

## EVALUACION DE METODOS DE MARCACION-RADIOACTIVOS Y NO RADIOACTIVOS-EMPLEADOS EN LA ELABORACION DE SONDAS DIAGNOSTICAS DE MALARIA

Gladys Pinilla <sup>1</sup>, María Orfa Rojas <sup>1</sup>, Jorge Contreras <sup>1</sup>, y Moisés Wasserman <sup>2</sup>

Se probaron métodos de marcación radioactivos dentro de los cuales el sistema Random Primers resultó mejor que el de Nick Translation. Se obtuvieron sondas con mayor actividad específica ( $1-2 \times 10^9$  dpm/ug) y una sensibilidad 10 veces mayor en la detección de ADN de *Plasmodium falciparum*. La sensibilidad alcanzada (12pg) obtenida con la sonda PFCOL692 desarrollada y caracterizada en nuestro laboratorio, fue igual a la obtenida con la sonda pRepHind, una de las más utilizadas en los laboratorios de otros países. El método de marcación no radioactivo confotobiotina mostró ventajas sobre la marcación por Nick Translation con nucleótidos biotinilados y se alcanzó una sensibilidad de 135 pg de ADN de *P. falciparum*. También se probó un sistema de degeneración de señales fluorescentes mediante el empleo de proteasas, y los resultados preliminares muestran sus posibilidades como método de detección.

KEYWORDS: Probes, nick translation, random *primers*, biotin, photobiotin, enterokinase, *P. falciparum*, *P. vivax*.

### INTRODUCCION

El diagnóstico eficiente y rápido es el primer paso importante en el control epidemiológico de la malaria (1). Este diagnóstico generalmente se hace mediante la identificación microscópica de parásitos en sangre. El examen microscópico tiene limitaciones que se hacen más evidentes en estudios de tipo epidemiológico, que requieren el examen de gran cantidad de muestras. Para superar esta condición, se han sugerido varias alternativas (2-4), dentro de las cuales está el diseño de sondas, que hacen posible detectar el ADN del parásito mediante procedimientos de hibridación molecular. El método de marcación de estas sondas dependerá de los niveles de sensibilidad y especificidad que se requieran en el estudio (5).

Como sondas se han utilizado secuencias repetitivas que tienen un alto número de copias por genoma (6). Una de estas secuencias denominada pRepHind, reportada por Franzen (7), se ha usado en varios ensayos (8-12) y ha resultado de gran utilidad en estudios de hibridación para detectar *P. falciparum*. También, se emplean sondas que detectan ARNr (13-15), que es el más abundante de los constituyentes de los ácidos nucleicos en organismos no virales, siendo un buen blanco para diagnóstico (16).

Teniendo en cuenta que cada vez más se sugiere la necesidad de utilizar sondas para diagnóstico, en este trabajo se evaluaron métodos de marcación radioactivos y no radiactivos, empleados en la producción de sondas para diagnóstico a nivel epidemiológico de *P. falciparum*.

<sup>1</sup> Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud. Santafé de Bogotá. Colombia

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Santafé de Bogotá, Colombia

y *P. vivax*. Se evaluaron además las condiciones óptimas de hibridación, la preparación de las muestras y las sondas utilizadas.

## METODOLOGIA

### Sondas utilizadas

Para la detección de *P. falciparum* se emplearon como sondas: el clon PFCOL692 que contiene un inserto de 1384 pb, con 2 copias de una secuencia de 692 pb y se repite 60 veces en el genoma del parásito; el clon pRepHind que contiene una secuencia de 21 pb repetitiva en serie (7); y el oligonucleótido 24 mer Tm 40 (McCutchan) (14).

Para *P. vivax* se utilizaron como sondas, el clon 11 (Grupo Bioquímica INS) con un inserto de 1,3 kb y el oligo 24 mer RPV24.1 (Grupo Lizardi-Alagón Ins.de Biotecnología, Cuernavaca-México), el cual hibridiza con la secuencia ribosomal 18S de *P. vivax* (tabla 1).

### MARCACIONES RADIOACTIVAS

#### Nick translation

Los clones PFCOL692 y pRepHind utilizados como sondas fueron marcados con [ $\alpha$ - $^{35}$ S] dATP, por el

método de reparación de cortes por desplazamiento o Nick Translation(17) empleando DNA polimerasa I 5 U/ $\mu$ g y DNAasa I 1 ng/ $\mu$ g (promega); mezcla de dNTPs (dGTP,dCTP,dTTP) 20  $\mu$ M; [ $\alpha$ - $^{35}$ S] dATP(1000Ci/mmol, 10mCi/ml)3.5  $\mu$ M; y ADN 20  $\mu$ g/ml. La incubación se llevó a cabo por 3 horas a 15°C. La sonda se purificó por precipitación etanólica (18).

#### Random primers o multiniciadores

Se linearizaron los clones PFCOL692 y pRepHind por digestión con BamHI (Pharmacia). Luego de denaturar las sondas por calentamiento a 92°C por 5 min se marcaron con 30 pmoles y 50 pmoles de [ $\alpha$ - $^{35}$ S] dATP (1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml). Se utilizó como buffer de reacción Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, hepes 0,2 M pH 6,6 y 26 U/ml ( $A_{260}$ ) de hexanucleótidos al azar; 100 U del fragmento klenow de la DNA polimerasa I (Promega), mezcla de dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP) 20  $\mu$ M y ADN 500ng/ml. Se incubó por tres horas a temperatura ambiente.

TABLA 1. Comparación de características de las sondas empleadas para la detección de ADN de *P. FALCIPARUM* Y *P. VIVAX*

SONDA	TIPO ADN (1)	PROCEDENCIA	OBTENCION ( <i>Plasmodium</i> )	PARASITO
PFCOL692	Ds ADN 4.0kb	INS Bioquímica	Cultivo	<i>falciparum</i>
pRepHind	Ds ADN 6.0Kb	FRANZEN	Cultivo	<i>falciparum</i>
i692	Ds ADN 1.4kb	INS Bioquímica	Cultivo	<i>falciparum</i>
clon11	Ds ADN 4.0kb	INS Bioquímica	Cultivo	<i>vivax</i>
Tm40	Ss 24 mer	McCutchan	Síntesis	<i>falciparum</i>
RPV24.1	Ss 24 mer	Lizardi -Alagón	Síntesis	<i>vivax</i>

(1) Ds: ADN de doble cadena; Ss: ADNr de cadena sencilla.

## MARCACIONES NO RADIOACTIVAS

### Marcación con Biotina por NICK translation

Se marcaron el clon PFCOL692, el pRepHind y la secuencia PFCOL692, empleando las condiciones descritas para Nick Translation, excepto que el nucleótido modificado fue dUTP-11-Biotina 20  $\mu$ M (19). La sonda se purificó utilizando una columna de sephadex G-50 (farmacia) y la detección colorimétrica se hizo mediante el sistema "Blue Gene" (BRL).

### Marcación con fotobiotina

Ya que se recomienda linearizar el ADN antes de la fotobiotinilación (20), el PFCOL692 se linearizó con BamHI y el pRepHind con ECOR1(20). Es importante anotar que debido a la extrema reactividad del grupo nitreno del acetato de fotobiotina, los ADN deben disolverse en agua (21). La reacción se llevó a cabo bajo luz roja de seguridad, adicionando en un tubo eppendorf 200  $\mu$ g/ml de ADN y 400  $\mu$ g/ml de acetato de fotobiotina (BRL); se colocó el tubo abierto en una cubeta con hielo y se irradió por 30 min a 10 cm de distancia con una lámpara de mercurio de 400w. Se realizó una extracción con sec-butanol, se precipitó con etanol y se detectó colorimétricamente empleando el sistema "Blue Gene" (BRL).

### Empleo de proteasas para la generación de señales fluorescentes

Con este método de detección primero se marcaron las sondas PFCOL692 y el clon 11 con dUTP-11-Biotina por Nick Translation, y los oligonucleótidos Tm40 y RPV24.1 con digoxigenina-11-dUTP empleando la terminal transferasa (21). Para acoplar la sonda biotinilada al sistema de las proteasas se incubó con 8  $\mu$ g/ml por 20 min. Luego se adicionaron: enteroquinasa biotinilada 50  $\mu$ g/ml por 20 min; tripsinógeno (Sigma T9503) 50  $\mu$ g/ml, sobre el cual tiene una gran especificidad la enteroquinasa; inhibidor de tripsina (Sigma T9003) al 2% con respecto al tripsinógeno, para eliminar la tripsina activa presente en los preparados de tripsinógeno. Después de 5 min se agregó un sustrato fluorogénico para tripsina [(Cbz-lis-Arg)<sub>2</sub>Rodamina]

70  $\mu$ g/ml (22), se incubó a 37°C hasta la aparición de señales fluorescentes, y finalmente se evaluó bajo iluminación UV de onda larga o registrando la lectura en un lector de ELISA a 490 nm.

### Preparación de las muestras

Las muestras de ADN de *P. falciparum*, extraído y purificado (23-24) se aplicaron sobre membranas de nitrocelulosa en forma de gotas de ADN en solución o "Dot Blot", previo humedecimiento de la membrana en 6xSSC (SSC=0.15 mol/l de cloruro de sodio, 0.015 mol/l de citrato de sodio); las cantidades aplicadas en volúmenes de 2  $\mu$ l fueron las siguientes: 125, 12.5, 1.25, 0.125, 0.012, 0.006 y 0.003 ng; como control negativo se sembró ADN humano en las mismas cantidades anteriores y como control positivo 10 ng de la sonda. El ADN se denaturó con NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M, se neutralizó con una solución de Tris-HCl 0.5 M pH 8.0, NaCl 1.5 M, y por último se fijó a la membrana por calentamiento a 80°C por 2 horas.

### Condiciones de hibridización

Con las marcaciones radioactivas se realizó una prehibridización de 4 h a 42°C con una solución compuesta de 6XSSC, sulfato de dextran al 5%, solución denhardt 10X (polivinilpirrolidona 0.2%, ficoll 0.2%, suero de albúmina bovina 0.2%), formamida 50% y ADN de esperma de salmón 0.1 mg/ml. La hibridización se llevó a cabo por 16h a 42°C en la misma solución, con una concentración de sonda marcada de 10 ng/ml en el caso de Nick Translation, y de 1.5 ng/ml en el caso de Random Primers. Los filtros se lavaron a 65°C 2 veces por 1 min en 6XSSC-SDS 0.1%; 2 veces con 1XSSC-SDS 0.1%, por 15 min y 3 veces con 0.1XSSC-SDS 0.1% por 15 min cada vez.

En las marcaciones no radioactivas la solución de hibridización y prehibridización estuvo compuesta por: 5XSSC, formamida 50%, sulfato de dextran 5%, SDS 0.5%, 5XDenhardt y ADN esperma de salmón 0.5 mg/ml. La concentración de las sondas empleadas osciló entre 150 y 250 ng/ml. Se realizaron 2 lavados con 2XSSC-SDS 0.1% a t° amb. 3 min, 2 con 0.2XSSC-SDS 0.1% y 2 con 0.1XSSC-SDS 0.1% a 50°C por 15 min cada uno.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En los métodos de marcación radioactiva se compararon las incorporaciones y las actividades específicas obtenidas. Con el método de *random primers* se probaron 30 pmoles y 50 pmoles de [ $a\text{-}^{35}\text{S}$ ]dATP. Se encontró mayor porcentaje de incorporación con 30 pmoles, puesto que ya se sintetizó la máxima cantidad posible de ADN y al utilizar cantidades superiores de [ $a\text{-}^{35}\text{S}$ ]dATP no se mejoró la eficiencia de la reacción.

Con la marcación *nick translation* las incorporaciones fueron del 29 y 31%, mientras que con el método de *random primers* las incorporaciones oscilaron entre 55 y 58% (tabla 2). Por lo tanto la marcación radioactiva por *random primers* produjo alta incorporación de la marca, que resultó en sondas con mayor actividad específica ( $1\text{-}2 \times 10^9$  dpm/ug). Además, este método tiene otras ventajas como la de utilizar pequeñas cantidades de ADN (10ng), las cuales se marcan muy eficientemente ya que el ADN plantilla no se degrada durante la reacción (21).

Debido a las altas incorporaciones de marca obtenidas con *random primers*, en las sondas marcadas por este método puede evitarse la remoción de los nucleótidos no incorporados. La desventaja que presenta este método comparado con *nick translation*, es que produce menores cantidades de sonda marcada, además que el ADN circular debe ser linearizado para lograr una marcación eficiente.

En este trabajo se logró una sensibilidad 10 veces mayor en la detección de ADN de *P. falciparum*, utilizando el sistema de marcación radioactiva *random primers*, con respecto a la obtenida con *nick translation*, alcanzando los niveles reportados (8,9). La sensibilidad alcanzada de 12 pg, se logró tanto con la sonda PFCOL692, como con la sonda pRepHind (Figura 1). Estos resultados aumentaron el interés en conocer más a fondo el clon PFCOL692, debido a la sensibilidad obtenida, y mostraron las ventajas de utilizar el método *random primers*.

TABLA 2. Comparación entre los métodos de marcación radioactiva *nick translation* y *random primers*

METODOS SONDAS	NICK TRANSLATION		RANDOM PRIMERS		
	pRepHind	PFCOL692	pRepHind	p38R	
Cantidad de marca (pmoles)	80	80	50	50	30
Incorporación %	31	29	52	55	58
Act. específica (dpm/M $\gamma$ )	4,16x10	4,10x10 <sup>8</sup>	2,27x10 <sup>9</sup>	1,02x10 <sup>9</sup>	1,78x10 <sup>9</sup>
Concentración de marca (dpm/ml)	1,62x10 <sup>6</sup>	1,33x10 <sup>6</sup>	3,75x10 <sup>6</sup>	2,78x10 <sup>6</sup>	2,16x10 <sup>6</sup>
Concentración de sonda (ng/ml)	10	10	1,5	1,5	1,5
Sensibilidad (ng)	0,125	0,125	0,012	0,012	0,012

Se marcaron las sondas PFCOL692 y pRepHind con [ $a\text{-}^{35}\text{S}$ ] dATP, por los métodos *random primers* y *nick Translation* y se emplearon en un ensayo de sensibilidad.

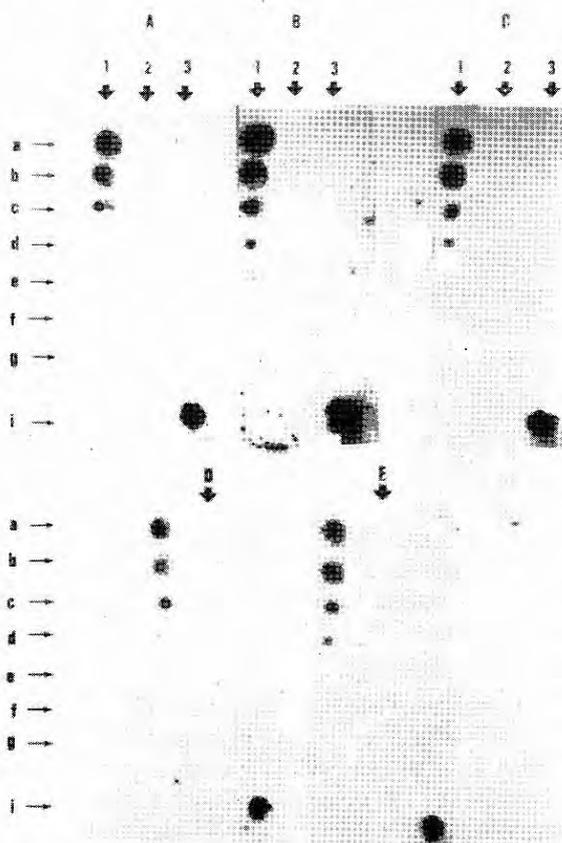


Figura 1. Autorradiografía de filtros con muestras de ADN de *P. falciparum* (1) y ADN humano (2) hibridizado con las sondas pRepHind (A y D) y PFCOL692 (B, C y E) marcadas con  $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$  por *random primers* (A, B, y C), y *nick translation* (D y E). Cantidad de ADN (a-g) 125ng, 12,5ng, 1,25ng, 0,12ng, 0,012ng, 0,006ng y 0,003ng. Control positivo (3) PFCOL692 o pRepHind.

En cuanto a las condiciones de hibridización empleadas (formamida 50%, sulfato de dextrán 5%) se observó que la señal inespecífica fue menor que la obtenida en ensayos preliminares (no mostrados) sin utilización de estos agentes. La solución de prehibridización fue la misma de hibridización, pero se disminuyó el volumen a la mitad, considerando que volúmenes pequeños de solución de hibridización son mejores, puesto que la cinética de reacción es más rápida. La cantidad de sonda necesaria puede reducirse,

haciendo que el ADN enlazado al filtro actúe como conductor en la reacción (5). Utilizando una menor cantidad de sonda (1,5 ng/ml), se disminuyó el ruido que se presenta por la unión inespecífica de la sonda marcada al filtro de nitrocelulosa (5).

El aumento de la señal obtenida en los ensayos de sensibilidad con respecto a experimentos realizados anteriormente (no mostrados) con la sonda PFCOL692, pudo deberse, además de la mayor actividad específica lograda en las marcaciones, a la utilización de formamida y sulfato de dextrán; este polímero, favorece la reacción, probablemente por el aumento de la concentración efectiva del ADN; la formamida, al disminuir la  $T_m$ , hace que los híbridos perfectos sean más estables (25).

En cuanto a los métodos de marcación no radioactivos, se probaron la marcación enzimática con dUTP-11-biotina por *nick translation*, la marcación química con fotobiotina, con detección colorimétrica por precipitación de un sustrato. Y la marcación con biotina o digoxigenina seguida de una detección por la producción de señales fluorescentes (mediadas por proteasas).

En la marcación con biotina las condiciones empleadas en la reacción funcionaron bien, considerando tanto las recomendaciones de la técnica *nick translation* (17), como las condiciones para marcaciones no radioactivas usando análogos biotinilados (26). Hubo una marcación eficiente de las sondas, comparadas con el patrón empleado ( $\lambda$ -biotina). Lo mismo se puede decir de la marcación con fotobiotina (figura 2).

Es importante anotar que en la marcación con fotobiotina, se debe conservar la relación en peso ADN/fotobiotina (1/2), para lograr una marcación efectiva (20), teniendo en cuenta que aproximadamente 1 de 50 bases se modifican bajo las condiciones usadas (21). La reacción se terminó cuando se observó una ligera intensificación del color inicial (salmón), porque ya se ha logrado un buen grado de fotobiotinilación, sin necesidad de exponer por mucho más tiempo el ADN.

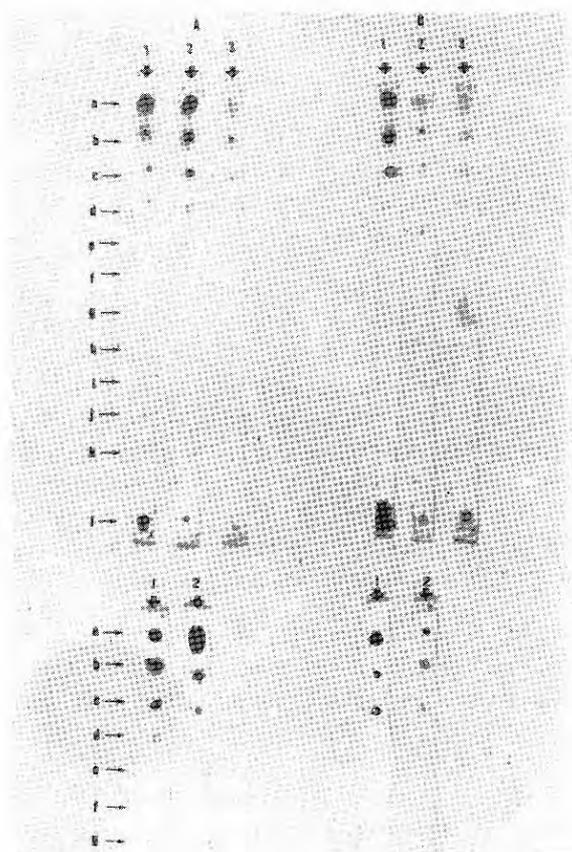


Figura 2. Hibridación con las sondas PFCOL692(A) y pRepHind (B) marcadas con fotobiotina. Parte superior:(1-3) concentración de sonda 250 ng/ml, 200 ng/ml,150 ng/ml. ADN de *P. falciparum* ( a-i) 270 ng, 135ng, 13,5ng, 1,35 ng, 0,135 ng, 0,013 ng, 0,006 ng, 0,003 ng y 0,001 ng. ADN esperma de salmón (j) 500 ng. ADN humano (k) 400 ng/ml. Control positivo (l) PFCOL692 o pRepHind. Parte inferior: patrón lambda (1) y sonda (2) fotobiotinilados. (a-g) 200 pg,100 pg,20 pg,10 pg,5 pg, 2,5 pg,1,25 pg.

En la hibridación llevada a cabo bajo idénticas condiciones con ambos tipos de marcación, se probaron tres concentraciones de sonda (150, 200 y 250 ng/ml), con las que se obtuvo el mismo nivel de sensibilidad (figura 2). Por lo tanto, se escogió para realizar los experimentos posteriores, la concentración menor de sonda (150 ng/ml). Esta disminución resulta conveniente si se tiene en cuenta que para métodos de marcación no radioactivos, la concentración de sonda debe ser un orden mayor que para métodos no radioactivos (26).

Con la secuencia PFCOL692 marcada con biotina se logró igual sensibilidad que con el plásmido recombinante PFCOL692. Resulta además conveniente utilizar este último.

La sensibilidad alcanzada (135 pg) con los métodos anteriores, es similar a la reportada en la literatura con el oligo PFR-1 (secuencia repetitiva de 21 bases) marcado con biotina (27-28). La marcación con fotobiotina dió los mismos resultados y es mucho más rápida, sencilla y económica.

Con el empleo de las proteasas para generar señales fluorescentes en experimentos de hibridación de la secuencia PFCOL692 con ADN de *P. falciparum*, se detectaron hasta 13 pg de ADN purificado del parásito. Aunque este resultado es preliminar muestra sus posibilidades como método de detección.

Finalmente, comparando los resultados obtenidos tanto con marcaciones radioactivas como no radioactivas con las sondas PFCOL692 y pRepHind, se podía pensar que el clon PFCOL692 fuera semejante al pRepHind (secuencia de 21 pb repetida en serie), o tuviera algún tipo de repetitividad en el genoma. Sin embargo, la secuencia del PFCOL692 (en publicación) no se encontró formando parte del pRepHind. El PFCOL692 hibridiza con 13 de los 14 cromosomas de *P. falciparum*, contiene 2 copias de una secuencia de 692 pb y se repite 60 veces en el genoma del parásito (en publicación). Todo esto explica la sensibilidad obtenida en la detección de *P. falciparum*.

## SUMMARY

We report here a comparison of various methods for labelling of *Plasmodium falciparum* DNA probes.

The sensitivity of *P. falciparum* DNA detection was increased ten times when the *random primers* method was used instead of the nick translation method. Using the probe PFCOL692 developed in our laboratory, the detection level was 12 pg of DNA. These results are similar to those reported by other laboratories using the probe pRepHind.

When comparing non-radioactive methods for labelling, photobiotin was advantageous in comparison with nick translation biotin-dUTP. The detection limit was 135 pg of *P. falciparum* DNA.

A fluorescent system based on proteases and fluorogenic substrates was assayed, and its expectations were discussed.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió el apoyo financiero del Instituto para el desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas, Colciencias, y la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional, JICA.

### REFERENCIAS

1. **Wernsdorfer WH, Mcgregor J.** Malaria principles and practice of malariology. New York: Churchill Livingstone, 1988; 1:815.
2. **Draper C, Greenwood B, Holmberg, M, et al.** The use of DNA probes for malaria diagnosis: memorandum from WHO Meeting. Bull WHO 1986; 6:642.
3. **Spielman A.** Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. Am J Trop Med Hyg., 1988; 39:4
4. **Esposito F.** Evaluation of an ELISA kit for epidemiological detection of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoites. Acta tropica 1990; 47:35.
5. **Matthews J.** Review Analytical strategies for the use of DNA probes. Anal. Biochem 1988; 169:1.
6. **Aslund L, Franzen L, et al.** Highly reiterated non coding sequence in the genome of *Plasmodium falciparum* is composed of 21 base pair tandem repeats J Mol Biol 1985; 185:509.
7. **Franzen L, et al.** Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. Lancet 1985; 1:525.
8. **Barker RH, et al.** Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. Science 1986; 231:1434.
9. **Barker RH, et al.** Detection of *Plasmodium falciparum* infection of human patient. Am J Trop Med Hyg., 1989; 41:266.
10. **Holmberg M, et al.** Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection by spot hybridisation assay: specificity. Bull WHO 1986; 64:579.
11. **McLaughlin G L, et al.** Detection of *Plasmodium falciparum* using a synthetic DNA probes. Am J Trop Med Hyg 1985; 34:837.
12. **McLaughlin, et al.** Assessment of a synthetic DNA probes for *Plasmodium falciparum* in Africa blood specimens Am J Trop Med Hyg 1987; 37:27.
13. **Waters A P, McCutchan TF.** Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. Lancet 1989; 17.
14. **McCutchan TF, et al.** Ribosomal RNA based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. Mol Biochem Parasitol 1989; 36:67.
15. **McCutchan JF, Waters A P.** Partial sequence of the asexually expressed rRNA gene of *Plasmodium vivax*. Nucl Acid Res 1989; 17(5).
16. **Waters A P, McCutchan TF.** Ribosomal RNA: nature's own polimerasa-amplified target for diagnosis. Parasitology today 1990; 6(2).
17. **Rigby P W, Dieckmann M.** Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polimerasa I. J Mol Biol 1977; 143:237.
18. **Perbal B A.** A practical guide to Molecular cloning, second edition. U.S.A. Wiley Interscience. 1988.
19. **Leary G, Brigarty D J, et al.** Rapid sensitive colorimetric methods for visualitation biotin labelled DNA probes hybridized to DNA o RNA immobilized on nitrocelulose. Proc Natl Acad Sci 1983; 80:4045.
20. **Forster AC., et al.** Non radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. Nucl Acid Res 1985; 13(3).
21. **Keller, G., Manak, M.** DNA probes. New York. Stockton press. 1989.
22. **Leytus S, Melhado L.** Rhodamine-based compounds as fluorogenic substrates for serine proteinases. Biochem J 1983; 209:299.
23. **Ausubel F.** Current protocols in molecular biology, 1; supl. 13, 2.2.1-2.2.3. U.S.A., 1989.
24. **Goman M, et al.** The stablishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and identification of individual clones by hybridization. Mol Biochem Parasitol 1982; 5:391
25. **Arrand JE.** Nucleic acid hybridisation a practical approach, Oxford: IRL Press 1985.
26. **Gebeyehu, G.** Novel biotinilated nucleotide . Analogs for labelling and colorimetric detection of DNA. Nucl Acid Res 1987; 15:4513.
27. **McLaughling, G. L., et al.** Use of enzyme linked synthetic DNA in diagnosis of *falciparum* malaria. The Lancet 1987; 714.
28. **Sethabutr O, et al.** A comparative field study of radiolabelled and enzyme-conjugated synthetic DNA probes for the diagnosis of *falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg 1988; 39:227.