificação por PCR (exemplo: Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM); assim como os ribonucleotídeos ou desoxiribonucleotídeos trifosfatos, tais como dGTP (desoxiguanidina-trifosfato), dATP (desoxiadenosina-trifosfato), dCTP (desoxicitidina-trifosfato), dTTP (desoxitimidina-trifosfato); e catalisadores, a exemplo da *Taq* polimerase.

As concentrações das substâncias para a manutenção do tampão, das enzimas e outros aditivos, além dos reagentes empregados na presente invenção estão de acordo com aquelas comumente utilizadas nas reações de amplificação por PCR.

De acordo com o método proposto nesta invenção, anteriormente ao início da primeira fase de amplificação, os iniciadores internos são fixados na parte interna da tampa do tubo reacional através da evaporação dos mesmos de

uma solução aquosa. A evaporação pode ser realizada de acordo com métodos disponíveis no estado da técnica, a exemplo da evaporação em estufa.

Os tubos são fechados após a evaporação, e abertos quando da adição dos ácidos nucleicos a serem processados, dos iniciadores externos, assim como dos reagentes e aditivos necessários ao prosseguimento das duas fases de amplificação características da PCR tipo *Nested*. Uma camada de óleo mineral é adicionada sobre esta mistura reacional, a fim de evitar a evaporação da mesma e prevenir a dissolução dos iniciadores internos imobilizados na tampa.

Os tubos reacionais e as respectivas tampas utilizados na presente são aqueles normalmente disponíveis para a realização da amplificação pela reação em cadeia da polimerase e utilizados nos termocicladores disponíveis no mercado, a exemplo dos tubos tipo *Eppendorf* de polipropileno.

Após o fechamento do tubo de reação com a tampa contendo os iniciadores internos, a primeira etapa da reação de amplificação tem início e prossegue apenas com a atuação dos iniciadores externos. Cada produto desta etapa servirá como molde para o ciclo seguinte. O número de ciclos necessários será determinado pela quantidade de iniciadores externos disponível, prosseguindo até o seu completo consumo.

Ao longo de toda a primeira fase da amplificação, os iniciadores internos permanecem na tampa do tubo reacional sem a exigência de controle de temperatura no local. O meio reacional, entretanto, é mantido sob condições de

temperaturas adequadas ao prosseguimento da reação, garantindo o anelamento entre os iniciadores externos e as seqüências de nucleotídeos alvo. As temperaturas empregadas na primeira etapa de amplificação estão de acordo com aquelas utilizadas comumente nas reações de PCR tipo *Nested*.

Ao término do primeiro estágio da PCR tipo *Nested*, o contato dos iniciadores internos com a mistura reacional é promovido, a fim de que a segunda etapa de amplificação tenha início. Novamente, cada produto resultante desta segunda etapa serve como molde para o ciclo seguinte.

Os iniciadores internos podem entrar em contato com a mistura reacional através de métodos conhecidos pelo estado da técnica, a exemplo da eluição dos iniciadores internos através da inversão do tubo de reação repetidas vezes.

Durante toda a segunda fase da amplificação, a mistura reacional também é mantida sob condições de temperaturas comumente empregadas na técnica de PCR tipo *Nested* e adequadas ao prosseguimento da reação, de forma a permitir o anelamento entre os iniciadores internos e as seqüências de nucleotídeos alvo.

Finalizada a segunda etapa da PCR tipo *Nested*, ocorre a separação e análise dos produtos resultantes desta etapa de acordo com técnicas disponíveis no estado da técnica. Um exemplo é a posterior separação dos produtos de amplificação por eletroforese, seguida de técnicas apropriadas de coloração que permitam a visualização adequada de ácido nucléico no gel compreendendo, mas não limitados a: coloração por sais, a exemplo do brometo de

etídeo e de sais de prata, radioisótopos e enzimas em combinação com substratos que permitam sua detecção.

O método da presente invenção pode ser empregado, por exemplo, para a amplificação e identificação de seqüências específicas de seres humanos, de espécies de plantas, animais e de outros organismos unicelulares e pluricelulares (bactérias, fungos, leveduras, algas, actinomicetos, protozoários, helmintos, vírus e etc.) em qualquer amostra biológica que contenha células ou DNA ou RNA livre dos mesmos, sendo suficientemente íntegro para ser amplificado pela PCR tipo *Nested*. Desta forma, o método apresentado por esta invenção é passível de ampla utilização, por exemplo, no setor ambiental, no setor alimentício, na área da saúde e no campo da medicina forense.

Esta invenção também está relacionada a um kit para uso na detecção de seqüências de nucleotídeos específicas de seres humanos, plantas, animais e outros organismos unicelulares e pluricelulares (bactérias, fungos, leveduras, algas, actinomicetos, protozoários, helmintos, vírus e etc.). Basicamente, o kit compreende os iniciadores específicos, todos os reagentes e os aditivos necessários à realização da técnica de PCR tipo *Nested*, a exemplo dos nucleotídeos, da solução tampão apropriada para a amplificação e de enzimas em quantidades suficientes para amplificação. Opcionalmente, pode conter protocolo e manual para instruir o usuário.

Em um exemplo de concretização da presente invenção, o método é utilizado para a amplificação e identificação de helmintos do gênero *Schistosoma*.

Em um outro exemplo de concretização desta invenção, o referido método é empregado para a amplificação e identificação de parasitas do gênero *Plasmodium*.

A presente invenção é descrita detalhadamente através dos exemplos apresentados abaixo. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos, mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona.

EXEMPLO 1

Extração do DNA.

Para exemplificar o método proposto na presente invenção, foram utilizados dois sistemas de detecção de DNA, um para DNA de *Schistosoma sp.*, e outro para a detecção de DNA de *Plasmodium sp.*

O DNA foi purificado utilizando-se o kit comercial "GenomicPrep Cells and Tissue Isolation Kit" (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo-se as instruções do fornecedor.

EXEMPLO 2

Desenho dos iniciadores.

Em cada caso, utilizou-se a respectiva seqüência do gene para o rRNA depositada no GenBank, a fim de descobrir regiões apropriadas para o desenho de iniciadores a serem empregados na detecção de DNA específico de *Schistosoma sp.* e *Plasmodium sp.*

Assim, inicialmente, seqüências da subunidade pequena do rRNA (SSU rRNA) referentes ao helminto de interesse e seus hospedeiros foram alinhadas, permitindo a identificação de regiões alvos para o desenho de iniciadores para PCR, a fim de detectar a *Schistosoma mansoni*.

O alinhamento foi realizado com a ajuda de ferramentas disponíveis no site www.rrna.uia.ac.be, mantido pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade da Antuérpia (Bélgica). O desenho dos iniciadores com características apropriadas para PCR foi realizado com a ajuda do programa *Primer Select* (Lasergene Software, Dnastar Inc.).

Foram sintetizados os iniciadores SCHFO11, SCHFO17, SCHRE19, específicos para o gênero *Schistosoma sp.*, e o iniciador universal UNVRE16, cujas seqüências de nucleotídeos são apresentadas na Tabela 1.

Para a detecção de *Schistosoma sp.*, SCHFO11 e UNVRE16 foram utilizados como iniciadores externos, enquanto que SCHFO17 e SCHRE19 foram empregados como iniciadores internos. Adicionalmente, SCHFO11 e SCHFO17 caracterizaram-se por serem iniciadores senso, e UNVRE16 e SCHRE19 por serem iniciadores reversos.

As ferramentas disponíveis no site www.rrna.uia.ac.be também foram usadas para alinhar seqüências da subunidade pequena do rRNA (SSU rRNA) referentes ao parasita de interesse e seus hospedeiros. Desta forma, foi possível identificar regiões alvos para o desenho de iniciadores para PCR, a fim de detectar o *Plasmodium falciparum*.

O programa *Primer Select* também auxiliou no desenho dos iniciadores empregados na detecção de *Plasmodium sp.* Foram utilizados os iniciadores externos GJ1 e HR842. Os iniciadores PGFO3 e HR842 foram empregados como iniciadores
5 internos. As seqüências destes iniciadores senso GJ1 e PGFO3, e do iniciador reverso HR842, são apresentadas na tabela 1.

No caso dos sistemas de detecção de DNA de *Schistosoma sp.* e *Plasmodium sp.*, a originalidade também residiu na
10 identificação de novas regiões úteis para a detecção específica deste helminto e deste parasita, respectivamente, sendo originais os iniciadores utilizados.

As Figuras 2 e 3 apresentam as seqüências originais repetitivas ID SEQ NO.1 E ID SEQ NO. 2, respectivamente,
15 para *Plasmodium sp.* e *Schistosoma sp.*, as quais serviram de base para o desenho dos oligonucleotídeos mencionados a seguir e cujas seqüências também estão indicadas, em negrito, nas referidas figuras.

27/10

Tabela 1: Iniciadores utilizados na reação de PCR tipo *Nested* para amplificação de região repetitiva do genoma de *Plasmodium sp.* e *Schistosoma sp.*

ID SEQ	Iniciadores
	<i>Plasmodium sp.</i>
3	(GJ1): 5'-GGCTTAGTTACGATTAATAG-3'
4	(HR842): 5'-CTTAAACTTCCTTGTGTTAG-3'
5	(PGFO3): 5'-ACTAGTTTAAGACAAGAGT-3'
	<i>Schistosoma sp.</i>
6	(SCHFO11): 5'-GTTACGATCAGGACCAGTGT-3'
7	(UNVRE16): 5'-CCGGACATCTAAGGGCATCA-3'
8	(SCHFO17): 5'-GTGCTGGTGGGTTGACGAGTTC-3'
9	(SCHRE19): 5'-CTAAACGAGCACAGAGGAC-3'

EXEMPLO 3

5. Fixação dos iniciadores internos.

Antes do início da PCR tipo *Nested*, os iniciadores internos eram previamente fixos à superfície interna da tampa dos microtubos de reação, através da evaporação (em estufa a 37 °C) de 10 µl de uma solução aquosa contendo 50 pmoles de cada iniciador interno.

Os tubos foram fechados após a evaporação, apenas sendo abertos quando da adição da mistura de reação para a amplificação da seqüência de nucleotídeos específica.

[REPRODUCED]

EXEMPLO 4

Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested utilizando os iniciadores específicos mostrados na Tabela 1:

29/

5 Em relação a cada organismo (parasita e helminto), o seu DNA purificado foi submetido à amplificação em um termociclador automático (Touch Down Hybrid). Nos tubos de reação, foram adicionados 2 µl de DNA genômico do organismo de interesse, contendo 1ng, 0,1ng, 0,01ng, 1pg, 0,1pg, 10 0,01pg, 1fg, 0,1fg e 0,01fg. A primeira etapa da PCR tipo Nested consistiu em 15 ciclos (sob 92°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 1 min), enquanto que o segundo estágio da PCR tipo Nested consistiu em 45 ciclos (sob 92°C por 30s, 15 55°C por 30s e 72°C por 1 min). Os primeiros 15 ciclos da reação continham apenas 0.1 pmol/µl de iniciadores externos em um volume final de 50 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, 0,1 mg/ml de gelatina, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM e 2,5 U de Taq DNA polimerase. A mistura da reação era recoberta com 30 µl de óleo mineral.

20 Após o 15º ciclo de reação, foram realizadas repetidas inversões dos tubos, a fim de que os iniciadores internos entrassem em contato com a mistura reacional, passando a participar dos 45 ciclos subseqüentes. Foi empregada uma concentração de iniciadores internos de 1pmol/µl. A esta 25 altura a concentração de iniciadores externos estava praticamente exaurida.

EXEMPLO 5

Análise dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested.

30p

10 µl dos produtos da PCR tipo *Nested* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% corados pelo brometo de etídec segundo Sambrook e outros (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com um sistema de documentação polaróide (MP4+ System), conforme pode ser observado através da Figura 4.

10 Na Figura 4, as diferentes faixas (1 à 7) representam os resultados obtidos com diferentes quantidades de DNA genômico de *Schistosoma mansoni*, a seguir: (i) Faixa 1, 0,1 ng; (ii) Faixa 2, 0,01 ng; (iii) Faixa 3, 1 pg; (iv) Faixa 4, 0,1 pg; (v) Faixa 5, 0,01 pg; (vi) Faixa 6, 1 fg e (vii) Faixa 15 7, 0,1 fg. M representa o marcador de peso molecular (λ HindIII). A seta aponta o produto de amplificação, possuindo 721 bp. Adicionalmente, foram repetidos os experimentos já mencionados, porém com 1 ng de cada DNA genômico, não apenas de *Schistosoma mansoni*, como também de 20 ser humano, de *Biomphalaria glabrata* (caramujo) e de camundongo. Desta forma, foi possível verificar que os iniciadores utilizados para a detecção de *Schistosoma sp.* permitem a detecção de DNA específico desses helmintos, mas não de seus hospedeiros. Para fins representativos, a 25 Figura 5 mostra que a PCR tipo *Nested* em um único tubo, objeto da presente invenção, amplifica DNA de *Schistosoma sp.*, mas não de hospedeiros vertebrados (humanos e camundongos) ou invertebrados (caramujos).

Na Figura 5, a Faixa 1 representa o resultado obtido

para *S.mansoni*, a Faixa 2 para o ser humano, a Faixa 3 para *Biomphalaria glabrata* (caramujo) e a Faixa 4 para camundongo. M representa o marcador de peso molecular (λ HindIII). A seta aponta o produto de amplificação, possuindo 721bp.

Os resultados obtidos para a detecção de *Plasmodium* sp. através da PCR tipo Nested da presente invenção estão apresentados na Figura 7. Nesta Figura, cada faixa representa o resultado relacionado a uma quantidade diferente de DNA genômico do parasita em questão, a seguir:

(i) Faixa 1, 100 pg; (ii) Faixa 2, 10 pg; (iii) Faixa 3, 1 pg; (iv) Faixa 4, 100 fg; (v) Faixa 5, 10 fg; (vi) Faixa 6, 1 fg e (vii) Faixa 7, 0,1 fg. A seta aponta o produto de amplificação, possuindo 356 pb.

15 **EXEMPLO 6**

PCR convencional.

Nessa PCR foram utilizados os iniciadores internos. A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ l, contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, 0,1 mg/ml de gelatina, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 2,5 U de Taq DNA polimerase e 50 pmoles de cada um dos iniciadores. A essa mistura foram adicionados 2 μ l de DNA genômico do organismo de interesse, contendo 10 ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng, 1pg, 0,1pg, 0,01pg, 1fg, 0,1fg e 0,001fg. A amplificação consistiu de 30 ciclos: 92°C por 30s, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, precedidos de uma desnaturação inicial de 3 minutos a 92°C.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos a partir de algumas quantidades de DNA genômico de *S.mansoni*, a seguir:

(i) Faixa 1, 1 ng; (ii) Faixa 2, 0,1 ng; (iii) Faixa 3, 0,01

ng; (iv) Faixa 4, 1 pg; (v) Faixa 5, 0,1 pg; (vi) Faixa 6, 0,01 pg; (vii) Faixa 7, 1 fg; (viii) Faixa 8, 0,1 fg e (ix) Faixa 9, 0,01 fg. M representa o marcador de peso molecular (λ HindIII). A seta aponta o produto de amplificação, possuindo 721pb.

Os resultados obtidos com *P. falciparum* são apresentados na Figura 8. Nesta Figura, cada Faixa está relacionada a uma quantidade diferente de DNA genômico deste parasita, a seguir: (i) Faixa 1, 10 ng; (ii) Faixa 2, 1 ng; (iii) Faixa 3, 100 pg; (iv) Faixa 4, 10 pg; (v) Faixa 5, 1 pg; (vi) Faixa 6, 100 fg; (vii) Faixa 7, 10 fg e (viii) Faixa 8, 1 fg. A seta aponta o produto de amplificação, possuindo 746 pb.

EXEMPLO 7

15 Comparação entre PCR convencional e PCR tipo *Nested* de acordo com a presente invenção.

O limite de detecção de DNA de acordo com a PCR tipo *Nested* em um único tubo proposta pela presente invenção foi determinado mediante a comparação dos resultados obtidos nos exemplos 5 e 6.

O limite de detecção determinado foi de cerca de 1 fg para *Schistosoma sp.* (Figura 4) e 100 fg para *Plasmodium sp.* (Figura 7). Esses limites de detecção são menores que os apresentados pela PCR simples, ou seja, 1pg (Figura 6) e 25 10 pg (Figura 8), indicando que a PCR tipo *Nested* em um único tubo é mais sensível.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para amplificar e identificar seqüências de nucleotídeos específicas através do desenvolvimento da PCR tipo *Nested* em um único tubo de reação caracterizado por
5 compreender as etapas de:

(a) fixar, por evaporação, os iniciadores internos na face interna da tampa do tubo de reação;

10 (b) introduzir, no tubo reacional, os ácidos nucléicos a serem processados, assim como os reagentes e aditivos necessários ao prosseguimento das duas fases de amplificação características da PCR tipo *Nested*; e acrescentar uma camada de óleo mineral sobre a mistura reacional;

15 (c) fechar o tubo reacional;

(d) executar a primeira fase de amplificação da seqüência de nucleotídeos específica;

20 (e) após o término da amplificação correspondente a etapa (d), promover o contato dos iniciadores internos com a mistura reacional;

(f) executar a segunda fase de amplificação da seqüência de nucleotídeos específica;

25 (g) separar e analisar os produtos de amplificação da etapa (f) por técnicas apropriadas.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por amplificar e identificar seqüências de

nucleotídeos específicas de seres humanos, plantas, animais e outros organismos unicelulares e pluricelulares.

3. Método de acordo com a reivindicação 2 34/10
caracterizado por amplificar e identificar seqüências de
5 nucleotídeos específicas de protozoários.

4. Método de acordo com a reivindicação 3
caracterizado por amplificar e identificar seqüências de
nucleotídeos específicas do gênero *Plasmodium*.

5. Método de acordo com a reivindicação 4
10 caracterizado pelo fato da seqüência de nucleotídeos
específica do gênero *Plasmodium* estar contida na ID SEQ
No:1.

6. Método de acordo com a reivindicação 5
15 caracterizado pelo fato dos iniciadores externos e internos
específicos serem construídos a partir da ID SEQ No:1.

7. Método de acordo com a reivindicação 6
caracterizado pelo fato dos iniciadores externos
compreenderem as seqüências ID SEQ No:3 e ID SEQ No:4 ou
seqüências funcionalmente equivalentes capazes de
20 amplificar a região específica do DNA de *Plasmodium* sp.

8. Método de acordo com a reivindicação 6
caracterizado pelo fato dos iniciadores internos
compreenderem as seqüências ID SEQ No:4 e ID SEQ No:5 ou
seqüências funcionalmente equivalentes capazes de
25 amplificar a região específica do DNA de *Plasmodium* sp.

9. Método de acordo com a reivindicação 2
caracterizado por amplificar e identificar seqüências de
nucleotídeos específicas de helmintos.

10. Método de acordo com a reivindicação 9

caracterizado por amplificar e identificar seqüências de nucleotídeos específicas do gênero *Schistosoma*.

11. Método de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo fato da seqüência de nucleotídeos específica do gênero *Schistosoma* estar contida na ID SEQ No:2.

12. Método de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato dos iniciadores externos e internos específicos serem construídos a partir da ID SEQ No:2.

13. Método de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato dos iniciadores externos compreenderem as seqüências ID SEQ No:6 e ID SEQ No:7 ou seqüências funcionalmente equivalentes capazes de amplificar a região específica do DNA de *Schistosoma* sp.

14. Método de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato dos iniciadores internos compreenderem as seqüências ID SEQ No:8 e ID SEQ No:9 ou seqüências funcionalmente equivalentes capazes de amplificar a região específica do DNA de *Schistosoma* sp.

15. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do contato entre os iniciadores internos e a mistura reacional correspondente à etapa (e) ser decorrente da eluição dos iniciadores internos após a realização de repetidas inversões do tubo de reação.

16. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato dos produtos de amplificação da etapa (f) serem separados por eletroforese em gel de agarose e detectados pela coloração por brometo de etídeo.

17. Iniciador oligonucleotídico caracterizado por

compreender a seqüência ID SEQ No:4 ou seqüências funcionalmente equivalentes.

18. Iniciador oligonucleotídico caracterizado por compreender a seqüência ID SEQ No:5 ou seqüências funcionalmente equivalentes.

19. Iniciador oligonucleotídico caracterizado por compreender a seqüência ID SEQ No:6 ou seqüências funcionalmente equivalentes.

20. Iniciador oligonucleotídico caracterizado por compreender a seqüência ID SEQ No:7 ou seqüências funcionalmente equivalentes.

21. Iniciador oligonucleotídico caracterizado por compreender a seqüência ID SEQ No:8 ou seqüências funcionalmente equivalentes.

22. Iniciador oligonucleotídico caracterizado por compreender a seqüência ID SEQ No:9 ou seqüências funcionalmente equivalentes.

23. Kit para uso na amplificação e identificação de seqüências de nucleotídeos específicas segundo o método descrito na reivindicação 1 caracterizado pelo fato de compreender os iniciadores específicos, todos os reagentes e aditivos necessários para realizar a PCR tipo *Nested* e, opcionalmente, protocolo e manual para instruir o usuário.

24. Kit de acordo com a reivindicação 23 caracterizado por ser empregado na amplificação e identificação de seqüências de nucleotídeos específicas de seres humanos, plantas, animais e outros organismos unicelulares e pluricelulares.

25. Kit de acordo com a reivindicação 24 caracterizado

por ser utilizado na amplificação e identificação de seqüência de nucleotídeo específica para *Plasmodium* sp.

26. Kit de acordo com a reivindicação 25 caracterizado pelo fato dos iniciadores específicos serem construídos a partir da seqüência original descrita em ID SEQ No:1.

27. Kit de acordo com a reivindicação 26 caracterizado pelo fato dos iniciadores específicos compreenderem as seqüências ID SEQ No:3, ID SEQ No:4 e ID SEQ No:5 ou seqüências funcionalmente equivalentes capazes de amplificar a região específica do DNA de *Plasmodium* sp.

28. Kit de acordo com a reivindicação 24 caracterizado por ser utilizado na amplificação e identificação de seqüência de nucleotídeo específica para *Schistosoma* sp.

29. Kit de acordo com a reivindicação 28 caracterizado pelo fato dos iniciadores específicos serem construídos a partir da seqüência original descrita em ID SEQ No:2.

30. Kit de acordo com a reivindicação 29 caracterizado pelo fato dos iniciadores específicos compreenderem as seqüências ID SEQ No:6, ID SEQ No:7, ID SEQ No:8 e ID SEQ No:9 ou seqüências funcionalmente equivalentes capazes de amplificar a região específica do DNA de *Schistosoma* sp.

Handwritten signature

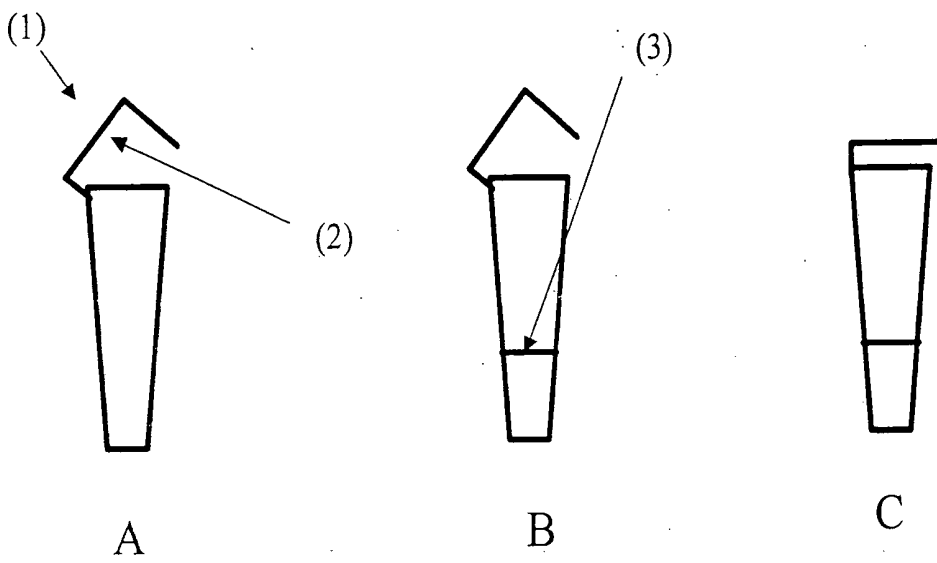


Figura 1

1 aacctggttg atcttgccag tagtcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcaagtga
 61 aagtatatat atattttata tgtagaaact gcgaacggct cattaanaaca gttatagtct
 121 acttgacatt tttattataa ggataactac ggaaaagctg tagctaatac ttgctttatt
 181 atccttgatt tttatctttg gataagtatt tgtaggacct tataagaaaa aagttattaa
 241 cttaaaggaat tataacaaaag aagtaacacg taataaattt attttattta gtgtgtatca
 301 atcgagtttc tgacctatca gcttttgatg ttaggggtatt ggcctaacat ggctatgacg
 361 ggtaacgggg aattagagtt cgattccgga gagggagcct gagaaatagc taccacatct
 421 aaggaaggca gcaggcgcgt aaattacca attctaaaga agagaggtag tgacaagaaa
 481 taacaatgca aggccaattt ttggttttgt aattggaatg gtgggaattt aaaaccttcc
 541 cagagtaaca attggagggc aagtctggtg ccagcagccg cggtaattcc agctccaata
 601 gcgtatatta aaattggttc agttaaacy ctcgtagttg aatttcaaag aatcgatatt
 661 ttattgtaac tattctaggg gaactatttt agcttttggc ttaatacgc ttctctatt
 721 attatgttct ttaaataaca aagattcttt ttaaaatccc cacttttgct tttgcttttt
 781 tggggatttt gttactttga gtaaattaga gtgttcaaag caaacagtta aagcatttac
 841 tgtgtttgaa tactatagca tggaaataca aaattgaaca agctaaaatt tttgttctt
 901 ttttcttatt **ttggcttagt tacgattaat** agggagtagct tggggacatt cgtattcaga
 961 tgtcagaggt gaaattctta gattttctgg agacgaaca ctgcgaaagc atttgtctaa
 1021 aatactcca ttaatcaaga acgaaagtta agggagtga gacgatcaga taccgtcgt
 1081 atcttaacca taaactatgc cgactagggt ttggatgaaa gtgttaaaaa taaagtc
 1141 ctttcgaggt gactttttaga ttgcttcctt cagtacctta tgagaaatca aagtctttgg
 1201 gttctggggc gagtattcgc gcaagcggaga aagttaaaag aattgacgga agggcaccac
 1261 caggcgtgga gcttgcggt taatttgact caacacgggg aaactcacta **gtttaagaca**
 1321 **agagtaggat** tgacagatta atagctctt cttgatttct tggatggtga tgcattggccg
 1381 tttttagttc gtgaatatga tttgtctggt taattccgat aacgaacgag atcttaacct
 1441 gctaattagc ggcgagtaca ctatattctt atttgaaatt gaacataggt aactatacat
 1501 ttattcagta atcaaattag gatattttta ttaaaatct cttttcctg ttctactaat
 1561 aaattgtttt ttactctatt tctctcttct ttaagaatg tacttgcttg attgaaaagc
 1621 ttcttagagg aacattgtgt gt**ctaacaca** **aggaagtta** **aggcaacaac** aggtctgtga
 1681 tgccttaga tgaactaggc tgcacgcgtg ctacactgat atatataacg agtttttaaa
 1741 aatatgctta tatttgtatc tttgatgctt atattttgca tacttttct ccgocgaaag
 1801 gcgtaggtaa tctttatcaa tatatatcgt gatggggata gattattgca attattaatc
 1861 ttgaacgagg aatgcctagt aagcatgatt catcagattg tgctgactac gtcctgccc
 1921 tttgtacaca ccgcccgtcg ctcctaccga ttgaaagata tgatgaattg tttggacaag
 1981 aaaaattgaa ttatattctt tttttctgg aaaaaccgta aatcctatct tttaaaggaa
 2041 ggagaagtcg taacaaggtt tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta

39

Figura 2

1 aactggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtctcag agattaagcc atgcatgtct
 61 aagtacatac cttaaaacgg tgaaacccgg aatggctcat taaatcagct atggttcctt
 121 agatcgtaaa cgctacatgg ataactgtag taattctaga gctaatacat gccttgaatc
 181 cctgacccgc aaggggacgg gtgcatttat tagaacagaa ccaaccgggt gggccttcgg
 241 ctgtgcctgt tacattctgt gatgactctg gataacttta ctgatcgagc tggccttctg
 301 gtcggcgacg gatctttcaa atgtctgcc tatcaatttg ttggtaggtg atttgcctac
 361 catgatgata acgggtaacg gggaatcagg gttcgattcc ggagagggag cctgagaaat
 421 ggctaccaca tccaaggacg gcagcaggcg cgaaaattac ccaactccgg cacggggagg
 481 tagtgacgaa aaatacgtat acgggactca attgaggctc cgtaattcga atgagtacaa
 541 tttaaatcct ttaacgagga ccaattggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaac
 601 tccagctcca aaagcgtata ttaaagtgc tgcagttaa aagctcgtag ttgaatctgg
 661 gtcgtgaggc cgcattgctg tgcttcttca cggttttggt **tacgatcagg accagtggtc**
 721 agctcgggtg agtggtctgt cagcctttca gccgtgtctg tgttaaaccg **gtgctgggtg**
 781 **gttgacgagt** tegtcttctg gacctgtcgg catgcttccg gatgccttta aacgggtgtc
 841 gggagcggac ggcatcttta ctttgaacaa atttgagtgc tcaaagcagg cctatgtgcc
 901 tgaaaattct tgcattggaat aatgaaatag gacttcgggt ctattttggt ggttttcgga
 961 tccgaagtaa tggttaagag ggacagacgg gggcatttgt atggcgggtg tagaggtgaa
 1021 attctgggat cgcgccaga caaactacag cgaaagcatt tgccaagaat gttttcattg
 1081 atcaggagcg aaagtcagag tttcgaagac gatcagatac cgtcgtagtt ctgaccataa
 1141 acgatgccaa ctgacgatcc gcgttggttc tataattgac atcgcgggca gtccccgga
 1201 aacctttaag tctttgggct ccggggggag tatggttgca aagctgaaac ttaaaggaat
 1261 tgacggaagg gcaccaccag gagtggagcc tgcggtttaa ttcgactcaa cacgggaaaa
 1321 ctccccggc cgggacactg tgaggattga cagattgata gctcttctt gattcgggtg
 1381 gtggtggtgc atggcgttc ttagttggtg gagcgatttg tctggttaat tccgataacg
 1441 aacgagactt taacctgcta aatagtagac **tggtcctctg tgctcgttta** gggcggcggc
 1501 tctattgctt ctttatggag tagtggtgct gtgatccggc ggggtcgggt ccagttttta
 1561 cttcttagag ggacaagcgg cacacttaag tcgcacgaaa ttgagcaata acaggtctgt
 1621 **gatgccctta gatgtccggg** gccacaegtg cgctacaatg acgggtccag cgagtctgga
 1681 aacctggccc gaaaggggtg ggcaaactgt ttcataccg tcgtgactgg gatcggggct
 1741 tgcaattatt ccccgatgac gaggaattcc tggtaagtgc aagtcataag ettgcgctga
 1801 ttacgtccct gccctttgta cacaccgccc gtcgctacta ccgattgaat ggtttagtga
 1861 ggtcgttga ttggcgtcgt tgtagtggct ttgccgctcg actgatgctg agaagatgac
 1921 ctaatttgac tatttagagg aagtaaaagt cgtaacaagg tttccgtagg tgaacctgac
 1981 gaagatcat ta

Figura 3

41 μ

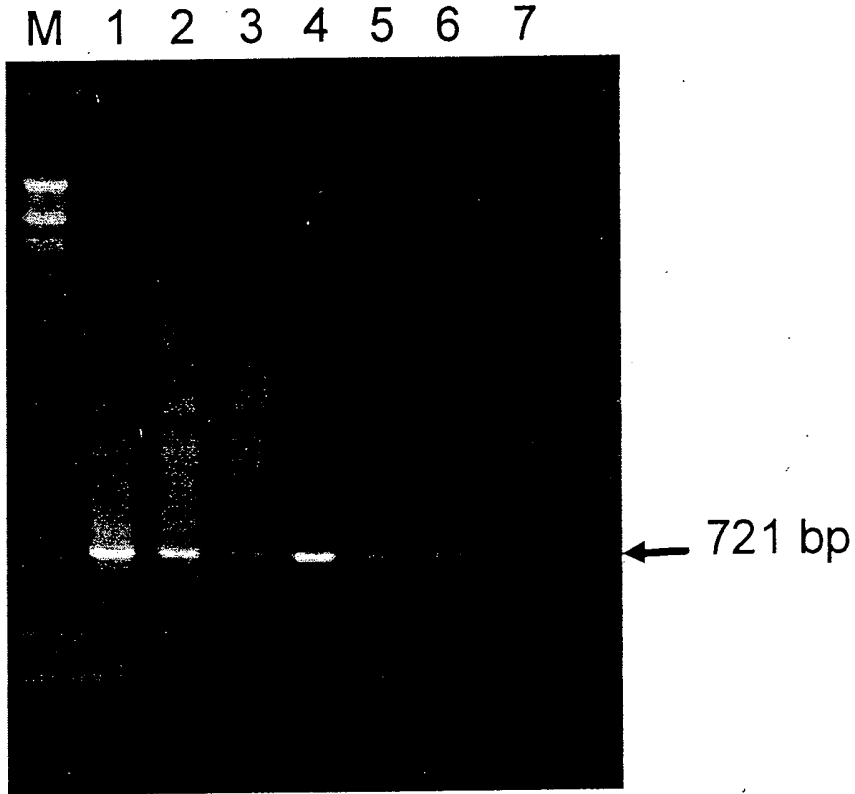


Figura 4.

23p

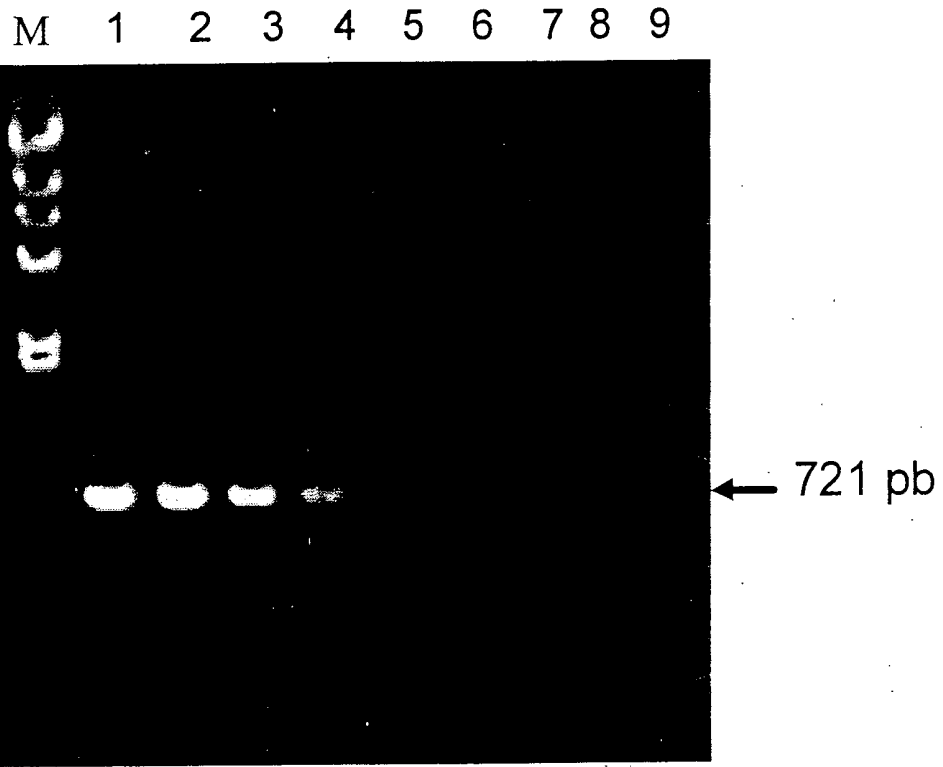


Figura 6.

[Handwritten signature]

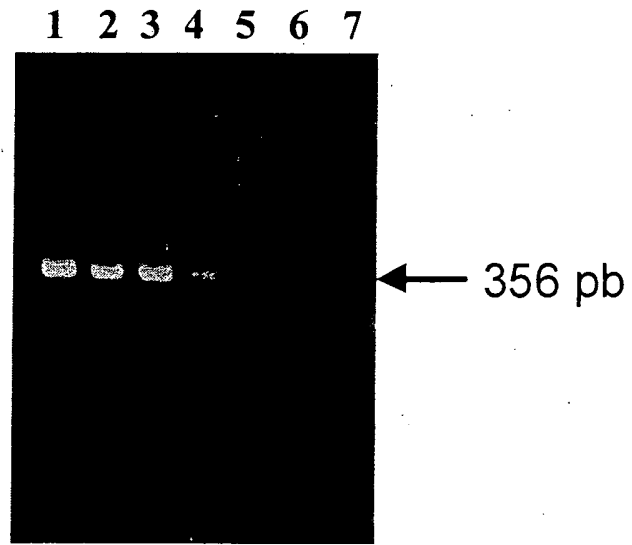


Figura 7

Handwritten signature

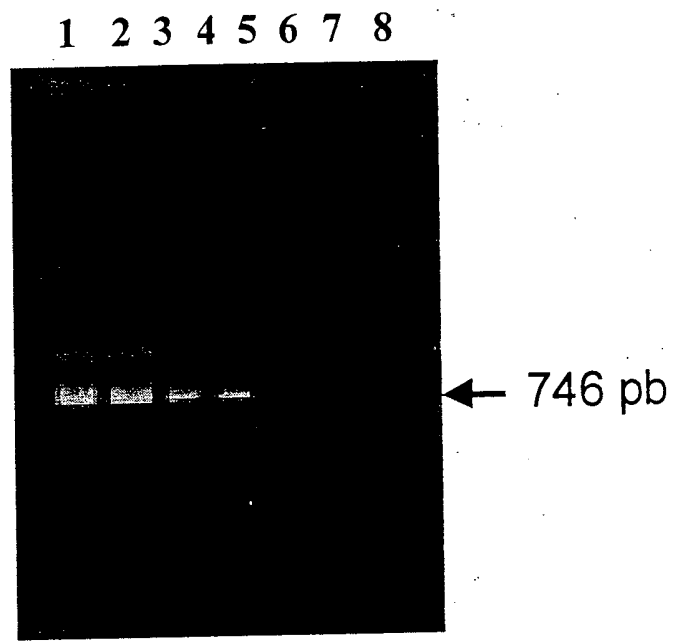


Figura 8.

RESUMO

"MÉTODO, KIT E INICIADORES PARA A IDENTIFICAÇÃO
DE SEQÜÊNCIAS ESPECÍFICAS DE NUCLEOTÍDEOS ATRAVÉS DA REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE TIPO NESTED
EM UM ÚNICO TUBO DE REAÇÃO"

46p

5

O objetivo da presente invenção é eliminar o risco de contaminação cruzada das misturas reacionais a serem utilizadas nos dois estágios da Reação em Cadeia da Polimerase tipo *Nested* através de um método simples e eficaz, onde não há comprometimento da especificidade e da sensibilidade do sistema quanto à amplificação e identificação da seqüência específica de nucleotídeos.

O método é caracterizado pela realização da PCR tipo *Nested* em um único tubo de reação, no qual os iniciadores internos são fixados, por evaporação, na face interna da tampa do tubo até o término da primeira fase de amplificação, quando é promovido o seu contato com a mistura reacional e, portanto, tem início a segunda etapa de amplificação.

Adicionalmente, a invenção está relacionada a um kit para uso na amplificação e identificação de seqüências de nucleotídeos específicas de seres humanos, plantas, animais e outros organismos unicelulares e pluricelulares. A invenção inclui ainda iniciadores específicos para *Plasmodium sp.* e *Schistosoma sp.*

25