



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 299**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08019285 .9**

96 Fecha de presentación : **04.11.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2055788**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54 Título: **Método de detección de secuencias de ácido nucleico y sustrato para detección de secuencias de ácido nucleico.**

30 Prioridad: **05.11.2007 JP 2007-286874**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.04.2011**

73 Titular/es: **HITACHI PLANT TECHNOLOGIES, Ltd.**  
**5-2 Higashi-Ikebukuro 4-chome**  
**Toshima-ku, Tokyo, JP**

72 Inventor/es: **Ikuta, Hajime y**  
**Takemura, Kiyokazu**

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 356 299 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de detección de secuencias de ácido nucleico y sustrato para detección de secuencias de ácido nucleico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de detección de secuencias de ácido nucleico. Particularmente, la presente invención se refiere a una técnica para detectar de manera altamente sensible, convenientemente y a bajo coste, la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse en una muestra.

Descripción de la técnica relacionada

10 Un método convencional para detectar una secuencia de ácido nucleico específica para una muestra como diana implica: unir la secuencia de ácido nucleico diana a cadenas de oligonucleótidos inmovilizadas en un sustrato y unir una cadena de oligonucleótidos diferente marcada con una sustancia fluorescente a la secuencia de ácido nucleico diana unida; y detectar la presencia de la secuencia de ácido nucleico particular en la muestra detectando/amplificando una señal de luz reflejada del marcador de sustancia fluorescente mediante irradiación con luz (por ejemplo, haz de láser) a una longitud de onda particular. Otro método de detección implica: unir la secuencia de ácido nucleico diana a cadenas de oligonucleótidos inmovilizadas en un sustrato; llevar a cabo una reacción de elongación usando las cadenas de oligonucleótidos como cebadores y la secuencia de ácido nucleico diana unida como molde, en el que se marcan las sustancias de base incorporadas durante la reacción con una sustancia fluorescente; y detectar/amplificar una señal de luz reflejada del marcador de sustancia fluorescente mediante irradiación con luz (por ejemplo, haz de láser) a una longitud de onda particular.

25 Sin embargo, estos métodos de detección deben detectar una sustancia fluorescente y por tanto requieren un aparato de detección especial que emite luz a una longitud de onda particular. Un aparato de detección de este tipo es costoso y tiene un uso limitado para ciertos institutos o universidades de investigación en las presentes circunstancias. Por tanto, estos enfoques no pueden adoptarse, por ejemplo, para detectar convenientemente microorganismos patógenos tales como norovirus o *Cryptosporidium* en agua (muestra) en sitios de tratamiento de agua, debido a procedimientos complicados y aparatos de análisis costosos.

30 Frente a este telón de fondo, por ejemplo, el método MPEX (extensión con múltiples cebadores) descrito en K. Kinoshita *et al.*, Multiple primer extension by DNA polimerase on a novel plastic DNA array coated with a biocompatible polymer, Nucleic Acid Research, vol. 35, n.º 1, 2007, págs. e3, y solicitudes de patentes japonesas abiertas a consulta por el público n.ºs 2006-174788 y 2007-222010 se ha desarrollado como un método para detectar convenientemente una secuencia de ácido nucleico particular en detección (por ejemplo, sitios de tratamiento de agua) a bajo coste.

35 Este método MPEX es un método para pruebas genéticas que usa una reacción de elongación de ADN catalizada por una enzima (ADN polimerasa) en un sustrato y también se usa en análisis de mutación génica, análisis de SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido) e identificación de microorganismos. Este método usa, como cebadores, cadenas de oligonucleótidos inmovilizadas en un sustrato que tiene, en la superficie del mismo, una sustancia polimérica que contiene una primera unidad que tiene un grupo inducido a partir de éster fosfórico que constituye el resto hidrófilo de fosfolípido y una segunda unidad que tiene un grupo éster activo. Implica: tras la adición de una secuencia de ácido nucleico diana, desnaturalizar por calor el ADN bicatenario en cadenas sencillas en el sustrato y llevar a cabo la reacción de elongación de ADN catalizada por ADN polimerasa usando la cadena sencilla como molde para incorporar bases, todas o algunas de las cuales están modificadas con un ligando, en el producto de reacción de elongación (ADN amplificado); y finalmente añadir al mismo una sustancia activa reactiva con el ligando para su reacción. Por tanto, el método MPEX consigue una detección génica altamente sensible.

45 El documento EP-A-1 634 963 se refiere a amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos mediante amplificación en puente, y a aparatos y a equipos útiles para amplificación y secuenciación de alto rendimiento a gran escala de ácidos nucleicos. El método comprende las etapas de: (1) formar al menos un molde de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico que va a amplificarse, en el que dicho ácido nucleico contiene en el extremo 5' una secuencia de oligonucleótidos Y y en el extremo 3' una secuencia de oligonucleótidos Z y, además, porta en el extremo 5' un medio para unir el ácido nucleico a un soporte sólido; (2) mezclar dicho molde de ácido nucleico con un cebador de colonia X, que puede hibridar con la secuencia Z y porta en el extremo 5' un medio para unir el cebador de colonia al soporte sólido, en presencia de un soporte sólido de manera que los extremos 5' tanto del molde de ácido nucleico como del cebador de colonia se unen al soporte sólido; (3) llevar a cabo una o más reacciones de amplificación de ácido nucleico en el molde unido, de manera que se generen colonias de ácido nucleico.

55 El documento WO 02/46456 A da a conocer otro método para amplificar ácidos nucleicos mediante amplificación en puente que se realiza en condiciones isotérmicas.

El documento WO 01/62982 A describe un método de amplificación en puente de múltiples fases que emplea un producto de amplificación bicatenario formado durante una primera amplificación en puente para iniciar una fase posterior de amplificación en puente.

5 El documento WO 03/076902 A se refiere a un método de detección de moléculas de ácido nucleico diana en una muestra. El método implica proporcionar una pluralidad de grupos diferentes de dos o más conductores eléctricos separados eléctricamente con sondas de captura, tales como oligonucleótidos, unidas a los conductores de manera que exista un espacio vacío entre las sondas de captura en los conductores separados eléctricamente. Se ponen en contacto las sondas de captura con una muestra en condiciones que permiten que cualquiera de las moléculas de ácido nucleico diana presentes en la muestra hibride con las sondas de captura y conecte de ese modo las sondas de captura en los conductores separados. Entonces, se detecta la presencia de la molécula de ácido nucleico diana determinando si se conduce electricidad entre los conductores separados.

15 Collins M.L. *et al.*, Nucleic Acid Research, 1997, vol. 25, n.º 1, páginas 2979-2984 describe un ensayo de amplificación de ADN ramificado para cuantificar moléculas diana de ácido nucleico. Se inmovilizan sondas de captura en un soporte sólido y se usan oligonucleótidos extensores de captura para capturar la molécula diana para el soporte sólido hibridando tanto con las sondas de captura como con la molécula diana. Posteriormente, se marca la molécula diana uniendo oligonucleótidos específicos para la molécula diana denominados extensores de marcador. Para detectar la molécula diana, se unen moléculas amplificadoras de ADN ramificado, que a su vez unen muchas sondas de fosfatasa alcalina, a los extensores de marcador que se hibridan con la molécula diana.

### SUMARIO DE LA INVENCION

20 Sin embargo, los colorantes de tinción son inferiores en sensibilidad de amplificación de señal de detección con respecto a las sustancias fluorescentes. Por tanto, el método MPEX no detecta de manera altamente sensible, por ejemplo, microorganismos patógenos tales como norovirus o *Cryptosporidium*, que están presentes sólo en un orden muy bajo en el agua (muestra) y no pueden hacerse proliferar mediante cultivo.

25 El método MPEX requiere, para una detección altamente sensible, aumentar la cantidad de marcadores y requiere, para este fin, la etapa de aumentar la concentración de una secuencia de ácido nucleico diana mediante PCR o similares. Por tanto, este método lleva desventajosamente un tiempo prolongado para obtener resultados.

Por tanto, el método MPEX debe mejorarse adicionalmente para detectar microorganismos patógenos tales como norovirus o *Cryptosporidium*, que están presentes sólo en un orden muy bajo en el agua y no pueden hacerse proliferar mediante cultivo.

30 Alternativamente, incluso el uso de sustancias fluorescentes da como resultado una sensibilidad de detección inestable para una cantidad extremadamente pequeña de un gen particular que va a detectarse, como en los microorganismos patógenos. Por tanto, no puede conseguirse una detección precisa.

35 Considerando tales circunstancias, un objeto de la presente invención es proporcionar un método de detección de secuencias de ácido nucleico, que puede detectar de manera altamente sensible incluso una concentración extremadamente pequeña de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse, a bajo coste y durante poco tiempo.

40 Un primer aspecto de la presente invención para alcanzar el objeto proporciona un método de detección de secuencias de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse en una muestra, comprendiendo el método: una etapa de inmovilización de anclar cadenas de oligonucleótidos sobre un sustrato inmovilizando uno de los extremos 5' y 3' de las mismas sobre el sustrato; una etapa de formación de espacio reticulado de llevar a cabo, basándose en un conjunto de las cadenas de oligonucleótidos, la etapa de inmovilización y unir las cadenas de oligonucleótidos a sus respectivas partes complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana para formar una estructura entrecruzada en múltiples conjuntos para formar un espacio finamente reticulado en el sustrato, en la que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas se entrelazan entre sí; una etapa de captura de capturar un ligando por el espacio reticulado a través de adsorción física; una etapa de coloración de hacer que el ligando capturado se coloree con una sustancia activa reactiva con el ligando; y una etapa de detección de detectar una señal de color derivada de la coloración para detectar la secuencia de ácido nucleico diana.

50 En este contexto, la secuencia de ácido nucleico diana se refiere a ARN o a ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que va a detectarse.

55 Según el primer aspecto de la presente invención, se anclan un par de cadenas de oligonucleótidos sobre la superficie de un sustrato inmovilizando uno de los extremos de las mismas sobre el sustrato. Se une cada una de las cadenas de oligonucleótidos inmovilizadas a la secuencia de ácido nucleico diana (monocatenaria) que tiene secuencias complementarias a las mismas para formar una estructura entrecruzada en el sustrato, formando de ese modo un espacio finamente reticulado. Se capturan ligandos por este espacio reticulado a través de adsorción física y se hace que se colorean con sustancias activas reactivas con los ligandos.

5 Tal como se describió anteriormente, cuando la secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse está presente en la muestra, se forma un espacio reticulado en el sustrato, y se captura un ligando como un constituyente de una sustancia cromógena para coloración por este espacio reticulado a través de adsorción física. Por tanto, puede capturarse la sustancia cromógena en una alta concentración por el espacio reticulado añadiendo a la misma una sustancia activa reactiva con el ligando como otro constituyente de la sustancia cromógena. Esto consigue una detección altamente sensible incluso para una concentración extremadamente pequeña de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse. Además, el primer aspecto de la presente invención no requiere reacción de elongación y por tanto la detección puede llevar poco tiempo. Además, el primer aspecto de la presente invención puede usar los colorantes de tinción, no colorantes fluorescentes, y por tanto puede eliminar la necesidad de aparatos de detección costosos, lo que conduce a una detección a bajo coste.

10 En este contexto, puede obtenerse información sobre la secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, en Internet, usando bancos de datos de ADN (por ejemplo, DDBJ (Banco de Datos de ADN de Japón), EMBL (Laboratorio Europeo de Biología Molecular) y GenBank). Por tanto, dos secuencias de ácido nucleico específicas para una muestra pueden asignarse respectivamente a un par de las cadenas de oligonucleótidos identificando estos dos sitios específicos en la secuencia de ácido nucleico diana.

15 Un segundo aspecto proporciona un método de detección de secuencias de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse en una muestra, comprendiendo el método: inmovilizar múltiples conjuntos de cadenas de oligonucleótidos sobre un sustrato; añadir, a un sistema de reacción, la muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana así como un ligando como un constituyente de una sustancia cromógena y fijar la temperatura del sistema de reacción a una temperatura a la que se desnaturaliza por calor la secuencia de ácido nucleico diana en cadenas sencillas; fijar la temperatura del sistema de reacción a una temperatura de hibridación a la que se unen de manera complementaria las cadenas de oligonucleótidos a la secuencia de ácido nucleico diana; añadir, sobre el sustrato, una sustancia activa como otro constituyente de la sustancia cromógena para su reacción con el ligando; y detectar una señal de color derivada de la coloración mediante la sustancia cromógena.

20 El segundo aspecto se basa en procedimientos operacionales, mientras que el primer aspecto interpreta la invención basándose en un mecanismo.

25 Según el segundo aspecto, se diseñan un par de cadenas de oligonucleótidos de manera que cada una de ellas tenga una parte de secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana desnaturalizada por calor en cadenas sencillas. Por tanto, en el sistema de reacción que contiene un ligando como un constituyente de una sustancia cromógena, se forman una pluralidad de las estructuras entrecruzadas mostradas en el primer aspecto a través de una reacción de hibridación. Entonces, una pluralidad de los ligandos se capturan por las estructuras entrecruzadas a través de adsorción física. Esto puede producir una señal de color fuerte, lo que conduce a una detección altamente sensible.

30 Un tercer aspecto de la presente invención para alcanzar el objeto proporciona un método de detección de secuencias de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse en una muestra, comprendiendo el método: una etapa de diseño de diseñar de antemano cadenas de oligonucleótidos primera y segunda de manera que la segunda cadena de oligonucleótidos tenga una secuencia de ácido nucleico complementaria a un producto de reacción de elongación disociado de un dúplex formado a través de la reacción de elongación usando la primera cadena de oligonucleótidos como cebador y la secuencia de ácido nucleico diana como molde tras la unión complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana y la primera cadena de oligonucleótidos; una etapa de inmovilización de anclar las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda sobre un sustrato inmovilizando los extremos 5' de las mismas sobre el sustrato; una primera etapa de reacción de elongación de unir de manera complementaria la primera cadena de oligonucleótidos a la secuencia de ácido nucleico diana y llevar a cabo la primera reacción de elongación usando la primera cadena de oligonucleótidos como cebador y la secuencia de ácido nucleico diana como molde; una primera etapa de disociación de disociar, de la secuencia de ácido nucleico diana, el primer producto de reacción de elongación extendido en la primera etapa de reacción de elongación; una primera etapa de entrecruzamiento de unir el primer producto de reacción de elongación disociado a la segunda cadena de oligonucleótidos para formar una estructura entrecruzada entre las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda; una segunda etapa de reacción de elongación de llevar a cabo la segunda reacción de elongación usando la segunda cadena de oligonucleótidos como cebador y el primer producto de reacción de elongación como molde; una segunda etapa de disociación de disociar del mismo el segundo producto de reacción de elongación extendido en la segunda etapa de reacción de elongación; una segunda etapa de entrecruzamiento de llevar a cabo la primera etapa de reacción de elongación con respecto a la segunda etapa de disociación en una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda y unir una primera cadena de oligonucleótidos diferente de la primera cadena de oligonucleótidos al segundo producto de reacción de elongación disociado para formar una estructura entrecruzada entre las cadenas de oligonucleótidos segunda y primera; una etapa de entrecruzamiento repetitivo de repetir las etapas de entrecruzamiento primera y segunda entre una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda; una etapa de formación de espacio reticulado de formar un espacio finamente reticulado mediante la etapa de entrecruzamiento repetitivo, en la que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas se entrelazan entre sí; una etapa de captura de capturar un ligando por el espacio reticulado a través de adsorción física; una etapa de coloración de hacer que el ligando capturado se

coloree con una sustancia activa reactiva con el ligando; y una etapa de detección de detectar una señal de color derivada de la coloración para detectar la secuencia de ácido nucleico diana.

Según el tercer aspecto de la presente invención, se forma un espacio reticulado mediante un método diferente al del primer aspecto. Específicamente, según el tercer aspecto, se une de manera complementaria una primera cadena de oligonucleótidos anclada en la superficie de un sustrato mediante el extremo 5' de la misma a la secuencia de ácido nucleico diana. Entonces, se disocia un primer dúplex, que se forma a través de la reacción de elongación usando la primera cadena de oligonucleótidos como cebador y la secuencia de ácido nucleico diana como molde de manera que el primer dúplex tenga una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana. Entonces, el primer producto de reacción de elongación disociado de la misma se une de manera complementaria a una segunda cadena de oligonucleótidos anclada en la superficie del sustrato por un extremo. Entonces, se forma un segundo dúplex a través de la reacción de elongación usando la segunda cadena de oligonucleótidos como cebador y el primer producto de reacción de elongación como molde. El segundo producto de reacción de elongación se disocia del primer dúplex.

Esto puede formar una pluralidad de estructuras entrecruzadas de secuencias de ácido nucleico a través de reacciones de elongación y disociación en el sustrato. La pluralidad de las estructuras entrecruzadas pueden entrelazarse intrincadamente entre sí, formando de ese modo un espacio reticulado en el sustrato.

En este contexto, puede obtenerse información sobre la secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, en Internet, usando bancos de datos de ADN (por ejemplo, DDBJ (Banco de Datos de ADN de Japón), EMBL (Laboratorio Europeo de Biología Molecular) y GenBank). Por tanto, se identifica una secuencia de ácido nucleico específica para una muestra en la secuencia de ácido nucleico diana y se asigna a la primera cadena de oligonucleótidos. Además, la segunda cadena de oligonucleótidos se diseña de manera que tenga una secuencia de ácido nucleico complementaria a un primer producto de reacción de elongación. Según el tercer aspecto, se diseñan las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda de manera que tengan secuencias de ácido nucleico diferentes.

Además, según el tercer aspecto, se capturan ligandos por el espacio reticulado a través de adsorción física y se hace que se colorean con sustancias activas reactivas con los ligandos. Tal como se describió anteriormente, cuando la secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse está presente en la muestra, se forma un espacio reticulado en el sustrato, y se captura un ligando como un constituyente de una sustancia cromógena para coloración por este espacio reticulado a través de adsorción física. Por tanto, puede capturarse la sustancia cromógena en una alta concentración por el espacio reticulado añadiendo a la misma una sustancia activa reactiva con el ligando. Esto consigue una detección altamente sensible incluso para una concentración extremadamente pequeña de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse. Además, la cantidad de una señal de color no depende en gran parte de un nivel de reacción de elongación. Por tanto, el tercer aspecto de la presente invención la detección puede llevar poco tiempo. Además, el tercer aspecto de la presente invención puede eliminar la necesidad de aparatos de detección costosos, lo que conduce a una detección a bajo coste.

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona el método de detección de secuencias de ácido nucleico según el tercer aspecto, que comprende además: una tercera etapa de reacción de elongación de unir el segundo producto de reacción de elongación disociado en la segunda etapa de disociación a una tercera cadena de oligonucleótidos diseñada de manera que la tercera cadena de oligonucleótidos tenga una secuencia de ácido nucleico complementaria al segundo producto de reacción de elongación y llevar a cabo la tercera reacción de elongación usando la tercera cadena de oligonucleótidos como cebador y el segundo producto de reacción de elongación como molde; una tercera etapa de disociación de disociar, del segundo producto de reacción de elongación, el tercer producto de reacción de elongación extendido en la tercera etapa de reacción de elongación; una tercera etapa de entrecruzamiento de unir una primera cadena de oligonucleótidos diferente de la primera cadena de oligonucleótidos al tercer producto de reacción de elongación disociado para formar una estructura entrecruzada entre las cadenas de oligonucleótidos tercera y primera; y una etapa de entrecruzamiento repetitivo de repetir las etapas de entrecruzamiento primera, segunda y tercera entre una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera, segunda y tercera.

El cuarto aspecto usa tres cadenas de oligonucleótidos. Puede formarse un espacio reticulado usando productos de reacción de elongación disociados uno tras otro repitiendo reacciones de unión→elongación→disociación. Por tanto, el cuarto aspecto de la presente invención consigue una detección altamente sensible incluso para una concentración más pequeña de una secuencia de ácido nucleico diana. Además, si la primera cadena de oligonucleótidos no se une a la secuencia de ácido nucleico diana, la reacción puede continuar mediante la unión de la tercera cadena de oligonucleótidos en su lugar. Por tanto, puede estabilizarse la sensibilidad de detección. Según el cuarto aspecto, que usa tres cadenas de oligonucleótidos, son más preferibles cuatro o más cadenas de oligonucleótidos. Por tanto, puede aumentarse el número de cadenas de oligonucleótidos diseñadas según la concentración de la secuencia de ácido nucleico diana presente en la muestra (es decir, cuando la secuencia de ácido nucleico diana presente en la muestra tiene una concentración pequeña), lo que conduce a una detección más altamente sensible.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona el tercer o cuarto aspecto que comprende además una etapa de hibridación de fijar la temperatura tras la etapa de entrecruzamiento repetitivo a una temperatura de hibridación para las cadenas de oligonucleótidos.

Como resultado, se unen productos de reacción de elongación no entrecruzados tras la etapa de entrecruzamiento repetitivo a las cadenas de oligonucleótidos ancladas en el sustrato mediante los extremos 5' de las mismas para formar un número mayor de estructura entrecruzadas. La pluralidad de las estructuras entrecruzadas pueden entrelazarse intrincadamente entre sí, lo que conduce a una detección más altamente sensible.

Un sexto aspecto se basa en procedimientos operacionales, mientras que el tercer aspecto interpreta la invención basándose en un mecanismo.

Un séptimo aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los aspectos primero a sexto, en los que el ligando es un elemento seleccionado del grupo que consiste en biotina, avidina, antígenos, hapteno y oligonucleótidos.

El séptimo aspecto enumera ejemplos específicos preferibles del ligando.

Un octavo aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los aspectos primero a séptimo, en los que la sustancia activa es un elemento seleccionado del grupo que consiste en receptores marcados con enzima, receptores marcados con sustancia fluorescente y sustratos.

El octavo aspecto enumera ejemplos específicos preferibles de la sustancia activa.

Un noveno aspecto de la presente invención proporciona cualquiera de los aspectos primero a octavo, en los que el sustrato tiene, en la superficie del mismo, una capa que comprende un polímero hidrófilo así como un grupo funcional reactivo con un grupo amino.

Según el noveno aspecto, esto puede suprimir una unión no específica de las cadenas de oligonucleótidos e inmovilizar firmemente las cadenas de oligonucleótidos sobre el sustrato.

Tal como se describió anteriormente, el método de detección de secuencias de ácido nucleico según la presente invención puede detectar de manera altamente sensible incluso una concentración extremadamente pequeña de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse, a bajo coste y durante poco tiempo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A a 1C son diagramas para mostrar esquemáticamente el mecanismo de una primera realización de un método de detección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención;

la figura 2 es un diagrama para mostrar esquemáticamente un espacio reticulado formado en la primera realización de la presente invención;

la figura 3 es un diagrama de flujo para mostrar procedimientos operacionales de la primera realización de la presente invención;

las figuras 4A a 4D son diagramas para mostrar esquemáticamente el mecanismo de una segunda realización de un método de detección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención;

la figura 5 es un diagrama para mostrar esquemáticamente un espacio reticulado formado en la segunda realización de la presente invención;

la figura 6 es un diagrama de flujo para mostrar procedimientos operacionales de la segunda realización de la presente invención;

las figuras 7A a 7C son diagramas para ilustrar imágenes de color derivadas de la coloración en un sustrato en el ejemplo;

la figura 8 es una tabla para mostrar una razón S/R promedio de los resultados de la digitalización de imágenes de color en el ejemplo 1; y

la figura 9 es un gráfico para mostrar los resultados en el ejemplo 2.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

A continuación en el presente documento, realizaciones preferidas de un método de detección de secuencias de ácido nucleico según la presente invención se describirán en detalle según los dibujos adjuntos.

[Primera realización de la presente invención]

Las figuras 1A a 1C son diagramas para mostrar esquemáticamente el mecanismo de una primera realización de un método de detección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención.

En los diagramas, A, C, G y T representan bases que constituyen secuencias de ácido nucleico (es decir, A: adenina, C: citosina, G: guanina y T: timina).

La primera realización del método de detección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención comprende principalmente etapas de diseño, inmovilización, entrecruzamiento, formación de espacio reticulado, captura, coloración y detección.

5 Se diseñan de antemano las secuencias de ácido nucleico de un par de cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 de manera que se entrecruce una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN diana) 10 que va a detectarse en una muestra con las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 (etapa de diseño). En este contexto, la secuencia de ácido nucleico diana 10 que va a entrecruzarse se refiere a una secuencia de ácido nucleico desnaturalizada por calor en cadenas sencillas a partir de una cadena doble.

10 Específicamente, se examina de antemano la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico diana 10 que va a detectarse, por ejemplo, en Internet, a partir de información almacenada en bancos de datos de ADN. Se diseñan las secuencias de ácido nucleico de un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 de modo que dos sitios en la secuencia de ácido nucleico se unan de manera respectivamente complementaria a un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14.

15 La cadena de oligonucleótidos 12 mostrada en el lado izquierdo de la figura 1A tiene una secuencia de ácido nucleico 3'-TAGGCA-5' que comienza desde el lado del sustrato 16, que está diseñada para que sea complementaria a una parte de secuencia 5'-ATCCGT-3' en un extremo de la secuencia de ácido nucleico diana 10. Alternativamente, la cadena de oligonucleótidos 14 mostrada en el lado derecho de la figura 1A tiene una secuencia de ácido nucleico 5'-TCTGTC-3' que comienza desde el lado del sustrato 16, que está diseñada para que sea complementaria a una parte de secuencia 3'-AGACAG-5' en el otro extremo de la secuencia de ácido nucleico diana 10. Específicamente, se asignan respectivamente secuencias de ácido nucleico respectivamente complementarias a dos sitios en la secuencia de ácido nucleico diana 10 a un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14. Las cadenas de oligonucleótidos diseñadas 12 y 14 tienen preferiblemente de 6 a 30 bases de longitud.

20 Para diseñar las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14, se seleccionan secuencias de ácido nucleico específicas para la secuencia de ácido nucleico diana 10 para las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 para impedir que un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 se unan a secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN animal, vegetal o humano) diferentes de la secuencia de ácido nucleico diana 10 contenida en la muestra.

25 Un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 pueden tener secuencias de ácido nucleico iguales o pueden tener secuencias de ácido nucleico diferentes. Dos sitios en la secuencia de ácido nucleico diana 10 apareados respectivamente con las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 deben estar distantes entre sí de manera que la secuencia de ácido nucleico diana 10 pueda formar un entrecruzamiento con un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14. Sin embargo, estos dos sitios no tienen que ubicarse en ambos extremos de la secuencia de ácido nucleico diana 10.

30 A continuación, tal como se muestra en la figura 1A, se anclan un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 sobre el sustrato 16 inmovilizando uno de los extremos 5' y 3' de las mismas sobre el sustrato 16 (etapa de inmovilización). La figura 1A muestra sólo un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14. En realidad, se anclan múltiples conjuntos del par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 en el sustrato 16. En este contexto, los múltiples conjuntos del par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 no significan que las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 sean de manera cuantitativa completamente iguales entre sí.

35 Se coloca (se añade gota a gota) la muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana 10 sobre el sustrato 16 así preparado para llevar a cabo las etapas de entrecruzamiento a detección. Específicamente, tal como se muestra en la figura 1B, un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 se unen a sus respectivas partes complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana 10 para formar una estructura entrecruzada 18.

40 En esta etapa de entrecruzamiento, las secuencias de ácido nucleico diferentes de la secuencia de ácido nucleico diana 10 contenida en la muestra ni tienen una relación complementaria con un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 ni forman la estructura entrecruzada 18.

45 Se lleva a cabo la etapa de entrecruzamiento en múltiples conjuntos de este par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 para formar, tal como se muestra en la figura 2, un espacio finamente reticulado 20 en el sustrato 16, en la que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas 18 se entrelazan intrincadamente entre sí (etapa de formación de espacio reticulado). Para facilitar el entendimiento, la figura 2 muestra un diagrama simplificado del espacio reticulado 20. En realidad, las estructuras entrecruzadas 18 se entrelazan intrincadamente entre sí para formar un espacio reticulado de alta densidad 20. La formación del espacio reticulado 20 presumiblemente puede confirmarse directamente, por ejemplo, usando un microscopio electrónico. Alternativamente, también pueden diseñarse un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 de manera que sus secuencias de ácido nucleico tengan una pequeña complementariedad con la secuencia de ácido nucleico diana 10. Como resultado, se obtiene una pequeña señal de color en la etapa de coloración, y no se obtiene ninguna señal de color eliminando una cualquiera de las cadenas de oligonucleótidos. Por tanto, puede confirmarse indirectamente la formación del espacio reticulado 20.

50 Tal como se muestra en la figura 1C, pueden capturarse una pluralidad de ligandos 22 como un constituyente de una sustancia cromógena por este espacio reticulado 20 a través de adsorción física (etapa de

captura). Para facilitar la comprensión, la figura 1C muestra una estructura entrecruzada 18. En realidad, se capturan los ligandos 22 a través de adsorción física por el espacio reticulado 20 en el que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas 18 se entrelazan intrincadamente entre sí, tal como se muestra en la figura 2. En este contexto, la adsorción física se basa en el fenómeno en el que se atrapan fácilmente pequeños compuestos químicos en pequeños agujeros. Por tanto, la adsorción física, a diferencia de la unión específica entre compuestos químicos particulares, significa una acción no específica.

Por tanto, se hace que una pluralidad de los ligandos capturados 22 se colorean con las sustancias activas reactivas con el ligando 22 (no mostradas) como otro constituyente de la sustancia cromógena (etapa de coloración). Puede llevarse a cabo una detección altamente sensible detectando una señal de color derivada de la coloración. La señal de color puede detectarse convenientemente no sólo usando aparatos generales tales como un detector de absorbancia o escáner de imágenes sino mediante observación visual a través de la visualización con los colorantes de tinción.

El ligando 22 que puede usarse preferiblemente es un elemento seleccionado del grupo que consiste en biotina, avidina, antígenos, hapteno y oligonucleótidos. La sustancia activa que puede usarse preferiblemente es un elemento seleccionado del grupo que consiste en receptores marcados con enzima, receptores marcados con sustancia fluorescente y sustratos.

La etapa de coloración se describirá tomando, como ejemplo, biotina usada como ligando y avidina marcada con fosfatasa alcalina usada como sustancia activa reactiva con el ligando. La biotina reacciona con la avidina (reacción de biotina-avidina) para formar específicamente un enlace fuerte. Por tanto, se captura biotina por el espacio reticulado 20 y se hace reaccionar con avidina marcada con fosfatasa alcalina para unir múltiples marcadores de fosfatasa alcalina (AP) a la biotina. La avidina y la biotina se unen en una razón de 1:4. Entonces, la fosfatasa alcalina reacciona con un sustrato BCIP/NBT (reacción de BCIP/NBT) para producir un color púrpura azulado, que a su vez se detecta.

BCIP: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo

NBT: azul de nitrotetrazolio

Por tanto, como en la presente invención, se captura biotina como el ligando 22 en una gran cantidad por el espacio reticulado 20 para amplificar la reacción de biotina-avidina y la reacción de BCIP/NBT frente a la fosfatasa alcalina, formando de ese modo una señal de color fuerte.

En otro método, puede usarse digoxigenina (DIG), un glicósido cardíaco obtenido de la planta medicinal digitalis, en lugar de biotina. En este caso, la digoxigenina reacciona de manera inmunitaria con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina puede producir un color púrpura azulado usando BCIP/NBT, como en la biotina, lo que conduce a una detección altamente sensible.

Preferiblemente, el sustrato 16 usado en las realizaciones de la presente invención tiene, en la superficie del mismo, una capa que comprende un polímero hidrófilo así como un grupo funcional reactivo con un grupo amino. La capa que comprende un polímero hidrófilo desempeña un papel principalmente en la supresión de la unión no específica de las cadenas de oligonucleótidos. El grupo funcional reactivo con un grupo amino desempeña un papel en la inmovilización química de las cadenas de oligonucleótidos sobre el sustrato. Particularmente, las cadenas de oligonucleótidos se inmovilizan firmemente en la superficie del sustrato 16 a través de enlaces covalentes en el grupo funcional reactivo con un grupo amino.

Ejemplos del polímero hidrófilo usado en la presente realización incluyen sustancias poliméricas que tienen un grupo hidrófilo en la cadena principal o lateral. Son preferibles las que contienen en la estructura cualquiera de poli(óxido de alquileno), poli(óxido de etileno), poli(óxido de propileno), poliacrilamida y copolímeros de los mismos. Particularmente, es preferible un gel de poliacrilamida, que tiene una estructura reticulada en la que la poliacrilamida se fotoentrecruza tridimensionalmente con un compuesto de fotoentrecruzamiento o similares.

Ejemplos del grupo funcional reactivo con un grupo amino usado en la presente realización incluyen grupos aldehído y éster activo. Es preferible el grupo éster activo. El grupo éster activo es ácido carboxílico que tiene un grupo carboxilo activado y es ácido carboxílico que tiene un grupo saliente por medio de C=O. Ejemplos del derivado de ácido carboxílico activado incluyen compuestos obtenidos convirtiendo un grupo carboxilo de ácido carboxílico tal como ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido crotónico, ácido maleico o ácido fumárico en anhídrido de ácido, haluro de ácido, éster activo o amida activada. Por ejemplo, el grupo éster activo es preferiblemente un grupo éster de p-nitrofenilo, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de succinimida, éster de ftalimida o éster de 5-norborneno-2,3-dicarboxiimida, más preferiblemente un grupo éster de p-nitrofenilo o éster de N-hidroxisuccinimida.

El grupo funcional reactivo con un grupo amino puede introducirse directamente en la superficie del sustrato o puede llevarlo la cadena principal o lateral de la estructura de polímero hidrófilo.

(Procedimientos operacionales para llevar a cabo el método de detección de la primera realización)

A continuación, se describirán los flujos de procedimientos operacionales para llevar a cabo el método de detección de la primera realización con referencia al diagrama de flujo de la figura 3 tomando, como ejemplo, un

sustrato 16 que tiene, en la superficie del mismo, una capa que comprende un polímero hidrófilo así como un grupo funcional reactivo con un grupo amino.

En una etapa 1, se diseñan un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 respectivamente complementarias a dos sitios en la secuencia de ácido nucleico diana 10, tal como se describió anteriormente, de manera que se entrecruce la secuencia de ácido nucleico diana 10 entre un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14.

A continuación, en una etapa 2, se inmovilizan un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 sobre el sustrato 16. Para la inmovilización, se inmovilizan las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 en la superficie del sustrato 16 uniendo covalentemente las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 a través de una reacción con al menos algunos de los grupos funcionales reactivos con un grupo amino que están presentes en la superficie del sustrato 16 o están contenidos en el polímero hidrófilo. Posteriormente, se inactivan grupos funcionales reactivos con un grupo amino diferentes de los unidos covalentemente con las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 en la superficie del sustrato 16. Específicamente, pueden anclarse las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 en la superficie del sustrato 16 inactivando los grupos funcionales restantes reactivos con un grupo amino. Para eliminar cadenas de oligonucleótidos no inmovilizadas 12 y 14 en la superficie del sustrato 16, puede lavarse el sustrato 16 con agua pura o una disolución tampón. Tras el lavado, se inactivan los grupos funcionales reactivos con un grupo amino diferentes de los unidos covalentemente con las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 en la superficie del sustrato 16 mediante tratamiento con un compuesto alcalino o con un compuesto que tiene un grupo amino primario.

En una etapa 3, se mezcla la muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana 10 con los ligandos 22 (por ejemplo, biotina) como un constituyente de una sustancia cromógena para preparar una disolución de mezcla.

A continuación, en una etapa 4, se determina si la secuencia de ácido nucleico diana es monocatenaria o bicatenaria. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana es bicatenaria (en la figura 3, "NO"), en una etapa 5, se aumenta la temperatura de un sistema de reacción al que se ha añadido la muestra hasta la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) o superior de la secuencia de ácido nucleico diana 10, por ejemplo, de 90 a 95°C. El tiempo de calentamiento es preferiblemente de aproximadamente 1 a 10 minutos. Esto disocia la secuencia de ácido nucleico diana bicatenaria 10 en cadenas sencillas de la secuencia de ácido nucleico diana 10. Incluso la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria 10 también se desnaturaliza por calor, por ejemplo, cuando tiene una estructura secundaria complicada. En la etapa 4, cuando se determina que la secuencia de ácido nucleico diana es monocatenaria (en la figura 3, "SÍ"), el procedimiento continúa a una etapa 6.

En la etapa 6, se ajustan el sustrato 16 y la disolución de mezcla que contiene la muestra y los ligandos hasta una temperatura de hibridación, y se añade (gota a gota) la disolución de mezcla al sustrato. La temperatura de hibridación es preferiblemente un valor de 2 a 8°C inferior a las temperaturas de fusión (T<sub>f</sub>) de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14.

En una etapa 7, se lleva a cabo la reacción de hibridación a una temperatura de 2 a 8°C inferior a las temperaturas de fusión (T<sub>f</sub>) de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14. El tiempo de reacción es preferiblemente 60 minutos o mayor. Esto une de manera complementaria un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 así diseñadas a sus respectivas partes complementarias (dos sitios) de la secuencia de ácido nucleico diana 10 para formar una estructura entrecruzada 18. Se forman una pluralidad de las estructuras entrecruzadas 18 y se entrelazan intrínsecamente entre sí para formar un espacio reticulado 20. Entonces, los ligandos añadidos 22 pueden captarse por este espacio reticulado 20 a través de adsorción física, capturando de ese modo una pluralidad de los ligandos 22.

A continuación, en una etapa 8, se desecha la disolución de reacción en el sustrato 16, y se lava el sustrato 16 con una disolución de lavado, por ejemplo, una disolución de SDS al 0,1% en peso.

A continuación, en una etapa 9, se añaden las sustancias activas (por ejemplo, avidina marcada con fosfatasa alcalina) sobre el sustrato 16 y se unen a través de una reacción con los ligandos 22 capturados por el espacio reticulado 20. La temperatura y el tiempo de reacción son preferiblemente una temperatura de reacción de 20 a 40°C y un tiempo de reacción de 5 a 60 minutos.

En una siguiente etapa 10, se determina si se continúa adicionalmente o no la reacción en la etapa 9. Cuando la reacción es suficiente y no tiene que continuarse (en la figura 3, "NO"), el procedimiento continúa a una siguiente etapa 11. Cuando la reacción es insuficiente y tiene que continuarse (en la figura 3, "SÍ"), el procedimiento regresa a la etapa 8 para la etapa de lavado. En la etapa 9, se añaden las sustancias activas (por ejemplo, BCIP/NBT) sobre el sustrato 16 y se hacen reaccionar adicionalmente con las sustancias activas que ya se han hecho reaccionar con los ligandos 22 capturados por el espacio reticulado 20. La temperatura y el tiempo de reacción son preferiblemente una temperatura de reacción de 20 a 40°C y un tiempo de reacción de 5 a 60 minutos.

En la etapa 11, se lava de nuevo el sustrato 16. En una etapa 12, se detecta una señal de color. Por ejemplo, cuando se usan biotina y avidina marcada con fosfatasa alcalina como los ligandos 22 y las sustancias activas, respectivamente, se sumerge el sustrato 16 en un reactivo de BCIP/NBT para producir manchas con un color púrpura azulado. Pueden detectarse señales de color derivadas de las manchas mediante observación visual o

pueden capturarse para su análisis como imágenes de color en un ordenador personal usando un escáner de imágenes. Además, puede medirse el grado de coloración usando un detector de absorbancia.

Tal como se describió anteriormente, cuando la secuencia de ácido nucleico diana 10 está presente en la muestra, se forma el espacio reticulado 20, y pueden retenerse una pluralidad de los ligandos 22 como un constituyente de una sustancia cromógena en el espacio reticulado 20, produciendo de ese modo una señal de color fuerte. Esto consigue una detección altamente sensible de la secuencia de ácido nucleico diana 10, si existe alguna, en la muestra.

[Segunda realización de la presente invención]

Las figuras 4A a 4D son diagramas para mostrar esquemáticamente el mecanismo de una segunda realización de un método de detección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Se forma un espacio reticulado 20 mediante un método diferente al de la primera realización. En la descripción de abajo, se usarán los mismos números de referencia para designar los mismos componentes que los de la primera realización.

La segunda realización del método de detección de secuencias de ácido nucleico de la presente invención comprende principalmente etapas de diseño, inmovilización, primera reacción de elongación, primera disociación, primer entrecruzamiento, segunda reacción de elongación, segunda disociación, segundo entrecruzamiento, entrecruzamiento repetitivo, hibridación, formación de espacio reticulado, captura, coloración y detección.

Se diseñan de antemano las secuencias de ácido nucleico de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 de manera que los productos de reacción de elongación 28 y 36 producidos a través de la reacción de elongación formen respectivamente una estructura entrecruzada en la relación de secuencias de ácido nucleico entre una secuencia de ácido nucleico diana 19 y las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 (etapa de diseño). Específicamente, se diseñan las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 de manera que el primer producto de reacción de elongación 28 en un primer dúplex 30, formado a través de la primera reacción de elongación usando la primera cadena de oligonucleótidos 24 como cebador y la secuencia de ácido nucleico diana 19 como molde tras la unión complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana 19 y la primera cadena de oligonucleótidos 24, puede disociarse de la secuencia de ácido nucleico diana 19 y unirse a la segunda cadena de oligonucleótidos 26 que tiene una secuencia de ácido nucleico complementaria al mismo. Puede obtenerse información sobre la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico diana 19 a partir de bancos de datos de ADN, como en la primera realización.

La primera cadena de oligonucleótidos 24 mostrada en el lado izquierdo de la figura 4A tiene una secuencia de ácido nucleico 5'-TAGGCA-3' partiendo del lado del sustrato 16, que está diseñada para que sea complementaria a una parte de secuencia 3'-ATCCGT-5' en un extremo de la secuencia de ácido nucleico diana 19. Alternativamente, la segunda cadena de oligonucleótidos 26 mostrada en el lado derecho de la figura 4A tiene una secuencia de ácido nucleico 5'-AGACAG-3' partiendo del lado del sustrato 16, que está diseñada para que sea complementaria a una parte de secuencia 3'-UCUGUC-5' en un extremo del primer producto de reacción de elongación 28. En este contexto, la base U (uracilo) usada en la reacción de elongación está biotinilada en los diagramas. Se usa una base T para la no biotinilación. La base U constituye originalmente ARN. Sin embargo, el U biotinilado es análogo a la base T en cuanto a estructuras químicas y por tanto puede usarse en la reacción de elongación catalizada por la ADN polimerasa.

A continuación, tal como se muestra en la figura 4A, se anclan un par de las cadenas de oligonucleótidos 24 y 26 sobre el sustrato 16 inmovilizando los extremos 5' de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 sobre el sustrato 16 (etapa de inmovilización).

La figura 4A muestra sólo cada una de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26. En realidad, se anclan una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 en el sustrato 16.

La muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana 19 se coloca (se añade gota a gota) sobre el sustrato 16 así preparado para llevar a cabo las etapas de primera reacción de elongación a detección. Específicamente, se une la primera cadena de oligonucleótidos 24 a su parte complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana 19 disociada en cadenas sencillas a través de desnaturalización por calor. Entonces, se lleva a cabo la reacción de elongación usando la secuencia de ácido nucleico diana 19 como molde y la primera cadena de oligonucleótidos 24 como cebador para formar una secuencia de ácido nucleico bicatenaria mostrada en la figura 4B, como en el método MPEX convencional (primera etapa de reacción de elongación). Sin embargo, cuando se lleva a cabo la reacción de elongación en la región de temperatura de Tf (temperatura de fusión) de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26, las regiones complementarias en el producto de reacción de elongación 28 a las cadenas de oligonucleótidos 24 y 26 pueden disociarse en cadenas sencillas en cualquier momento. Además, se inmoviliza la segunda cadena de oligonucleótidos 26 diseñada de antemano de manera que se una de manera complementaria al producto de reacción de elongación 28 en el sustrato 16. Por tanto, se disocia una parte del producto de reacción de elongación 28 de la secuencia de ácido nucleico diana 19 (primera etapa de disociación) y entonces se une a la segunda cadena de oligonucleótidos 26 para formar un estado entrecruzado (primera etapa de entrecruzamiento).

Específicamente, las regiones complementarias en el primer producto de reacción de elongación 28 extendido a través de la primera reacción de elongación a las cadenas de oligonucleótidos 24 y 26 buscan adoptar un estado estable en cuanto a estructuras moleculares en condiciones de energía inestables de la región de temperatura Tf. Por tanto, tal como se muestra en la figura 4C, el primer producto de reacción de elongación 28 se une a la segunda cadena de oligonucleótidos 26 que tiene una secuencia complementaria al mismo. La expresión "formación de puente" descrita en la figura 4C significa que la secuencia de ácido nucleico diana se entrecruza entre dos o más oligonucleótidos anclados por un extremo. En tal sentido, el entrecruzamiento de la secuencia de ácido nucleico diana 10 con un par de las cadenas de oligonucleótidos 12 y 14 en la primera realización también se incluye en la formación de puente.

En este contexto, las secuencias de ácido nucleico diferentes de la secuencia de ácido nucleico diana 19 contenida en la muestra ni tienen una relación complementaria con la primera cadena de oligonucleótidos 24 ni se unen a la primera cadena de oligonucleótidos 24 para la reacción de elongación.

Una enzima usada en la primera reacción de elongación incluye ADN polimerasa, ARN polimerasa y una mezcla de las mismas.

A continuación, la reacción de elongación mostrada en la figura 4D se produce usando la segunda cadena de oligonucleótidos 26 como cebador y el primer producto de reacción de elongación 28 como molde (segunda etapa de reacción de elongación). Por motivos de simplificación, la secuencia de ácido nucleico diana 19 no se muestra en la figura 4D. En realidad, se disocia la secuencia de ácido nucleico diana 19 de la primera cadena de oligonucleótidos 24 y se une a una primera cadena de oligonucleótidos diferente.

Una enzima usada en la segunda o posterior reacción de elongación es la ADN polimerasa. Esta ADN polimerasa puede ser ADN polimerasa pol I (por ejemplo, Taq (Takara-Bio Inc.)) y es preferiblemente  $\alpha$ -ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, KOD (TOYOBO CO., LTD.)), más preferiblemente ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena. La ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena escinde fácilmente enlaces de hidrógeno en una parte bicatenaria, si existe alguna, en ADNc o ADN molde para continuar la reacción de elongación. Ejemplos de la ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena incluyen el fragmento Klenow, ADN polimerasa phi29, ADN polimerasa BcaBEST y ADN polimerasa Bst. La temperatura de reacción es preferiblemente los valores de Tf o superior de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 e inferior a 65°C. El tiempo de reacción es preferiblemente de 20 a 90 minutos.

Una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 se inmovilizan en el sustrato 16. Por tanto, el segundo producto de reacción de elongación 36 extendido en la segunda etapa de reacción de elongación se disocia del primer producto de reacción de elongación 28 (segunda etapa de disociación) y se une a una primera cadena de oligonucleótidos 24 diferente de la primera cadena de oligonucleótidos 24 pero con la misma secuencia de ácido nucleico para formar un estado entrecruzado (segunda etapa de entrecruzamiento). En este estado, la primera cadena de oligonucleótidos 24 sirve como cebador. Por tanto, se repiten las etapas de entrecruzamiento primera y segunda entre las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26 (etapa de entrecruzamiento repetitivo). Entonces, se fija la temperatura a una temperatura de hibridación para que las cadenas de oligonucleótidos (etapa de hibridación) formen un número mayor de estructuras entrecruzadas en el sustrato 16. La temperatura de hibridación es preferiblemente una temperatura de 2 a 8°C inferior a las temperaturas de fusión (Tf) de las cadenas de oligonucleótidos 24 y 26.

Tal como se muestra en la figura 5, esto forma un espacio finamente reticulado 20 en el que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas se entrelazan entre sí (etapa de formación de espacio reticulado). Como en la primera realización, una pluralidad de ligandos 22 se capturan por el espacio reticulado 20 (etapa de captura) y se hace que se colorean con sustancias activas reactivas con los ligandos 22 (etapa de coloración). Puede llevarse a cabo una detección altamente sensible detectando una señal de color derivada de la coloración.

(Procedimientos operacionales para llevar a cabo el método de detección de la segunda realización)

A continuación, se describirán los flujos de procedimientos operacionales para llevar a cabo el método de detección de la segunda realización con referencia al diagrama de flujo de la figura 6 tomando, como ejemplo, un sustrato 16 que tiene, en la superficie del mismo, una capa que comprende un polímero hidrófilo así como un grupo funcional reactivo con un grupo amino.

En una etapa 1, se diseñan las secuencias de ácido nucleico de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26, tal como se describió anteriormente, de manera que los productos de reacción de elongación 28 y 36 producidos a través de la reacción de elongación formen respectivamente una estructura entrecruzada en la relación de secuencias de ácido nucleico entre la secuencia de ácido nucleico diana 19 y las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26.

En una etapa 2, se inmovilizan las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda diseñadas 24 y 26 sobre el sustrato 16. La inmovilización se lleva a cabo de la misma manera que en la primera realización, y se omite la descripción de la misma.

En una etapa 3, se mezcla la muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana 19 con los ligandos 22 (por ejemplo, dUTP biotinilado) como un constituyente de una sustancia cromógena para preparar una disolución de mezcla.

5 A continuación, en una etapa 4, se determina si la secuencia de ácido nucleico diana es monocatenaria o bicatenaria. Cuando la secuencia de ácido nucleico diana es bicatenaria (en la figura 6, "NO"), en una etapa 5, se aumenta la temperatura de un sistema de reacción al que se ha añadido la muestra hasta la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) o superior de la secuencia de ácido nucleico diana 19, por ejemplo, de 90 a 95°C. El tiempo de calentamiento es preferiblemente de aproximadamente 1 a 10 minutos. Esto disocia la secuencia de ácido nucleico diana bicatenaria 19 en cadenas sencillas de la secuencia de ácido nucleico diana 19. Incluso la secuencia de ácido nucleico diana monocatenaria 19 también se desnaturaliza por calor, por ejemplo, cuando tiene una estructura secundaria complicada. En la etapa 4, cuando se determina que la secuencia de ácido nucleico diana es monocatenaria (en la figura 6, "SÍ"), el procedimiento continúa a una etapa 6.

En la etapa 6, se añaden (gota a gota) la disolución de mezcla que contiene la muestra y los ligandos al sustrato.

15 A continuación, en una etapa 7, se llevan a cabo las etapas de primera reacción de elongación, primera disociación, primer entrecruzamiento, segunda reacción de elongación, segunda disociación, segundo entrecruzamiento, entrecruzamiento repetitivo, hibridación, formación de espacio reticulado y captura.

20 Específicamente, en la primera etapa de reacción de elongación, se lleva a cabo la reacción de elongación usando la secuencia de ácido nucleico diana 19 como molde y la primera cadena de oligonucleótidos 24 como cebador. En la primera etapa de disociación, se disocia el producto de reacción de elongación 28 de la secuencia de ácido nucleico diana 19. En la primera etapa de entrecruzamiento, se une el producto de reacción de elongación disociado 28 a la segunda cadena de oligonucleótidos 26 para formar un estado entrecruzado.

25 A continuación, en la segunda etapa de reacción de elongación, se lleva a cabo la reacción de elongación usando la segunda cadena de oligonucleótidos 26 como cebador y el primer producto de reacción de elongación 28 como molde. En la segunda etapa de disociación, se disocia el segundo producto de reacción de elongación 36 extendido en la segunda etapa de reacción de elongación del primer producto de reacción de elongación 28. En la segunda etapa de entrecruzamiento, se une el segundo producto de reacción de elongación disociado 36 a una primera cadena de oligonucleótidos 24 diferente de la primera cadena de oligonucleótidos 24 pero con la misma secuencia de ácido nucleico para formar un estado entrecruzado.

30 Entonces, en la etapa de entrecruzamiento repetitivo, se repiten las etapas de entrecruzamiento primera y segunda entre las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26. Entonces, en la etapa de hibridación, se fija la temperatura a una temperatura de hibridación para que las cadenas de oligonucleótidos formen un número mayor de estructuras entrecruzadas en el sustrato 16. Esto forma un espacio finamente reticulado 20 en el sustrato 16, en el que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas se entrelazan entre sí (etapa de formación de espacio reticulado).

Tras la formación del espacio reticulado 20, pueden llevarse a cabo las etapas 8 a 12 de la misma manera que en la primera realización, detectando de ese modo de manera altamente sensible la secuencia de ácido nucleico diana 19.

40 Tal como se describió anteriormente, se prepara en la etapa 3 la disolución de mezcla que contiene la secuencia de ácido nucleico diana 19 y los ligandos 22. Alternativamente, los ligandos 22 pueden añadirse en algún momento entre las etapas 6 y 7.

[Modificación de la segunda realización de la presente invención]

Se usan dos cadenas de oligonucleótidos, las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda 24 y 26, en la segunda realización de la presente invención descrita anteriormente. Alternativamente, también pueden usarse tres o más cadenas de oligonucleótidos.

5 La modificación de la segunda realización se describirá tomando tres cadenas de oligonucleótidos como ejemplo. El segundo producto de reacción de elongación 36 disociado en la segunda etapa de disociación de la segunda realización se une a una tercera cadena de oligonucleótidos diseñada de manera que tenga una secuencia de ácido nucleico complementaria al segundo producto de reacción de elongación 36. Tras la unión, se lleva a cabo la reacción de elongación de la misma manera, y se disocia el producto de reacción de elongación de la misma y se une a una primera cadena de oligonucleótidos para formar una estructura entrecruzada en el sustrato 16. Se lleva a cabo una etapa de entrecruzamiento repetitivo en estas cadenas de oligonucleótidos primera a tercera para formar un espacio finamente reticulado.

10 Por tanto, la segunda realización de la presente invención también puede aplicarse a tres o más cadenas de oligonucleótidos diseñando de antemano cadenas de oligonucleótidos complementarias a productos de reacción de elongación disociados uno tras otro.

15 Preferiblemente, el sustrato 16 usado en la segunda realización tiene, en la superficie del mismo, una capa que comprende un polímero hidrófilo así como un grupo funcional reactivo con un grupo amino. Esto es un producto de reacción de elongación disociado a través de desnaturalización por calor de un dúplex formado a través de la reacción de elongación, a una cadena de oligonucleótidos diferente para una reacción de elongación adicional.

20 [Sustrato para detección de secuencias de ácido nucleico]

En las realizaciones primera y segunda, se inmovilizan cadenas de oligonucleótidos sobre un sustrato para preparar un sustrato para detección de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse en una muestra puede detectarse de manera altamente sensible sólo colocando (añadiendo) la muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana sobre este sustrato para detección de secuencias de ácido nucleico.

[Ejemplos]

[Ejemplo 1]

30 A continuación, se describirá un método de detección de una primera realización de la presente invención con referencia al ejemplo. Una secuencia de ácido nucleico diana usada era una secuencia de ácido nucleico específica para norovirus. El método de detección de la primera realización se describirá tomando la detección de esta secuencia de ácido nucleico diana como ejemplo.

35 Específicamente, según un enfoque descrito a continuación, se inmovilizaron un par de cadenas de oligonucleótidos complementarias a la secuencia de ácido nucleico diana sobre la superficie de un sustrato de plástico, al que a su vez se añadió la secuencia de ácido nucleico diana como muestra y se unió a un par de las cadenas de oligonucleótidos en el sustrato para formar una estructura en la que la secuencia de ácido nucleico se entrecruzó con las mismas. Se formó un espacio finamente reticulado basándose en la estructura. Entonces, pudieron capturarse ligandos como un constituyente de una sustancia cromógena en una gran cantidad por el espacio reticulado a través de adsorción física. Esto consiguió una detección altamente sensible de la secuencia de ácido nucleico diana.

40 Específicamente, se usó un producto de PCR de ADNc de norovirus como la secuencia de ácido nucleico diana para los experimentos. Este producto de PCR se obtuvo mediante PCR dirigida para una región ORF2 que codifica para una proteína de la cápside, una proteína estructural del norovirus. Dado que el norovirus se divide en dos grupos, G1 y G2, se prepararon dos productos de PCR derivados de G1 y G2 para los experimentos.

(Preparación de la secuencia de ácido nucleico diana)

45 Se disolvieron heces en una disolución de tampón fosfato para preparar una emulsión al 10%. Tras centrifugación con enfriamiento a 12.000 rpm, se extrajo ARN del sobrenadante de centrifugación. Se calentó el sobrenadante de centrifugación hasta temperatura ambiente, y se extrajo ARN y se purificó del mismo usando un kit de extracción/purificación de ARN (QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)). Entonces, a 24  $\mu$ l de los extractos de ARN, se le añadieron 3  $\mu$ l de un tampón para RT-PCR concentrado 5 veces, 1  $\mu$ l de agua esterilizada y 2  $\mu$ l de ADNasa (ADNasa I (Takara Bio Inc.); 1 U/ $\mu$ l), y se hizo reaccionar la mezcla a 37°C durante 30 minutos y a 75°C durante 5 minutos y entonces se enfrió en hielo. El ARN obtenido se sometió a transcripción inversa (42°C durante 1 hora (1 ciclo), 99°C durante 5 minutos (1 ciclo) y 4°C) para dar ADNc usando cebadores aleatorios (Random Primer Hexamer (Amersham Pharmacia)) y un kit de reacción de RT (SuperScript II Reverse Transcriptase RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen)). Se llevó a cabo la reacción de PCR (94°C durante 3 minutos (1 ciclo); 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos (40 ciclos); y 72°C durante 15 minutos (1 ciclo)) usando este ADNc como molde, cebadores 1 (25  $\mu$ M), 2 (25  $\mu$ M), 3 (25  $\mu$ M) y 4 (25  $\mu$ M) y ADN polimerasa (ExTaq

(Takara Bio Inc.)) para preparar por separado productos de PCR de G1 y G2, que a su vez se sometieron a electroforesis para la confirmación de la amplificación, entonces se purificaron y se usaron como secuencias de ácido nucleico diana.

(Sustrato de plástico usado)

5 Se usó un sustrato de plástico para matriz de ADN disponible comercialmente (S-BIO<sup>(R)</sup> PrimeSurface<sup>(R)</sup> fabricado por SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) en los experimentos. Este sustrato es un sustrato de plástico que tiene, en la superficie del mismo, una capa que comprende un polímero hidrófilo así como un grupo funcional reactivo con un grupo amino, que se describe en las realizaciones. Tal como se muestra en las figuras 7A a 7C, el sustrato tiene un total de 24 regiones de colocación que incluyen 4 columnas (1 a 4) x 6 filas (A a F). La presencia o ausencia de cada secuencia de ácido nucleico se evaluó en cada región de colocación. En el presente experimento, se preparó el sustrato de plástico de manera que se usaron 12 regiones de colocación y 12 regiones de colocación para la detección de los productos de PCR de G1 y G2, respectivamente.

(Inmovilización de las cadenas de oligonucleótidos)

15 Para la detección del producto de PCR de G1, se sintetizaron un par de cadenas de oligonucleótidos 1 y 2 que comprendían secuencias de ácido nucleico mostradas más adelante. Las cadenas de oligonucleótidos 1 y 2, respectivamente, tenían una secuencia complementaria al producto de PCR de G1. La cadena de oligonucleótidos 1 es una cadena de nucleótidos de 20 bases modificada en el extremo 5' con un grupo amino. Se disolvió esta cadena de oligonucleótidos 1 en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

20 Por otro lado, la cadena de oligonucleótidos 2 es una cadena de nucleótidos de 20 bases modificada en el extremo 3' con un grupo amino. Se disolvió esta cadena de oligonucleótidos 2 en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

25 Entonces, se mezcló la disolución de la cadena de oligonucleótidos 1 con la disolución de la cadena de oligonucleótidos 2, y se colocó la mezcla sobre la superficie de cada sustrato de plástico usando un dosificador (aparato Marks-I fabricado por Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) y un pasador de corte cruzado de 100  $\mu$ m de diámetro. Específicamente, se colocó la disolución sobre 12 regiones de colocación (regiones de colocación 1 a 12) que incluían columnas 1 a 4 x filas A a C en el sustrato de plástico mostrado en la figura 7C. Entonces, se calentó cada sustrato que comprendía las cadenas de oligonucleótidos colocadas en los mismos a 80°C durante 1 hora para inmovilizar cada cadena de oligonucleótidos sobre los mismos.

30 Para la detección del producto de PCR de G2, se sintetizaron cadenas de oligonucleótidos 3 y 4 que comprendían secuencias de ácido nucleico mostradas más adelante. Las cadenas de oligonucleótidos 3 y 4, respectivamente, tenían una secuencia complementaria al producto de PCR de G2. La cadena de oligonucleótidos 3 es una cadena de nucleótidos de 20 bases modificada en el extremo 5' con un grupo amino. Se disolvió esta cadena de oligonucleótidos 3 en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

35 Por otro lado, la cadena de oligonucleótidos 4 es una cadena de nucleótidos de 23 bases modificada en el extremo 3' con un grupo amino. Se disolvió esta cadena de oligonucleótidos 4 en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

40 Entonces, se mezcló la disolución de la cadena de oligonucleótidos 3 con la disolución de la cadena de oligonucleótidos 4, y se colocó la mezcla sobre la superficie de cada sustrato de plástico usando un dosificador (aparato Marks-I fabricado por Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) y un pasador de corte cruzado de 100  $\mu$ m de diámetro. Específicamente, se colocó la disolución sobre 12 regiones de colocación (regiones de colocación 13 a 24) que incluían columnas 1 a 4 x filas D a F en el sustrato de plástico mostrado en la figura 7B. Entonces, se calentó cada sustrato que comprendía las cadenas de oligonucleótidos colocadas en los mismos a 80°C durante 1 hora para inmovilizar cada cadena de oligonucleótidos sobre los mismos.

45 Las secuencias de ácido nucleico de los cebadores 1 a 4 usados para preparar los productos de PCR de G1 y G2 así como las secuencias de ácido nucleico de las cadenas de oligonucleótidos 1 a 4 inmovilizadas en los sustratos de plástico se muestran a continuación.

- Cebador 1 (COG1F): **5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'**
- 50 • Cebador 2 (G1-SKR): **5'-CCAACCCARCCATTRTACA-3'**
- Cebador 3 (COG2F): **5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'**
- Cebador 4 (G2-SKR): **5'-CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT-3'**
- Cadena de oligonucleótidos 1 (G1SKF):

**5'-CTGCCCGAATTYGTAATGA-3'**

- Cadena de oligonucleótidos 2 (G1-1'):

**5'-CCAACAAACATGGATGGCAC-3'**

- Cadena de oligonucleótidos 3 (RING2AL-TP):

5 **5'-TGGGAGGGSGATCGCRATCT-3'**

- Cadena de oligonucleótidos 4 (G2SKRrc):

**5'-ATGTAYAA YGGDYATGCNNGGYGG-3'**

Códigos IUB (Código de la Unión Internacional de Bioquímica). R=A o G; B=C, G o T; Y=C o T; D=A, G o T; K=G o T; H=A, C o T; M=A o C; V=A, C o G; S=G o C; W=A o T; N=cualquier base.

10 (Hibridación)

Se mezclaron 59 µl de la secuencia de ácido nucleico diana preparada, 13 µl de un tampón de hibridación y 8 µl de biotina para preparar una disolución de mezcla, que a su vez se añadió al sustrato de plástico que comprendía los pares de las cadenas de oligonucleótidos (un par de las cadenas de oligonucleótidos 1 y 2 y un par de las cadenas de oligonucleótidos 3 y 4) inmovilizadas así en el mismo.

15 El sustrato mostrado en la figura 7A indica que se añadió una muestra libre de secuencia de ácido nucleico diana al sustrato que comprendía las cadenas de oligonucleótidos inmovilizadas así en el mismo.

Entonces se calentó un sistema de reacción en cada sustrato en condiciones que implicaban 95°C durante 8 minutos, disociando de ese modo la secuencia de ácido nucleico diana bicatenaria en cadenas sencillas a través de desnaturalización por calor. El sistema de reacción se sometió adicionalmente a hibridación a 54°C durante 90 minutos.

20 A continuación, tras lavado, se añadió estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina 0,01 mg/ml sobre el sustrato. Se cubrió el sustrato con un cubreobjetos, y se hizo reaccionar el sistema de reacción a 37°C durante 30 minutos. Entonces, se lavó el sustrato y se sumergió en un reactivo de coloración BCIP/NBT (sustrato para fosfatasa BCIP/NBT (sistema de 1 componente) (KPL)). Se hizo reaccionar el sistema de reacción a 37°C durante 30 minutos, y se lavó el sustrato para producir manchas con un color púrpura azulado. Se capturaron señales de color como imágenes de color en un ordenador personal usando un escáner de imágenes (aparato PIXUS MP470 fabricado por Canon Inc.). Se digitalizó la intensidad de color usando un software de análisis de imágenes (software de análisis de matrices de ADN Daredemo fabricado por SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.). Las imágenes de color se muestran en las figuras 7A a 7C. Además, se determinó una razón S/R promedio (razón de señal con respecto a ruido) de los resultados de la digitalización según la fórmula 1 a continuación y se muestra en la tabla 1 de la figura 8.

30 razón S/R =  $1 \times S/(S+R)$ ...Fórmula 1

S/R: razón de intensidad de color medida con respecto a intensidad de ruido de fondo: 1,0 como máximo

S: intensidad de señal de color medida

R: intensidad de ruido de fondo

35 Como resultado, cuando se usó el producto de PCR de G1 como secuencia de ácido nucleico diana, sólo las regiones de colocación 1 a 12 produjeron un color, tal como puede observarse de la figura 7C. Por otro lado, cuando se usó el producto de PCR de G2 como secuencia de ácido nucleico diana, sólo las regiones de colocación 13 a 24 produjeron un color, tal como puede observarse de la figura 7B.

40 Cuando se usó la muestra libre de producto de PCR (secuencia de ácido nucleico diana) como control, ni la inmovilización de las cadenas de oligonucleótidos 1 y 2 ni la inmovilización de las cadenas de oligonucleótidos 3 y 4 produjeron un color, tal como puede observarse de la figura 7A.

45 Se prepararon dieciocho sustratos de plástico para matriz de ADN (no mostrados), cada uno de los cuales comprendía manchas que comprendían sólo la cadena de oligonucleótidos 1 (regiones de colocación 1 a 6) y sólo la cadena de oligonucleótidos 2 (regiones de colocación 7 a 12) inmovilizadas en el mismo para la detección del producto de PCR de G1 así como manchas que comprendían sólo la cadena de oligonucleótidos 3 (regiones de colocación 13 a 18) y sólo la cadena de oligonucleótidos 4 (regiones de colocación 19 a 24) inmovilizadas en el mismo para la detección del producto de PCR de G2. Entonces, se hibridaron los productos de PCR de G1 y G2 con 6 sustratos cada uno mediante el método descrito anteriormente. Al mismo tiempo, se añadió biotina sobre cada sustrato. Tras lavado, se añadió avidina marcada con fosfatasa alcalina sobre el sustrato. Se cubrió el sustrato con un cubreobjetos y se dejó a 37°C durante 30 minutos. Entonces, se lavó el sustrato y se sumergió en un reactivo de coloración BCIP/NBT. Se hizo reaccionar el sistema de reacción a 37°C durante 30 minutos, y se lavó el sustrato para producir manchas con un color púrpura azulado.

50

Se capturaron señales de color como imágenes de color en un ordenador personal usando un escáner de imágenes (aparato PIXUS MP470 fabricado por Canon Inc.). Se digitalizó la intensidad de color usando un software de análisis de imágenes (software de análisis de matrices de ADN Daredemo fabricado por SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.).

5 Como resultado, se confirmó que ninguna de las regiones de colocación 1 a 24 produjo color. Los 6 sustratos de plástico para matriz de ADN libres de producto de PCR como control tampoco produjeron color.

10 La razón S/R de un valor promedio de las intensidades de señal de color (S) del producto de PCR de G1 mostradas en las regiones de colocación 1 a 12 en la figura 7C con respecto a un valor promedio de las intensidades de ruido de fondo (R) en la figura 7A era de 0,97, tal como puede observarse de la tabla 1 de la figura 8. Por tanto, se consiguió una detección extremadamente sensible.

Asimismo, la razón S/R de un valor promedio de las intensidades de señal de color (S) del producto de PCR de G2 mostradas en las regiones de colocación 13 a 24 en la figura 7B con respecto a un valor promedio de las intensidades de ruido de fondo (R) en la figura 7A era de 0,98. Por tanto, se consiguió una detección extremadamente sensible.

15 [Ejemplo 2]

A continuación, se describirá un método de detección de una segunda realización de la presente invención con referencia al ejemplo. Se usó una secuencia de ácido nucleico específica para norovirus como secuencia de ácido nucleico diana, tal como en el ejemplo 1. El método de detección de la segunda realización se describirá tomando como ejemplo la detección de esta secuencia de ácido nucleico diana.

20 Específicamente, según un enfoque descrito a continuación, se une de manera complementaria una primera cadena de oligonucleótidos inmovilizada en la superficie de un sustrato a la secuencia de ácido nucleico diana. Entonces, se lleva a cabo la reacción de elongación usando la primera cadena de oligonucleótidos como cebador y la secuencia de ácido nucleico diana como molde. El producto de reacción de elongación que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana se disocia de la misma a través de la reacción disociación.

25 Entonces, se une de manera complementaria el primer producto de reacción de elongación disociado a una segunda cadena de oligonucleótidos también inmovilizada en la superficie del sustrato. Entonces, se lleva a cabo la reacción de elongación usando la segunda cadena de oligonucleótidos como cebador y el primer producto de reacción de elongación como molde. El producto de reacción de elongación que tiene una secuencia complementaria al primer producto de reacción de elongación se disocia de la misma a través de la reacción disociación.

30 Se formó un espacio finamente reticulado en el sustrato repitiendo estos procedimientos. Se capturaron ligandos por el espacio reticulado a través de adsorción física. Se detectó la secuencia de ácido nucleico diana usando sustancias activas reactivas con los ligandos.

35 (Preparación de la secuencia de ácido nucleico diana)

Se prepararon por separado y se purificaron los productos de PCR de G1 y G2 de ADNc de norovirus mostrados en el ejemplo 1. Entonces, se ajustaron sus concentraciones a 0,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  copias/ $\mu$ l. y se usaron los productos de PCR de G1 y G2 como secuencias de ácido nucleico diana en los experimentos. Se realizó la evaluación usando una muestra complementada con agua esterilizada como referencia.

40 (Sustrato de plástico)

Se ancló cada cadena de oligonucleótidos por un extremo en la superficie de un sustrato compatible con MPEX (extensión con múltiples cebadores) del sustrato de plástico (S-BIO<sup>(R)</sup> PrimeSurface<sup>(R)</sup> fabricado por SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.) mostrado en el ejemplo 1, y se usó el sustrato preparado en los experimentos.

45 El método MPEX (K. Kinoshita *et al.*, Multiple primer extension by DNA polymerase on a novel plastic DNA array coated with a biocompatible polymer, Nucleic Acid Research, vol. 35, n.º 1, 2007, págs. e3, y solicitudes de patentes japonesas abiertas a consulta por el público n.ºs 2006-174788 y 2007-222010) se describe en la descripción de la técnica relacionada. Para control en el presente ejemplo 2, se detectó la secuencia de ácido nucleico diana mediante el método MPEX usando sólo un tipo de cadena de oligonucleótidos inmovilizada en el sustrato, en el que un producto de reacción de elongación no forma una estructura entrecruzada. Se realizó la evaluación usando una muestra complementada con agua esterilizada como referencia.

50 (Inmovilización de las cadenas de oligonucleótidos)

(Inmovilización de las cadenas de oligonucleótidos)

En el ejemplo 2, para la detección del producto de PCR de G1, se sintetizaron las cadenas de oligonucleótidos 5 y 6 mostradas más adelante. La cadena de oligonucleótidos 5 tenía una secuencia complementaria al producto de PCR de G1. La cadena de oligonucleótidos 5 es una cadena de nucleótidos de 20

bases modificada en el extremo 5' con un grupo amino. Se disolvió esta cadena de oligonucleótidos 5 en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

5 Por otro lado, la cadena de oligonucleótidos 6 es una cadena de nucleótidos de 19 bases también modificada en el extremo 5' con un grupo amino. Esta cadena de oligonucleótidos 6 se disolvió en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

10 En el ejemplo 2, se mezclaron estas disoluciones de las cadenas de oligonucleótidos 5 y 6, y se colocó la mezcla sobre la superficie de cada sustrato de plástico (regiones de colocación 1 a 4) usando un dosificador (aparato Marks-I fabricado por Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) y un pasador de corte cruzado de 100  $\mu$ m de diámetro. Los sustratos (no mostrados) usados en el ejemplo 2 se prepararon de manera similar como en los mostrados en las figuras 7A a 7C.

Por otro lado, se colocó sólo una de las cadenas de oligonucleótidos 5 y 6 (1  $\mu$ M) sobre las regiones de colocación en los sustratos (regiones de colocación 5 a 8 y 9 a 12, respectivamente) para el experimento control.

Entonces, se calentó cada uno de los sustratos del ejemplo 2 y el sustrato control a 80°C durante 1 hora para inmovilizar cada cadena de oligonucleótidos sobre los mismos.

15 En el ejemplo 2, para la detección del producto de PCR de G2, se sintetizaron las cadenas de oligonucleótidos 7 y 8. La cadena de oligonucleótidos 7 tenía una secuencia complementaria al producto de PCR de G2. La cadena de oligonucleótidos 7 es una cadena de nucleótidos de 26 bases modificada en el extremo 5' con un grupo amino. Se disolvió esta cadena de oligonucleótidos 7 en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

20 Por otro lado, la cadena de oligonucleótidos 8 es una cadena de nucleótidos de 20 bases también modificada en el extremo 5' con un grupo amino. Se disolvió esta cadena de oligonucleótidos 8 en un tampón carbonato 0,25 M (pH 9,0) para preparar una disolución de oligonucleótidos 1  $\mu$ M.

25 En el ejemplo 2, se mezclaron estas disoluciones de las cadenas de oligonucleótidos 7 y 8, y se colocó la mezcla sobre la superficie de cada sustrato de plástico (regiones de colocación 13 a 16) usando un dosificador (aparato Marks-I fabricado por Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) y un pasador de corte cruzado de 100  $\mu$ m de diámetro.

Por otro lado, se colocó sólo una de las cadenas de oligonucleótidos 7 y 8 (1  $\mu$ M) sobre las regiones de colocación en los sustratos (regiones de colocación 17 a 20 y 21 a 24, respectivamente) para el experimento control.

30 Entonces, se calentó cada uno de los sustratos del ejemplo 2 y el sustrato control a 80°C durante 1 hora para inmovilizar cada cadena de oligonucleótidos sobre los mismos.

Las secuencias de ácido nucleico de las cadenas de oligonucleótidos 5 a 8 inmovilizadas en los sustratos de plástico se muestran a continuación.

- Cadena de oligonucleótidos 5 (RING1-TP(a)):

**5'-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-3'**

- 35
- Cadena de oligonucleótidos 6 (G1SKR):

**5'-CCAACCCARCCATTRTACA-3'**

- Cadena de oligonucleótidos 7 (COG2F):

**5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'**

- Cadena de oligonucleótidos 8 (RING2AL-TP rc):

40 **5'-AGATYGCGATCWCCTCCCA-3'**

Códigos IUB (Código de la Unión Internacional de Bioquímica). R=A o G; B=C, G o T; Y=C o T; D=A, G o T; K=G o T; H=A, C o T; M=A o C; V=A, C o G; S=G o C; W=A o T; N=cualquier base.

45 Entonces, se mezclaron 59  $\mu$ l de la secuencia de ácido nucleico diana, 8,0  $\mu$ l de tampón A para MPEX 10x, 8,0  $\mu$ l de tampón para KOD-Plus 10x (TOYOBO CO., LTD.), 0,80  $\mu$ l de dUTP biotilado 0,1 mM, 0,8  $\mu$ l de dATP 0,1 mM, 0,8  $\mu$ l de dCTP 0,1 mM, 0,8  $\mu$ l de dGTP 0,1 mM y 2  $\mu$ l de KOD-Plus (TOYOBO CO., LTD.) para preparar una disolución de mezcla, que a su vez se añadió sobre cada sustrato del ejemplo 2. Se calentó un sistema de reacción en el sustrato a 95°C durante 8 minutos, disociando de ese modo la secuencia de ácido nucleico bicatenaria en cadenas sencillas a través de desnaturalización por calor.

A continuación, se cubrió el sustrato con un cubreobjetos y se puso en un envase herméticamente sellado (10 cm x 15 cm x 3 cm) que tenía el interior humedecido con 200  $\mu$ l de un tampón fosfato 0,25 M (pH 8,5). Se hizo reaccionar el sistema de reacción a 56°C durante 90 minutos.

5 A continuación, se retiró el cubreobjetos, y se lavó el sustrato. Entonces, se mezclaron 8  $\mu$ l de una estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina con una concentración de 0,01 mg/ml, 8,0  $\mu$ l de tampón A para MPEX 10x, 40  $\mu$ l de tampón B para MPEX 2x y 24  $\mu$ l de agua esterilizada en estas proporciones para preparar una disolución de mezcla, que a su vez se añadió al sustrato de plástico.

10 A continuación, se cubrió el sustrato con un cubreobjetos y se puso en un envase herméticamente sellado (10 cm x 15 cm x 3 cm) que tenía el interior humedecido con 200  $\mu$ l de un tampón fosfato 0,25 M (pH 8,5). Se hizo reaccionar el sistema de reacción a 37°C durante 30 minutos. Entonces, se lavó el sustrato y luego se sumergió en una disolución BCIP/NBT (sustrato para fosfatasa BCIP/NBT (sistema de 1 componente) (KPL)). Se hizo reaccionar el sistema de reacción a 37°C durante 30 minutos, y se lavó el sustrato para producir manchas con un color púrpura azulado.

15 Se capturaron señales de color como imágenes de color en un ordenador personal usando un escáner de imágenes (aparato PIXUS MP470 fabricado por Canon Inc.). Se digitalizó la intensidad de color usando un software de análisis de imágenes (software de análisis de matrices de ADN Daredemo fabricado por SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.).

20 En el ejemplo 2, se realizó el experimento de detección en 7 niveles de concentraciones de secuencia de ácido nucleico diana de 0,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  copias/ $\mu$ l. Asimismo, se realizó el experimento control usando sólo un tipo de oligonucleótido en 7 niveles de concentraciones de secuencia de ácido nucleico diana de 0,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  copias/ $\mu$ l.

25 Entonces se comparó la cantidad de señales de color entre el ejemplo 2 y el experimento control en cada una de las concentraciones. Los resultados de la comparación se muestran en la figura 9. Como resultado, el experimento control que usaba sólo un tipo de cadena de oligonucleótidos requirió la concentración de secuencia de ácido nucleico diana de  $10^6$  copias/ $\mu$ l o superior para detectar la secuencia de ácido nucleico diana, tal como puede observarse de la figura 9.

30 En comparación, en el ejemplo 2 que usaba dos tipos de oligonucleótidos, en el que un producto de reacción de elongación forma una estructura entrecruzada, la concentración de secuencia de ácido nucleico diana de  $10^0$  copias/ $\mu$ l o superior fue suficiente para detectar la secuencia de ácido nucleico diana. Por tanto, el ejemplo 2 consiguió la detección incluso para una concentración extremadamente baja de una secuencia de ácido nucleico diana.

## REIVINDICACIONES

1. Método de detección de secuencias de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular (10) que va a detectarse en una muestra, comprendiendo el método:
- 5 una etapa de inmovilización de anclar cadenas de oligonucleótidos (12, 14) sobre un sustrato (16) mediante la inmovilización de uno de los extremos 5' y 3' de las mismas sobre el sustrato;
- 10 una etapa de formación de espacio reticulado de llevar a cabo, basándose en un conjunto de las cadenas de oligonucleótidos (12, 14), la etapa de inmovilización y unir las cadenas de oligonucleótidos a sus respectivas partes complementarias de la secuencia de ácido nucleico diana (10) para formar una estructura entrecruzada en múltiples conjuntos para formar un espacio finamente reticulado (20) en el sustrato, en la que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas se entrelazan entre sí;
- una etapa de captura de capturar un ligando (22) por el espacio reticulado (20) a través de adsorción física;
- una etapa de coloración de hacer que el ligando capturado (22) se coloree con una sustancia activa reactiva con el ligando; y
- 15 una etapa de detección de detectar una señal de color derivada de la coloración para detectar la secuencia de ácido nucleico diana (10).
2. Método de detección de secuencias de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular (10) que va a detectarse en una muestra según la reivindicación 1, comprendiendo el método:
- 20 añadir, a un sistema de reacción, la muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana (10) así como un ligando (22) como un constituyente de una sustancia cromógena y fijar la temperatura del sistema de reacción a una temperatura a la que se desnaturaliza por calor la secuencia de ácido nucleico diana en cadenas sencillas antes de la etapa de formación de espacio reticulado; y
- 25 fijar la temperatura del sistema de reacción a una temperatura de hibridación a la que se unen de manera complementaria las cadenas de oligonucleótidos (12, 14) a la secuencia de ácido nucleico diana (10) en la etapa de formación de espacio reticulado y la etapa de captura;
- añadir, sobre el sustrato (16), una sustancia activa como otro constituyente de la sustancia cromógena para su reacción con el ligando (22) en la etapa de coloración; y
- 30 detectar una señal de color derivada de la coloración mediante la sustancia cromógena en la etapa de detección.
3. Método de detección de secuencias de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular (19) que va a detectarse en una muestra, comprendiendo el método:
- 35 una etapa de diseño de diseñar de antemano cadenas de oligonucleótidos primera y segunda (24, 26) de manera que la segunda cadena de oligonucleótidos tenga una secuencia de ácido nucleico complementaria a un producto de reacción de elongación disociado de un dúplex formado a través de la reacción de elongación usando la primera cadena de oligonucleótidos como cebador y la secuencia de ácido nucleico diana (19) como molde tras la unión complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana y la primera cadena de oligonucleótidos;
- 40 una etapa de inmovilización de anclar las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda (24, 26) sobre un sustrato (16) inmovilizando los extremos 5' de las mismas sobre el sustrato;
- una primera etapa de reacción de elongación de unir de manera complementaria la primera cadena de oligonucleótidos a la secuencia de ácido nucleico diana (19) y llevar a cabo la primera reacción de elongación usando la primera cadena de oligonucleótidos como cebador y la secuencia de ácido nucleico diana como molde;
- 45 una primera etapa de disociación de disociar, de la secuencia de ácido nucleico diana (19), el primer producto de reacción de elongación extendido en la primera etapa de reacción de elongación;
- una primera etapa de entrecruzamiento de unir el primer producto de reacción de elongación disociado a la segunda cadena de oligonucleótidos para formar una estructura entrecruzada entre las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda (24, 26);
- 50 una segunda etapa de reacción de elongación de llevar a cabo la segunda reacción de elongación usando la segunda cadena de oligonucleótidos como cebador y el primer producto de reacción de elongación como molde;
- una segunda etapa de disociación de disociar del mismo el segundo producto de reacción de elongación extendido en la segunda etapa de reacción de elongación;

- 5 una segunda etapa de entrecruzamiento de llevar a cabo la primera etapa de reacción de elongación con respecto a la segunda etapa de disociación en una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda (24, 26) y unir una primera cadena de oligonucleótidos diferente de la primera cadena de oligonucleótidos al segundo producto de reacción de elongación disociado para formar una estructura entrecruzada entre las cadenas de oligonucleótidos segunda y primera;
- una etapa de entrecruzamiento repetitivo de repetir las etapas de entrecruzamiento primera y segunda entre una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera y segunda (24, 26);
- 10 una etapa de formación de espacio reticulado de formar un espacio finamente reticulado (20) mediante la etapa de entrecruzamiento repetitivo, en la que una pluralidad de las estructuras entrecruzadas se entrelazan entre sí;
- una etapa de captura de capturar un ligando por el espacio reticulado (20) a través de adsorción física;
- una etapa de coloración de hacer que el ligando capturado se colorea con una sustancia activa reactiva con el ligando (22); y
- 15 una etapa de detección de detectar una señal de color derivada de la coloración para detectar la secuencia de ácido nucleico diana (19).
4. Método de detección de secuencias de ácido nucleico según la reivindicación 3, que comprende además:
- 20 una tercera etapa de reacción de elongación de unir el segundo producto de reacción de elongación disociado en la segunda etapa de disociación a una tercera cadena de oligonucleótidos diseñada de manera que la tercera cadena de oligonucleótidos tenga una secuencia de ácido nucleico complementaria al segundo producto de reacción de elongación y llevar a cabo la tercera reacción de elongación usando la tercera cadena de oligonucleótidos como cebador y el segundo producto de reacción de elongación como molde;
- una tercera etapa de disociación de disociar, del segundo producto de reacción de elongación, el tercer producto de reacción de elongación extendido en la tercera etapa de reacción de elongación;
- 25 una tercera etapa de entrecruzamiento de unir una primera cadena de oligonucleótidos diferente de la primera cadena de oligonucleótidos al tercer producto de reacción de elongación disociado para formar una estructura entrecruzada entre las cadenas de oligonucleótidos tercera y primera; y
- una etapa de entrecruzamiento repetitivo de repetir las etapas de entrecruzamiento primera, segunda y tercera entre una pluralidad de las cadenas de oligonucleótidos primera, segunda y tercera.
- 30 5. Método de detección de secuencias de ácido nucleico según la reivindicación 3 ó 4, que comprende además una etapa de hibridación de fijar la temperatura tras la etapa de entrecruzamiento repetitivo a una temperatura de hibridación para las cadenas de oligonucleótidos.
6. Método de detección de secuencias de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana particular que va a detectarse en una muestra según la reivindicación 3, comprendiendo el método:
- 35 mezclar la muestra que contiene la secuencia de ácido nucleico diana con un ligando (22) como un constituyente de una sustancia cromógena para preparar una disolución de mezcla;
- añadir la disolución de mezcla a un sistema de reacción en el sustrato (16) y fijar la temperatura del sistema de reacción a una temperatura de desnaturalización por calor a la que se desnaturaliza por calor la secuencia de ácido nucleico diana tras la etapa de inmovilización y antes de la etapa de formación de espacio reticulado;
- 40 fijar la temperatura del sistema de reacción a una primera temperatura de reacción de elongación a la que se une de manera complementaria la primera cadena de oligonucleótidos a la secuencia de ácido nucleico diana (19) para la primera reacción de elongación en la primera etapa de disociación;
- 45 fijar la temperatura del sistema de reacción a una primera temperatura de disociación a la que se disocia el primer producto de reacción de elongación del primer dúplex formado a través de la primera reacción de elongación;
- fijar la temperatura del sistema de reacción a una segunda temperatura de reacción de elongación a la que el primer producto de reacción de elongación disociado se une de manera complementaria a la segunda cadena de oligonucleótidos para la segunda reacción de elongación en la segunda etapa de disociación;
- 50 fijar la temperatura del sistema de reacción a una segunda temperatura de disociación a la que el segundo producto de reacción de elongación se disocia del segundo dúplex formado a través de la segunda reacción de elongación;

fijar la temperatura del sistema de reacción a una temperatura a la que el segundo producto de reacción de elongación disociado se une de manera complementaria a la primera cadena de oligonucleótidos en la segunda etapa de entrecruzamiento;

5 añadir, sobre el sustrato (16), una sustancia activa como otro constituyente de la sustancia cromógena y fijar la temperatura a una temperatura para su reacción con el ligando (22); y

detectar una señal de color derivada de la coloración mediante la sustancia cromógena.

7. Método de detección de secuencias de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ligando (22) es un elemento seleccionado del grupo que consiste en biotina, avidina, antígenos, hapteno y oligonucleótidos.

10 8. Método de detección de secuencias de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la sustancia activa es un elemento seleccionado del grupo que consiste en receptores marcados con enzima, receptores marcados con sustancia fluorescente y sustratos.

15 9. Método de detección de secuencias de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sustrato (16) tiene, en la superficie del mismo, una capa que comprende un polímero hidrófilo así como un grupo funcional reactivo con un grupo amino.

FIG.1A

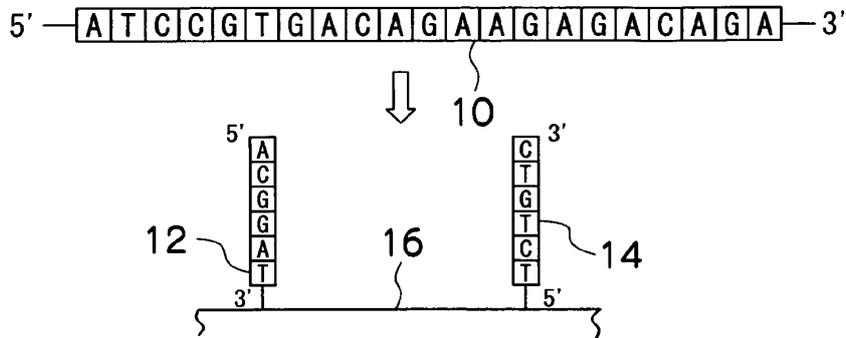


FIG.1B

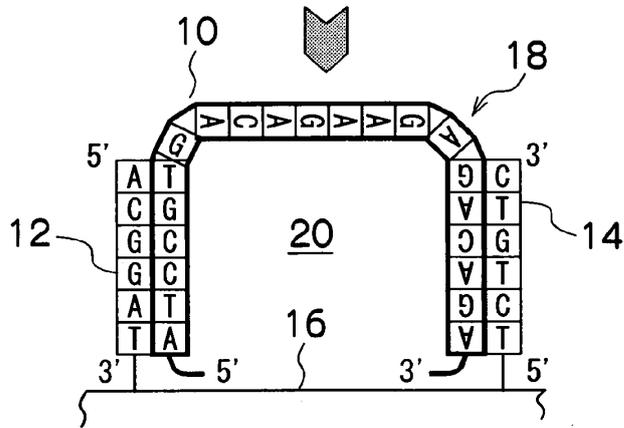


FIG.1C

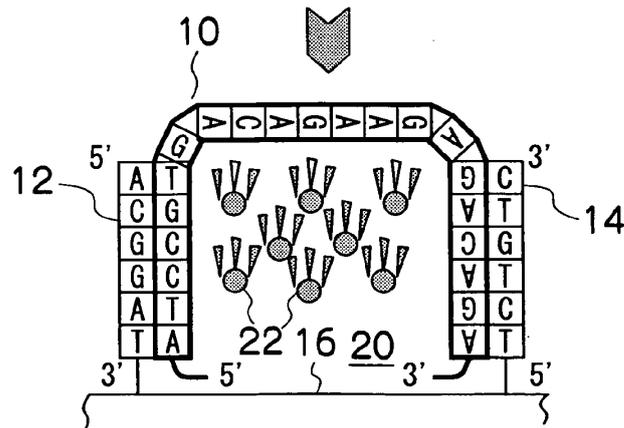


FIG.2

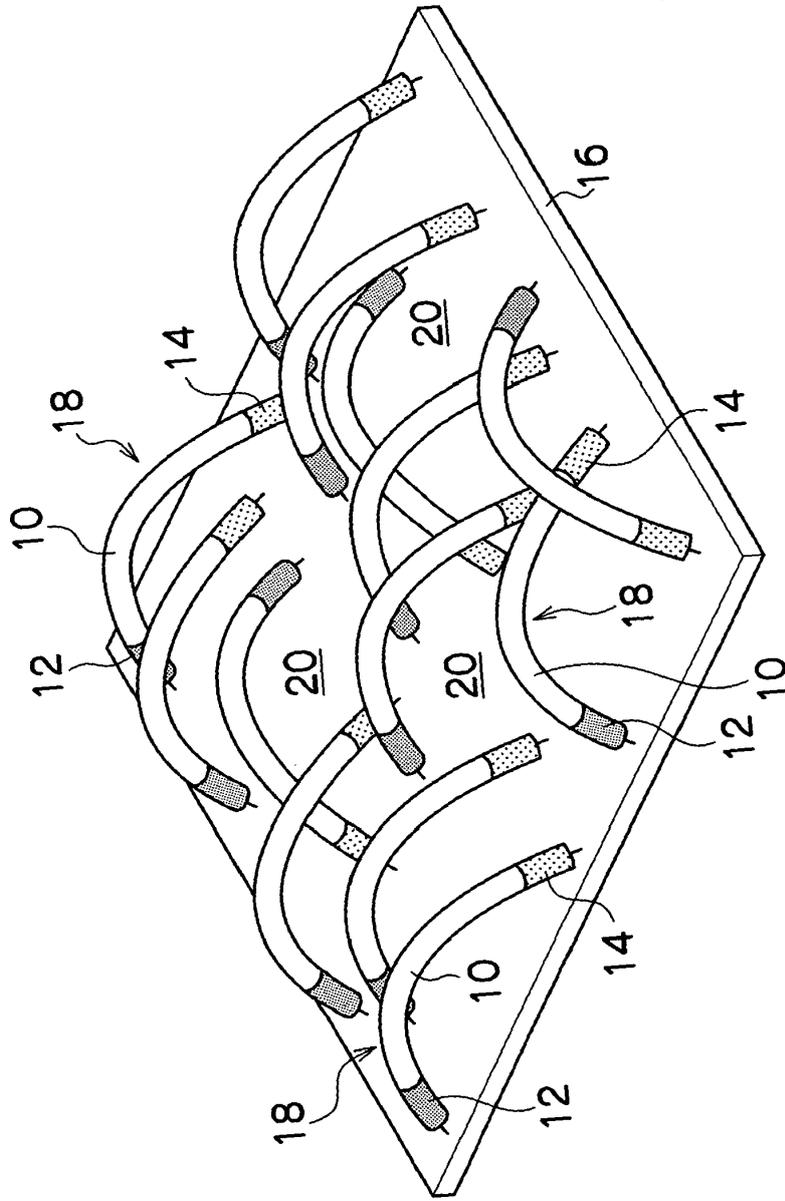


FIG.3

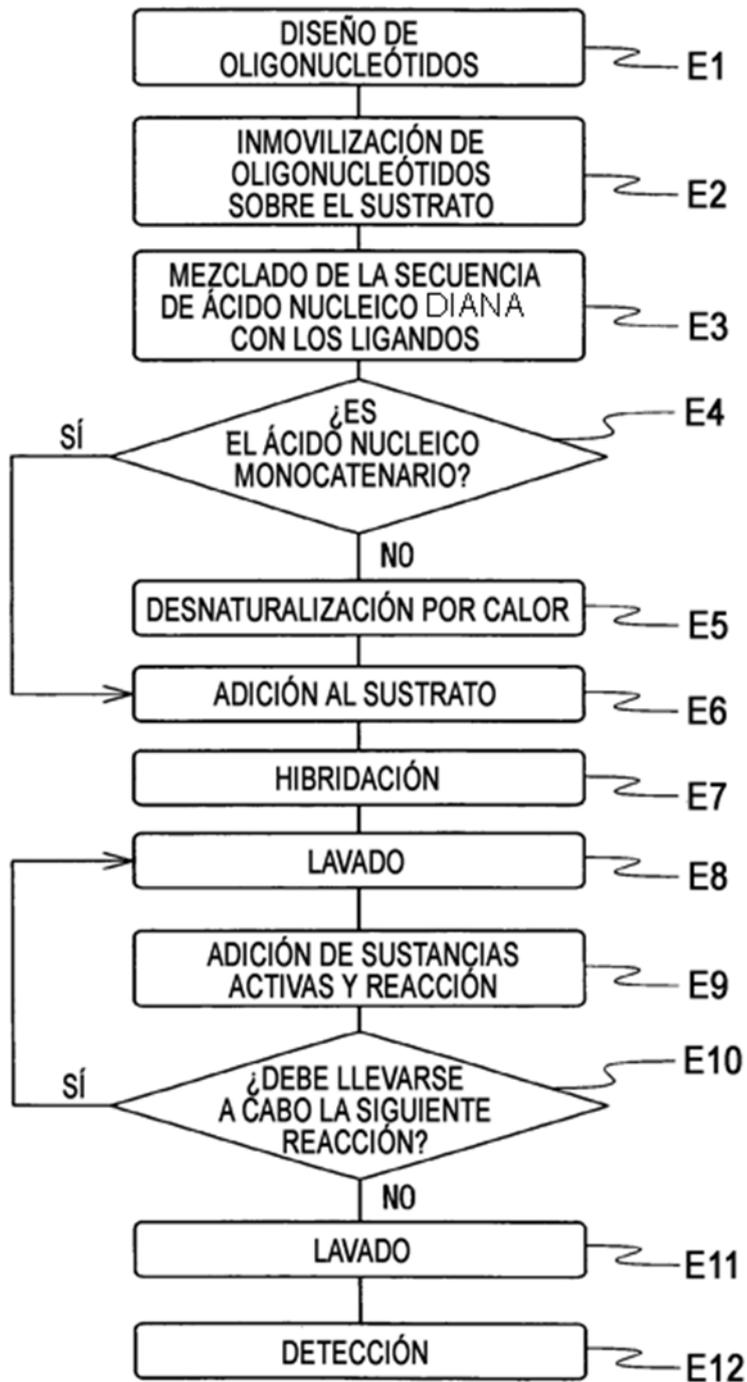


FIG.4A

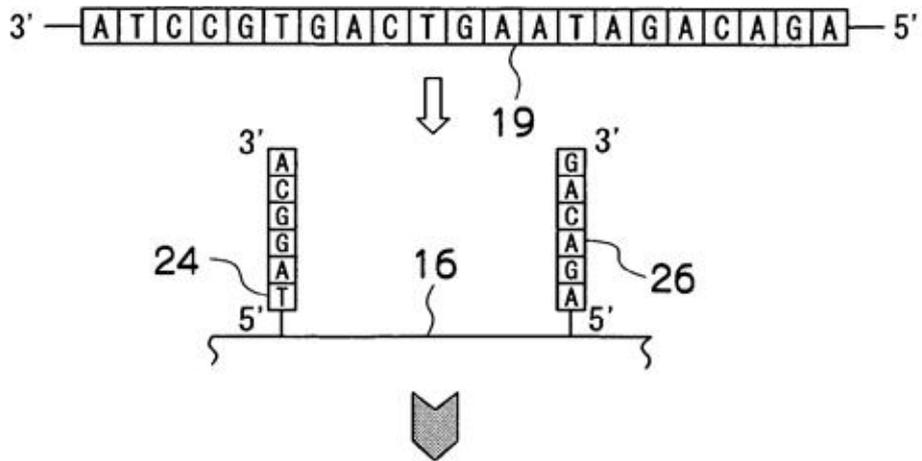


FIG.4B

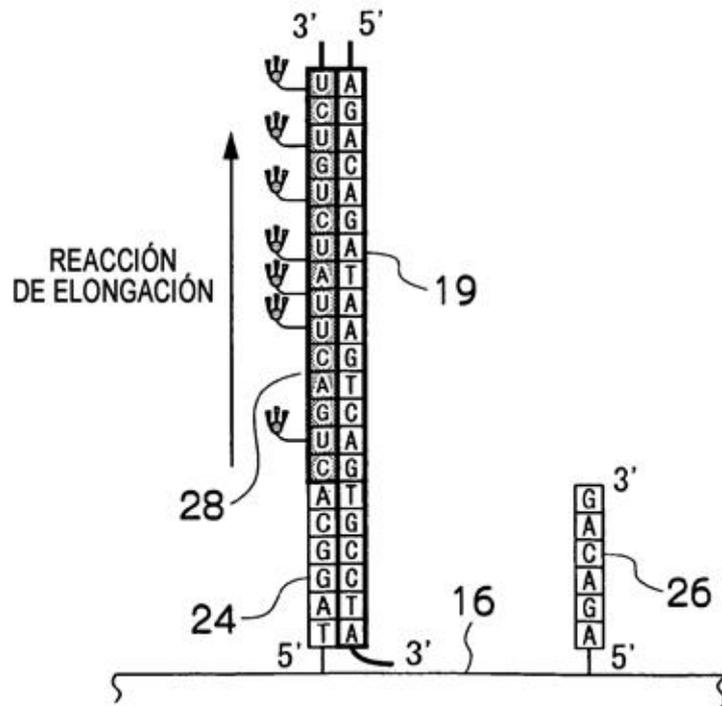


FIG.4C

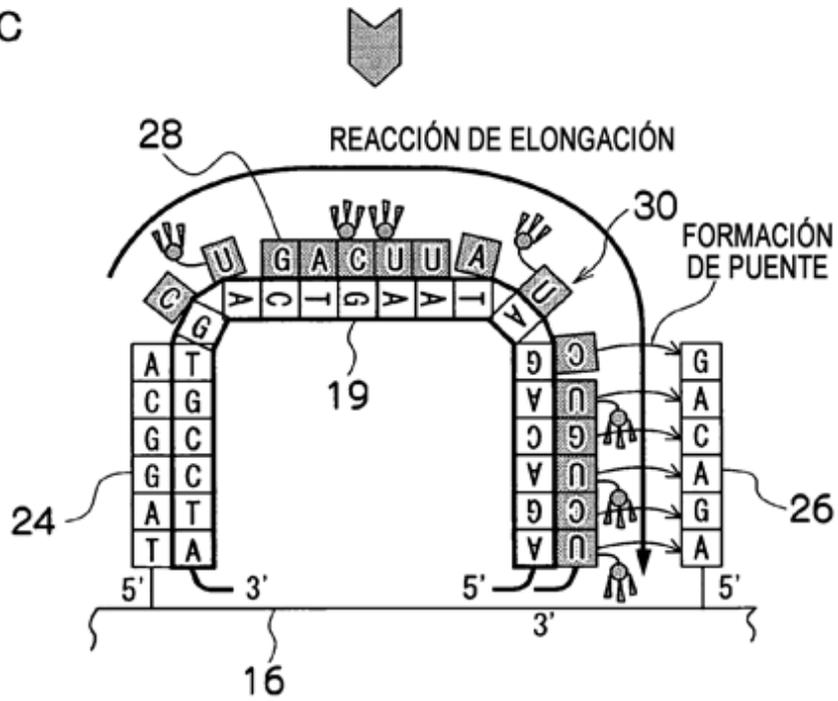


FIG.4D

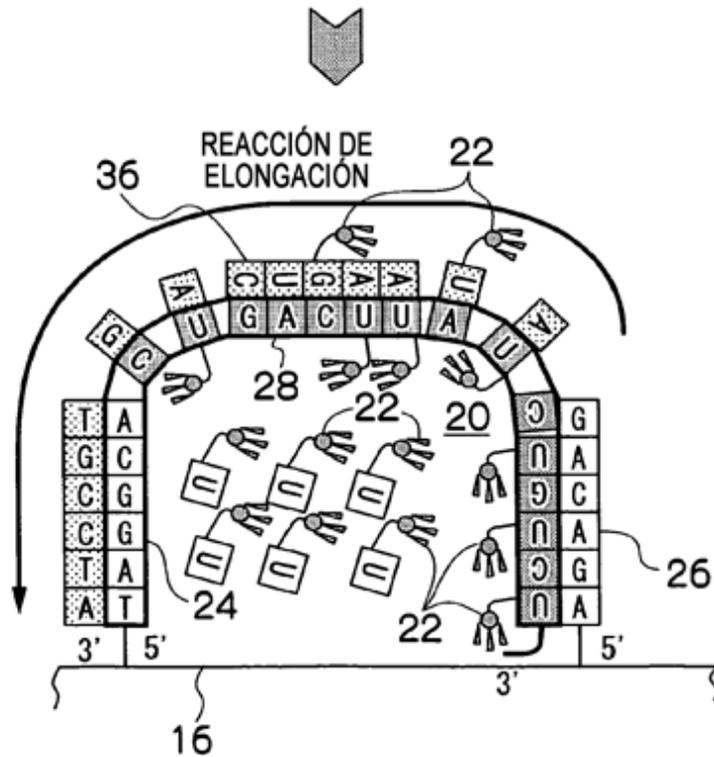


FIG.5

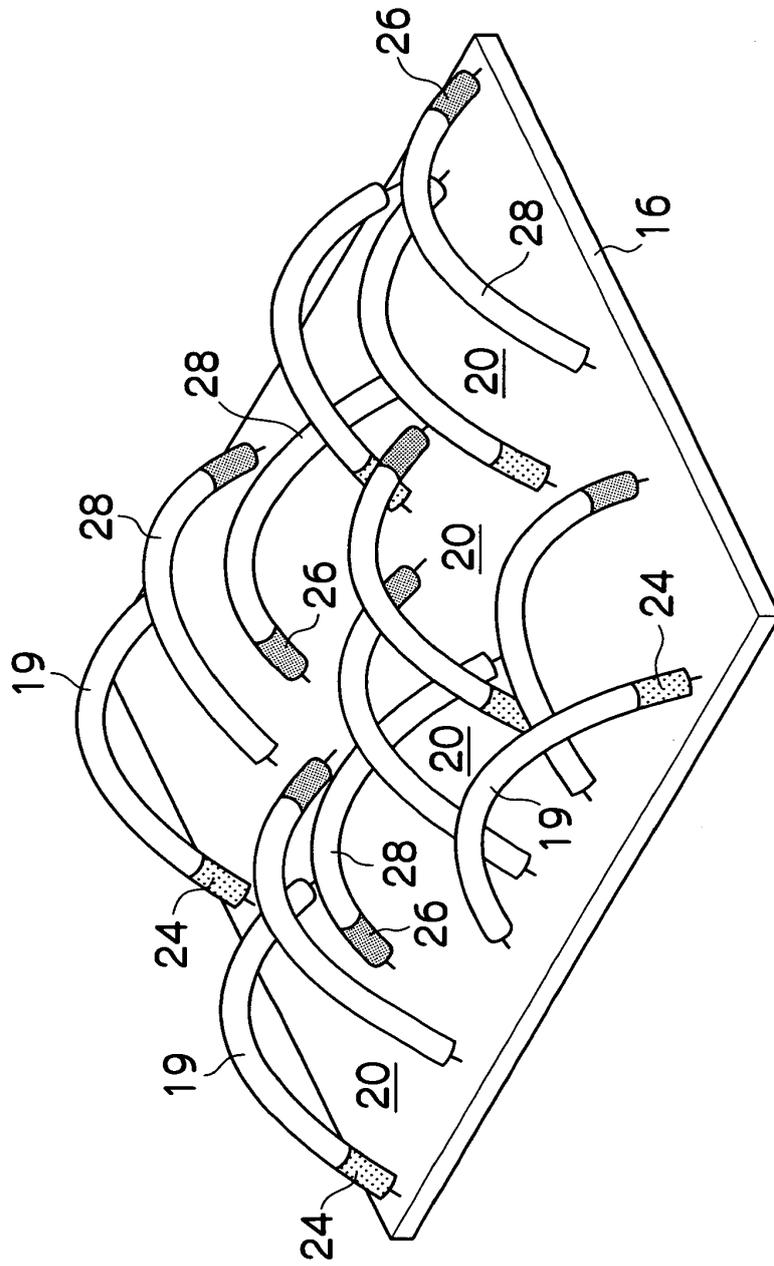


FIG.6

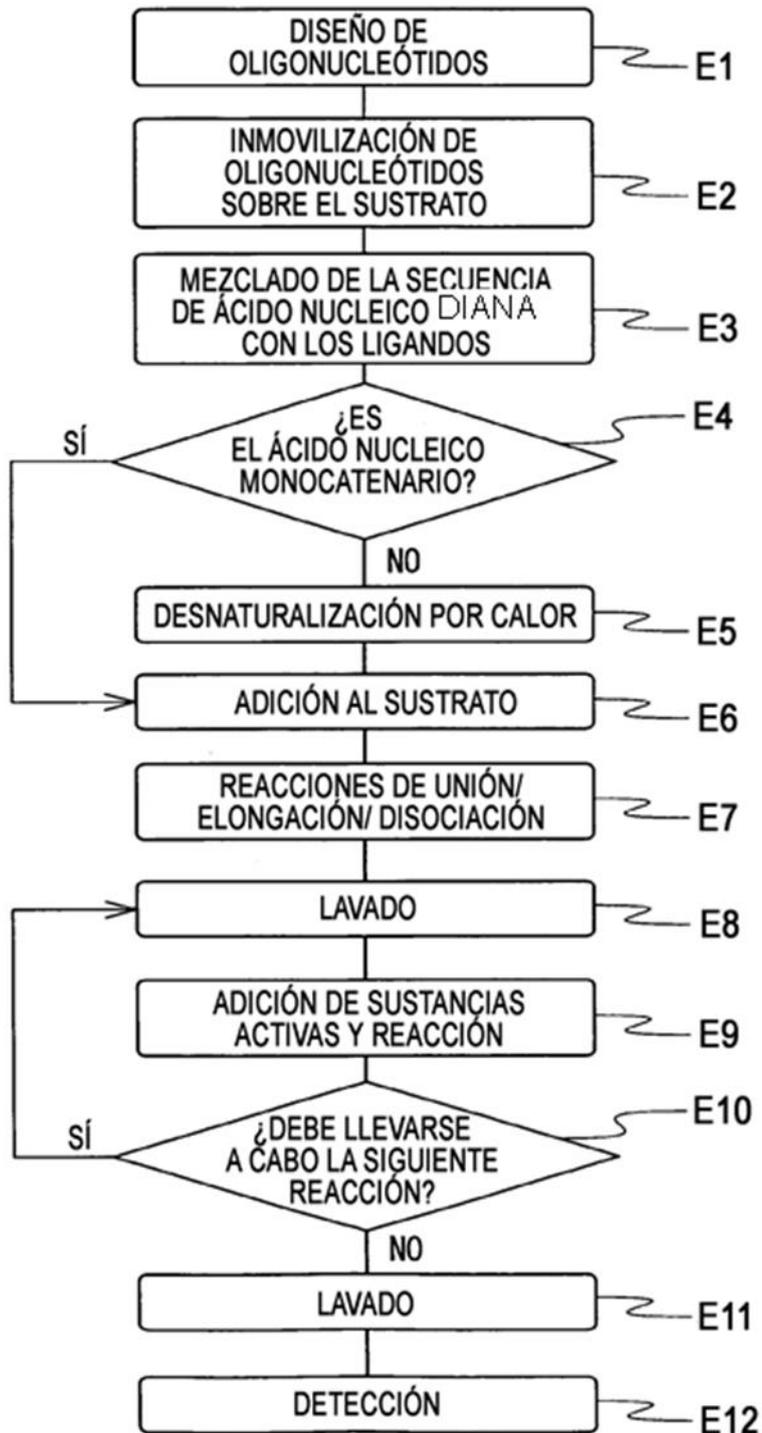
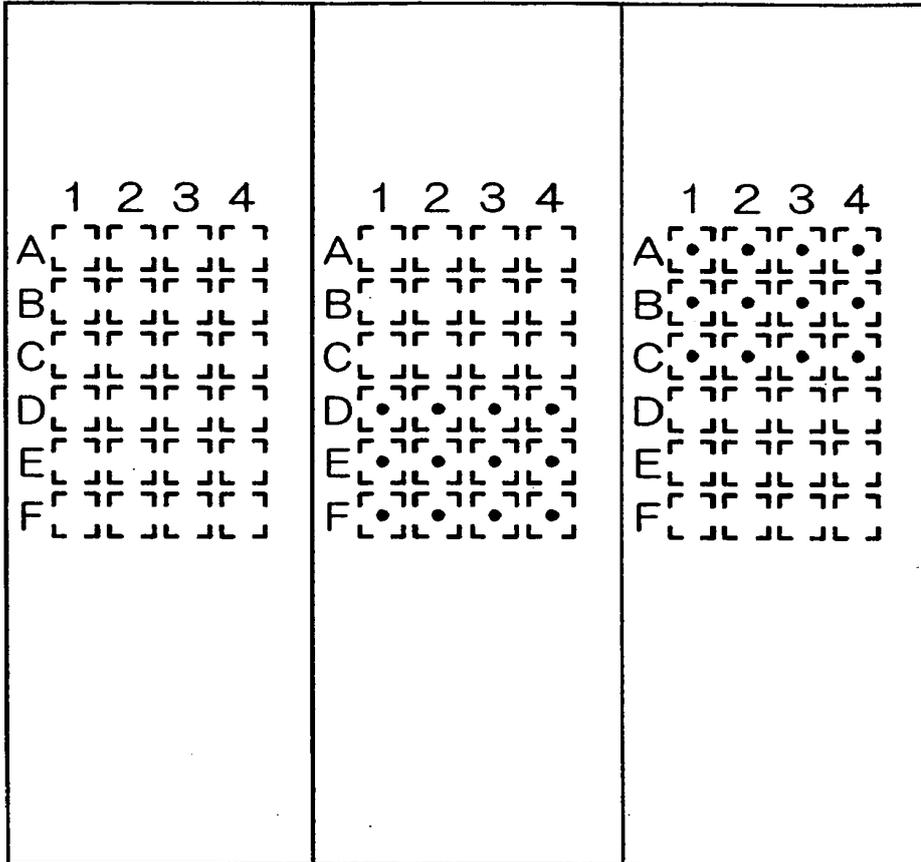


FIG.7A

FIG.7B

FIG.7C



## FIG.8

(TABLA 1)

	RAZÓN S/R: (S+R)/R
PRODUCTO DE PCR DE G1	0,97
PRODUCTO DE PCR DE G2	0,98

FIG.9

