



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 322**

(51) Int. Cl.:
C07H 21/04 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05810422 .5**
(96) Fecha de presentación : **17.10.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1805199**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

(54) Título: **Procedimiento para la amplificación de ácidos nucleicos.**

(30) Prioridad: **18.10.2004 US 619654 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.05.2011

(73) Titular/es: **Brandeis University**
415 South Street
Waltham, Massachusetts 02454-9110, US

(72) Inventor/es: **Wangh, Lawrence, J.;**
Rice, John;
Sánchez, Aquiles, J.;
Pierce, Kenneth;
Salk, Jesse;
Reis, Arthur y
Hartshorn, Cristina

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 322 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

Procedimiento para la amplificación de ácidos nucleicos.

Campo técnico

La presente invención se refiere a reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen amplificaciones que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa, y ensayos que utilizan dichas reacciones en combinación con procedimientos de secuenciación y detección de sondas de hibridación.

Antecedentes

Se bien conocidos los ensayos y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Algunas reacciones de amplificación son isotérmicas, tales como la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA). Otras utilizan el ciclado térmico, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ensayos de amplificación preferidos que utilizan detección de fluorescencia de producto amplificado son homogéneos, es decir, no requieren la separación física de reactivos para permitir la detección (por ejemplo, separación de sondas unidas de sondas no unidas) y pueden realizarse en un único recipiente cerrado. Tales ensayos pueden ser de punto final, en el que el producto se detecta tras la amplificación, o pueden ser en tiempo real, en el que el producto se detecta a medida que avanza la amplificación.

La amplificación de ácidos nucleicos y ensayos que utilizan PCR se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 4.683.202, nº 4.683.195 y nº 4.965.188, y, de manera general, en PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis *et al.* eds., Academic Press (San Diego, CA (EE.UU.) 1990). Los ensayos de PCR homogéneos, incluyendo los ensayos en tiempo real, en los que el producto amplificado se detecta durante algunos o todos los ciclos de PCR a medida que avanza la reacción se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 5.994.056, nº 5.487.972, nº 5.925.517 y nº 6.150.097.

Generalmente las reacciones de amplificación mediante PCR están destinadas a ser simétricas, es decir, para preparar amplicones bicatenarios exponencialmente utilizando cebador directo y cebador inverso en concentraciones equimolares y a iguales temperaturas de fusión (T_f). Una técnica que ha descubierto una utilización limitada para preparar ADN monocatenario directamente en una reacción de PCR es la "PCR asimétrica", Gyllensten y Erlich, "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652-7656 (1988); y la patente US nº 5.066.584. La PCR asimétrica es un procedimiento de amplificación mediante PCR no simétrica que se diferencia de la PCR simétrica porque uno de los cebadores se diluye de cinco veces a cien veces para estar presente en una cantidad limitante del 1-20 por ciento de la concentración del otro cebador. Como consecuencia, la amplificación consiste en una fase exponencial en la que ambos cebadores se extienden, generando producto, o amplicón, bicatenario seguida por una amplificación lineal en la que sólo queda un cebador, generando amplicón monocatenario.

Más recientemente, se ha desarrollado un procedimiento de amplificación mediante PCR no simétrica conocido como PCR "lineal después de exponencial" o, para abreviar, "LATE-PCR". LATE-PCR es una amplificación mediante PCR no simétrica que consiste en una fase exponencial en la que ambos cebadores se aparean y se extienden seguida por una fase lineal tras agotarse el cebador limitante, en la que sólo se aparean y se extiende el cebador en exceso. Véase Sanchez *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 101: 1933-1938, la solicitud de patente internacional publicada WO 03/054233 (3 de julio de 2003), y Pierce *et al.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 102: 8609-8614.

Un procedimiento conveniente y económico para monitorizar la producción de amplicón bicatenario en una amplificación mediante PCR es utilizar un tinte que fluoresce tras intercalarse en, o interactuar de otro modo con, ADN bicatenario, tal como SYBR Green I o SYBR Gold. Véase, por ejemplo, la patente US nº 5.994.056. Los análisis de la temperatura de fusión de amplicones realizados o bien en tiempo real durante una amplificación mediante PCR o bien realizados tras la amplificación se utilizan para la identificación del producto. Un problema con la utilización de tales análisis de la temperatura de fusión es que la fluorescencia del tinte depende del tamaño del amplicón. Otro problema es que los tintes se redistribuyen desde los productos de amplificación, o amplicones, que presentan bajas temperaturas de fusión hacia amplicones que presentan temperaturas de fusión superiores durante el análisis, alterando de ese modo los resultados. Se han planteado dos enfoques para solucionar estos problemas. Un enfoque, la extinción de G, impone restricciones estrictas sobre el diseño de cebadores y provoca una gran fluorescencia de fondo (Crockett AO, Wittwer CT. "Fluorescein-Labeled Oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the Inherent Quenching of Deoxyguanosine Nucleotides" Anal. Biochem. 290:89-97 (2001)). El otro, la sustitución de tintes SYBR por tinte LC Green, proporciona un porcentaje muy pequeño de señal para secuencias no presentes en abundancia y requiere software y hardware sumamente especializados (Wittwer *et al.* High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen", Clin. Chem. 49:853-860(2003).

Se utilizan sondas marcadas con fluorescente en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos homogéneos,

incluyendo los ensayos de PCR, para medir la acumulación del amplicón deseado, mediante análisis o bien en tiempo real o bien de punto final. Varios tipos de sondas disponibles discriminan alelos significativamente en comparación con sondas monocatenarias lineales. Las sondas en tiempo real incluyen sondas lineales marcadas de manera doble que se escinden mediante actividad exonucleasa de 5' a 3' de ADN polimerasa durante la etapa de extensión de un ciclo de PCR (véanse las patentes US nº 5.210.015, nº 5.487.972 y nº 5.538.848); sondas de baliza molecular (véanse las patentes US nº 5.925.517, nº 6.103.476 y nº 6.365.729); sondas de unión al surco menor (véase Afonina *et al.* "Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence", *Biotechniques* 32: 946-949 (2002)); pares de sondas lineales experimentan FRET cuando se hibridan de manera adyacente en una cadena diana; sondas lineales bicatenarias extinguidas para las que una diana compite para hibridarse con la cadena de sonda marcada (véase Li, Q. *et al.* (2002), *Nucl. Acid. Res.* 30: e5); y las denominadas sondas "de iluminación", que son oligómeros de ácido nucleico peptídico (ANP) unidos a un tinte de cianina asimétrica que fluoresce cuando la sonda se une a una diana para formar una región bicatenaria. Para la LATE-PCR se han utilizado sondas de discriminación de alelos de baja temperatura, tales como sondas de baliza molecular de baja temperatura (véase el documento WO 03/045233). Pueden unirse sondas oligonucleotídicas marcadas a cebadores mediante ligadores de tal manera que durante la amplificación las sondas no se copian sino que están libres para hibridarse con una secuencia diana resultante de la extensión del cebador. Los ejemplos son Scorpions®, cebadores a los que están unidas sondas de baliza molecular, y Anglers®, cebadores a los que están unidas sondas lineales marcadas con fluoróforo. Lee, M.A. *et al.* (2002), *Analytica Clinica Acta* 457: 61:70; Whitcombe, D. *et al.* (1999), *Nature Biotechnology* 17: 804-807. La parte de sonda de tales estructuras compuestas, que lleva el marcador fluorescente, se hibrida por separado de la parte de cebador. Por tanto, son sondas marcadas y cebadores no marcados, tal como se utilizan esas expresiones en la presente memoria. Sin embargo, las sondas específicas de diana carecen de la capacidad para monitorizar la producción total de productos bicatenarios.

Determinadas sondas toleran el apareamiento erróneo. Las sondas que toleran apareamiento erróneo se hibridan con, y generan una señal detectable para, más de una secuencia diana a una temperatura de detección en un ensayo, y diversos híbridos así formados presentarán diferentes puntos de fusión. Generalmente, las sondas monocatenarias lineales, o espirales al azar, toleran apareamiento erróneo. Los ejemplos de tales sondas son sondas lineales con un resto fluorescente interno cuyo nivel de fluorescencia aumenta tras la hibridación con una u otra cadena diana; sondas lineales marcadas de manera fluorescente utilizadas en combinación con tintes SYBR Gold y SYBR Green I, de tal manera que la fluorescencia del marcador se produce mediante FRET a partir del tinte cuando la sonda se hibrida con una u otra diana (véase la publicación de patente estadounidense US 2002/0119450, 28 de agosto de 2002), denominadas "balizas descuidadas" ("sloppy"), y variaciones de pares de sondas lineales que experimentan FRET (véase la patente US nº 6.472.156).

Utilizar múltiples sondas que se unen cada una sólo a un amplicón diana posible generado en una reacción de amplificación crea un problema para analizar complicadas mezclas de reacción o para detectar una o unas pocas dianas entre numerosas dianas posibles. La detección de fluorescencia posible permite la resolución de un número limitado de fluoróforos, generalmente no más de ocho. Es posible una multiplexación limitada, por ejemplo, diseñando una sonda de baliza molecular de discriminación de alelos diferente para cada diana y marcando cada sonda de manera diferencial. (Véase, por ejemplo, Tyagi *et al.* (2000) *Nature Biotechnology* 18: 1191-1196). Las mezclas de sondas de discriminación de alelos, que comprenden cada una alícuotas de múltiples colores, amplían el número de firmas de sonda y funcionan bien si sólo está realmente presente una de muchas (por lo menos hasta 56) dianas, pero encuentra resultados ambiguos si hay más de una diana presente.

Hay muchas situaciones que implican dianas complejas o una entre muchas dianas posibles. Se han desarrollado o propuesto varios esquemas para tales situaciones, pero todos presentan graves inconvenientes y limitaciones. Tyagi *et al.* solicitud de patente internacional publicada WO 01/31062, han descrito una técnica denominada algunas veces "balizas descuidadas", que son sondas de baliza molecular que presentan largas secuencias en lazo, que hacen que toleren apareamiento erróneo y puedan unirse en cierta medida a múltiples dianas a la temperatura de apareamiento de una reacción de amplificación mediante PCR. Tales sondas presentan una escasa cinética de reacción frente a dianas con apareamiento erróneo y es probable que permanezcan hibridadas a dianas perfectamente apareadas a la temperatura de extensión de una amplificación mediante PCR y se escinden mediante Taq ADN polimerasa. Además, sólo se obtiene una indicación indirecta de temperaturas de fusión de híbridos de sonda-diana en las condiciones de ensayo, y esto supone que se ha alcanzado el equilibrio. Se ha descrito la multiplexación en tiempo real en amplificaciones mediante PCR simétrica con sondas de FRET. Con el fin de no interferir con la amplificación, las temperaturas de fusión de todos los híbridos de sonda-diana se limitan a estar en el estrecho intervalo de temperatura entre la temperatura de apareamiento de cebadores y la temperatura de extensión de cebadores. Además, ese esquema no es cuantitativo. Se han dado a conocer ensayos de múltiples sondas tras la amplificación utilizando sondas de FRET de diferentes colores en Wittwer *et al.*, "Real-Time Multiplex PCR Assays, Methods" 25:430-442 (2001). Se enfría rápidamente la mezcla de reacción tras una amplificación mediante PCR simétrica, después se calienta lentamente para determinar curvas de fusión para los diversos fluoróforos presentes. Este enfoque no es cuantitativo. Además, debido a la gran dispersión entre amplificaciones mediante PCR simétrica repetidas, los ensayos de punto final tienden generalmente a ser sólo cualitativos.

La secuenciación de productos de reacción proporciona una alternativa al ensayo con sondas. La secuenciación dideoxi tradicional puede utilizar productos de reacciones de amplificación, tales como PCR simétrica o LATE-PCR,

como materiales de partida para la secuenciación en ciclos. Se purifica el producto amplificado utilizando precipitación en etanol o en una columna de afinidad para eliminar dNTP y cebadores restantes, se somete a una reacción de secuenciación en ciclos utilizando un cebador de secuenciación y didesoxinucleótidos marcados de manera fluorescente, y se somete a electroforesis en gel capilar. La "pirosecuenciación" es un procedimiento de secuencia mediante síntesis, isotérmico, en tiempo real, conocido en la materia. Si se utilizan procedimientos de amplificación exponencial, por ejemplo PCR, en la preparación de material de partida para la pirosecuenciación, el producto amplificado debe limpiarse mediante aislamiento de producto monocatenario así como eliminación de dNTP, pirofosfato y cebadores no incorporados de la reacción de amplificación. LATE-PCR simplifica la preparación de muestras, porque genera principalmente producto monocatenario, pero no elimina en y por sí misma la necesidad de limpiar el producto.

Un aspecto de esta invención son procedimientos para la detección homogénea de productos de reacción de reacciones de amplificación, ciclado por temperatura o isotérmica, utilizando la detección de fluorescencia a partir de cebadores oligonucleotídicos lineales marcados con fluoróforo excitados indirectamente mediante excitación de un tinte fluorescente de ADN tal como SYBR Green I o, preferentemente, SYBR Gold. Tales tintes se vuelven fluorescentes cuando se asocian con ADN bicatenario, en el que se notifica que se intercalan. Los procedimientos anteriores pueden realizarse en tiempo real o tras la reacción de amplificación, o bien leyendo la fluorescencia a una temperatura de detección (detección de punto final) o bien determinando cambios de fluorescencia como función de la temperatura mediante análisis de función tras la amplificación. A medida que se calienta una mezcla de reacción a través de las temperaturas de fusión de diversos productos de reacción, la fluorescencia disminuye progresivamente a medida que diversos amplicones que contienen un cebador que contiene fluoróforo particular alcanzan sus temperaturas de fusión y se vuelven monocatenarios. Los procedimientos preferidos incluyen calcular la razón de señal de cebador con respecto a señal de tinte.

Aún otros aspectos de esta invención son procedimientos homogéneos para detectar productos de reacción de reacciones de LATE-PCR utilizando una etapa de detección a baja temperatura. Determinadas formas de realización comprenden incluir en la mezcla de reacción por lo menos una sonda de discriminación de alelos según esta invención, concretamente, una sonda bicatenaria extinguida generalmente del tipo descrito por Li, Q. *et al.* (2002) Nucl. Acids Res. 30: e5 excepto porque es una sonda específica de diana de baja temperatura (baja T_f o superbaja T_f) y porque se excita indirectamente excitando un tinte fluorescente de ADN intercalado en el híbrido de sonda-diana tal como, preferentemente, SYBR Gold. Otras formas de realización comprenden incluir en la mezcla de reacción por lo menos una sonda que tolera apareamiento erróneo indirectamente excitable según esta invención, concretamente, una sonda monocatenaria extinguida generalmente del tipo descrito por Lee y Furst en la solicitud de patente publicada estadounidense con nº de publicación US 2002/0119450 excepto porque es una sonda de baja temperatura extinguida. Estos diversos procedimientos incluyen excitar el tinte durante las etapas de detección a baja temperatura de una amplificación mediante LATE-PCR y detectar la fluorescencia a partir de las sondas en esas condiciones para proporcionar una medida de la secuencia monocatenaria diana. Formas de realización particulares pueden incluir además medir la cantidad total de producto(s) bicatenario(s) en la mezcla de reacción detectando fluorescencia de tinte, preferentemente durante, o al final de, la etapa de extensión de ciclos de PCR mientras la temperatura de la mezcla de reacción está por encima de la(s) temperatura(s) de fusión de las sondas. Determinados procedimientos preferidos incluyen calcular la razón de señal de sonda con respecto a señal de tinte. En el caso de muestras repetidas, tal razón corrige las diferencias entre muestras repetidas en rendimientos de amplificación que se sabe que se producen en amplificaciones mediante PCR.

Otros aspectos de esta invención son procedimientos de detección homogéneos para su utilización cuando hay múltiples amplicones presentes o pueden estar presentes, comprendiendo tal procedimiento incluir en una mezcla de reacción de amplificación mediante LATE-PCR una o más sondas de detección que toleran apareamiento erróneo de baja temperatura que, debido a su baja T_f , no interfieren con la amplificación y no se hidrolizan (cortan) mediante una ADN polimerasa que presenta actividad exonucleasa 5'-3', y que emiten una señal fluorescente cuando se hibridan y se excitan, o bien directamente mediante una fuente de excitación adecuada o bien indirectamente mediante un tinte de ADN fluorescente que se excita mediante una fuente de excitación adecuada. Tales procedimientos incluyen ensayos con una única sonda y ensayos con múltiples sondas para aplicaciones tales como genotipado. Puede marcarse más de una sonda con el mismo fluoróforo, en cuyo caso la discriminación se basa en el cambio de fluorescencia con la temperatura, al igual que cuando se utiliza una única sonda. Las sondas pueden marcarse con diferentes fluoróforos, en cuyo caso también se utiliza la diferencia de color para la discriminación. La discriminación entre dianas para la identificación y la cuantificación puede incluir razones de fluorescencia entre fluoróforos a la misma o a diferentes temperaturas, así como razones de fluoróforo con respecto a tinte. La detección se realiza preferentemente durante la amplificación (en tiempo real) y más preferentemente durante una etapa de detección a baja temperatura incluida en un protocolo de amplificación mediante LATE-PCR, y la etapa de detección puede incluir la detección a múltiples temperaturas. Aún otro aspecto de esta invención es una sonda lineal monocatenaria útil en tales procedimientos de detección, siendo tal sonda del tipo descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense US 2002/0119450 (29 de agosto de 2002), es decir, una sonda excitada mediante la emisión de fluorescencia a partir de un tinte de ADN fluorescente, excepto porque es una sonda de baja temperatura (baja T_f o superbaja T_f), tolera apareamiento erróneo, e incluye un resto de extinción que extingue la fluorescencia, que de lo contrario resultaría de la estructura secundaria de a baja temperatura.

Sumario

En la presente solicitud se hace referencia a las temperaturas de fusión, T_f , de cebadores de ácido nucleico, sondas y amplicones. T_f significa la temperatura a la que la mitad del material objeto existe en forma bicatenaria y el resto es monocatenario. Generalmente, excepto para LATE-PCR, la T_f de un cebador es un valor calculado utilizando o bien el procedimiento de “%GC” (Wetmar, J.G. (1991) “DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization”, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227-259) o bien el procedimiento de “2(A+T) más 4(G+C)”, ambos de los cuales se conocen bien, a unas condiciones convencionales de concentración de cebador y de sal. Sin embargo, LATE-PCR tiene en cuenta las temperaturas de fusión de cebadores reales en una reacción particular, teniendo en cuenta las concentraciones de cebadores al comienzo de la amplificación. Véase Sanchez *et al.* (2004) PNAS (USA) 101: 1933-1938, y Pierce *et al.* (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 102: 8609-8614.

En la presente solicitud se hace referencia a tal temperatura de fusión ajustada para la concentración al comienzo de la amplificación como $T_{f[0]}$, que puede determinarse empíricamente, tal como se necesita cuando se utilizan nucleótidos no naturales, o calcularse según el procedimiento del “vecino más próximo” (Santa Lucia, J. (1998), PNAS (USA) 95: 1460-1465; y Allawi, H.T. y Santa Lucia, J. (1997), Biochem. 36: 10581-10594) utilizando un ajuste de la concentración de sal, que en los ejemplos a continuación era una concentración de catión monovalente de 0,07 M. LATE-PCR también puede tener en cuenta la temperatura de fusión del amplicón, que se calcula utilizando la formula: $T_f = 81,5 + 0,41 (\%G + \%C) - 500/L + 16,6 \log [M]/(1 + 0,7 [M])$, en la que L es la longitud en nucleótidos y [M] es la concentración molar de cationes monovalentes. Las temperaturas de fusión de sondas lineales, o espirales al azar, se calculan tal como para los cebadores. Las temperaturas de fusión de sondas estructuradas, por ejemplo sondas de baliza molecular, pueden determinarse empíricamente.

Tal como se utiliza en esta solicitud, “LATE-PCR” significa una amplificación de ADN no simétrica utilizando el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un cebador oligonucleotídico (el “cebador en exceso”) en un exceso de por lo menos cinco veces con respecto al otro cebador (el “cebador limitante”), que se utiliza a su vez a baja concentración, hasta 200 nM, de modo que se agota en aproximadamente suficientes ciclos de PCR como para producir amplicón bicatenario detectable de manera fluorescente, en el que la temperatura de fusión ajustada para la concentración del cebador limitante al comienzo de la amplificación, $T_{f[0]}^L$, no está más de 5°C por debajo de la temperatura de fusión ajustada para la concentración del cebador en exceso al comienzo de la amplificación, $T_{f[0]}^X$, preferentemente por lo menos igual de alta y más preferentemente 3-10°C superior; y en el que la ciclado térmico se continúa durante múltiples ciclos tras el agotamiento del cebador limitante para producir producto monocatenario, concretamente, el producto de extensión del cebador en exceso, denominado algunas veces la “cadena de cebador en exceso”.

Los cebadores y las sondas de esta invención o útiles en procedimientos y kits de esta invención son oligonucleótidos en el sentido amplio, mediante lo cual se quiere decir que pueden ser ADN, ARN, mezclas de ADN y ARN, y pueden incluir nucleótidos no naturales (por ejemplo, 2' o-metil-ribonucleótidos) y enlaces internucleotídicos no naturales (por ejemplo, enlaces de fosforotioato). Tanto los cebadores como las sondas funcionan en parte hibridándose con una secuencia de interés en una mezcla de reacción. Un cebador es un oligonucleótido monocatenario que puede hibridarse con su secuencia complementaria a la temperatura de apareamiento de cebadores de una reacción de amplificación y puede extenderse en su extremo 3' mediante una ADN polimerasa. Un cebador de esta invención es un cebador que señala la hibridación de su secuencia de cebador mediante un fluoróforo que puede excitarse indirectamente. Una sonda de esta invención o útil en procedimientos y kits de esta invención es o incluye un oligonucleótido monocatenario que puede hibridarse con su secuencia (o secuencias) diana prevista a la temperatura (o temperaturas) de detección en o tras una reacción de amplificación y señala de manera fluorescente ese acontecimiento de hibridación mediante un fluoróforo que puede excitarse indirectamente. Tal como se utiliza en la presente memoria una “sonda” no se extiende en la reacción de amplificación mediante una ADN polimerasa. Las sondas que son muy específicas para una secuencia diana perfectamente complementaria y rechazan fuertemente secuencias relacionadas que presentan una o unas pocas bases con apareamiento erróneo son de “discriminación de alelos”. Las sondas que se hibridan en por lo menos una condición de detección aplicable no sólo con secuencias perfectamente complementarias sino también con secuencias parcialmente complementarias que presentan una o más bases con apareamiento erróneo son sondas “que toleran apareamiento erróneo”.

“Tinte de ADN fluorescente” tal como se utiliza en la presente memoria hace referencia a una composición, por ejemplo SYBR Green I o SYBR Gold, que se vuelve excitable de manera fluorescente cuando se asocia con ADN bicatenario. Se ha notificado que los tintes de ADN fluorescentes se intercalan en ADN bicatenario, pero no se desea limitarse por ninguna teoría de operación.

Los cebadores de esta invención se utilizan junto con un tinte de ADN fluorescente y son oligonucleótidos monocatenarios lineales marcados con un fluoróforo que puede excitarse indirectamente, es decir, cuando el cebador se hibrida con una cadena molde en la mezcla de reacción para formar una región de ADN bicatenario, y se ilumina sobre la muestra luz (habitualmente, pero no necesariamente, luz visible) de una longitud de onda que excita, o se absorbe por, el tinte fluorescente de ADN pero no el fluoróforo, el fluoróforo emite. Se ha notificado que se transfiere energía desde un tinte de ADN fluorescente hacia un fluoróforo cercano mediante transferencia de

energía por resonancia de fluorescencia (FRET), pero no se desea limitarse por ninguna teoría de operación. Un fluoróforo que emite en esta circunstancia se denomina un fluoróforo que se “excita indirectamente”. Las sondas de esta invención también se utilizan junto con un tinte fluorescente que se une a ADN bicatenario (un “tinte de ADN fluorescente”) y marcado con un fluoróforo indirectamente excitable de este tipo de tal manera que cuando la sonda se hibrida con una cadena diana en la mezcla de reacción y el tinte se excita, el fluoróforo emite.

Tal como se utiliza en la presente memoria “kit” significa una colección de reactivos para realizar una amplificación o ensayo. Un kit puede ser “completo”, es decir, incluye todos los reactivos necesarios para todas las etapas de una amplificación o amplificación-detección. Alternativamente un kit puede ser “parcial”, omitiendo determinados reactivos necesarios para esas operaciones. Los kits tanto completos como parciales de esta invención pueden incluir adicionalmente reactivos para la preparación de muestras, tales como aislamiento de ácido nucleico y transcripción inversa. La secuenciación puede implicar dos kits, por ejemplo, un kit completo de amplificación mediante LATE-PCR y un kit completo de secuenciación en ciclos, o los dos pueden combinarse en un único kit.

Tal como se utiliza en la presente memoria un “conjunto de oligonucleótidos” hace referencia a una colección de cebadores o cebadores y sondas para realizar una amplificación o ensayo. Para la secuenciación un conjunto de oligonucleótidos puede incluir, por ejemplo, cebador limitante y cebador en exceso para una amplificación mediante LATE-PCR y uno o más cebadores de secuenciación adicionales para la secuenciación en ciclos. Para un ensayo con sonda de hibridación un conjunto de oligonucleótidos puede incluir, por ejemplo, cebador limitante y cebador en exceso para una amplificación mediante LATE-PCR y por lo menos una sonda de hibridación marcada con fluoróforo.

Tal como se utiliza en la presente memoria un procedimiento “en un único tubo” significa una serie de por lo menos dos operaciones, por ejemplo, preparación de muestra, amplificación o secuenciación, que pueden realizarse sin transferencia de la muestra de un recipiente, ya sea un tubo de ensayo, un pocillo de reacción, una cámara en un dispositivo de microfluído, un portaobjetos de vidrio o cualquier otro aparato que puede sostener una mezcla de reacción, a otro recipiente.

Pueden añadirse sondas que presentan bajas temperaturas de fusión (es decir, sondas que forman híbridos de sonda-diana que presentan bajas temperaturas de fusión) a mezclas de reacción de amplificación antes del comienzo de la amplificación y utilizarse sólo cuando se desee. Manteniendo las temperaturas por encima de la temperatura de fusión de una sonda durante la totalidad o partes de una reacción de amplificación, se evita que la sonda se hibride con su diana y reduzca posiblemente la eficacia de la reacción. Determinadas formas de realización de ensayos de LATE-PCR utilizan sondas de baja temperatura. Tal como se utiliza en la presente memoria, “sonda de baja T_f ” significa una sonda de hibridación que presenta una temperatura de fusión ajustada para la concentración al comienzo de la amplificación, $T_{f[0]}$, por lo menos 5°C por debajo de la $T_{f[0]}$ del cebador limitante en un ensayo de LATE-PCR; y una “sonda de superbaja T_f ” significa una sonda de hibridación que presenta una $T_{f[0]}$ que está por lo menos 5°C por debajo de la temperatura de apareamiento de cebadores media de la fase exponencial de una reacción de LATE-PCR. Frecuentemente se añaden sondas a reacciones de LATE-PCR a una concentración de 1 micromolar (μM). Por tanto, al diseñar sondas, algunas veces se utiliza una $T_{f[0]}$ nominal calculada tal como se describió anteriormente pero utilizando una concentración nominal de 1 μM . La mayoría de las sondas de baja T_f y superbaja T_f presentan una $T_{f[0]}$ calculada a una concentración de 1 μM en el intervalo de 30-55°C.

La detección utilizando sondas de baja temperatura requiere la detección a baja temperatura, en la que la temperatura de la mezcla de sonda-diana se reduce lo suficientemente para que las sondas marcadas de manera fluorescente se hibriden y produzcan una señal. Esto puede realizarse al final de la amplificación (punto final) o en un análisis de fusión tras la amplificación. Alternativamente puede incluirse una etapa de detección a baja temperatura en algunos o todos los ciclos de la fase lineal de una amplificación mediante LATE-PCR para un ensayo en tiempo real. Preferentemente tal etapa se produce tras la extensión del cebador y antes de la fusión de cadenas a alta temperatura (o “desnaturalización”), aunque puede incluirse en la etapa de apareamiento de cebadores. Una etapa de detección a baja temperatura en un ensayo de LATE-PCR significa una reducción de temperatura por lo menos 5°C por debajo de la temperatura de apareamiento de cebadores.

Determinados procedimientos según esta invención utilizan sondas de hibridación o cebadores marcados con fluoróforo en combinación con tintes fluorescentes que se unen a ADN bicatenario e incluyen estimular un tinte a una longitud de onda que excita el tinte pero no el/los fluoróforo(s) y detectar la fluorescencia emitida por un fluoróforo estimulado indirectamente mediante este procedimiento. Algunas formas de realización de procedimientos según esta invención incluyen detectar también la emisión de fluorescencia a partir del tinte. Determinados procedimientos preferidos incluyen además calcular la razón de emisión de fluoróforo con respecto a emisión de tinte.

Una forma de realización de esta invención incluye añadir a una mezcla de amplificación de ácidos nucleicos un tinte de ADN fluorescente, tal como SYBR Green I, o preferentemente SYBR Gold, y por lo menos un cebador de amplificación según esta invención, es decir, un oligonucleótido monocatenario lineal que puede extenderse mediante una ADN polimerasa y que está marcado con un fluoróforo que puede excitarse indirectamente para señalar el cebado tal como se describió anteriormente; realizar una reacción de amplificación, preferentemente una

reacción de PCR (incluyendo LATE-PCR), que incluye aparear y extender ese cebador marcado; y o bien durante la amplificación (detección en tiempo real) o bien tras terminar la amplificación (o bien una detección de punto final al terminar la reacción de amplificación o bien durante un análisis térmico posterior (curva de fusión)) excitando el tinte y detectando la emisión de fluorescencia a partir del fluoróforo, o bien solo o bien en combinación con detectar emisión de fluorescencia a partir del tinte. Mediante un diseño de protocolo de amplificación apropiado, puede incluirse un análisis de fusión de productos bicatenarios en puntos deseados en una reacción de amplificación. En esta realización sólo fluorescerán los cebadores que estén incorporados en ADN bicatenario. Los cebadores no incorporados no fluorescerán, de modo que no hay necesidad de separar físicamente los cebadores no unidos. El procedimiento es homogéneo. Además, la emisión de fluoróforo sólo procede de regiones bicatenarias de productos que incluyen un cebador marcado, no de todos los productos bicatenarios. El ejemplo 1 a continuación demuestra estas mejoras. Muestra que en un ciclo de una única extensión destinado a producir productos de extensión mixtos de diversas longitudes, una curva de fusión basada en la detección de emisiones a partir del fluoróforo del cebador mostró todos los productos, mientras que una curva de fusión basada en la detección de emisiones a partir del tinte no lo hizo. El ejemplo 1 también demuestra la utilización del procedimiento de esta realización en reacciones isotérmicas.

Tal como apreciará un experto en la materia, generalmente es importante corregir para compensar el solapamiento de fluorescencia cuando se utiliza un tinte de ADN fluorescente, por ejemplo SYBR Green I, junto con una sonda o cebador marcado de manera fluorescente que se excita mediante FRET a partir del tinte intercalado. Se da este caso porque los tintes de ADN fluorescentes emiten normalmente luz a través de una amplia gama espectral que puede incluir la longitud de onda de la luz utilizada para medir la fluorescencia emitida por el cebador o la sonda. La corrección deseada puede lograrse: 1) estableciendo el espectro de emisión del tinte solo; 2) midiendo la intensidad de la emisión del tinte en cada muestra a una longitud de onda que es más corta que la longitud de onda de emisión del cebador o la sonda; 3) calcular la intensidad de la emisión del tinte a la misma longitud de onda de emisión del cebador o la sonda con el conocimiento de las etapas 1 y 2; y 4) restar la intensidad de tinte calculada de la intensidad total medida a la longitud de onda de emisión del cebador o la sonda. Muchas máquinas comerciales, tales como el instrumento ABI 7700 y el ciclador Cepheid Smart Cycler proporcionan software para llevar a cabo esta corrección. Alternativamente pueden realizarse las mediciones de espectro del tinte, emisión de tinte solo, y emisión total de tinte/sonda y puede aplicarse manualmente una fórmula satisfactoria para la corrección. Por ejemplo, Lee y Fuerst, solicitud de patente publicada estadounidense con el nº de publicación US 2002/011945 describen una fórmula de este tipo para la medición y corrección manual de solapamiento de fluorescencia de SYBR Green I en el ciclador Light Cycler.

Todos los ejemplos descritos en esta solicitud se llevaron a cabo en el instrumento ABI 7700 y se utilizó el software de la máquina para corregir para compensar el solapamiento de fluorescencia en todos los casos en los que se utilizó un tinte de ADN fluorescente junto con un cebador o sonda fluorescente indirectamente excitado, independientemente de si se registró la fluorescencia del tinte solo.

Para amplificaciones mediante PCR utilizando un único par de cebadores, en el que por lo menos un cebador está marcado con fluoróforo para su excitación indirecta tal como se describió anteriormente, un análisis de curva de fusión según esta realización puede distinguir entre el/los producto(s) pretendido(s) y productos no específicos. Para amplificaciones mediante PCR multiplexadas utilizando múltiples pares de cebadores, en los que por lo menos un miembro de cada par está marcado con fluoróforo y se utiliza un fluoróforo diferente para cada par, pueden distinguirse diferentes productos pretendidos mediante el color y mediante las temperaturas de fusión asociados con los diferentes fluoróforos. Para amplificaciones mediante PCR generalmente pueden monitorizarse la(s) emisión/emisiones de fluoróforo y las emisiones de tinte durante la reacción para realizar un seguimiento de la acumulación de producto(s) específico(s) y para realizar un seguimiento de la acumulación de productos bicatenarios, respectivamente.

Los análisis de reacciones de amplificación pueden utilizar la razón de emisiones de fluoróforo, una señal específica para cebadores o sondas hibridados, con respecto a la señal de emisión de tinte, que no es específica. Tal razón, por ejemplo, corrige para compensar variaciones entre reacciones repetidas. Además, análisis pueden utilizar el pico de fusión de cebador-molde, cuya magnitud disminuye a medida que se incorpora cebador marcado en producto o productos de extensión.

Esta invención incluye kits de amplificación y kits parciales que incluyen un tinte de ADN fluorescente, por lo menos un par de cebadores que incluye un cebador marcado con un fluoróforo que se excita indirectamente cuando se excita el tinte, y reactivos para amplificar la región definida por los cebadores, preferentemente mediante LATE-PCR.

Otra realización de un procedimiento según esta invención incluye añadir a una mezcla de amplificación de ácidos nucleicos un tinte de ADN fluorescente, tal como SYBR Green I o, preferentemente, SYBR Gold, y por lo menos una sonda de hibridación de baja T_m o superbaja T_m , de discriminación de alelos, extinguida, indirectamente excitable, que puede ser una sonda de esta invención. Las sondas de discriminación de alelos de esta invención son el tipo de sondas bicatenarias descritas por Li, Q. *et al.* (2002), "A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization", Nucl. Acid Res. 30: (2)e5 (una cadena de sonda oligonucleotídica lineal marcada con fluoróforo complementaria a la diana, y una cadena complementaria marcada con agente de extinción

que es más corta que la cadena de sonda, generalmente en 2-10 nucleótidos), excepto porque están marcadas con un fluoróforo que se excita indirectamente excitando el tinte, y porque presentan una baja temperatura de fusión adecuada para su utilización en amplificaciones mediante LATE-PCR como sondas de baja T_f o superbaja T_f . La capacidad de discriminación de alelos de sondas bicatenarias puede ajustarse tal como se describió por Li *et al.*, al igual que el nivel de fluorescencia de fondo. Además, la fluorescencia de fondo puede reducirse incluyendo residuos de guanidina adyacentes al resto fluorescente, denominado "extinción mediante G".

Los procedimientos de esta realización incluyen la amplificación utilizando tal mezcla y detección a una temperatura a la que la sonda se hibrida de una manera de discriminación de alelos. Las formas de realización preferidas incluyen utilizar una etapa de detección a baja temperatura durante la fase de amplificación lineal de una reacción de LATE-PCR en la que las sondas anteriores se hibridan con el amplicón monocatenario que está sintetizándose, excitar el tinte de ADN fluorescente a una longitud de onda que no excita el fluoróforo o fluoróforos directamente, y leer la fluorescencia a partir del fluoróforo de sonda o fluoróforos de sondas, que se excita o excitan indirectamente de esta manera. Otras formas de realización incluyen la amplificación seguida por una detección a baja temperatura como determinación de punto final. Algunas formas de realización incluyen además detectar la emisión a partir del tinte, y determinadas formas de realización preferidas incluyen calcular una razón de emisión de sonda(s) con respecto a emisión de tinte. La detección de la emisión de tinte se realiza todavía más preferentemente al comienzo de la etapa de detección, mientras que la temperatura de la mezcla de reacción está por encima de las temperaturas de fusión de todas las sondas que están presentes. Pueden utilizarse datos de moléculas bicatenarias en acumulación o acumuladas (la señal de tinte) y de moléculas monocatenarias en acumulación o acumuladas (la señal de cada sonda) para construir razones de la manera descrita. Los procedimientos de esta realización también incluyen la utilización de sondas de baliza molecular de baja temperatura, tal como se describe en la solicitud publicada WO 03/054233, si se estimula el marcador de fluoróforo mediante emisión a partir del tinte pero no mediante la longitud de onda utilizada para excitar el tinte.

Aún otra realización de un procedimiento según esta invención incluye añadir a una mezcla de reacción de amplificación no simétrica, preferentemente una mezcla de reacción de LATE-PCR, reactivos de detección que comprenden un tinte de ADN fluorescente tal como SYBR Gold y por lo menos una sonda de hibridación lineal monocatenaria que tolera apareamiento erróneo que es perfectamente complementaria a una secuencia diana de amplicón monocatenario posible que puede o no está presente para la amplificación en la reacción y es menos que perfectamente complementaria a por lo menos otra secuencia diana de amplicón monocatenario posible que puede estar presente. Las sondas útiles en esta realización son monocatenarias marcadas con un fluoróforo que puede excitarse indirectamente mediante emisión de fluorescencia a partir del tinte. Son sondas de baja T_f o, preferentemente, superbaja T_f con respecto a sus dianas posibles más complementarias que pueden estar presentes, lo que generalmente significa diana perfectamente apareada. Resulta preferido que presenten una $T_{[10]}$ frente a una diana perfectamente complementaria que no sea más de unos pocos grados superior, y preferentemente por debajo de, más preferentemente por lo menos 5°C por debajo de, la temperatura de apareamiento de cebadores durante la fase de amplificación exponencial de la reacción de amplificación. Las sondas pueden ser sondas lineales (o espirales al azar), o sondas espirales al azar según esta invención, es decir, se extinguir para eliminar la señal debida a la formación de estructura secundaria a bajas temperaturas. Las sondas lineales extinguidas según esta invención presentan preferentemente un fluoróforo en un extremo y un resto de extinción no fluorescente en el otro extremo, sustituyendo el que está en el extremo 3' de la sonda a caperuza de fosfato añadida de otro modo para impedir que la sonda se extienda, es decir, funcione como un cebador.

Esta realización comprende someter la mezcla anterior a amplificación no simétrica, preferentemente LATE-PCR, para generar moléculas de amplicón monocatenario y someter la mezcla de reacción de amplificación a un análisis térmico utilizando por lo menos una sonda que tolera apareamiento erróneo que señala tras la hibridación. El análisis térmico puede realizarse no sólo tras completarse la reacción de amplificación sino también durante una etapa de detección a baja temperatura de LATE-PCR durante ciclos térmicos en los que está produciéndose producto monocatenario, es decir, tras agotarse el cebador limitante. El análisis térmico revela dianas de cada sonda según las temperaturas de fusión de los híbridos de sonda-diana que se forman o desestabilizan a medida que se reduce o se aumenta la temperatura, respectivamente. A medida que se reduce la temperatura, en primer lugar una sonda se hibridará con su diana perfectamente apareada (si está presente) y emitirá una señal fluorescente. A medida que se reduce adicionalmente la temperatura, la sonda se hibridará sucesivamente con dianas progresivamente con "más apareamiento erróneo" y emitirá una señal fluorescente aumentada en cada ocasión. Tal como se explicó con relación a formas de realización anteriores, también puede detectarse la emisión a partir del tinte de ADN fluorescente, preferentemente cuando las sondas no están hibridadas, es decir, a una temperatura por encima de la T_f de la(s) sonda(s), para permitir la monitorización de la acumulación de moléculas bicatenarias en la reacción y para permitir la utilización de razones para reducir la dispersión entre muestras repetidas.

Los procedimientos según esta invención que utilizan una etapa de detección a baja temperatura de ensayos de LATE-PCR, preferentemente una etapa de detección a baja temperatura tras la extensión de cebadores y antes de la fusión de cadenas, incluyen ensayos de sondas multiplexados que contienen más de un par de cebadores y generan uno o más amplicones monocatenarios (una sonda para cada diana) así como ensayos de múltiples sondas que contienen por lo menos una sonda para múltiples dianas. Determinados procedimientos preferidos con una etapa de detección a baja temperatura incluyen una etapa de detección a baja temperatura tras la extensión de

cebadores y antes de la fusión de cadenas. Durante la etapa de detección en tales ensayos la temperatura puede disminuir hasta 30°C o incluso 40°C por debajo de la temperatura de apareamiento de cebadores, proporcionando un gran intervalo de temperatura para la detección. Las sondas de discriminación de alelos, además de poder diferenciarse por el color (longitud de onda de emisión de fluoróforo) pueden diferenciarse por diferencias en la temperatura de fusión. Por ejemplo, pueden distinguirse cuatro sondas de discriminación de alelos marcadas con FAM diferentes con T_f de 30, 35, 40 y 45°C, respectivamente, frente a sus dianas en tiempo real o tras la amplificación como una determinación de punto final, a medida que se reduce o se aumenta la temperatura de reacción, no sólo mediante análisis de fusión tras la amplificación. Este grado añadido de libertad multiplica significativamente el número de sondas diferentes que pueden utilizarse en la misma reacción. Las sondas que toleran el apareamiento erróneo presentarán T_f inferiores frente a dianas con apareamiento erróneo que frente a dianas perfectamente apareadas. Las combinaciones de sondas que toleran apareamiento erróneo de baja temperatura de colores diferentes que señalizan tras la hibridación produce patrones de curvas de emisión de fluorescencia dependientes de la temperatura durante la detección a baja temperatura. Procedimientos según esta invención incluyen la utilización de tales curvas de emisión, curvas derivadas y razones de cualquiera de ellas a una temperatura o a diferentes temperaturas para identificar los constituyentes de dianas mixtas con análisis de fusión tras la amplificación y también en tiempo real monitorizando la fluorescencia a diversas temperaturas dentro del intervalo de la etapa de detección a baja temperatura de LATE-PCR. Las razones pueden incluir de sonda/sonda iguales, razones de sonda/sonda diferentes, razones de sonda/tinte, y combinaciones de las mismas.

La presente invención incluye procedimientos mejorados para preparar los productos de amplificación de amplificaciones mediante LATE-PCR para reacciones de secuenciación, o bien secuenciación didesoxi o bien procedimientos de secuenciación mediante síntesis tales como pirosecuenciación. En particular, se ha demostrado la generación y preparación de tales materiales de partida en un único recipiente de reacción, por ejemplo, un tubo de microcentrifugadora. Las formas de realización preferidas incluyen en la mezcla de reacción de LATE-PCR un reactivo para inhibir el cebado erróneo, todavía más preferentemente un reactivo dado a conocer en la solicitud de patente provisional estadounidense nº 60/619.620, titulada "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification". Para la secuenciación didesoxi se ha demostrado preparar productos de amplificación mediante LATE-PCR para la secuenciación mediante la etapa única de dilución de muestra, un procedimiento que se denomina "diluir y listo". Para la pirosecuenciación, se han demostrado procedimientos que sólo requieren la adición de reactivos de enzima/sustrato de pirosecuenciación a la mezcla de productos de LATE-PCR antes del apareamiento de cebadores.

Los procedimientos según esta invención también incluyen la amplificación mediante LATE-PCR y la preparación de muestras para la pirosecuenciación en el mismo recipiente, tal como el mismo tubo de reacción o la misma cámara de dispositivo de microfluído, todos los cuales se denominan para abreviar procedimientos "en un único tubo". En la pirosecuenciación tradicional, se amplifica el ADN mediante PCR simétrica en la que se marca en 5' un cebador con una molécula de biotina. Tras la amplificación, se utilizan perlas recubiertas con estreptavidina junto con equipo de vacío o magnético para aislar ADN monocatenario (ADNmc) y eliminar mediante lavado componentes residuales de la reacción de PCR que interfieren con la pirosecuenciación incluyendo pirofosfato (PPi), dNTP y cebadores de PCR. Gracias a su capacidad para generar ADNmc, LATE-PCR elimina la necesidad de separación de cadenas y simplifica la preparación de muestras cuando se combina con un procedimiento en el mismo recipiente para eliminar los cuatro componentes que interfieren que quedan de la PCR. En un procedimiento de este tipo, se minimiza la necesidad de eliminar dNTP que permanecen al final de la amplificación utilizando cantidades limitantes de dNTP en la mezcla de reacción de amplificación mediante LATE-PCR, teniendo cuidado de utilizar una cantidad suficiente para producir bastante ADNmc para su pirosecuenciación. Se añade una enzima con actividad pirofosfatasa, por ejemplo una pirofosfatasa tal como pirofosfatasa de levadura, al producto de amplificación para eliminar PPi y se calienta la mezcla para desnaturar esa enzima antes de proceder a la pirosecuenciación. Dado que no permanece cebador limitante tras la amplificación mediante LATE-PCR y el cebador en exceso residual no puede cebar la cadena extendida a partir del cebador en exceso durante la amplificación (cadena de cebador en exceso), no se necesita eliminar los cebadores restantes en muchos casos. Sin embargo, puede evitarse el posible cebado erróneo incluyendo en la mezcla de reacción de LATE-PCR un oligonucleótido que se hibrida con el cebador en exceso a temperaturas por debajo de la T_f del cebador en exceso, incluyendo la temperatura utilizada para la pirosecuenciación. Alternativamente, puede añadirse un oligonucleótido bloqueado para la extensión en el extremo 3' y completamente complementario al cebador en exceso tras la amplificación mediante LATE-PCR pero antes de la pirosecuenciación para evitar el posible cebado erróneo por el cebador en exceso a temperaturas utilizadas para la pirosecuenciación. Una tercera estrategia para evitar el cebado erróneo por el cebador en exceso en el extremo 3' de la cadena extendida a partir del cebador limitante durante la amplificación (cadena de cebador limitante) implica utilizar una concentración suficiente de un oligonucleótido bloqueado en 3' que contiene la misma secuencia que el cebador en exceso para ser más competitivo que el cebador en exceso por los sitios de unión.

El procedimiento más preferido de preparación de muestras "en un único tubo" evita la necesidad de determinar concentraciones de dNTP limitantes apropiadas para amplificaciones particulares. En este procedimiento se añaden en primer lugar reactivos de enzima/sustrato de pirosecuenciación al producto de LATE-PCR, lo que elimina los dNTP y PPi. Se continúa esto con el apareamiento de cebadores utilizando un cebador de secuenciación añadido y después se añaden dNTP individuales para la pirosecuenciación. Alternativamente, pueden eliminarse dNTP mediante adición de una enzima purificada con actividad dNTPasa, tal como apirasa de patata, seguido por

calentamiento para inactivar la enzima y puede eliminarse el pirofosfato mediante adición de una enzima purificada con actividad pirofosfatasa, tal como pirofosfatasa de levadura, seguido por calentamiento para inactivar la enzima. Si se utilizan ambas enzimas pueden añadirse al mismo tiempo.

Los ensayos según esta invención, particularmente ensayos de LATE-PCR, incluyen preferentemente unos medios para evitar el cebado erróneo, que pueden provocar una disminución en la señal de la sonda en las últimas fases de la reacción. Se ha evitado satisfactoriamente el “efecto gancho” incluyendo en la mezcla de reacción un reactivo de supresión de cebado erróneo dado a conocer en la solicitud de patente provisional estadounidense descrita anteriormente. También se ha evitado ese efecto ajustando la concentración de polimerasa añadida a la reacción. Puede observarse la disminución de cebado erróneo ajustando la polimerasa en cuanto a la cinética de la reacción de LATE-PCR utilizando una sonda del ADNmc, así como mediante la composición del producto final revelado mediante diversos medios conocidos en la materia.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La figura 1 representa la utilización de cebadores marcados de manera fluorescente según los procedimientos de la invención para análisis de curvas de fusión.

La figura 2 representa la reducción de dispersión de señal mediante la utilización de razones de producto monocatenario con respecto a producto bicatenario según los procedimientos de la invención.

La figura 3 representa la comparación de identificación de cinco especies de *Mycobacteria* mediante análisis de curvas de fusión obtenidos o bien con sondas que toleran apareamiento erróneo convencionales frente al gen de ARN ribosómico 16S o bien con dos versiones diferentes de sondas que toleran apareamiento erróneo extinguidas frente a la misma diana diseñadas según los procedimientos de la invención.

La figura 4 representa la identificación de cinco especies de *Mycobacteria* utilizando únicamente dos sondas que toleran apareamiento erróneo frente al gen de ARN ribosómico 16S según los procedimientos de la invención.

La figura 5 representa la identificación de cinco especies de *Mycobacteria* mediante análisis de primera derivada de curvas de fusión mostradas en la figura 3 utilizando dos sondas que toleran apareamiento erróneo frente al gen de ARN ribosómico 16S concebidas según los procedimientos de la invención.

La figura 6 representa la identificación de cinco especies de *Mycobacteria* utilizando razones de señales fluorescentes recogidas a diferentes temperaturas a partir de dos sondas que toleran apareamiento erróneo frente al gen de ARN ribosómico 16S según los procedimientos de la invención.

La figura 7 representa el genotipado de punto final de representas homocigotas y heterocigotas para la mutación G269 del gen HexA humano utilizando LATE-PCR y una única sonda que tolera apareamiento erróneo de baja T_f frente al alelo de tipo natural según los procedimientos de la invención.

La figura 8 representa la identificación separada de tres alelos diferentes del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) humano utilizando LATE-PCR, sondas de baja T_f de discriminación de alelos marcadas con el mismo color, y análisis de primera derivada de curvas de fusión.

La figura 9 representa la identificación simultánea de diferentes combinaciones de diversos alelos del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) humano utilizando sondas de baja T_f de discriminación de alelos marcadas con el mismo color, y análisis de primera derivada de curvas de fusión.

La figura 10 representa la identificación de diferentes combinaciones de alelos del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) humano trazando los cambios de fluorescencia a dos temperaturas recogidos según los procedimientos de la invención.

La figura 11 representa ensayos de normalización a dos temperaturas (con corrección de fondo).

La figura 12 representa ensayos de normalización a dos temperaturas (sin corrección de fondo).

La figura 13 representa ensayos de normalización a tres temperaturas.

La figura 14 representa una comparación del procedimiento “diluir y listo” de preparación de representas de LATE-PCR para la pirosecuenciación según los procedimientos de la invención con respecto al procedimiento convencional de preparación de representas de LATE-PCR para el mismo ensayo.

La figura 15 son pirogramas obtenidos a partir de células individuales preparadas mediante el procedimiento de LATE-PCR en un único tubo. Las flechas indican el sitio de β -globina IVS 110 de células: a) homocigotas de tipo natural, b) heterocigotas y c) mutantes homocigotas.

La figura 16 es el pirograma de una reacción de pirosecuenciación llevada a cabo para más de cincuenta pares de bases. El orden de dispensación de nucleótidos se indica debajo de cada pico y la secuencia esperada se indica encima.

La figura 17 son cromatogramas de secuenciación didesoxi resultantes del procedimiento "diluir y listo" de preparación de representas de LATE-PCR para la secuenciación didesoxi según los procedimientos de la invención y del procedimiento convencional de preparación de representas de LATE-PCR para el mismo ensayo.

La figura 18 es un gel de electroforesis de una amplificación mediante LATE-PCR de más de un producto del mismo molde de ADN en la misma reacción.

La figura 19 son cromatogramas de la secuenciación didesoxi diluir y listo del producto de la amplificación mediante LATE-PCR de la figura 18.

La figura 20 representa que la cantidad de ADNmc y ADNbc generado mediante una amplificación mediante LATE-PCR puede medirse de manera independiente y puede utilizarse para calcular la razón de ADNmc/ADNbc que, a su vez, puede utilizarse para determinar si la cantidad de ADNmc acumulado hasta el momento es suficiente para la secuenciación posterior mediante el procedimiento "diluir y listo".

La figura 21 son cromatogramas de secuenciación didesoxi resultantes del procedimiento "diluir y listo" utilizado en una mezcla 50:50 de amplicones de LATE-PCR que presentan dos secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes.

La figura 22 representa el intervalo de sensibilidad de amplicones de LATE-PCR mixtos que presentan secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes, que pueden distinguirse mediante el procedimiento "diluir y listo".

La figura 23 representa que puede utilizarse una LATE-PCR junto con por lo menos una única sonda que tolera el apareamiento erróneo para generar curvas de fusión de punto final que, a su vez, pueden utilizarse para cuantificar las cantidades relativas de dos o más amplicones de LATE-PCR mixtos que presentan secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes.

La figura 24 representa la cinética de varios ensayos de LATE-PCR llevados a cabo utilizando dos concentraciones diferentes de Taq polimerasa con cada una de tres cantidades diferentes de ADN genómico.

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

Descripción detallada

La presente invención incluye los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo ensayos de PCR, que incluyen la detección de la emisión de fluorescencia a partir de por lo menos un cebador marcado con fluoróforo que está excitado, no directamente aplicando luz (visible o no) de una longitud de onda fuertemente absorbida por el fluoróforo, sino indirectamente aplicando luz de una longitud de onda que excita un tinte de ADN fluorescente próximo tal como SYBR Green o, preferentemente, SYBR Gold, así como kits completos y parciales que contienen todos o algunos de los reactivos de amplificación y conjuntos de oligonucleótidos que contienen tales cebadores marcados, y también los propios cebadores.

Son bien conocidos los cebadores de amplificación. Los cebadores según esta invención son oligonucleótidos cortos, generalmente de menos de cincuenta bases de longitud que se hibridan con una cadena diana y se extienden mediante una polimerasa apropiada. Un cebador puede estar compuesto por oligonucleótidos que se producen de manera natural, o puede incluir nucleótidos no naturales y enlaces entre nucleótidos no naturales. Aunque los cebadores son generalmente oligonucleótidos lineales, pueden incluir una estructura secundaria. (Véase, por ejemplo, Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ (1997), "A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based on Energy Transfer", Nucleic Acids Res. 25:2516-2521). Las amplificaciones incluyen a menudo la utilización de uno o más pares de cebadores que consisten cada uno en un cebador directo y un cebador inverso. En los procedimientos, kits y conjuntos de oligonucleótidos según esta invención, o bien un cebador de un par o bien ambos cebadores del par pueden estar marcados con un fluoróforo unido covalentemente que fluoresce cuando se estimula un tinte de ADN fluorescente próximo. Cuando el cebador marcado se hibrida (o se aparea) con su secuencia complementaria en una cadena molde, se forma una región bicatenaria. El tinte de ADN fluorescente se asocia con esa región, intercalándose en la misma o de otra forma, y pasa a ser fluorescente en esa región, que está próxima al fluoróforo del cebador de manera que cuando se estimula el tinte a una longitud de onda que no excita directamente el fluoróforo, el fluoróforo emite a una longitud de onda característica. Estos cebadores pueden

utilizarse para monitorizar la síntesis de productos que resultan por extensión de una ADN polimerasa tales como los que resultan de ensayos de PCR y extensión del cebador en tiempo real o mediante detección de punto final y/o para evaluar la especificidad del producto mediante análisis de la curva de fusión.

Los cebadores según esta invención, utilizados como sustrato para la extensión mediante una ADN polimerasa, incluyendo cebadores para amplificación mediante PCR (simétrica o no simétrica, incluyendo particularmente LATE-PCR), están marcados en cualquier posición de nucleótido con un fluoróforo unido covalentemente de manera que el extremo 3' del cebador de oligonucleótido sigue estando disponible para la extensión. Los cebadores pueden presentar el diseño de sondas bicatenarias descrito por Li, Q. *et al.* (2002) ("A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization", Nucl. Acid Res. 30: (2)e5). La única limitación de secuencia en el oligonucleótido del cebador es que el oligonucleótido no debe presentar ninguna estructura secundaria que por sí misma conduzca a una excitación indirecta del fluoróforo, lo que significa que generalmente no hay ninguna estructura secundaria mayor de 2 pares de bases. El resto de fluoróforo no debe excitarse de manera apreciable directamente, aunque el tinte debe excitarse directamente, por la longitud de onda de la fuente de excitación utilizada; el fluoróforo debe emitir cuando el tinte de ADN fluorescente se excita en su inmediata presencia, generalmente no mayor que una distancia a la que el fluoróforo experimenta transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET); y el espectro de emisión del fluoróforo elegido debe poder distinguirse del espectro de emisión del tinte de ADN fluorescente o bien mediante la utilización de filtros o bien deconvolución espectral. En estas condiciones, el fluoróforo fluoresce tras su incorporación en un producto bicatenario tras el apareamiento del cebador, incluyendo extensión por una ADN polimerasa. La pérdida de fluorescencia tiene lugar durante el calentamiento cuando se alcanza la temperatura de fusión (T_f) del tramo particular de ADN bicatenario que contiene el fluoróforo.

Las condiciones para la utilización de los cebadores según esta invención conjuntamente con tintes de ADN fluorescentes (concentración de cebador y tinte de ADN, longitud de onda de excitación del tinte de ADN) son iguales que las conocidas en la materia para monitorizar la síntesis de productos de reacciones de extensión del cebador (incluyendo PCR) en el transcurso de la reacción y para evaluar la especificidad del producto de extensión mediante análisis de la curva de fusión utilizando sólo tintes de ADN fluorescentes con la excepción de que la fluorescencia se recoge a la longitud de onda de emisión correspondiente al primer fluoróforo en lugar de o además de la longitud de onda de emisión del tinte. En estas condiciones, las señales de fluorescencia se originan a partir de secuencias bicatenarias que contienen los cebadores, en vez de todas las secuencias bicatenarias en la reacción.

La comparación del rendimiento del tinte de ADN con procedimientos y sistemas según esta invención se realizó mediante el experimento notificado a continuación en el ejemplo 1 y en la figura 1. Un cebador marcado con fluoróforo se extendió mediante una ADN polimerasa en presencia de tinte SYBR Green y en presencia de un oligonucleótido no extensible relativamente largo hibridado con la cadena molde cerca de la región de extensión del cebador. Esto dio como resultado una mezcla de productos que presenta híbridos cadena molde-cebador no extendido, productos de extensión del cebador cortos y el oligonucleótido no extensible, de manera que los híbridos con el molde presentan T_f comprendida entre 60°C (el cebador marcado con fluoróforo (Cy5)) y 79°C (el oligonucleótido no extensible), encontrándose los productos de extensión del cebador entre esas dos T_f .

Se realizó un análisis de la curva de fusión convencional en la mezcla de reacción final (muestras duplicadas) utilizando tanto lecturas de fluorescencia del tinte como lecturas de fluorescencia del fluoróforo. Las curvas de fusión se presentan en la figura 1. El panel A es la curva de fusión 1 obtenida utilizando las emisiones del tinte. El único pico está a 79°C, la temperatura de fusión del oligonucleótido no extensible. No se observa ningún otro pico, ni siquiera el del cebador no extendido. El panel A demuestra la migración del tinte SYBR Green al híbrido de T_f superior durante la generación de una curva de fusión, que enmascara la presencia de híbridos de T_f inferior. El panel B es la curva de fusión 2 obtenida utilizando las emisiones del fluoróforo. Muestra un pico a 60°C, la T_f del híbrido cebador no extendido-molde, y un pico adicional a una temperatura entre 69°C y 79°C, es decir, un pico indicativo de un producto de extensión del cebador. Se observan las T_f inferiores a pesar de la tendencia del tinte a migrar, tal como se muestra mediante la curva de fusión 1. La monitorización de la emisión del fluoróforo según esta invención revela que cada especie de híbrido marcado con el fluoróforo en la mezcla está en su concentración correcta.

En el caso de amplificaciones mediante PCR que utilizan un único par de cebadores, en las que por lo menos un miembro del par es un cebador según esta invención, el análisis de la curva de fusión puede distinguir entre productos específicos y no específicos utilizando un único fluoróforo debido a que el producto específico presenta una temperatura de fusión esperada y el producto no específico presenta una temperatura de fusión no esperada. En el caso de amplificaciones mediante PCR múltiples, que utilizan más de un par de cebadores, en las que por lo menos un miembro de cada par de cebadores es un cebador según esta invención, pueden distinguirse entre sí dos productos específicos diferentes o bien porque presentan valores de T_f diferentes, aunque esperados y/o bien porque los dos cebadores diferentes utilizados están marcados con diferentes fluoróforos. Además, el análisis de la curva de fusión utilizando cebadores según esta invención puede llevarse a cabo durante una reacción de amplificación en curso o al final de una reacción.

También puede utilizarse la incorporación de uno o más cebadores según esta invención durante el transcurso de

una reacción para medir cuantitativamente el grado de amplificación de una o más dianas durante el transcurso de una PCR, o la síntesis de uno o más tramos de ADN bicatenario durante el transcurso de una reacción de extensión isotérmica. En cualquier caso, la cantidad de la molécula o moléculas de producto bicatenario de longitud completa puede seguirse a lo largo del tiempo mediante detección repetida de la fluorescencia creciente, o puede medirse al final de una reacción. Además, puede utilizarse la incorporación de uno o más cebadores según esta invención durante el transcurso de o bien reacciones isotérmicas o bien reacciones de ciclado térmico para medir la existencia y/o acumulación de productos parciales, es decir, los que han comenzado la extensión a lo largo de una cadena molde pero que no han alcanzado su máxima longitud posible. En tales casos, las temperaturas de fusión de los productos parciales son inferiores a la temperatura de fusión del producto de longitud completa, pero son superiores a la temperatura de fusión del cebador marcado a partir del cual se derivan. Además, de manera concomitante con la incorporación del cebador marcado en una cadena de producto de longitud completa o parcial, la magnitud del pico de temperatura de fusión generado a partir del híbrido ADN-ADN de cebador/molde disminuye, y puede utilizarse como medición adicional de la síntesis de ADN.

Tal como se estableció anteriormente, cada tramo de amplicón o ADN bicatenario sintetizado mediante la incorporación de un cebador según esta invención genera una señal fluorescente a la longitud de onda de emisión del fluoróforo unido covalentemente del cebador, cuando se estimula indirectamente mediante FRET u otro mecanismo del tinte SYBR unido, una "señal específica de cebador". El propio ADN bicatenario genera también una señal fluorescente a la longitud de onda de emisión del tinte SYBR, la "señal de SYBR total", la suma de todas las secuencias bicatenarias presentes en la reacción, puesto que todas las secuencias bicatenarias fluorescen, independientemente de si han incorporado un cebador marcado. Por tanto, pueden utilizarse cebadores según esta invención para analizar las señales fluorescentes en cuanto a la siguiente razón: (señal específica de cebador/señal de SYBR total), a continuación en el presente documento el valor (PSS/TSS). El análisis de datos en cuanto al valor (PSS/TSS) corrige las variaciones en la señal de tinte de ADN fluorescente (TSS) entre reacciones repetidas. Esto es particularmente útil en el caso de amplificaciones mediante LATE-PCR porque la velocidad de síntesis de amplicones monocatenarios es proporcional a la cantidad de amplicón bicatenario acumulada al final de la fase exponencial de la reacción. Por tanto, pequeñas diferencias en el nivel de ADN bicatenario entre reacciones repetidas alteran la velocidad de acumulación de amplicones monocatenarios.

También es posible utilizar más de un cebador marcado con el mismo fluoróforo, siempre que los amplicones puedan diferenciarse mediante un análisis de la curva de fusión tras la amplificación. Véase la figura 1, panel B, para un ejemplo de este principio. La señal procedente del fluoróforo común al final de una etapa de extensión, que puede ser la etapa de extensión final (punto final), o etapas de extensión intermedias, proporciona una indicación de los amplicones totales que incorporan el fluoróforo. El análisis de la curva de fusión distingue entre productos y proporciona una medición cuantitativa de sus concentraciones.

La LATE-PCR es una amplificación mediante PCR no simétrica que, entre otras ventajas, proporciona un "espacio de temperatura" grande en el que pueden emprenderse acciones. Véase el documento WO 03/054233 y Sanchez *et al.* (2004), citado anteriormente. La LATE-PCR permite la utilización de sondas de hibridación de "baja T_f " y "superbaja T_f " para detectar productos de amplificación ("amplicones") que son monocatenarios. Pueden utilizarse con LATE-PCR diversos tipos de sondas que son específicas de una única diana en un ensayo particular, incluyendo sondas de discriminación de alelos que pueden discriminar un único apareamiento erróneo de pares de bases, tales como sondas de baliza molecular que realizan discriminación de alelos, como sondas de baja T_f y superbaja T_f , como pueden ser sondas que toleran apareamiento erróneo tales como sondas lineales (espiral al azar) o sondas de baliza molecular que toleran apareamiento erróneo que presentan un fluoróforo indirectamente excitable mediante emisión a partir de un tinte SYBR. Se ha ideado una nueva clase de sondas de discriminación de alelos útiles como sondas de baja T_f y superbaja T_f en ensayos de LATE-PCR que permiten la determinación de las razones monocatenario/bicatenario dentro de una reacción, como pueden ser sondas de baliza molecular de discriminación de alelos marcadas con un fluoróforo de este tipo.

Las sondas de discriminación de alelos según esta invención son sondas extinguidas de discriminación de alelos, bicatenarias, según Li, Q. *et al.* (2002), Nucl. Acid Res. 30: (2)e5). Presentan las siguientes modificaciones: están marcadas con un fluoróforo que puede excitarse indirectamente excitando un tinte fluorescente de ADN bicatenario tal como SYBR Green o SBYR Gold pero que no puede excitarse directamente mediante la longitud de onda utilizada para estimular el tinte (en este sentido, similar a los cebadores tratados anteriormente), y se construyen para que sean sondas de baja T_f o superbaja T_f . Cuando no está unida a su secuencia diana, una sonda de este tipo se une a un oligonucleótido complementario más corto. Se prefiere que el oligonucleótido complementario incluya un extintor tal como Dabcyl o un extintor Black Hole™ para reducir la fluorescencia de fondo de la sonda. Alternativamente o además, la fluorescencia de fondo puede reducirse incluyendo residuos de guanidina adyacentes al fluoróforo (extinción de G). En presencia de una cadena diana totalmente complementaria, la cadena complementaria más corta se desplaza, la cadena marcada con fluoróforo más larga se hibrida con la diana y el fluoróforo pasa a estar no extinguido y pueden recibir energía del tinte de modo que fluoresce a su longitud de onda característica. Pueden utilizarse varias de estas sondas para diferentes dianas, marcadas con diferentes fluoróforos, para ensayos múltiples.

Tales sondas de discriminación de alelos están diseñadas para presentar una temperatura de fusión ajustada a la

concentración, $T_{f[0]}$, en el ensayo que produce una baja T_f o superbaja T_f . La $T_{f[0]}$ del híbrido sonda-diana se determina de manera conveniente y se ajusta de manera empírica, aunque puede utilizarse un valor calculado por lo menos como buen punto de partida para minimizar el ajuste. La longitud y concentración de la cadena de sonda complementaria en relación con la cadena marcada con fluoróforo se ajustan de manera empírica para lograr una discriminación de alelos máxima. Se comienza con una longitud de 1-3 nucleótidos más corta que la cadena marcada con fluoróforo y una concentración de 1-1,2 veces la concentración de la cadena marcada con fluoróforo.

En un ensayo de LATE-PCR, estas sondas de discriminación de alelos se utilizan en una etapa de detección a baja temperatura, preferentemente tras la etapa de extensión del cebador en ciclos tras el agotamiento del cebador limitante. Para lecturas en tiempo real a lo largo de múltiples ciclos, se excita el tinte SYBR y se lee la fluorescencia tanto del tinte como del fluoróforo (o fluoróforos). Se prefiere leer la señal del tinte durante o a la conclusión de la etapa de extensión de la PCR cuando la temperatura está por encima de la T_f de la sonda (o sondas), y leer la emisión del fluoróforo durante la etapa de detección a baja temperatura cuando se hibridan las sondas (o bien una sonda de discriminación de alelos según esta invención o bien una sonda de baliza molecular apropiadamente marcada). Entonces se determina la razón de fluorescencia de cada sonda con respecto a la señal de SYBR total. Esta razón minimiza las diferencias entre ensayos repetidos debidas a diferencias en la acumulación de producto. Debido a que tales razones se minimizan, tales razones pueden utilizarse también para análisis de punto final.

La utilización de razones de producto monocatenario con respecto a producto bicatenario permitidas por cebadores y sondas según esta invención es una técnica para reducir la dispersión entre ensayos repetidos, tal como se ha establecido. Esto es particularmente importante para ensayos de punto final, que no revelan la cinética de la reacción. Un ejemplo es un ensayo de LATE-PCR para distinguir muestras homocigotas de muestras heterocigotas utilizando un par de cebadores para ambos alelos y una sonda de discriminación de alelos según esta invención. La figura 2 ilustra la reducción de la dispersión lograda cuando se aplica a una amplificación mediante LATE-PCR con una etapa de detección a baja temperatura realizada con un tinte SYBR (en este caso SYBR Gold), una sonda de discriminación de alelos para un alelo marcado con Cy5, excitación del tinte y lecturas de señales procedentes del tinte (a 72°C, la temperatura de extensión) y el fluoróforo (a 55°C, una detección a baja temperatura tras la extensión del cebador). El panel A presenta las lecturas en tiempo real del fluoróforo para las muestras homocigotas repetidas (círculo 21) y muestras heterocigotas repetidas (círculo 22). Tal como resulta evidente, la dispersión entre las repeticiones hace que la diferencia sea borrosa. El panel B, sin embargo, representa gráficamente la razón de señales de Cy5 con respecto a señales de SYBR para las muestras homocigotas (círculo 23) y muestras heterocigotas (círculo 24). La reducción de la dispersión es suficiente para permitir un ensayo de punto final.

La presente invención también incluye sondas monocatenarias lineales de baja T_f o superbaja T_f que toleran apareamiento erróneo que están marcadas, preferentemente marcadas de manera terminal, con un fluoróforo excitable mediante la emisión de un tinte de ADN fluorescente (por ejemplo, SYBR Green I o SYBR Gold) y que se extinguen para reducir la fluorescencia de fondo. Estas sondas portan un resto extintor que suprime la fluorescencia en ausencia de la diana. Las sondas lineales que toleran apareamiento erróneo presentan una tendencia a plegarse y formar regiones bicatenarias cortas a medida que desciende la temperatura. La utilización de una etapa de detección de LATE-PCR a baja temperatura agrava esta tendencia. Esto no se produce cuando la secuencia de la sonda se hibrida con la secuencia diana. Si la sonda incluye un fluoróforo que se excita mediante emisión de un tinte SYBR que está presente en la mezcla de reacción, el tinte se intercala en o se asocia de otra forma con la región bicatenaria no prevista de las moléculas de sondas no unidas y por tanto excita el fluoróforo de la sonda mediante FRET. El resultado es un aumento de la fluorescencia de fondo a baja temperatura.

La extinción de sondas que toleran apareamiento erróneo según esta invención se obtiene mediante la adición de un resto extintor, por ejemplo, un extintor DABCYL o Black Hole™ (BHQ), a la sonda en una ubicación en la que extingue la fluorescencia del fluoróforo que resulta de la estructura secundaria no prevista dentro de la sonda no unida. Se prefiere añadir el extintor en el extremo opuesto al fluoróforo siempre que sea posible. El ejemplo 2 a continuación muestra a modo de ejemplo dos técnicas posibles, simplemente añadir un extintor o construir una horquilla extinguida, es decir, una estructura secundaria concebida específicamente que aproxima el extintor estrechamente al fluoróforo, con la estructura secundaria o ambos. Preferentemente, la T_f de la estructura secundaria construida es por lo menos 5°C superior a la T_f de cualquier estructura secundaria alternativa de modo que en ausencia de diana, la mayoría de las moléculas de sondas están en la configuración de horquilla y la fluorescencia de fondo es baja. La T_f del tallo construido es inferior a la T_f de la sonda hibridada para aparearse perfectamente con la diana y similar a la T_f de la sonda hibridada con sus dianas apareadas de manera errónea, de manera que no se impide la hibridación con dianas de secuencia dentro del tallo mediante la formación del tallo.

La detección e identificación de dianas de ácido nucleico pueden lograrse utilizando una o múltiples sondas que toleran apareamiento erróneo de baja temperatura que producen señal cuando se hibridan, incluyendo sondas de baliza molecular que toleran apareamiento erróneo, sondas monocatenarias lineales que se excitan indirectamente excitando un tinte de ADN fluorescente, y sondas lineales extinguidas según esta invención. Una mezcla de sondas, para ciertas formas de realización, puede incluir también por lo menos una sonda específica de alelo según esta invención. Una técnica útil es utilizar la razón de fluorescencia de dos sondas como función de la temperatura para distinguir entre dianas que presentan una T_f similar con respecto a por lo menos una de las sondas. Algunas veces se hace referencia a curvas de una razón de este tipo como "firma de fluorescencia" de una diana.

Con LATE-PCR que incluye una etapa de detección a baja temperatura es posible combinar el efecto de temperatura de detección con el efecto de firma de fluorescencia. Se ha utilizado un ensayo con múltiples sondas que toleran apareamiento erróneo, incluyendo pero sin limitarse a sondas extinguidas, monocatenarias, indirectamente excitables según esta invención, en una amplificación mediante LATE-PCR que consiste en una etapa a alta temperatura para desnaturalizar ADN bicatenario (95°C durante 2 min.), seguida por una amplificación en fase exponencial utilizando tanto cebador limitante como cebador en exceso (30 ciclos de 95°C durante 10 s, 60°C durante 15 s y 78°C durante 40 s), seguida por la finalización de la fase exponencial y la fase lineal posterior durante la cual se incluyen etapas de detección de la sonda (40 ciclos de 95°C durante 10 s, 60°C durante 15 s, 78°C durante 40 s, 55°C durante 20 s, 50°C durante 20 s, 45°C durante 20 s y 40°C durante 20 s). Esto proporciona cuatro temperaturas de detección por debajo de la temperatura de apareamiento del cebador, 60°C. Puede monitorizarse la producción bicatenaria mediante la emisión del tinte SYBR a la temperatura de extensión del cebador, 78°C, que está por encima de la T_f de cualquier sonda. Puede monitorizarse la emisión del fluoróforo a cada baja temperatura desde 55°C hasta 40°C. Tras el último ciclo, la temperatura puede disminuirse hasta un valor bajo, por ejemplo 30°C y aumentarse lentamente para el análisis de fusión. Además de los niveles de fluorescencia detectados, pueden utilizarse las razones de fluorescencia del fluoróforo con respecto a fluorescencia del tinte y las razones de fluorescencia del fluoróforo para generar información de diferenciación de amplicones.

Algunas de las figuras son ilustrativas de técnicas que aprovechan las posibilidades anteriores. La figura 4 muestra el comportamiento de fusión de dos sondas que toleran apareamiento erróneo frente al gen de ARN ribosómico 16s de varias especies de *Mycobacteria*. Se utilizaron dos sondas: la sonda extinguida que forma una horquilla descrita en el ejemplo 2, que presenta la secuencia 5'-Cy5-CTG GAT AGG ACC ACG AGG CCA G -BHQ II-3' (SEQ. ID No. 2) y una sonda marcada con TAMRA que presenta la secuencia 5'-G CAT GTC TTG TGG TGG-TAMRA-3' (SEQ. ID No. 3). Se encontró que esta última sonda, que no estaba extinguida, producía señales discernibles por encima del fondo para varias especies. El panel A de la figura 4 presenta curvas de fusión para la sonda de horquilla sin diana (línea 41), *M. asiaticum* (línea 42), *M. gordonae* (línea 43), *M. heidelbergense* (línea 44), *M. malmoense* (línea 45) y *M. marinum* (línea 46). El panel B presenta curvas de fusión para la sonda marcada con TAMRA sin diana (línea 47), *M. asiaticum* (línea 48), *M. gordonae* (línea 49), *M. heidelbergense* (línea 50), *M. malmoense* (línea 51) y *M. marinum* (línea 52). El panel C de la figura 4 representa gráficamente la razón de fluorescencia de TAMRA con respecto a fluorescencia de Cy5, *M. asiaticum* (línea 53), *M. gordonae* (línea 54), *M. heidelbergense* (línea 55), *M. malmoense* (línea 56) y *M. marinum* (línea 57).

Otra técnica analítica consiste en representar gráficamente la tasa de cambio de fluorescencia de los fluoróforos como función de la temperatura. La figura 5 presenta tales gráficas para la sonda de horquilla extinguida marcada con Cy5 anterior según esta invención y la sonda no extinguida marcada con TAMRA, ambas descritas anteriormente. El panel A es la sonda de horquilla extinguida, y el panel B es la sonda marcada con TAMRA. Las gráficas muestran los picos de fusión para *M. asiaticum* (líneas 61, 71), *M. gordonae* (líneas 62, 72), *M. heidelbergense* (líneas 63, 73), *M. malmoense* (líneas 64, 74) y *M. marinum* (líneas 65, 75). Utilizando ambas sondas, es posible distinguir las cinco dianas mediante los picos de fusión. La sonda marcada con Cy5 pudo distinguir por sí misma *M. gordonae* (línea 62) de las otras. La sonda marcada con TAMRA pudo distinguir por sí misma cada uno de *M. asiaticum* (línea 71), *M. gordonae* (línea 72) y *M. marinum* (línea 75) entre sí. Conjuntamente, las sondas pudieron distinguir *M. heidelbergense* de *M. asiaticum*, porque *M. heidelbergense* produjo un pico alto con la sonda de Cy5 y un pico bajo con la sonda de TAMRA, mientras que *M. asiaticum* produjo lo contrario. Con una única sonda por amplicón, las alturas relativas de los picos pueden reflejar diferencias en la concentración de producto. En este caso, sin embargo, ambas sondas detectan el mismo amplicón, de modo que las alturas relativas de los picos reflejan diferencias en las características de fusión de la sonda-diana.

Otra herramienta analítica, descrita anteriormente, consiste en utilizar una o más razones de fluorescencia, tales como, en la realización particular tratada en la presente memoria, la razón de fluorescencia de TAMRA con respecto a fluorescencia de Cy5 a la misma temperatura o a diferentes temperaturas durante la PCR. Una estrategia útil para el diseño de la sonda incluye diseñar una sonda que se une a una región conservada común a múltiples especies para que sirva como referencia, o incluyendo, cuando sea necesario, la utilización de una parte de la secuencia del cebador limitante como región conservada. Esto es una opción para la LATE-PCR, porque las T_f de la sonda son muy inferiores a la T_f del cebador limitante y la temperatura de apareamiento, de modo que una sonda con una secuencia común no interfiere con la amplificación. La figura 6 muestra los resultados utilizando una combinación de razones de fluorescencia. En esta realización se utilizó como una razón los valores de fluorescencia de TAMRA/Cy5 recogidos cada uno a la temperatura de detección de 40°C y como la otra razón la razón de señales de fluorescencia de TAMRA/Cy5 recogidas a la temperatura de detección de 45°C y 55°C, respectivamente. La figura 6 representa gráficamente ambas razones en un ciclo particular, en este caso el ciclo 50. Seis repeticiones produjeron datos no solapantes para las diversas especies *M. asiaticum* (círculo 81), *M. gordonae* (círculo 82), *M. heidelbergense* (círculo 83), *M. malmoense* (círculo 84) y *M. marinum* (círculo 85).

La medición de la fluorescencia de la sonda a diferentes temperaturas durante la PCR presenta ventajas con respecto a limitar el análisis a las fusiones tras la PCR. Una ventaja es la capacidad de comparar valores de fluorescencia a un número específico de ciclos tras alcanzarse el ciclo umbral, C_T . Esto permite la utilización de razones con tintes SYBR (u otros tintes de intercalación) tal como se describió anteriormente. Otra ventaja es que

cada muestra presenta una fluorescencia de fondo medida a cada temperatura durante los ciclos antes de la detección de amplicones. Por tanto, pueden hacerse ajustes precisos para las variaciones de una muestra a otra en la fluorescencia de fondo. Es posible medir la fluorescencia a muchas temperaturas durante la PCR, proporcionando un análisis de fusión casi completo a lo largo del intervalo de temperatura en el que una sonda muestra diferencias en hibridación con diferentes dianas. El número y la duración de estas etapas dependen en parte de las capacidades del equipo de detección. La detección continua de la fluorescencia durante aumentos o disminuciones de la temperatura es posible con algunos termocicladores. No resulta necesario comenzar la detección a múltiples temperaturas hasta cierto momento poco antes de que se espere una subida inicial de la fluorescencia. La detección a múltiples temperaturas puede realizarse en cada ciclo, o a algún otro intervalo, por ejemplo cada cinco ciclos. La eliminación de múltiples etapas de detección durante los ciclos iniciales y la reducción de la frecuencia de esas etapas reduce el tiempo global requerido para completar la reacción de amplificación. Cuando se utiliza la razón de fluorescencia de la sonda con respecto a fluorescencia del tinte, la fluorescencia de la sonda se mide preferentemente a lo largo de las temperaturas a las que la sonda se hibrida con sus dianas, y la fluorescencia de SYBR se mide a temperaturas a las que las sondas no están unidas. Todavía más preferentemente, la fluorescencia de SYBR se mide a la temperatura de extensión. Puesto que la fluorescencia de la sonda aumenta a ciclos más allá del valor del ciclo umbral (C_T) mientras que la fluorescencia de SYBR alcanza una meseta, estas razones cambiarán durante la reacción de amplificación. Por tanto, es importante comparar las razones de muestras individuales a un número de ciclos específico tras el valor de C_T de cada muestra.

El análisis de productos de ADN monocatenario puede lograrse también utilizando una sonda que tolera apareamiento erróneo cuya señal se mide a más de una, por ejemplo dos o tres, temperaturas diferentes. Los datos resultantes pueden tratarse entonces como razones utilizando los valores de fluorescencia a dos o más temperaturas. La razón reduce significativamente las diferencias de señal entre muestras repetidas y proporciona una medición cuantitativa del alelo investigado. La figura 11 muestra niveles de fluorescencia de la sonda a dos temperaturas. Tal como se ilustra en la figura 11, las señales de la sonda que surgen de la hibridación de la sonda con la cadena del cebador en exceso se recogen a una alta temperatura a la que la sonda discrimina alelos y se une sólo al alelo totalmente complementario, así como a temperaturas inferiores a las que la sonda tolera apareamiento erróneo totalmente y se une a todas las posibles variantes alélicas de la secuencia diana. La medición de la fluorescencia a la temperatura alta y baja y el cálculo de las razones resultantes pueden llevarse a cabo también como un ensayo de punto final. Se denominan estos ensayos “ensayos de normalización a dos temperaturas (sin corrección del fondo)”. Distinguen fácilmente genotipos homocigotos y heterocigotos tal como se ilustra en la figura 11. Este tipo de ensayo puede llevarse a cabo como ensayos de LATE-PCR homogénea de punto final, ensayos de QE-LATE-PCR.

La figura 11 notifica señales de fluorescencia corregidas para el nivel inicial. Tal como se trata en el ejemplo 5, se prefiere utilizar señales de fluorescencia sin procesar que corregidas para el nivel inicial procedentes del instrumento ABI 7700, tal como se muestra en la figura 12. La corrección para el nivel inicial introduce posiblemente artefactos en las razones fluorescentes normalizadas de muestras individuales, debido a que el factor de corrección es sensible a fluctuaciones falsas en las señales de fluorescencia de fondo utilizadas para definir el valor inicial. Las lecturas de fluorescencia sin procesar no son sometidas a este artefacto. La confianza en señales fluorescentes sin procesar hace que el ensayo pueda aplicarse a cualquier termociclador de PCR con capacidades de fluorímetro o a termocicladores regulares utilizados en combinación con un fluorímetro de temperatura regulada para lecturas de fluorescencia de punto final.

El genotipado mediante QE-LATE-PCR puede refinarse adicionalmente construyendo razones de señales detectadas a más de dos temperaturas. Se proporciona un procedimiento de tres temperaturas para normalizar datos de punto final mediante la siguiente fórmula: valor de fluorescencia normalizado = $(F_s - F_t) / (F_b - F_t)$, en la que (F_t = fluorescencia a la temperatura superior), (F_b = fluorescencia a la temperatura inferior), (F_s = fluorescencia a cualquier tercera temperatura dada). El procedimiento de tres temperaturas aplicado a genotipos homocigotos y heterocigotos de un sitio SNP dentro del gen p53 humano se describe en el ejemplo 6 y se ilustra en la figura 13.

El ejemplo 11 y las figuras 18 a 19 ilustran estrategias para la amplificación mediante LATE-PCR de más de un producto del mismo molde de ADN en la muestra de reacción. Por tanto, estas reacciones contienen dos pares de cebadores (compuesto cada uno por un cebador en exceso y un cebador limitante) que amplifican dos secuencias separadas dentro de un molde contiguo. Los dos pares de cebadores pueden estar dispuestos de manera que tanto los cebadores en exceso como los cebadores limitantes se hibridan con la misma cadena del molde, o con cadenas opuestas del molde. Tal como apreciará un experto en la materia, cuando cebadores similares se hibridan con cadenas opuestas del molde, los dos cebadores en exceso pueden extenderse o bien “hacia dentro” o bien “hacia fuera” en sus respectivas cadenas molde. La figura 19 muestra también que pueden obtenerse secuencias de ambas cadenas de cebador en exceso a partir de la misma mezcla de reacción mediante el procedimiento de “diluir y listo”.

El ejemplo 12 y la figura 20 muestran que la cantidad de ADN_{mc} y ADN_{bc} generada por una amplificación mediante LATE-PCR puede medirse independientemente y puede utilizarse para calcular la razón ADN_{mc}/ADN_{bc} que, a su vez, puede utilizarse para determinar si la cantidad de ADN_{mc} acumulada hasta el momento es suficiente para la secuenciación posterior mediante el procedimiento de “diluir y listo”.

El ejemplo 13 y la figura 21 muestran el procedimiento de “diluir y listo” utilizado en una mezcla 50:50 de amplicones de LATE-PCR que presentan dos secuencias estrechamente relacionadas, aunque diferentes. La figura 22 muestra que mezclas compuestas por razones de 90:10 y 10:90 de dos amplicones de LATE-PCR que presentan secuencias estrechamente relacionadas, aunque diferentes, pueden distinguirse de mezclas 100:0 y 0:100 puras así como de mezclas 30:70 y 70:30 mediante el procedimiento de “diluir y listo”. Con el fin de llevar a cabo este tipo de análisis, es necesario corregir las amplitudes observadas de cada pico de nucleótido en cada posición heteroplásmica en cuando a la amplitud esperada del nucleótido “puro” equivalente en esa posición. Una vez hecho esto, pueden calcularse las cantidades relativas de cada secuencia como la razón de amplitudes (nucleótido corregido 1) ÷ (nucleótido corregido 1 + nucleótido corregido 2). Por tanto, como en el caso de secuencias de ADN mitocondrial que difieren, los procedimientos de LATE-PCR y “diluir y listo” de didesoxi descritos en la presente memoria pueden utilizarse para detectar heteroplasma. El procedimiento de didesoxi para medir la heteroplasma es particularmente ventajoso porque puede utilizarse para estudiar muchos cientos de nucleótidos en un único análisis. Aunque sin querer restringirse a ninguna teoría, se cree que los procedimientos descritos en la presente memoria funcionan, en contraposición a intentos previos basados en secuenciación por didesoxi y PCR simétrica, porque la LATE-PCR genera poblaciones altamente homogéneas de amplicones monocatenarios. En contraposición, la PCR simétrica tiende a generar poblaciones de moléculas de longitud completa junto con algunos amplicones parciales y algunos amplicones cebados de manera errónea.

El ejemplo 14 y la figura 23 muestran que puede utilizarse una LATE-PCR junto con por lo menos una única sonda que tolera apareamiento erróneo para generar curvas de fusión de punto final que a su vez pueden utilizarse para cuantificar las cantidades relativas de dos o más amplicones de LATE-PCR mezclados que presentan secuencias estrechamente relacionadas, aunque diferentes. El análisis de fusión de punto final cuantitativo, (QE) LATE-PCR, de mezclas de amplicones relacionados se hace posible en virtud del hecho de que la LATE-PCR genera productos monocatenarios. Por tanto, cuando están presentes una o más sondas que toleran apareamiento erróneo marcadas en la reacción, la(s) sonda(s) se hibrida(n) en primer lugar con la secuencia diana más complementaria y luego, si la temperatura desciende lo suficiente, con todas las secuencias diana relacionadas. Por tanto, cada híbrido sonda/diana en el conjunto presenta su propia temperatura de fusión y la magnitud del pico de fusión derivado de cada híbrido sonda/diana refleja de manera precisa la cantidad de cada secuencia diana acumulada. Pueden utilizarse entonces mediciones cuantitativas de o bien la amplitud, o bien el área dimensional de cada curva de fusión, para calcular la abundancia relativa de cada secuencia diana. Los datos representados en la figura 23 demuestran que este procedimiento puede utilizarse con una confianza del 99,7% para distinguir entre mezclas 0:100 - 10:90 - 50:50 - 90:10 - 100:0 de dos secuencias que difieren en un único nucleótido.

Los ensayos según esta invención, se lleven a cabo o no en presencia o ausencia del reactivo descrito en la solicitud de patente provisional estadounidense 60/619.620, pueden optimizarse independientemente para evitar o minimizar el cebado erróneo ajustando la concentración de ADN polimerasa, por ejemplo Taq polimerasa, añadida a la reacción. La disminución del cebado erróneo ajustando la polimerasa puede observarse en cuando a la cinética de la reacción LATE-PCR utilizando una sonda del ADNmc, así como mediante la composición del producto final revelada mediante diversos medios conocidos en la materia. Se ha encontrado que es conveniente de manera experimental comenzar con una concentración en exceso típica de Taq polimerasa y luego disminuir esta concentración por etapas. Aunque demasiado poca polimerasa puede provocar que la reacción sea ineficaz (manifestado como una disminución significativa en la tasa o el grado de amplificación de productos), niveles óptimos de polimerasa dan como resultado un ensayo de amplificación mediante LATE-PCR con amplificación de ADNbc eficaz y síntesis de ADNmc sostenida a lo largo de muchos ciclos. El ejemplo 15 demuestra que puede determinarse el nivel óptimo de polimerasa mediante la señal de ADNbc observada utilizando un tinte bicatenario tal como SYBR Green más la curva de fusión del producto de ADNbc, también observada utilizando SYBR Green. El ejemplo 16 y la figura 24 muestran que cuando tales ensayos se estudian con sonda para detectar un producto de ADNmc específico generado a partir de diferentes cantidades de material de partida, las gráficas resultantes son lineales y paralelas a lo largo de muchos ciclos de producción de ADNmc.

Ejemplos

Ejemplo 1. Tinte de unión frente a tinte de unión más cebadores marcados

Para comparar el rendimiento de un tinte de intercalación con el rendimiento del tinte utilizado en combinación con un cebador que incluye un fluoróforo de interacción, se realizó un ensayo de extensión. El tinte utilizado fue SYBR Green I a una dilución de 1:40.000.

Se incluyeron tres cadenas de nucleótidos. También se marcó un molde de ADN, un cebador de ADN extensible (marcado en 5' con Cy5, complementario al molde, y que presenta una T_f de 60°C), y un oligonucleótido de ADN no extensible (bloqueado en el extremo 3' con un grupo fosfato) también complementario a la diana, en una ubicación 3' con respecto al cebador, también marcado con el fluoróforo Cy5, y que presenta una T_f superior de 79°C. Se escogió la separación entre el cebador y el nucleótido no extensible de manera que los productos de extensión del cebador hasta el oligonucleótido no extensible tuvieran todos T_f inferiores a 79°C.

La mezcla de reacción para el ensayo de extensión del cebador incluyó ADN de molde 0,5 micromolar (μM), cebador 1,5 μM y 1,5 μM del oligonucleótido no extensible. La mezcla también incluyó 1X tampón de PCR, MgCl_2 3 milimolar (mM), 250 nanomolar (nM) de cada dNTP, 1:40.000X SYBR Green I y Taq ADN polimerasa. Se calentó la mezcla de reacción hasta 50°C durante 2 minutos para unir el cebador y el oligonucleótido no extensible, y para generar productos de extensión del cebador próximos a alcanzar el oligonucleótido no extensible. Se procesaron muestras por duplicado.

Tras la reacción de extensión del cebador, se sometió el producto a análisis de fusión en el que el tinte SYBR Green se excitaba a medida que cambiaba la temperatura. Se tomaron lecturas de fluorescencia a la longitud de onda de la emisión del tinte y a la longitud de onda de la emisión del fluoróforo a medida que la temperatura aumentaba a través del intervalo de temperaturas de fusión que abarca el cebador no extendido y el oligonucleótido no extensible. En la figura 1 se presentan curvas de fusión, la primera derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura representada gráficamente frente a la temperatura, tal como se presenta en la figura 1, en la que el panel A presenta las curvas 1 para las dos muestras, datos de emisiones del tinte y el panel B presenta curvas 2 para las dos muestras, datos de emisiones de Cy5.

Ejemplo 2. Sondas que toleran el apareamiento erróneo extinguidas.

Se diseñó una sonda marcada para que presentara una secuencia consenso complementaria al gen de ARN ribosómico 16S de *Mycobacterium*. Se pronosticó la estructura secundaria según los programas Mfold (Zucker, M (2003), "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction", Nucleic Acids Res 31: 3406-3415) con una concentración de sodio fijada a 70 milimolar (mM) y una concentración de magnesio fijada a 3 mM. La secuencia de la sonda fue Cy5-AATACTGGATAGGACC ACG AGG (SEQ. ID No. 1), con una estructura secundaria pronosticada formada mediante la hibridación de las regiones subrayadas. La T_f pronosticada de la estructura secundaria de la sonda fue de 37°C. Se sometió a prueba esta sonda en muestras que no contenían diana, *M. gordonae*, o *M. asiaticum* en mezclas que contenían tinte SYBR Green I, en las que el tinte se excitaba directamente y el fluoróforo se excitaba a su vez indirectamente. En la figura 3 se presentan los resultados de la fluorescencia de Cy5 frente a la temperatura, panel A. La línea 31 (sin diana) muestra una alta fluorescencia de fondo pero la línea 32 (*M. gordonae*) y la línea 33 (*M. asiaticum*) muestran señales discernibles por encima del fondo. Para extinguir la fluorescencia de fondo, se añadió un extintor no fluorescente (un extintor Black Hole™ II) al nucleótido terminal en 3' de la sonda. La sonda modificada se sometió a prueba de manera similar y los resultados se muestran en el panel B de la figura 3. Tal como puede observarse, la fluorescencia de fondo (línea 34, sin diana) disminuyó notablemente, y las señales de *M. gordonae* (línea 35) y *M. asiaticum* (línea 36) fueron muy superiores al fondo anterior.

Otra técnica para extinguir una sonda consiste en construir la sonda para que presente una estructura de horquilla marcada en los extremos terminales con un fluoróforo apropiado en un extremo y con un extintor en el otro. Se construyó una sonda que presentaba la secuencia Cy5-CTGGATAGGACCACGAGGCCAG-BHQII (SEC ID nº 2), en la que las secuencias subrayadas son complementarias y forman un tallo de horquilla. Se añadieron los tres nucleótidos terminales en 3' con el fin de lograr el tallo. La temperatura de fusión pronosticada de esta sonda con una diana perfectamente apareada es de 60°C. La T_f pronosticada del tallo es de aproximadamente 48°C (basándose en la T_f pronosticada del nucleótido no modificado de 40°C que no explica el aumento de afinidad de la interacción fluoróforo-extintor). También se sometió a prueba esta sonda tal como se describió anteriormente y los resultados se presentan en el panel C de la figura 3. La fluorescencia de fondo (línea 37, sin diana) fue bastante baja, y las señales de *M. gordonae* (línea 38) y *M. asiaticum* (línea 39) fueron muy superiores al fondo.

Ejemplo 3. Genotipado en tiempo real y de punto final utilizando sondas que toleran apareamiento erróneo.

Este ejemplo ilustra la identificación de muestras homocigotas y muestras heterocigotas para el alelo G269 del gen de hexosaminidasa A humana (Hex A) responsable de la enfermedad de Tay-Sachs utilizando amplificación mediante LATE-PCR en tiempo real y una sonda lineal que tolera apareamiento erróneo marcada con Cy5, de baja T_f , excitada indirectamente mediante emisión de un tinte SYBR. Se monitorizó la hibridación de la sonda dos veces durante cada ciclo de amplificación dentro del espacio de temperatura de detección de LATE-PCR, en primer lugar a 55°C, una temperatura a la que la sonda realiza discriminación de alelos en este ensayo y se une exclusivamente a su diana perfectamente apareada, y luego a 40°C, una temperatura a la que la sonda es tolerante a apareamiento erróneo y se une a la totalidad de alelos de su secuencia diana en la reacción de amplificación. La detección de alelos específicos y alelos totales con la sonda que tolera apareamiento erróneo permite la corrección de variaciones estocásticas de un tubo a otro en el rendimiento de amplicones entre muestras repetidas. La razón de alelo específico con respecto a alelos totales en la reacción (Cy5 a 55°C/Cy5 a 40°C) permite la normalización de la muestra repetida para el genotipado de punto final. La información genotípica se deriva de los valores de la razón. En el caso de las muestras homocigotas, las señales de sondas detectadas en condiciones de discriminación de alelos son las mismas que las señales de sondas detectadas en condiciones tolerantes a apareamiento erróneo, puesto que en ambos casos la sonda está uniéndose al 100% de los alelos de la secuencia diana. Por el contrario, en el caso de muestras heterocigotas, las señales de sondas detectadas en condiciones de discriminación de alelos son la mitad de intensas que las señales de sondas detectadas en condiciones tolerantes a apareamiento erróneo, puesto que la sonda está uniéndose sólo al 50% de los alelos de la secuencia diana en condiciones de discriminación de alelos pero al 100% de los alelos en condiciones tolerantes a apareamiento erróneo. Por tanto, las

muestras homocigotas presentan razones superiores de Cy5 a 55°C/Cy5 a 40°C que las muestras heterocigotas. Este procedimiento de genotipado sólo se basa en la detección de un único alelo.

Las secuencias y la temperatura de fusión ajustada a la concentración, $T_{f[0]}$, de los cebadores de LATE-PCR y la sonda son las siguientes. El cebador limitante presenta la secuencia 5'CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (SEQ. ID No. 3). Presenta una $T_{f[0]}$ ajustada a la concentración de 63,2°C a 25 nM. El cebador en exceso presenta la secuencia 5' TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (SEQ. ID No. 4). Presenta una $T_{f[0]}$ ajustada a la concentración de 61,8°C a 1 µM. La sonda presenta la secuencia 5' Cy5-GGGACCAGGTAAGAA 3' (SEQ. ID No. 5). Presenta una T_f de 56,3°C. Es una sonda de baja T_f y cuando se utiliza con una temperatura de apareamiento de 65°C, también es una sonda de superbaja T_f .

Se establecieron ensayos de LATE-PCR repetidos ($n=15$) para cada genotipo diferente (G269 homocigoto y G269 heterocigoto) en 1X tampón de PCR, $MgCl_2$ 3 mM, dNTP 250 micromolar (µM), cebador limitante 25 nM, cebador en exceso 1000 nM, 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa, sonda marcada con Cy5 0,6 µM y una dilución 1:40.000 de SYBR Gold I. Los parámetros de los ciclos de PCR fueron 95°C durante 3 minutos, luego 25 ciclos a 95°C durante 10 s, 65°C durante 20 s y 72°C durante 20 s, seguido por 30 ciclos a 95°C durante 10 s, 65°C durante 20 s, 72°C durante 20 s, 55°C durante 20 s y 40°C durante 20 s con adquisición de fluorescencia a 55°C y 40°C en el canal de Cy5. La figura 7 muestra el análisis de las razones de señales de Cy5 a 55°C con respecto a señales de Cy5 a 40°C y demuestra que estas razones son adecuadas para el genotipado de punto final para cualquier ciclo de amplificación pasado el umbral de detección de la sonda. En esta figura, las muestras homocigotas (círculo 91) presentan razones de aproximadamente dos veces la razón de las muestras heterocigotas (círculo 92).ç

Ejemplo 4. Análisis de múltiples dianas utilizando sondas específicas de diana con diferentes temperaturas de fusión.

Pueden utilizarse múltiples sondas, marcada cada una con el mismo fluoróforo, en combinación para detectar y cuantificar diferentes secuencias a lo largo de un único oligonucleótido más largo (por ejemplo, un producto de PCR asimétrica, LATE-PCR, o amplificación por círculo rodante) o en diferentes oligonucleótidos. La utilización de sondas de baja T_f aumenta la especificidad de tales dianas, reduciendo enormemente o eliminando las señales generadas a partir de dianas con apareamiento erróneo. Una posible aplicación de esta tecnología es el genotipado del ADN humano para identificar alelos conocidos que producen enfermedad genética. Este ejemplo describe análisis de temperatura para el diseño de sondas y para la detección de productos.

Como punto de partida se seleccionan las siguientes dianas que podrían estar presentes potencialmente en un producto de amplificación: la secuencia normal del gen del regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) en la región que codifica para el aminoácido 542 de la proteína; la secuencia de la mutación Delta F508, la mutación de CFTR más común; y la secuencia normal correspondiente a la mutación Delta F508.

Se diseñaron sondas de discriminación de alelos de baja T_f para cada una de las tres secuencias diana. Las sondas fueron sondas de baliza molecular de baja temperatura, marcadas cada una con el fluoróforo FAM y un extintor. Se diseñaron las tres sondas para que presentaran diferentes T_f frente a sus dianas en mezclas que contenían Tris-HCl 70 mM y $MgCl_2$ 3 mM. La "sonda de 542" presentaba una T_f de 40°C (valor pronosticado de 41°C mediante cálculo del vecino más próximo); la "sonda de 508 normal" presentaba una T_f de 47°C (valor pronosticado de 46°C mediante cálculo del vecino más próximo); y la "sonda de Delta F508" presentaba una T_f de 54°C (valor pronosticado de 53°C mediante cálculo del vecino más próximo). La figura 8 presenta las curvas de fusión de las que se obtuvieron los valores de T_f . La figura 8 muestra la primera derivada negativa de lecturas de fluorescencia como función de la temperatura para la sonda de 542 (línea 96), la sonda de DF508 (línea 97) y la sonda de 508 normal (línea 98) para muestras por duplicado. Se obtuvieron alturas de pico aproximadamente iguales mediante la utilización de concentraciones de diana de 1 µM, y concentración de sonda de 542 de 2 µM. Se sometió a prueba cada sonda frente a la diana con apareamiento erróneo para comprobar la discriminación de alelos, y se encontró que la fluorescencia frente a la diana con apareamiento perfecto era de 5-10 veces la fluorescencia frente a la diana con apareamiento erróneo.

A partir de la figura 8 puede observarse que se habrían resuelto fácilmente incluso pequeñas diferencias de T_f . A partir de una gráfica tal como la de la figura 8, podrían resolverse diferencias de 4-5°C. La deconvolución utilizando el software suministrado con los termocicladores de PCR en tiempo real podrían permitir la resolución de diferentes T_f en la mitad de esa cantidad.

El examen de la primera derivada negativa de la fluorescencia es un procedimiento para determinar qué oligonucleótidos diana están presentes en una muestra dada. La figura 9 muestra un análisis de este tipo, utilizando fluorescencia superior al fondo. Las muestras que contienen la diana 508 normal, pero no la diana Delta F508 (círculo 101) presentan un pico de fusión a 54°C, indicativo de ese híbrido baliza molecular-diana. Las muestras que contienen la diana Delta F508, pero no la diana normal (círculo 102) presentan un pico de fusión a aproximadamente 47°C, indicativo de hibridación de la baliza con la secuencia mutante. Las muestras que contienen ambas dianas (círculo 103) presentan un pico amplio a lo largo de ese intervalo de temperaturas, lo que indica fluorescencia de ambos híbridos baliza molecular-diana. La presencia y la concentración relativa de la secuencia normal en el

aminoácido 542 está indicada por la presencia y la altura relativa del pico de fusión a aproximadamente 40°C. Las muestras con diana 542 normal (línea continua para cada grupo numerado) presentan un pico grande a esa temperatura, las muestras con diana 542 mutante que contienen un único cambio de nucleótido en esta región idéntica a la segunda mutación de CFTR más común (línea punteada para cada grupo numerado) no presentan ningún pico a esa temperatura, y las muestras con ambas dianas 542 (línea discontinua para cada grupo numerado) presentan picos de altura intermedia. La altura del pico en las muestras con ambas dianas 542 se ve afectada por la presencia del pico de fusión de Delta F508 vecino.

Puede que no siempre sea posible o deseable obtener un perfil de fusión completo durante el transcurso de una reacción de amplificación. El análisis adicional de las muestras descritas anteriormente muestra que un número limitado de etapas de detección podría proporcionar la información requerida para identificar los oligonucleótidos específicos en una mezcla. Puede utilizarse disminución, en lugar de aumento de temperatura. Se calentaron las muestras hasta 70°C, y luego se disminuyeron en decrementos de 5°C hasta 30°C con una detección de 30 segundos en cada etapa. Las muestras que contenían la diana 508 normal pero no la diana Delta F508, o que contenían la diana Delta F508 pero no la diana normal podían distinguirse basándose en cambios en la fluorescencia entre 60°C y 50°C. Cada combinación de oligonucleótidos diana produjo un patrón único de cambio de fluorescencia. En la figura 10 se muestra un gráfico de dispersión del cambio en porcentaje en el aumento de fluorescencia a 55°C frente al cambio en porcentaje en el aumento de fluorescencia a 45°C. Este análisis distingue la combinación de dianas que están presentes en cada muestra. Mediante la utilización de los cambios en la fluorescencia en lugar de la propia intensidad de fluorescencia, puede realizarse una evaluación precisa aunque las muestras difieran considerablemente en la concentración total de dianas, como podría ocurrir en muestras de amplificación repetidas. La figura 10 incluye muestras por duplicado para cada combinación de diana 508 normal más diana 542 normal (marcas con el círculo 111), diana 508 normal más ambas dianas 542 (112), diana 508 normal más diana 542 mutante (113), ambas dianas 508 más diana normal 542 (114), ambas dianas 508 más ambas dianas 542 (115), ambas dianas 508 más diana 542 mutante (116), diana Delta 508 más diana 542 normal (117), diana Delta 508 más ambas dianas 542 (118), y diana Delta 508 más diana 542 mutante (119). Podría realizarse un análisis similar utilizando este perfil de temperatura durante cada ciclo o ciclos seleccionados de una reacción de amplificación. Podrían amplificarse varias muestras con ADN de genotipos conocidos y utilizarse los datos de detección para establecer un intervalo de valores esperado. Esto proporcionaría un procedimiento para la determinación rápida de genotipos de muestras desconocidas.

Aunque en este ejemplo sólo se utilizaron 3 sondas, es posible la utilización combinada de un número mucho mayor de sondas. Las principales limitaciones en el número total de sondas son el intervalo de temperatura para la detección y la diferencia de T_f mínima entre el híbrido sonda-diana. A su vez, éstas dependen de la naturaleza de la reacción de amplificación y las capacidades del equipo y el software de deconvolución. Por ejemplo, podrían distinguirse 10 combinaciones diferentes de sonda-diana a lo largo de un intervalo de temperatura de 30 grados si la diferencia de T_f mínima de la deconvolución es de 3 grados. Este número puede aumentarse varias veces utilizando múltiples fluoróforos.

Ejemplo 5. Normalización a dos temperaturas con y sin corrección de fondo.

Se llevó a cabo el genotipado mediante QE LATE-PCR del SNP rs858521 con muestras de ADN desconocidas y rs858521 control homocigoto (alelos CC) y control heterocigoto (alelos CG) utilizando una única sonda que tolera apareamiento erróneo marcada con Cy5. Se llevaron a cabo la amplificación y la detección utilizando un detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), que normalmente genera señales fluorescentes corregidas para el nivel inicial. Para el análisis utilizando razones, sin embargo, se obtuvieron razones de señales fluorescentes tanto a partir de señales de fluorescencia corregidas para el nivel inicial (figura 11) como a partir de señales fluorescentes sin procesar (figura 12). La figura 11 presenta la razón de la fluorescencia de la sonda a 50°C con respecto a su fluorescencia a 25°C como una función del número de ciclos de la reacción de amplificación utilizando señales fluorescentes corregidas para el nivel inicial del instrumento. En la figura 11, el círculo 113 son repeticiones del control homocigoto, el círculo 114 son repeticiones del control heterocigoto, mientras que los círculos 111 y 112 son las muestras desconocidas. La figura 12 presenta los mismos resultados utilizando señales de fluorescencia sin procesar. En la figura 12, el círculo 116 son repeticiones del control homocigoto, el círculo 117 son repeticiones del control heterocigoto, y el círculo 115 son las muestras desconocidas. La utilización de señales de fluorescencia corregidas para el nivel inicial para la normalización dio como resultado un genotipado ambiguo para una muestra en la figura 11, el círculo 112. En contraposición, la utilización de señales de fluorescencia sin procesar para la normalización proporcionó el genotipado correcto para todas las muestras. Este resultado demuestra que la corrección para el nivel inicial en el software del detector de secuencias ABI Prism 7700 puede introducir artefactos que afectan a la normalización de la señal y preferentemente no debe utilizarse.

Ejemplo 6. Normalización a tres temperaturas.

Se llevaron a cabo reacciones de amplificación repetidas mediante LATE-PCR que contenían los cebadores de SNP rs858521 y una única sonda ResonSense que tolera apareamiento erróneo con ADN genómico purificado para cada genotipo del SNP del gen rs858521 (1800 genomas equivalentes, 18 reacciones repetidas de cada genotipo de CC homocigoto, CG heterocigoto, y GG homocigoto). Se analizaron los productos amplificados mediante curvas de

fusión, mostradas en la figura 13, panel A y mediante la normalización de los datos, tal como se muestra en el panel B y el panel C. La figura 13A muestra una gráfica de las señales de fluorescencia sin procesar recogidas durante el análisis de curva de fusión tras la amplificación mediante LATE-PCR. La sonda que se utilizó era de discriminación de alelos a temperaturas superiores pero se hacía cada vez más tolerante a apareamiento erróneo a medida que se reducía la temperatura. Esta variabilidad intrínseca en el rendimiento del producto entre muestras repetidas impide la discriminación de estos genotipos mediante señales de fluorescencia sin procesar (círculo 131) dentro del intervalo de temperaturas de la discriminación de alelos para esta sonda (40°C-60°C, determinado anteriormente con dianas de oligonucleótido sintético, datos no mostrados). La figura 13B muestra las señales de cada muestra normalizada a cada temperatura frente a la señal recogida a una temperatura que tolera apareamiento erróneo completamente (25°C) para esa muestra. En la figura 13B, las señales normalizadas para los alelos CC homocigotos son el círculo 132, las señales normalizadas para los alelos CG heterocigotos son el círculo 133, y las señales normalizadas para los alelos GG homocigotos son el círculo 134. Tal como muestra la figura, la normalización reduce la dispersión de la señal y permite la identificación de cada genotipo dentro del intervalo de discriminación de alelos. Se observó separación máxima a 52°C, que corresponde a la T_f de la sonda ResonSense que se utilizó. Aunque la dispersión de la señal se redujo significativamente en la figura 13B en comparación con la figura 13A, todavía había cierta variabilidad en la intensidad de la señal entre muestras repetidas a juzgar por la diseminación de los gráficos cinéticos. La figura 13C muestra que el mejor procedimiento para eliminar esta dispersión residual de la señal era mediante la normalización de las señales fluorescentes a cada temperatura con respecto a las señales fluorescentes recogidas a las temperaturas superior e inferior del intervalo de discriminación de alelos observado en la figura 13B a las que las curvas de fusión comienzan a divergir (es decir, 40°C y 60°C respectivamente). En la figura 13C las señales normalizadas para los alelos CC homocigotos son el círculo 135, las señales normalizadas para los alelos CG heterocigotos son el círculo 136, y las señales normalizadas para los alelos GG homocigotos son el círculo 137. Si F_b y F_t son las lecturas de fluorescencia hacia el valor superior y el valor inferior del intervalo de temperatura de discriminación de alelos, respectivamente, y F_s es la lectura fluorescente a cualquier temperatura dada durante el análisis de fusión, entonces las razones fluorescentes normalizadas se calculan de la siguiente forma:

Razón de fluorescencia normalizada a tres temperaturas = $(F_s - F_t)/(F_b - F_t)$

La normalización simultánea de las señales fluorescentes a cada temperatura para las señales fluorescentes a 40°C y 60°C dentro de cualquier muestra dada redujo además la dispersión de la señal fluorescente e hizo que las curvas de fusión repetidas de cada genotipo quedasen muy apretadas (véase la figura 13C). Las razones fluorescentes calculadas a una única temperatura, concretamente, la T_f de la sonda (52°C) normalizada utilizando las señales fluorescentes hacia las temperaturas superior e inferior del intervalo de discriminación de alelos (es decir, a 60°C, 40°C) definen excepcionalmente cada genotipo con más del 99,7% de certeza (es decir, los recuadros de error que consisten en tres desviaciones estándar que abarcan el 99,7% de todas las posibles razones fluorescentes para cada genotipo están completamente separados entre sí, datos no mostrados). Se obtuvieron resultados mejorados de manera similar para el sitio SNP rs2270517 cuando se calcularon las señales fluorescentes a la T_f de la sonda (57°C) normalizada para las temperaturas superior e inferior correspondientes del intervalo de discriminación de alelos (es decir, a 71°C, 45°C).

Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

Volumen: 25 µl

1x tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)

MgCl₂ 3 mM

dNTP 10 µM

Sonda 0,6 µM (LATE-PCR únicamente)

Tinte SYBR Gold a dilución 1:41.666 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.)

1,25 unidades de Taq ADN polimerasa Platinum (Invitrogen)

6 ng de ADN genómico humano (equivalente a 1000 genomas)

Cebadores: para LATE-PCR, cebador limitante 25 nM y cebador en exceso 1000 nM; (para el control, 300 nM de cada uno de los mismos cebadores).

Secuencias de oligonucleótidos

Cebador limitante: 5' CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (SEC ID nº 17)

Cebador en exceso: 5' TAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (SEC ID nº 18)

Sonda: 5' Cy5 GGGACCAGGTAAGAA-Fosfato 3' (SEQ. ID No. 19)

Mezcla de reacción para secuenciación por ciclos

Volumen: 20 µl

100 femtomoles (fmoles) de producto que está secuenciándose

5 picomoles (pmoles) de cebador de secuenciación (o bien el cebador limitante o bien el cebador en exceso)

1x DTC5 Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) [incluye dNTP, ddNTP, tampón, MgCl₂].

Secuenciación didesoxi

Las mezclas de reacción de secuenciación se sometieron a secuenciación por ciclos y electroforesis capilar en un secuenciador de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) utilizando el kit CEQ 2000 Due Termination Cycle Sequencing (Beckman Coulter) según las instrucciones del fabricante.

Amplificación mediante LATE-PCR y preparación de la secuenciación

La mezcla reacción de amplificación mediante LATE-PCR se sometió a ciclado térmico de la siguiente forma: 95°C durante 3 min.; 20 ciclos de 95°C durante 10 s, 65°C durante 20 s y 72°C durante 20 s, y 70 ciclos de 95°C durante 10 s, 65°C durante 20 s, 72°C durante 20 s, 55°C durante 20 sec y 40°C durante 20 sec. Se monitorizó la síntesis del amplicón bicatenario excitando el tinte SYBR y leyendo su fluorescencia durante la etapa de extensión del cebador a 72°C. Se monitorizó la síntesis del producto monocatenario tras el agotamiento del cebador limitante excitando el tinte SYBR y leyendo la fluorescencia del fluoróforo Cy5 de la sonda de baja T_f durante la etapa de detección a baja temperatura a 40°C.

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del cebador en exceso, fue necesaria la dilución del producto de amplificación. Se estimó la cantidad de producto en los 25 µl de producto de reacción de la siguiente forma. En primer lugar, la cantidad de ese producto en el producto bicatenario obtenido durante los ciclos de amplificación iniciales viene establecida por la cantidad de cebador limitante. En este ejemplo, ésta fue de 25 nM, lo que se traduce en 25 fmoles/µl. Se estimó la concentración de producto de extensión monocatenario obtenido durante la fase lineal de la amplificación mediante LATE-PCR, es decir, tras el agotamiento del cebador limitante, dividiendo esa fase en dos partes determinadas por la inspección de la curva de fluorescencia de Cy5: una primera parte en la que la amplificación avanza aritméticamente, y una segunda parte en la que la acumulación de producto se ha ralentizado. Para la primera parte, que en este ejemplo fue de seis ciclos, se supuso una eficacia de amplificación del 50%, basándose en Gyllensten, U.B.H. y Erlich, A. (1988), "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. Se calculó la producción de cadenas sencillas durante los seis ciclos como la concentración de partida (25 fmoles/µl) por el número de ciclos (6) por la eficacia (0,5). Se estimó la producción adicional como el aumento en porcentaje en la señal de Cy5 durante el resto de la reacción, que en este caso fue del 233,3%. La producción total durante la fase lineal fue por tanto de 175 fmoles/µl (25 x 6 x 0,5 x 2,333), y se calculó que la concentración total de ese producto, incluyendo 25 fmoles/µl en el amplicón bicatenario, era de 200 fmoles/µl. Para obtener 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación por ciclos, se diluyó el producto de amplificación 1:8 con agua y se utilizaron 4 µl del producto diluido en los 20 µl de mezcla de reacción. Tal como se apreciará, esto significó que el producto de amplificación se diluyó finalmente 1:40.

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del cebador limitante, el punto de partida fue que el producto de la reacción de amplificación contenía 25 nM de ese producto, o 25 fmoles/µl. Simplemente se utilizaron 4 µl del producto de amplificación en los 20 µl de mezcla de reacción de secuenciación por ciclos para obtener la cantidad de partida deseada de 100 fmoles.

Amplificación de control y preparación de la secuenciación.

La mezcla de reacción de amplificación se sometió al mismo perfil de ciclado térmico, excepto porque sólo se llevaron a cabo 18 (en lugar de 70) de los ciclos de cinco temperaturas, porque una gráfica en tiempo real de la señal de tinte de intercalación indicó que la amplificación alcanzaba una meseta en este punto y sólo se obtuvo el producto de amplificación deseado para ese punto. Se purificaron los productos de amplificación en la mezcla de amplificación al final de la amplificación de una manera convencional utilizando el kit de purificación por PCR QUIA quick (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron los amplicones purificados mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 3% en 0,5x TBE frente a diferentes cantidades conocidas de marcadores de ADN de ΦX174 Hind III seguido por la visualización mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se utilizó un volumen que contenía 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación por ciclos con cada cebador de secuenciación.

Resultados

Los procedimientos de LATE-PCR y control produjeron ambas secuencias correspondientes a la información de secuencia de Genbank (número de registro M 16417). La figura 17 incluye cuatro cromatogramas obtenidos a partir de secuenciación didesoxi. El panel A es del procedimiento de LATE-PCR con secuenciación por ciclos que utiliza el cebador limitante como cebador de secuenciación. El panel B es del procedimiento de LATE-PCR con secuenciación por ciclos que utiliza el cebador en exceso como cebador de secuenciación. El panel C es el procedimiento de control que utiliza el cebador en exceso como cebador de secuenciación. El panel D es el procedimiento de control que utiliza el cebador limitante como cebador de secuenciación. Cada cromatograma incluye las curvas de fluorescencia obtenidas a partir de los nucleótidos didesoxi marcados y la secuencia de nucleótidos determinada.

Ejemplo 11. Estrategias para la amplificación mediante LATE-PCR de más de un producto a partir del mismo molde de ADN en la misma reacción.

Las amplificaciones mediante PCR pueden realizarse utilizando un detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para amplificar dos amplicones de 549 y 464 bases designados como cadenas HV1 y HV2 H y L en la misma reacción de dúplex dentro de la región de lazo D en el ADN mitocondrial humano, basándose en los cuales se amplificaron secuencias utilizando un cebador en exceso.

Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

Volumen: 25 µl

1x tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)

MgCl₂ 3 mM (Invitrogen)

dNTP 250 µM (Promega)

Sonda 1,0 µM (LATE-PCR únicamente)

Tinte SYBR Green a dilución 10x (FMC Bioproducts, Rockland ME, EE.UU.)

1,25 unidades de Taq ADN polimerasa Platinum (Invitrogen)

ADN genómico de linfocitos de sangre humana (equivalente a 100 genomas de ADNmt)

Cebadores: para LATE-PCR, cebador limitante 50 nM y cebador en exceso 1000 nM.

Secuencias de oligonucleótidos

Sonda: 5' Cy5 - TGCTAATGGTGGAG -Fosfato 3' (SEQ. ID No. 20)

HV1-H

Cebador limitante: 5' GCCCGGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTTG 3' (SEC ID nº 21)

Cebador en exceso: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAA 3' (SEC ID nº 22)

HV2-H

Cebador limitante: 5' GTATGGGAGTGGGAGGGGAAAATAATGTGTTAG 3' (SEC ID nº 23)

Cebador en exceso: 5' AGGTCTATCACCTATTAACCACTCA3' (SEC ID nº 24)

HV1-L

Cebador limitante: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAAAACC 3' (SEC ID nº 25)

Cebador en exceso: 5' CGAGGAGAGTAGCACTCTT3' (SEC ID nº 26)

HV2-L

Cebador limitante: 5' AGGTCTATCACCTATTAACCACTCACGGG 3' (SEC ID nº 27)

Cebador en exceso: 5' GGAGGGGAAAATAATGTGTTAGT 3' (SEC ID nº 28)

Mezcla de reacción para secuenciación por ciclos

Volumen: 25 µl

Se secuenciaron 100 fmoles de producto

5 pmoles de cebador de secuenciación (o bien el cebador limitante o bien el cebador en exceso)

1x DTC5 Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) [incluye dNTP, ddNTP, tampón, MgCl₂].

Secuenciación didesoxi

Las mezclas de reacción de secuenciación se sometieron a secuenciación por ciclos y electroforesis capilar en un secuenciador de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) utilizando el kit CEQ 2000 Due Termination Cycle Sequencing (Beckman Coulter) según las instrucciones del fabricante.

Amplificación mediante LATE-PCR y preparación de la secuenciación

La mezcla reacción de amplificación mediante LATE-PCR se sometió a ciclado térmico de la siguiente forma: 95°C durante 3 min.; 15 ciclos de 95°C durante 15 s, 64°C durante 10 s y 72°C durante 45 s, y 50 ciclos de 95°C durante 15 s, 64°C durante 10 s, 72°C durante 45 s, y para HV1-H sólo 50°C durante 20 s. Se monitorizó la síntesis del amplicón bicatenario excitando el tinte SYBR Green y leyendo su fluorescencia durante la etapa de extensión del cebador a 72°C. Se monitorizó la síntesis del producto monocatenario tras el agotamiento del cebador limitante excitando el tinte SYBR y leyendo la fluorescencia del fluoróforo Cy5 de la sonda de baja T_f durante la etapa de detección a baja temperatura a 50°C para la región de HV1-H únicamente.

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del cebador en exceso, fue necesaria la dilución del producto de amplificación. Se estimó la cantidad de producto en los 25 µl de producto de reacción de la siguiente forma. En primer lugar, la cantidad de ese producto en el producto bicatenario obtenido durante los ciclos de amplificación iniciales viene establecida por la cantidad de cebador limitante. En este ejemplo, ésta fue de 50 nM, lo que se traduce en 50 fmoles/µl. Se estimó la concentración de producto de extensión monocatenario obtenido durante la fase lineal de la amplificación mediante LATE-PCR, es decir, tras el agotamiento del cebador limitante, dividiendo esa fase en dos partes determinadas por la inspección de la curva de fluorescencia de Cy5: una primera parte en la que la amplificación avanza aritméticamente, y una segunda parte en la que la acumulación de producto se ha ralentizado. Para la primera parte, que en este ejemplo fue de once ciclos, se supuso una eficacia de amplificación del 50%, basándose en Gyllensten, U.B.H. y Erlich, A. (1988), "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. Se calculó la producción de cadenas sencillas durante los once ciclos como la concentración de partida (50 fmoles/µl) por el número de ciclos (11) por la eficacia (0,5). Se estimó la producción adicional como el aumento en porcentaje en la señal de Cy5 durante el resto de la reacción, que en este caso fue del 100%. La producción total durante la fase lineal fue por tanto de 275 fmoles/µl (50 x 11 x 0,5 x 1,0), y se calculó que la concentración total de ese producto, incluyendo 50 fmoles/µl en el amplicón bicatenario, era de 325 fmoles/µl. Para obtener 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación por ciclos, se diluyó el producto de amplificación 1:13 con agua y se utilizaron 4 µl del producto diluido en los 25 µl de mezcla de reacción.

Resultados

Hay cuatro combinaciones posibles: 1) HV1-H con HV2-H, 2) HV1-L con HV2-L, 3) HV 1-H con HV2-L, 4) HV1-L con HV2-H. La figura 18 muestra un gel de agarosa al 4% de electroforesis de controles sin molde (NTC), tres carriles de la izquierda; amplicones de reacciones que comenzaron con 100 copias de ADN genómico, tres carriles siguientes; y en el carril más a la derecha un marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases. La figura 18 muestra la formación de los amplicones de ADNbc HV1-H y HV2-H de 549 y 464 pares de bases utilizando 100 copias de ADN genómico al comienzo de la reacción. Los controles sin molde, NTC, no se amplificaron.

Tal como apreciará un experto en la materia, al amplificar dos amplicones monocatenarios en la misma reacción a partir de un único molde, pueden generarse las dos cadenas de cebador en exceso a partir de la misma cadena de ADN o a partir de cadenas complementarias de ADN. Se han utilizado satisfactoriamente ambos enfoques. En las combinaciones HV1-H con HV2-H y HV1-L con HV2-L se generan ambos amplicones a partir de la misma cadena molde de ADN. En las combinaciones HV1-H con HV2-L y HV1-L con HV2-H los dos amplicones se generan a partir de cadenas complementarias de ADN. La figura 19 A presenta información de secuencia para el amplicón HV1-H en el dúplex HV1-H con HV2-H en la región de bases 16209-16169. La figura 19 B presenta información de secuencia para el amplicón HV2-H en el dúplex HV1-H con HV2-H en la región de bases 289-326. La figura 19 C presenta información de secuencia para el amplicón HV1-H en el dúplex HV1-H con HV2-L en la región de bases 16209-

16169. La figura 19 D presenta información de secuencia para el amplicón HV2-L en el dúplex HV1-H con HV2-L en la región de bases 289-326. La LATE-PCR produjo secuencias correspondientes a la información de secuencia de GenBank.

Ejemplo 12. Determinación del ADNmc necesario.

La cantidad de ADN monocatenario y ADN bicatenario generada por una amplificación mediante LATE-PCR puede utilizarse para determinar la cantidad de ADNmc necesario para la secuenciación didesoxi mediante “diluir y listo”. Se realizaron amplificaciones mediante PCR utilizando un detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para amplificar el amplicón de 549 bases designado como HV1 H dentro de la región de lazo D del ADN mitocondrial humano. Se extrajo ADNmt en condiciones de lisis (tal como se describe en Peirce *et al.* (2002) *Biotechniques* 32(5); 1106-1111 con la inclusión de 4 µl de DTT en 100 µl de la mezcla de reacción de lisis) a partir de una hebra de cabello humano. Todas las amplificaciones fueron amplificaciones mediante LATE-PCR, y el producto se sometió directamente a secuenciación didesoxi.

Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

Volumen: 25 µl

1x tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)

MgCl₂ 3 mM (Invitrogen)

dNTP 250 µM (Promega)

Sonda 1,0 µM (LATE-PCR únicamente)

Tinte SYBR Green a dilución 10x (FMC Bioproducts, Rockland ME, EE.UU.)

1,25 unidades de Taq ADN polimerasa Platinum (Invitrogen)

1 µl de disolución de lisis de ADN (equivalente a ~ 10 genomas de ADNmt)

Cebadores: para LATE-PCR, cebador limitante 50 nM y cebador en exceso 1000 nM.

Secuencias de oligonucleótidos

HV1H: Cebador limitante, cebador en exceso y sonda como en el ejemplo 11.

Mezcla de reacción para secuenciación por ciclos

Como en el ejemplo 11.

Secuenciación didesoxi

Como en el ejemplo 11.

Amplificación mediante LATE-PCR y preparación de la secuenciación

Como en el ejemplo 11. Se utilizaron datos fluorescentes sin procesar tanto de CY5 como de SYBR Green para determinar la cantidad de producto disponible para una reacción de secuenciación. Se utilizó la razón CY5/SYBR Green para normalizar todas las fluctuaciones en los datos sin procesar.

Resultados

En la figura 20 se presentan los datos de fluorescencia de las amplificaciones mediante LATE-PCR, paneles A y B. En la figura 20A, por ejemplo, la línea 201 representa todos los datos de la hebra de cabello representados gráficamente frente a los números de ciclo de amplificación como la razón ADNmc/ADNbc (señal de sonda con respecto a señal de tinte). Este procedimiento de análisis minimiza la variación debida a cuándo comienza la amplificación exponencial, o a qué nivel se alcanza la meseta, y demuestra que la eficacia de la amplificación del ADNmc es prácticamente la misma en todas las muestras excepto en la que comienza muy tarde.

La figura 20B representa un procedimiento para monitorizar un conjunto de ensayo de LATE-PCR con el fin de establecer su facilidad para la secuenciación mediante diluir y listo. La gráfica muestra las razones calculadas ADNmc/DNAbc (señal de sonda con respecto a señal de tinte frente a señal de tinte) para todas las muestras amplificadas en el ciclo 45 (cuadrados) y en el ciclo 65 (rombos). Sólo las muestras que presentan razones de entre

0,06 y 0,10 y valores de SYBR de entre 300 y 600 (las del recuadro) están listas para la secuenciación. La figura 20B se extiende a la utilización del análisis de punto final cuantitativo (QE LATE-PCR) para demostrar que tras 65 ciclos, todas excepto una muestra presentaba suficiente ADNmc acumulado como para utilizarse en la secuenciación de “diluir y listo”.

Ejemplo 13. Amplicones que presentan múltiples SNP.

La sensibilidad del procedimiento de LATE-PCR y secuenciación de “diluir y listo” puede distinguir una mezcla de amplicones que presentan múltiples SNP al nivel de resolución del 10%. Las amplificaciones mediante PCR se realizan a partir de una hebra de cabello humano de 2 mm o una única huella digital humana adherida a un portaobjetos de vidrio. Todas las amplificaciones fueron amplificaciones mediante PCR, y el producto se sometió directamente a secuenciación didesoxi. Las mezclas de reacción de amplificación finales, la secuencias de oligonucleótidos (HV1-H), la mezcla de reacción para secuenciación por ciclos, y la secuenciación didesoxi, y la amplificación mediante LATE-PCR y la preparación de la secuenciación se realizaron todos como en el ejemplo 11.

Se secuenciaron mezclas desde 10:90 hasta 90:10 de los productos de LATE-PCR monocatenarios de cada una de las tres reacciones utilizando el protocolo de didesoxi de “diluir y listo” descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 21 y en la figura 22.

La figura 21 muestra un segmento de 10 bases que rodea a las bases 16320 y 16311 de la mezcla 50:50 de linfocitos de sangre humana y huella dactilar humana. Las alturas de pico reflejan las alturas al 100% reales en la secuencia de didesoxi y no las alturas iguales esperadas de una mezcla 50:50. La línea 211 muestra el pico para la base de G en esta secuencia y la línea 202 muestra el pico para la base de A en la misma posición en la secuencia. El pico 212 es más alto que el pico 211 en una mezcla 50:50 de linfocitos de sangre humana y hebra de cabello humano que presentan diferentes secuencias genéticas, debido a las características fluorométricas de la secuenciación didesoxi tal como puede demostrarse mediante el análisis de las secuencias puras para la misma región.

La figura 22 muestra los porcentajes recíprocos (90:10, 70:30, 50:50, 30:70 y 10:90) de dos muestras en cada una de las cinco ubicaciones de SNP. La muestra 1 procede de una hebra de cabello humano y la muestra 2 procede de una huella dactilar humana de otro individuo. Las alturas de cada pico en cada posición se midieron a partir de las impresiones de las secuencias didesoxi y luego se representaron a escala basándose en la misma base de una muestra 1 al 100% o una muestra 2 control al 100%. En la figura 22, la línea 222 es el porcentaje previsto de muestra 1 en la mezcla representada gráficamente frente al porcentaje previsto de muestra 2 en la mezcla. La línea 221 es una línea ajustada a los resultados reales, es decir, el porcentaje observado de muestra 1 en la mezcla representado gráficamente frente al porcentaje previsto de muestra 2. El porcentaje observado para cada porcentaje previsto de muestra 2 es de cinco puntos, uno para cada base. Los datos demuestran que hay muy poca dispersión entre las diferentes bases en cada porcentaje, pero los datos también muestran que la línea 221 de los valores observados no se encuentra en la parte superior de la línea de los valores pronosticados (línea 222), probablemente debido a que la cantidad de muestra 1 y muestra 2 en la mezcla no eran exactamente iguales.

Ejemplo 14. Distinción de mezclas.

Para distinguir muestras que consistían en un 100% de ADN genómico heterocigoto a partir de muestras que consistían en un 90% de ADN heterocigoto y un 10% de ADN genómico homocigoto para un único cambio de nucleótido, se creó en primer lugar una mezcla de ADN que consistía en un 90% de ADN heterocigoto para el sitio SNP rs858521 ubicado en el cromosoma 17 humano (alelos C/G) más un 10% de ADN homocigoto para el mismo sitio SNP (alelos C/C). El sitio SNP se enumera en la base de datos de SNPbc del NCBI accesible a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=SNP>). Esta mezcla de ADN se preparó mezclando concentraciones coincidentes de los ADN heterocigotos y homocigotos correspondientes proporcionados por el Reid Laboratory en la University of Washington en Seattle. Se estimaron las concentraciones de ADN para cada ADN genómico para fines de mezclado basándose en los valores de Ct de la fluorescencia de SYBR derivados del análisis en tiempo real de muestras para LATE-PCR similar al descrito posteriormente. Una vez preparada la mezcla de ADN, se realizaron reacciones de LATE-PCR repetidas que contenían o bien un 100% de ADN heterocigoto o bien un 90% de ADN heterocigoto + un 10% de ADN homocigoto. Cada muestra para LATE-PCR consistía en 1X tampón Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgCl₂ 3 mM, mezcla de dNTP 250 µM, 0,24X SyberGold I (Invitrogen, Carlsbad, CA), reactivo de prevención del cebado erróneo 200 nM que se denomina compuesto Elixir 9-3iDD, 1,25 unidades de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), cebador en exceso de rs858521 1 µM, cebador limitante de rs858521 50 mM y sonda ResonSense 2,4 µM sonda frente al alelo G de SNP rs858521, y 1800 equivalentes de genoma del ADN genómico apropiado en un volumen final de 25 µl. La secuencia del cebador en exceso de rs858521 es

5' CAATCCCTTGACCTGTTGTGGAGAGAA 3' (SEC ID nº 29)

La secuencia del cebador limitante de rs858521 es

5' TCCCCAGAGCCCAGCCGGTGTCAATTTTC 3' (SEC ID nº 30)

La secuencia de la sonda ResonSense frente al alelo G de SNP rs858521 es

5 [Cy5] CTTTCAGCTCAAACAATA (SEC ID nº 31)

La secuencia del reactivo de prevención del cebado erróneo es 5' Dabcyl-CGCTATAATGAAATTATAGCG-Dabcyl (SEC ID nº 32)

Estas muestras se sometieron a amplificación en un instrumento ABI 7700 utilizando un perfil de ciclo térmico que consistió en un ciclo de 95°C durante 3 min., seguido por 45 ciclos de 95°C durante 10 s., 66°C durante 10 s. y 72°C durante 20 s. Al final de la reacción, se fundió la reacción desde 95°C hasta 25°C a intervalos de 1°C durante 1 min. a cada temperatura con adquisición de fluorescencia en el canal de Cy5. Las señales de fluorescencia cortadas de Cy5 sin corrección para el nivel inicial se exportaron al programa informático Excel. Se realizó el cálculo de la primera derivada de las señales de fluorescencia restando las señales de fluorescencia de una temperatura de las señales de fluorescencia de la siguiente temperatura durante la fusión. Los resultados se muestran en la figura 23, paneles A y B. La figura 23A muestra la gráfica de la primera derivada de las señales de fluorescencia frente a la temperatura, es decir, curvas de fusión. Las curvas de fusión en la figura 23A se suavizaron utilizando la función promedio móvil de Excel para eliminar el ruido debido a las fluctuaciones térmicas en el instrumento ABI 7700. La figura 23A representa los picos de fusión correspondientes a la unión de la sonda con su diana del alelo G apareado a temperaturas superiores y con la diana del alelo C con apareamiento erróneo a temperaturas inferiores. La figura 23A muestra que las muestras heterocigotas al 90% + homocigotas al 10%, círculo 231, muestran un pico del alelo G inferior y un pico de fusión del alelo C superior con respecto a las alturas de los picos de fusión del alelo C y el alelo G en las muestras heterocigotas al 100%, círculo 232. Estas diferencias están de acuerdo con la proporción superior esperada del alelo C en la muestra heterocigotas al 90% + homocigota al 10% (55% de alelo C : 45% de alelo G) en comparación con la muestra heterocigota al 100% (50% de alelo G : 50% de alelo C). La razón de la altura del pico del alelo C con respecto a la altura del pico del alelo G se muestra como una gráfica de barras en la figura 23B. El conjunto de barras de la derecha son para las muestras heterocigotas al 90% + homocigotas al 10%, correspondiente al círculo 231. Las barras más oscuras de la izquierda son para las muestras heterocigotas al 100%. Los recuadros de error convencional 233 y 234 se muestran para conjuntos de barras, respectivamente. Esta razón distingue muestras heterocigotas al 100% de muestras heterocigotas al 90% + homocigotas al 10% con un 99,7% de certeza basándose en la falta de solapamiento de los recuadros de error que reflejan tres desviaciones estándar del error de la media.

35 **Ejemplo 15. Sensibilidad de reacciones de LATE-PCR a la concentración de polimerasa inicial.**

Se realizaron amplificaciones mediante PCR utilizando un instrumento ABI 7700 para amplificar el amplicón de 549 bases designado como HVI-H dentro de la región de lazo D del ADN mitocondrial humano. Las mezclas de reacción para ADN genómico humano, secuencias de oligonucleótidos (HV1-H) y amplificaciones mediante LATE-PCR fueron tal como se describe en el ejemplo 11, excepto en que las unidades de Taq ADN polimerasa Platinum variaron entre muestras, de la siguiente forma: 0,125, 0,250, 0,375, 0,50, 0,625 y 1,25 unidades.

Se realizó el análisis de curva de fusión (fluorescencia de SYBR Green frente a temperatura). Las curvas de fusión mostraron cómo la concentración de Taq influía en la especificidad del producto de ADNbc para esta reacción de LATE-PCR. A medida que la concentración de Taq Platinum disminuyó desde 1,25 unidades hasta 0,375 unidades, la especificidad de la reacción aumentó, tal como se refleja en los picos de fusión de repeticiones. La disminución adicional de la concentración, hasta 0,250 unidades, disminuyó la especificidad. A 0,125 unidades, no se producía la reacción. La mayor especificidad se produjo con una concentración de Taq de 0,375 unidades.

50 **Ejemplo 16. Variación de la pendiente como función de la concentración de Taq en una LATE-PCR en tiempo real y en una LATE-PCR doble en tiempo real.**

Se diseñó un ensayo de LATE-PCR en tiempo real doble para la amplificación simultánea de secuencias dentro de exones de los genes Oct4 y Xist murinos (número de registro de GenBank NM 013633 y L04961, respectivamente). Se realizó cada reacción en un volumen final de 50 µl y contenía los siguientes reactivos: 1 X tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) compuesto por Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, y KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 0,4 mM de cada dNTP, cebador limitante de Oct4 50 nM que presenta la secuencia 5' TGGCTGGACACCTGGCTTCAGACT 3' (SEQ ID NO: 33), cebador en exceso de Oct4 2 µM que presenta la secuencia 5' CAACTTGGGGGACTAGGC 3' (SEQ ID NO: 34), cebador limitante de Xist 100 nM que presenta la secuencia 5' GGTCGTACAGGAAAAGATGGCGGCTCAA 3' (SEQ ID NO: 35), cebador en exceso de Xist 2 µM que presenta la secuencia 5' TGAAAGAAACCACTAGAGGGCA 3' (SEQ ID NO: 36), 1 µM de una sonda de baliza molecular de Oct4 de bajo punto de fusión que presenta la secuencia 5' TET-CCG CCT GGG ATG GCA TAC TGT GGA AGG CGG-Dabcyl 3' (SEQ ID NO: 37) y 300 nM de un reactivo de prevención del cebado erróneo (que se denomina compuesto 9-3bDD) que presenta la secuencia 5' Dabcyl-CGTTATAATGAAATTATAACG-Dabcyl 3' (SEC ID nº 38). Se incluyó también Taq ADN polimerasa Platinum® complejada con anticuerpo (Invitrogen, Carlsbad, CA) en la mezcla de PCR a concentraciones de 1, 2 ó 3 unidades por ensayo). No se añadió en este ejemplo una sonda de baliza molecular

para la detección de amplicones de Xist.

En paralelo con estas LATE-PCR dobles, se realizó también una serie de ensayos para la amplificación mediante LATE-PCR de sólo el amplicón de Oct4. Estos ensayos presentaban idéntica composición que los ensayos dobles mencionados anteriormente, excepto por la omisión del cebador limitante de Xist y el cebador en exceso de Xist.

Se añadió ADN genómico de ratón (Sigma, St Louis, MO) a todos los ensayos y se proporcionaron los moldes para la amplificación mediante PCR. Se calculó el número de genomas añadidos a cada tubo como 1000, basándose en un tamaño de 6 pg/genoma (véase Vendrely y Vendrely (1949) *Experientia* 5: 327-329).

Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se llevó a cabo la amplificación en un detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, CA) con un perfil de ciclado térmico compuesto por 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos; 6 ciclos a 95°C durante 10 s, 63°C durante 20 s y 72°C durante 30 s; y 54 ciclos a 95°C durante 15 s, 55°C durante 25 s, 72°C durante 35 s y 45°C durante 30 s, con adquisición de fluorescencia a 45°C en el canal de TET.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 24, que representa gráficamente las señales fluorescentes generadas mediante la acumulación de amplicones de Oct4 a través de hibridación con la sonda de baliza molecular TET-Oct4. Cuando sólo estaba presente un par de cebadores, una concentración de Taq polimerasa creciente desde 1 unidad/ensayo (círculo 241) hasta 2 unidades/ensayo (círculo 242) o 3 unidades/ensayo (círculo 243) aumentó la pendiente de las señales, debido a un aumento de la eficacia de amplificación. Las señales identificadas mediante los círculos 242 y 243 (2 y 3 unidades/ensayo, respectivamente) estaban intercaladas, lo que sugiere que se había alcanzado la eficacia máxima a aproximadamente estos niveles. Tal como se esperaba, las pendientes de las líneas generadas mediante las reacciones dobles (círculos 244, 245 y 246) eran en todos los casos inferiores a las generadas mediante amplificación de un único amplicón, debido a que la Taq polimerasa se utilizó a dos veces esa tasa. Como en el caso de la LATE-PCR de amplicón único, el aumento de la concentración de Taq en la reacción doble desde 1 unidad/ensayo (círculo 244) hasta 2 unidades/ensayo (círculo 245) o 3 unidades/ensayo (círculo 246) provocó un aumento de la pendiente de la señal. No se experimentó ningún aumento adicional en la pendiente inicial de las 3 unidades/ensayo (círculo 246) en comparación con la pendiente inicial de las 2 unidades/ensayo (círculo 245), lo que sugiere de nuevo que se había alcanzado la eficacia máxima. Sin embargo, las muestras de 3 unidades/ensayo (círculo 246) alcanzaron rápidamente una meseta y la pendiente comenzó a disminuir, a diferencia de la de las muestras de 2 unidades/ensayo (círculo 245), lo que indica la probable aparición de cebado erróneo en presencia de la concentración de Taq más alta sometida a prueba, lo que no era el caso para las muestras 243, que también contenían 3 unidades de Taq/ensayo pero sólo un par de cebadores. A pesar de la superior cantidad de Taq disponible en los ensayos de un único amplicón en comparación con los ensayos dobles (utilizándose 3 unidades para generar un amplicón en vez de dos amplicones al mismo tiempo), se produjo más cebado erróneo en los ensayos dobles debido a la adición de los cebadores de Xist. Con el fin de obtener una eficacia máxima sin cebado erróneo, es necesario por tanto optimizar la concentración de Taq polimerasa en consideración del número y las secuencias de los cebadores añadidos a la reacción.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento homogéneo de detección y amplificación mediante LATE-PCR no simétrica que reduce la dispersión entre ensayos repetidos que comprende:

- (i) realizar una reacción de amplificación mediante LATE-PCR que incluye una temperatura de apareamiento de cebadores para generar por lo menos un producto de amplificación monocatenario en presencia de: (a) un molde, (b) un par de cebadores de LATE-PCR que comprende un cebador limitante y un cebador en exceso que se hibridan con sus secuencias diana a la temperatura de apareamiento de cebadores, (c) un tinte de ADN fluorescente que resulta excitable de manera fluorescente cuando se asocia con ADN bicatenario a temperaturas que incluyen, y superiores a, la temperatura de apareamiento de cebadores, (d) por lo menos una sonda de hibridación de baja temperatura marcada de manera fluorescente que se hibrida a dicho por lo menos un producto de amplificación monocatenario a una temperatura inferior a la temperatura de apareamiento de cebadores pero no a la temperatura de apareamiento de cebadores;
- (ii) detectar los amplicones bicatenarios mediante la señal fluorescente a partir del tinte de ADN a una temperatura a la que dicha por lo menos una sonda no se hibrida con dicho por lo menos un producto de amplificación;
- (iii) detectar los productos de amplificación monocatenarios mediante la señal o señales fluorescente(s) específica(s) de secuencia a partir de dicha por lo menos una sonda hibridada con dicho por lo menos un amplicón monocatenario a una temperatura o temperaturas inferior(es) a la temperatura de apareamiento de cebadores, y
- (iv) normalizar las señales calculando una razón entre la fluorescencia del producto o los productos de amplificación monocatenario(s) y la fluorescencia de amplicones bicatenarios, reduciéndose así la dispersión entre repeticiones.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sonda de hibridación para dicho por lo menos un producto de amplificación monocatenario es una sonda bicatenaria extinguida de discriminación de alelos, en el que opcionalmente el procedimiento comprende por lo menos dos sondas para diferentes productos de amplificación monocatenarios que están marcadas con el mismo fluoróforo pero presentan diferentes temperaturas de fusión con respecto a sus dianas, en el que dicha etapa de detección a baja temperatura incluye detectar la emisión de dicho fluoróforo a una temperatura a la que sólo una sonda se une a su diana y a una temperatura a la que por lo menos dos sondas se unen a sus respectivas dianas.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que (i) la sonda que se hibrida con dicho por lo menos un producto de amplificación monocatenario está marcada con un fluoróforo que se estimula indirectamente mediante emisión de fluorescencia de dicho tinte de ADN fluorescente, y en el que la detección de dicho por lo menos un producto de amplificación monocatenario incluye la estimulación del tinte de ADN fluorescente y la detección de la fluorescencia emitida por dicha sonda; o (ii) el procedimiento comprende por lo menos una sonda de hibridación que tolera apareamiento erróneo que se une a por lo menos dos productos de amplificación monocatenarios posibles para formar híbridos que presentan temperaturas de fusión diferentes inferiores a la temperatura utilizada para aparear cebadores en dicha amplificación y que está marcada con un fluoróforo que se estimula indirectamente mediante emisión de fluorescencia a partir de dicho tinte de ADN fluorescente, en el que la detección del producto monocatenario incluye la detección a baja temperatura a múltiples temperaturas determinadas mediante dichas temperaturas de fusión diferentes.

4. Procedimiento según la reivindicación 3(ii), en el que dicha sonda de hibridación que tolera el apareamiento erróneo es una sonda de hibridación lineal que forma una estructura secundaria que comprende una región bicatenaria de 1-4 nucleótidos de longitud durante dicha detección a baja temperatura, en el que la fluorescencia resultante de dicha estructura secundaria se extingue internamente; y/o en el que dicha sonda de hibridación que tolera el apareamiento erróneo es una sonda de baliza molecular.

5. Procedimiento según la reivindicación 3(ii), que comprende una pluralidad de sondas de hibridación de baja temperatura marcadas de manera fluorescente de manera diferente, cada una de las cuales presenta una temperatura de fusión con respecto a cualquier diana que es inferior a la temperatura de apareamiento de cebadores y que en combinación se hibridan con múltiples posibles secuencias diana, siendo por lo menos dos sondas que toleran el apareamiento erróneo que se hibridan con una pluralidad de posibles dianas a temperaturas diferentes y que presentan fluoróforos que se excitan mediante emisión de fluorescencia de dicho tinte, en el que la detección de los productos de amplificación monocatenarios incluye estimular dicha mezcla de reacción de amplificación a por lo menos tres temperaturas inferiores a dicha temperatura de apareamiento de cebadores con luz que excita el tinte pero no los fluoróforos de dichas sondas que toleran el apareamiento erróneo y detectar las emisiones de las sondas que toleran el apareamiento erróneo.

FIGURA 1

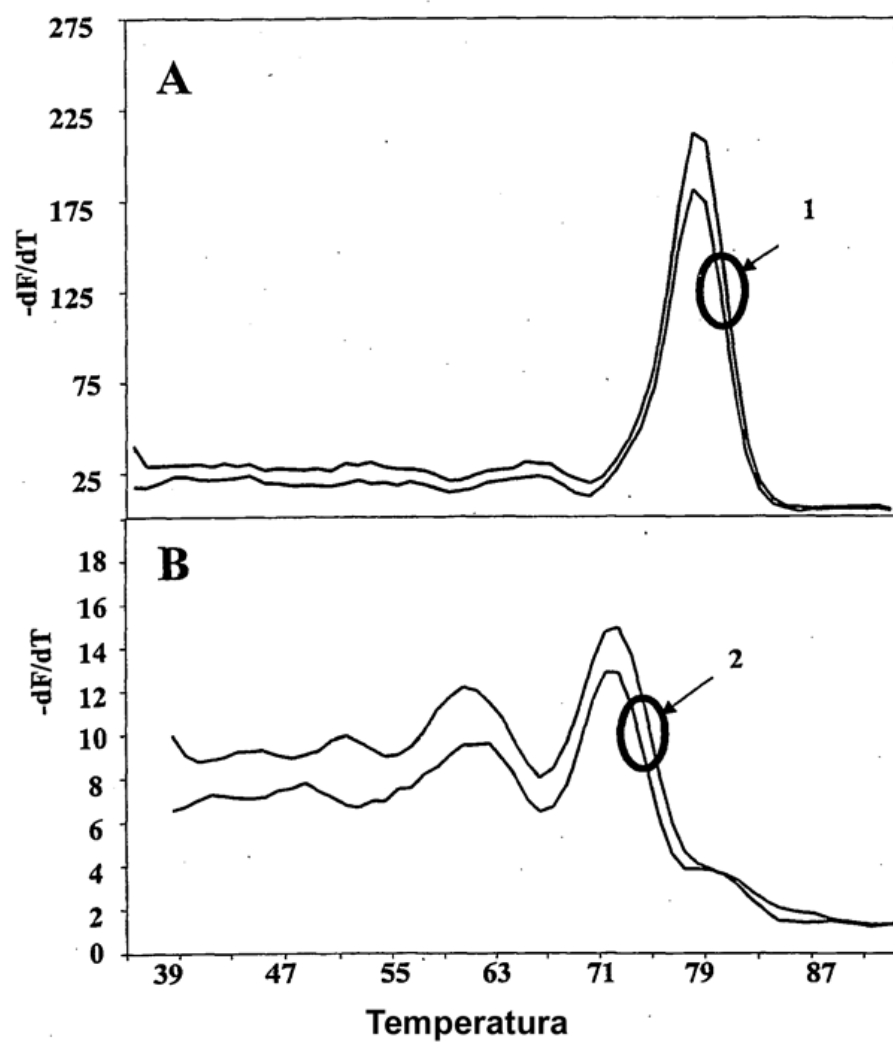


FIGURA 2

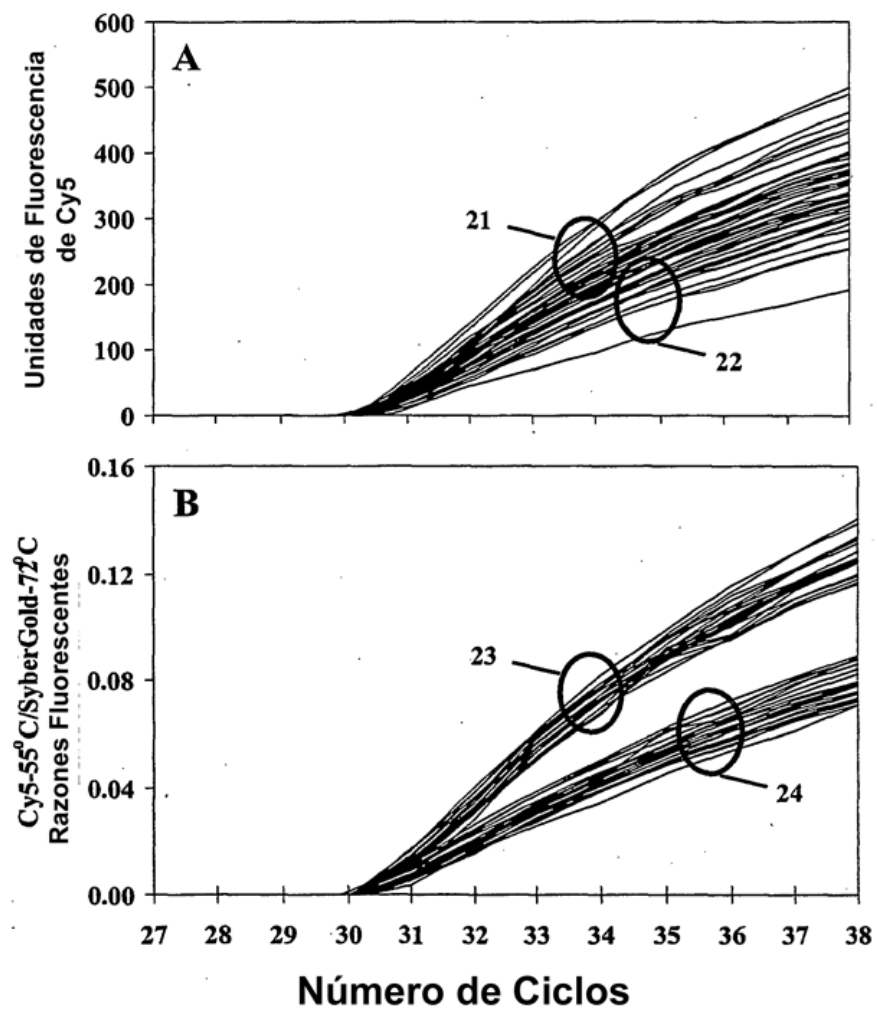


FIGURA 3

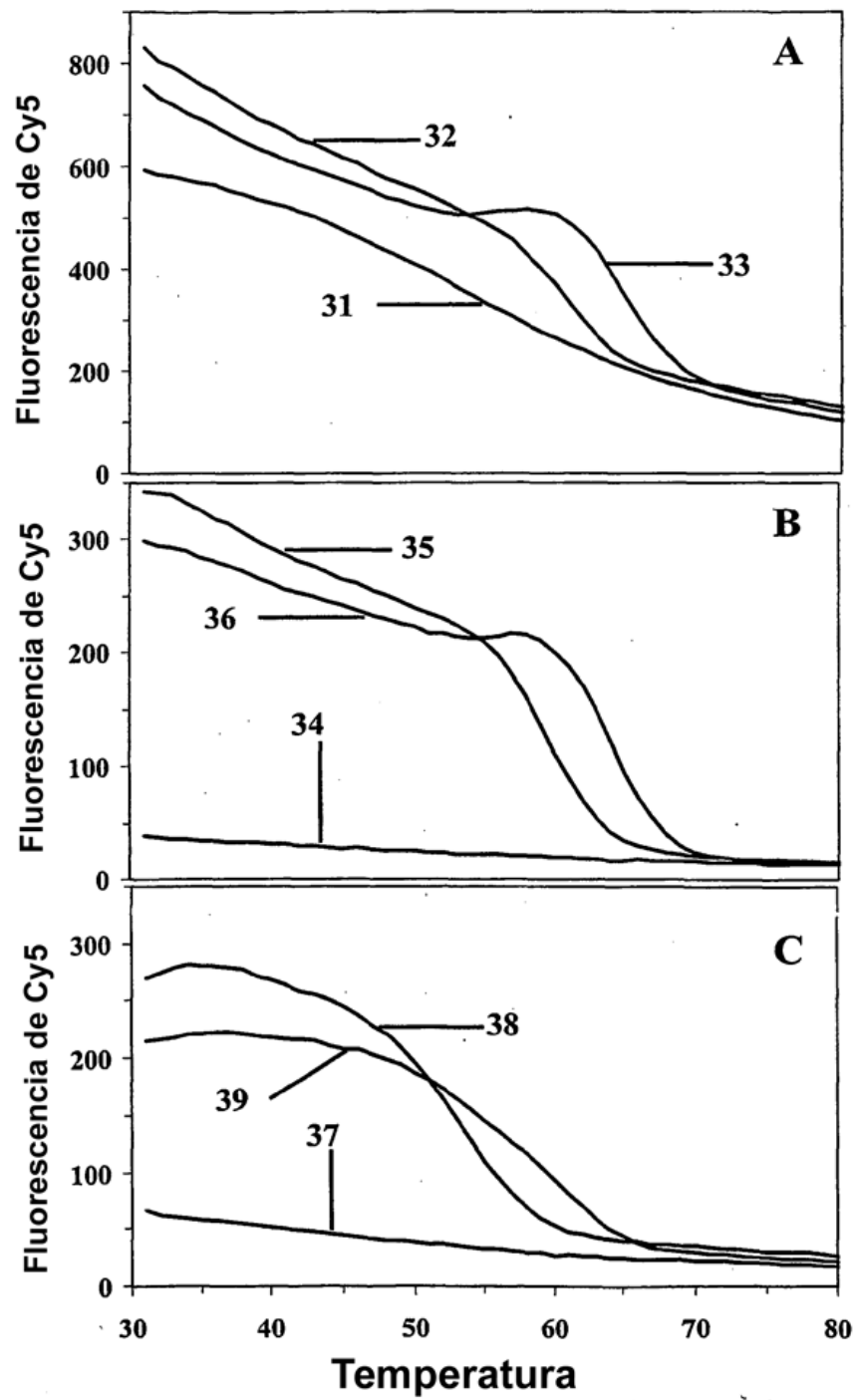


FIGURA 4

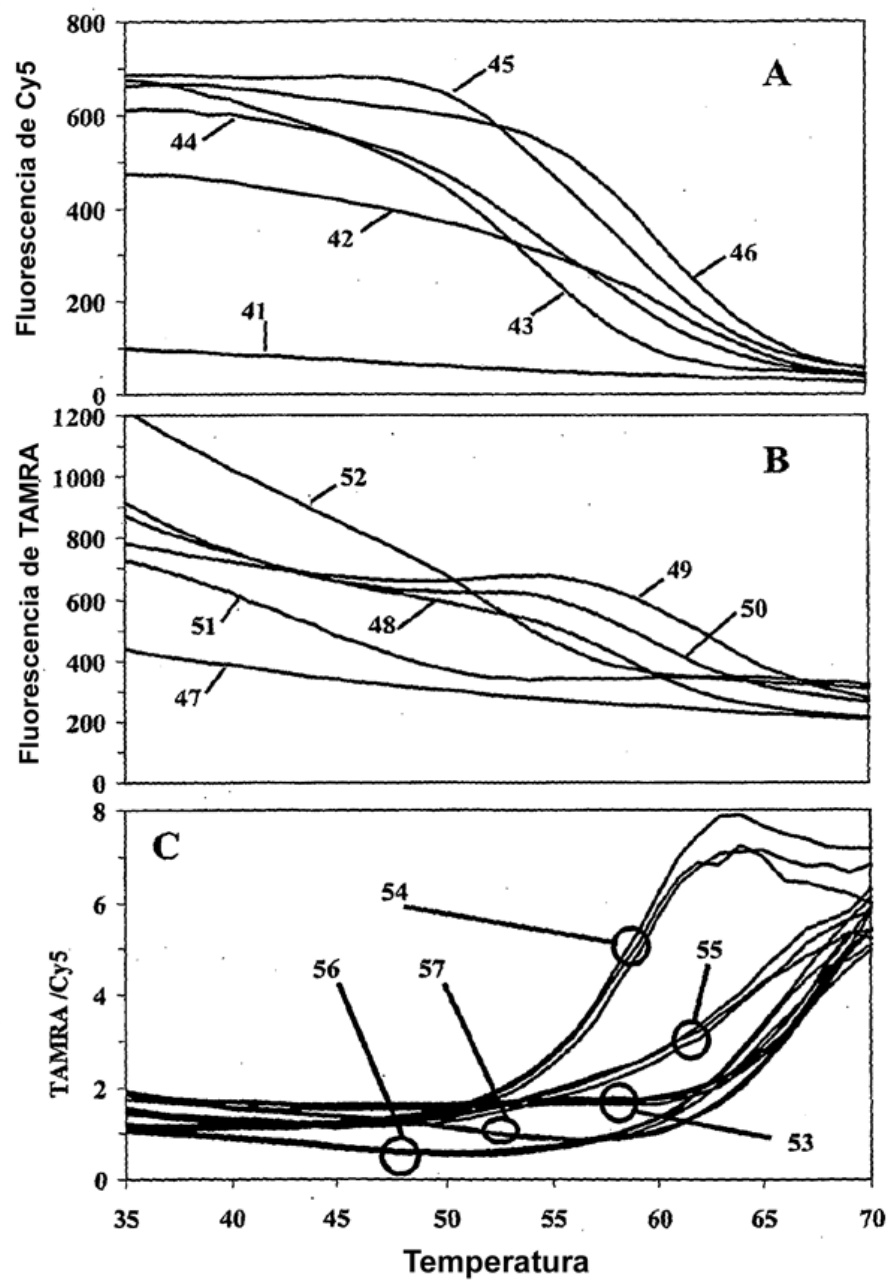


FIGURA 5

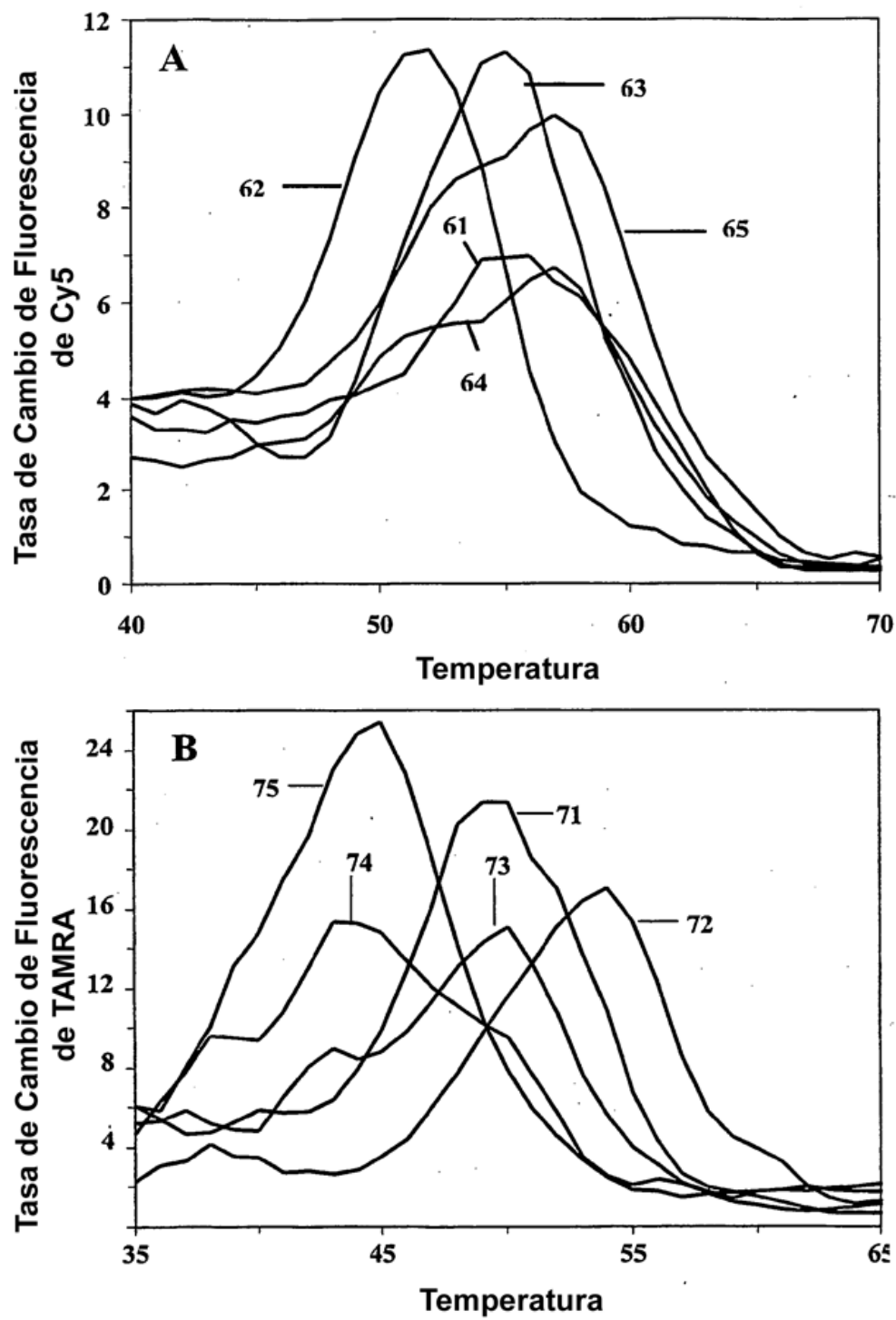


FIGURA 6

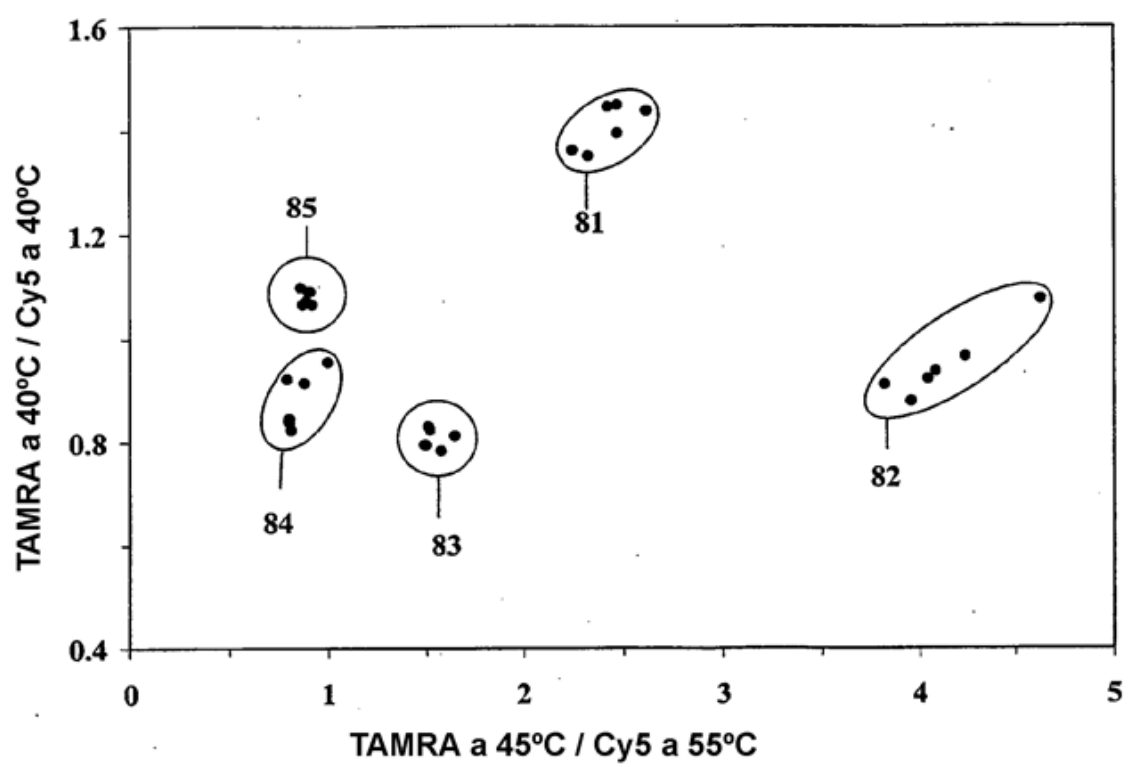


FIGURA 7

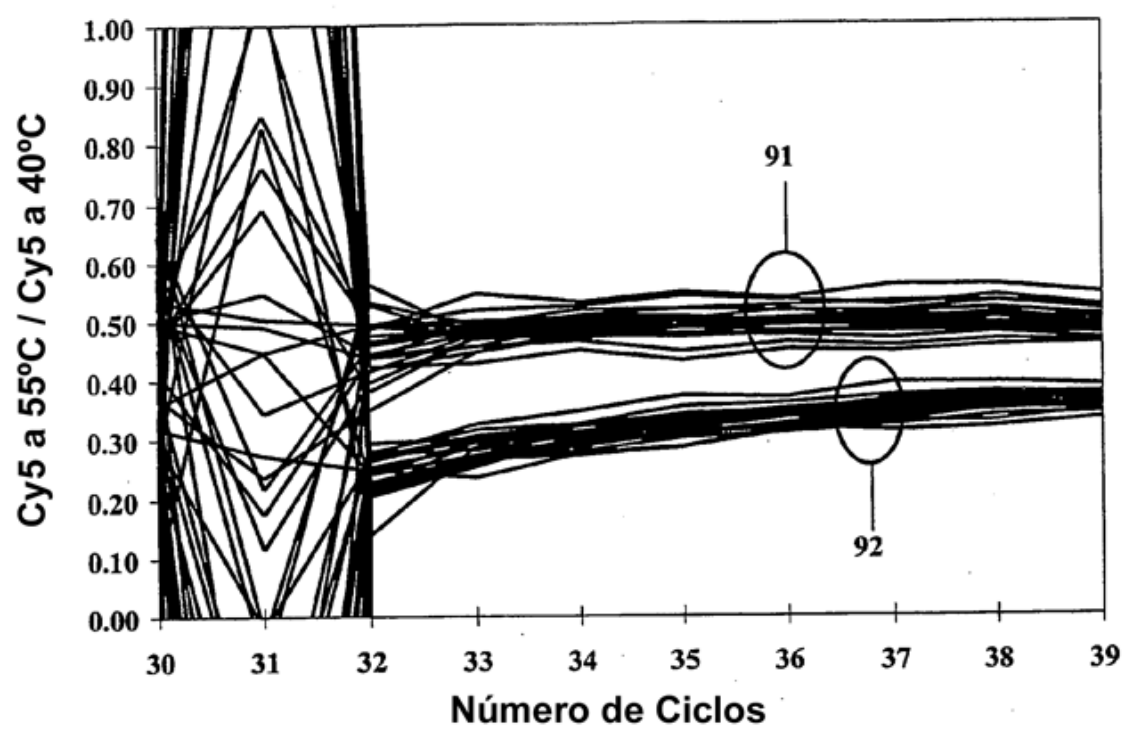


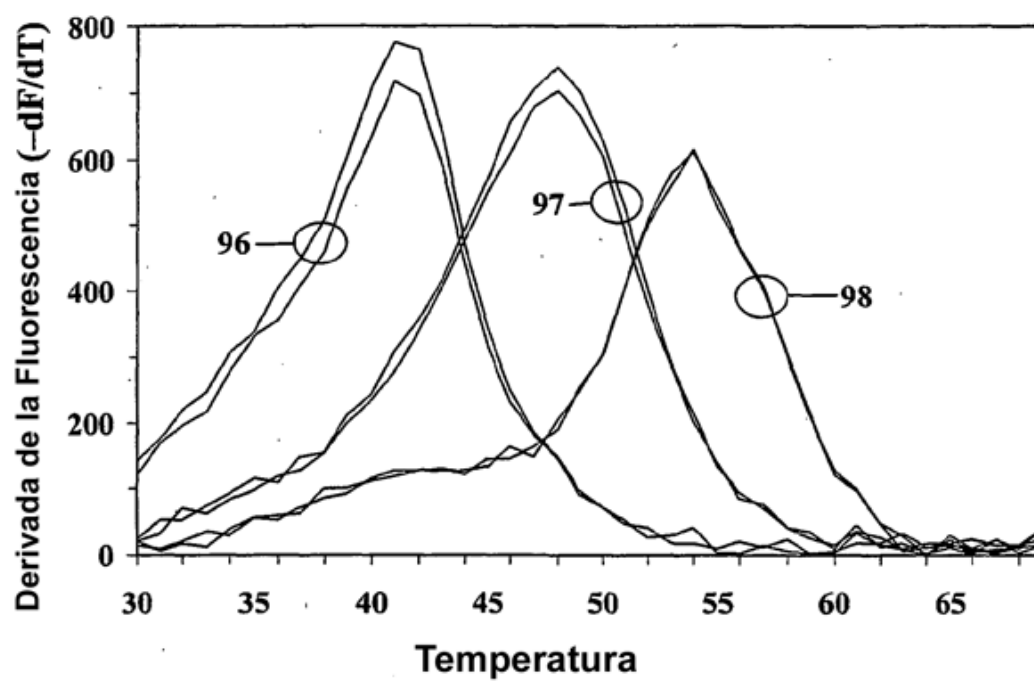
FIGURA 8

FIGURA 9

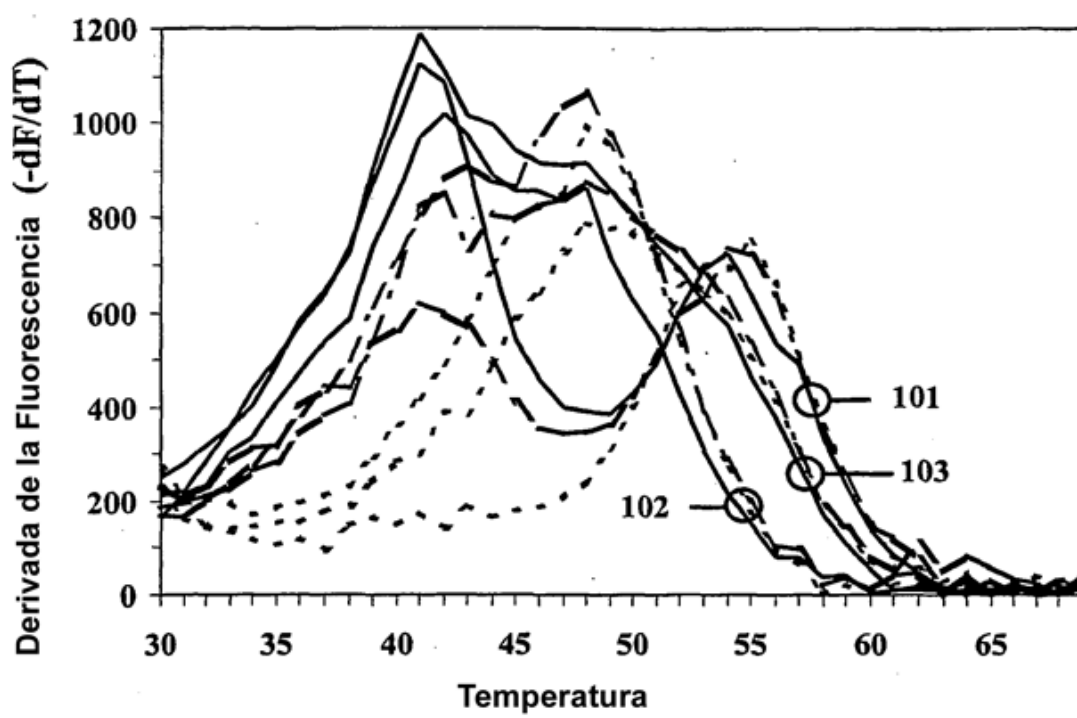


FIGURA 10

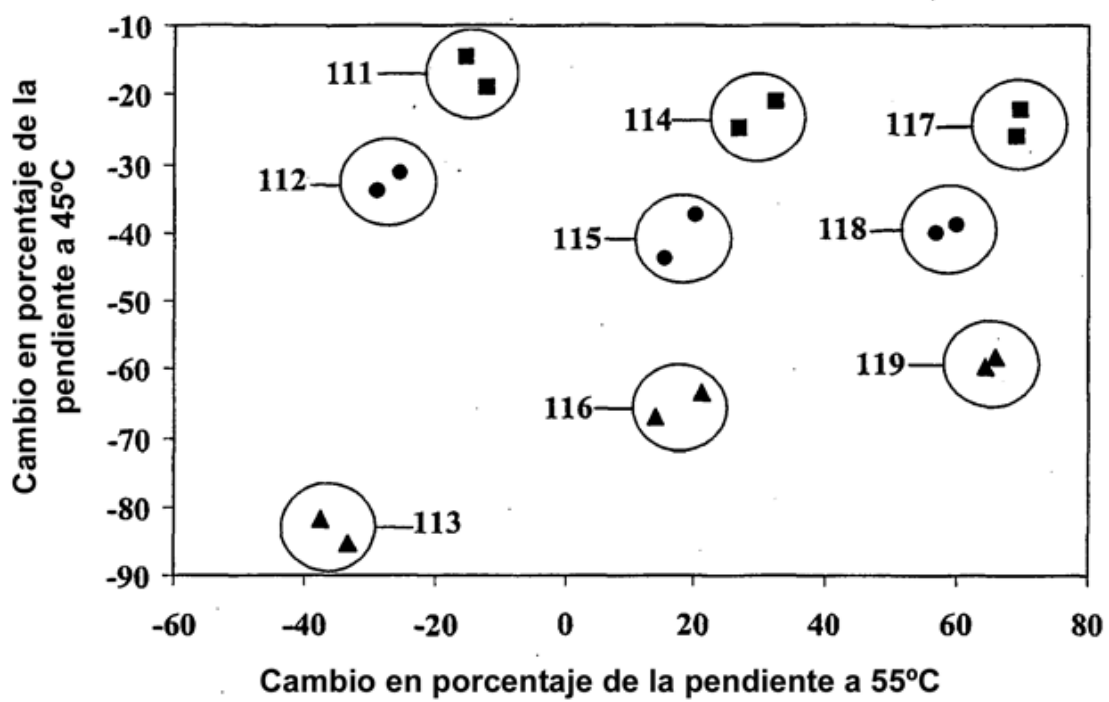


FIGURA 11

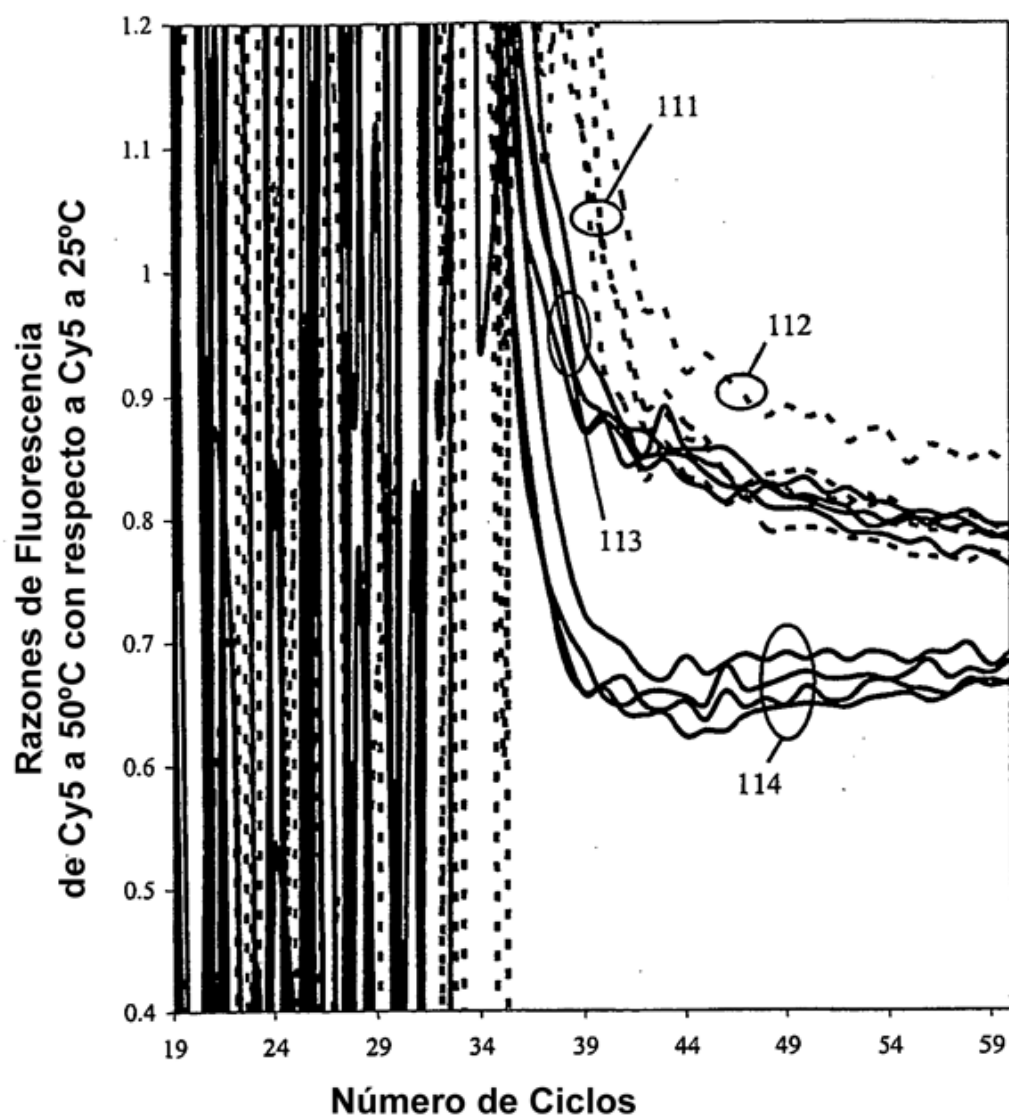


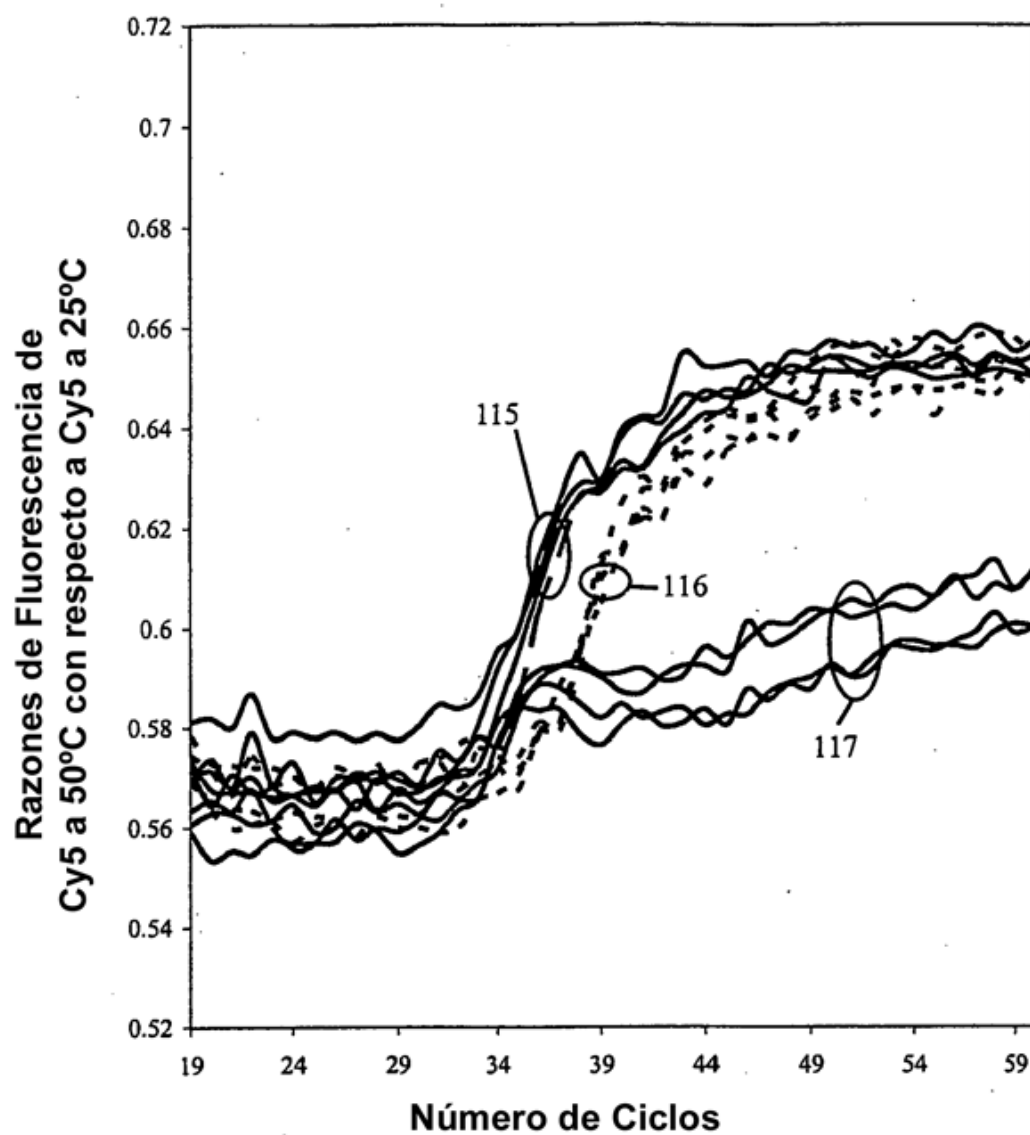
FIGURA 12

FIGURA 13

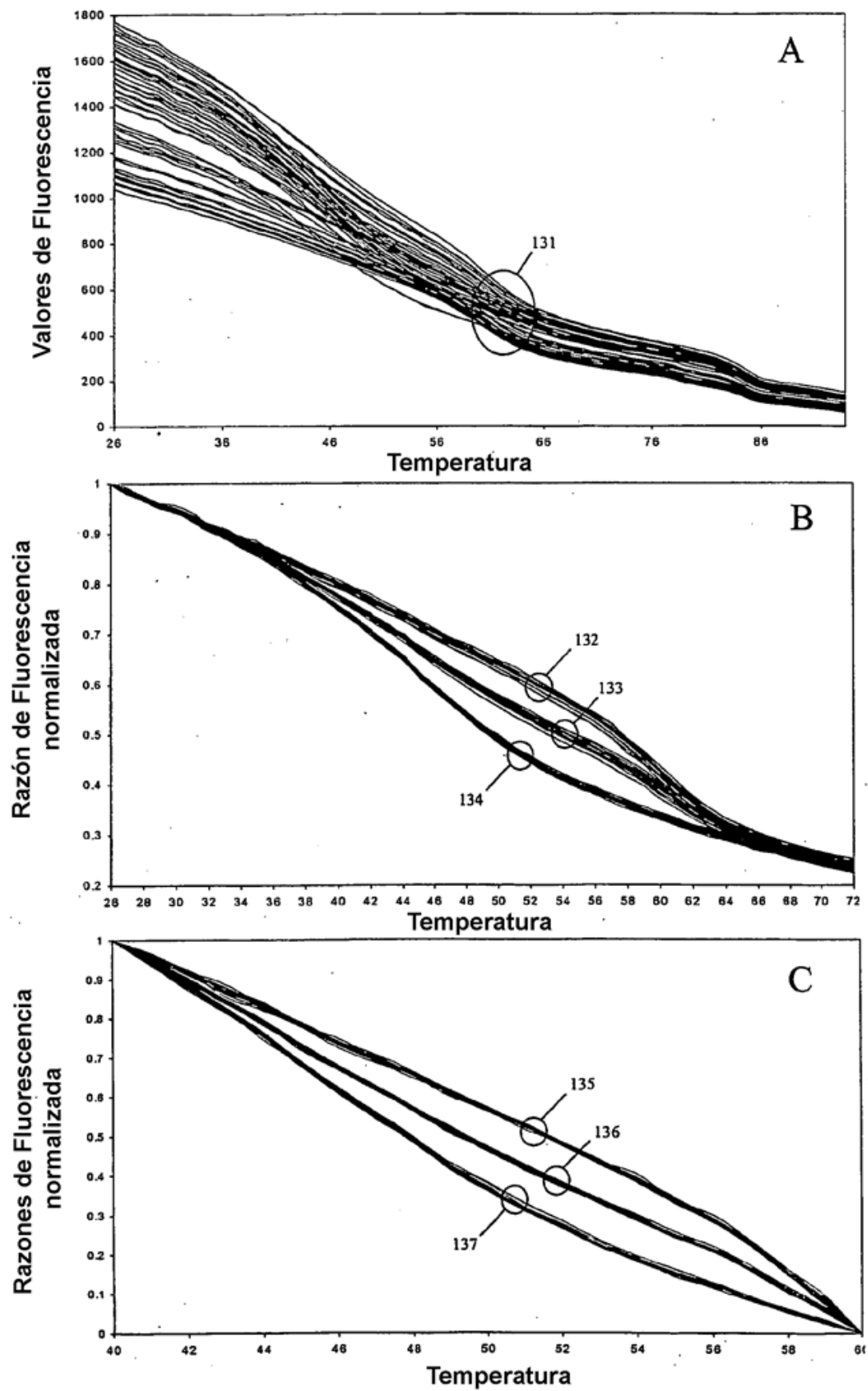


FIGURA 14

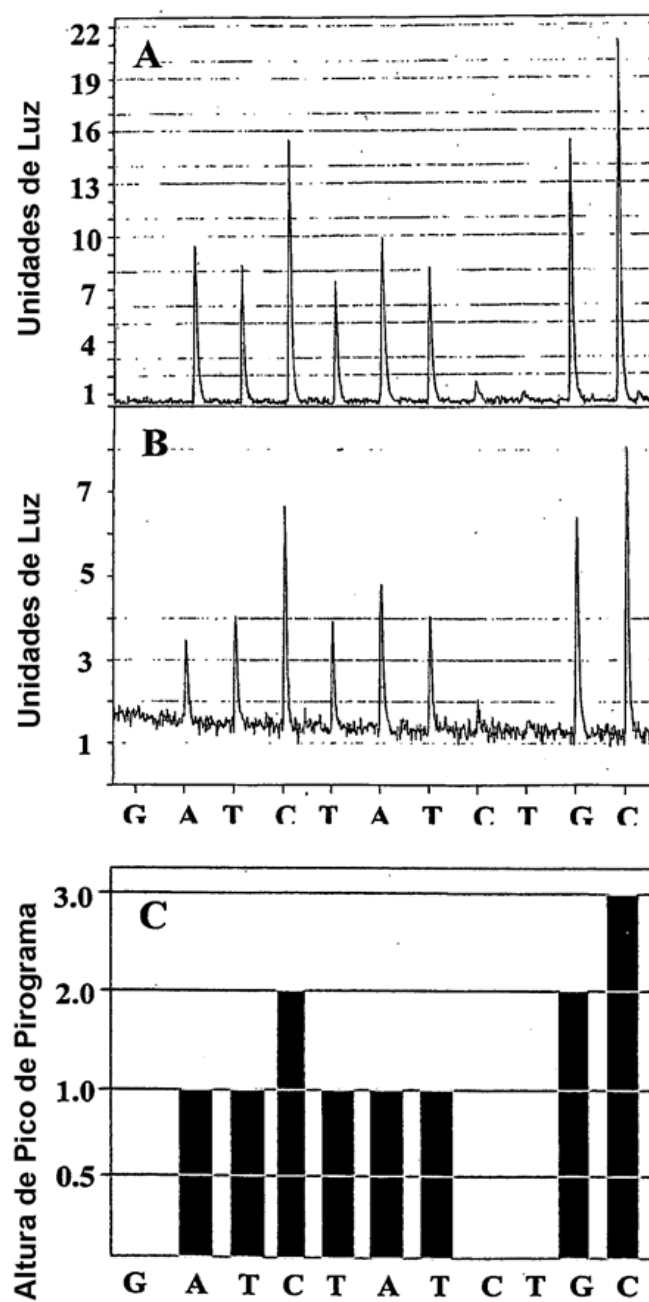


FIGURA 15

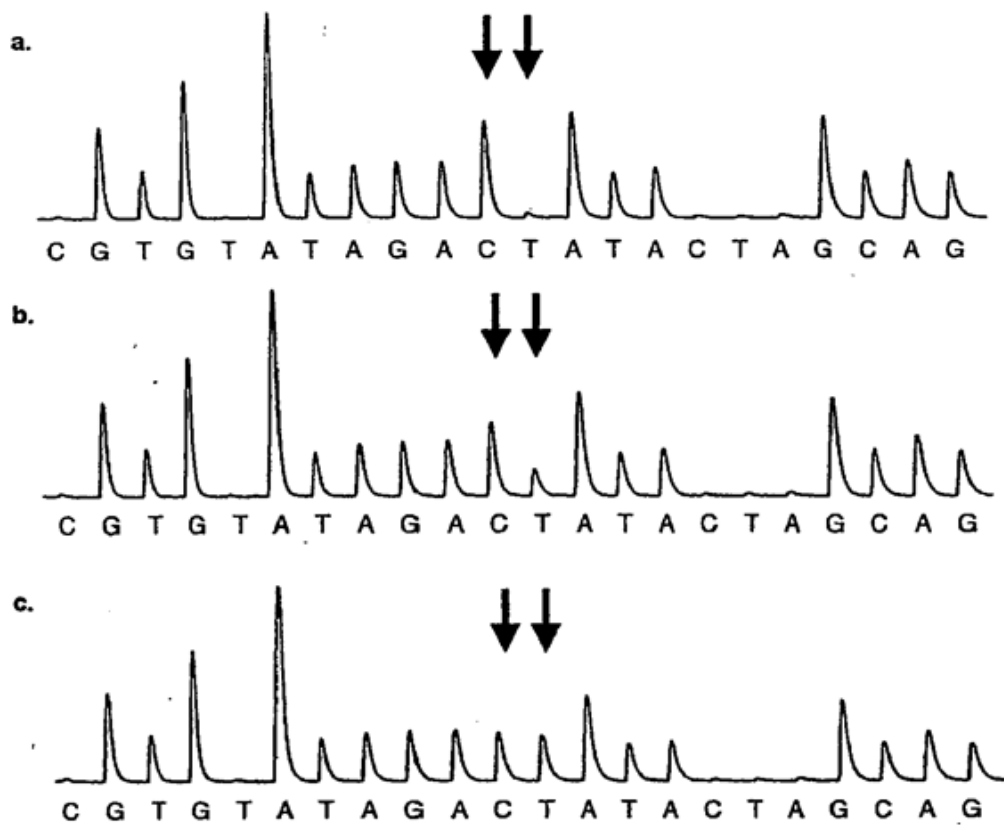


FIGURA 16

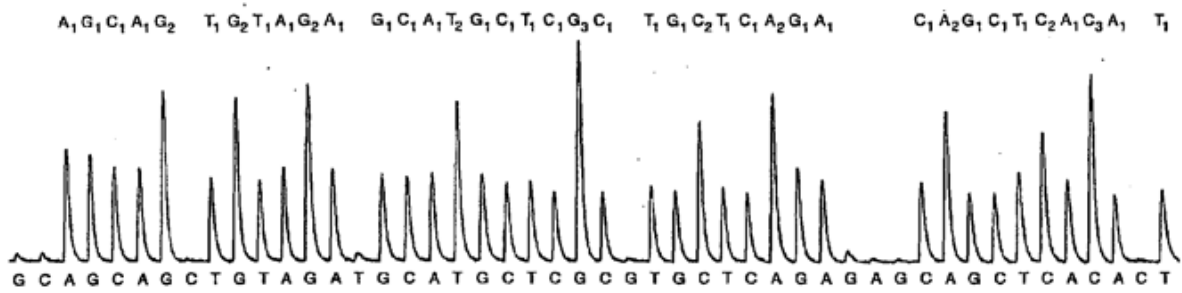
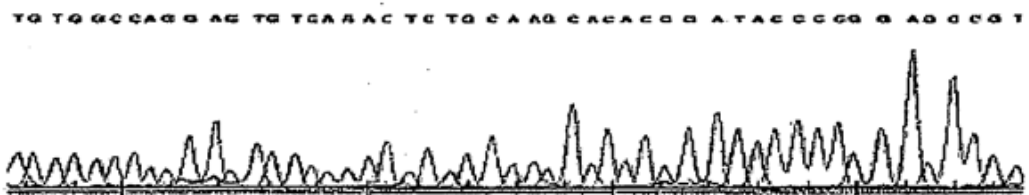


FIGURA 17

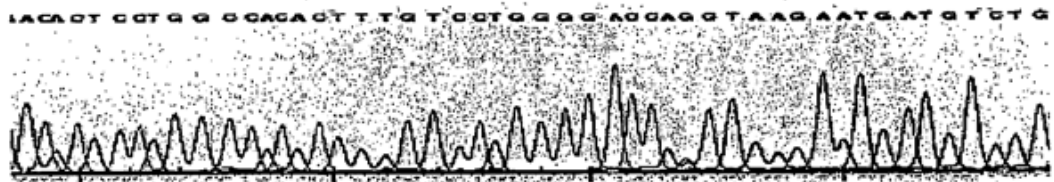
A



B



C



D

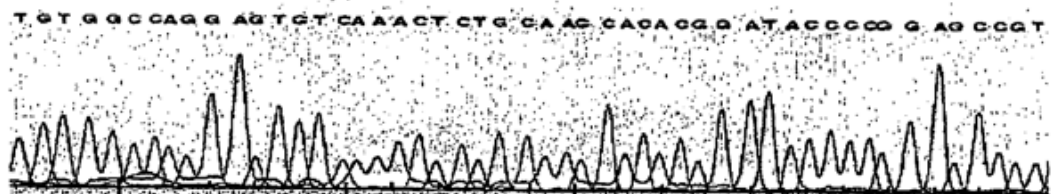


FIGURA 18

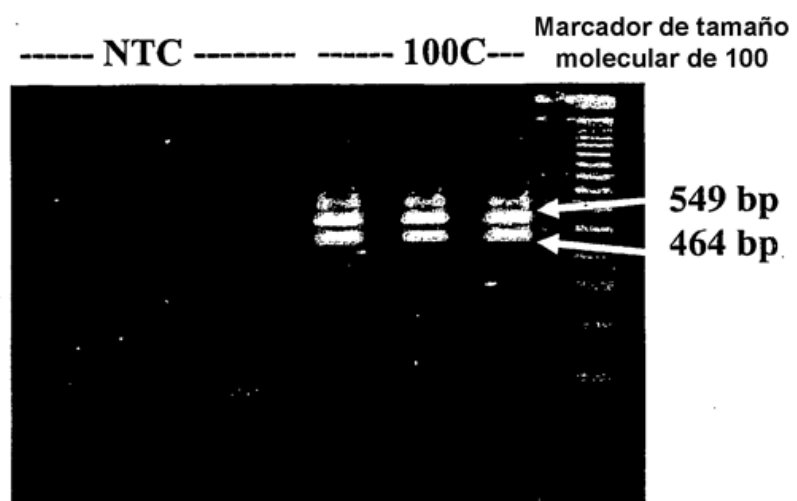


FIGURA 19

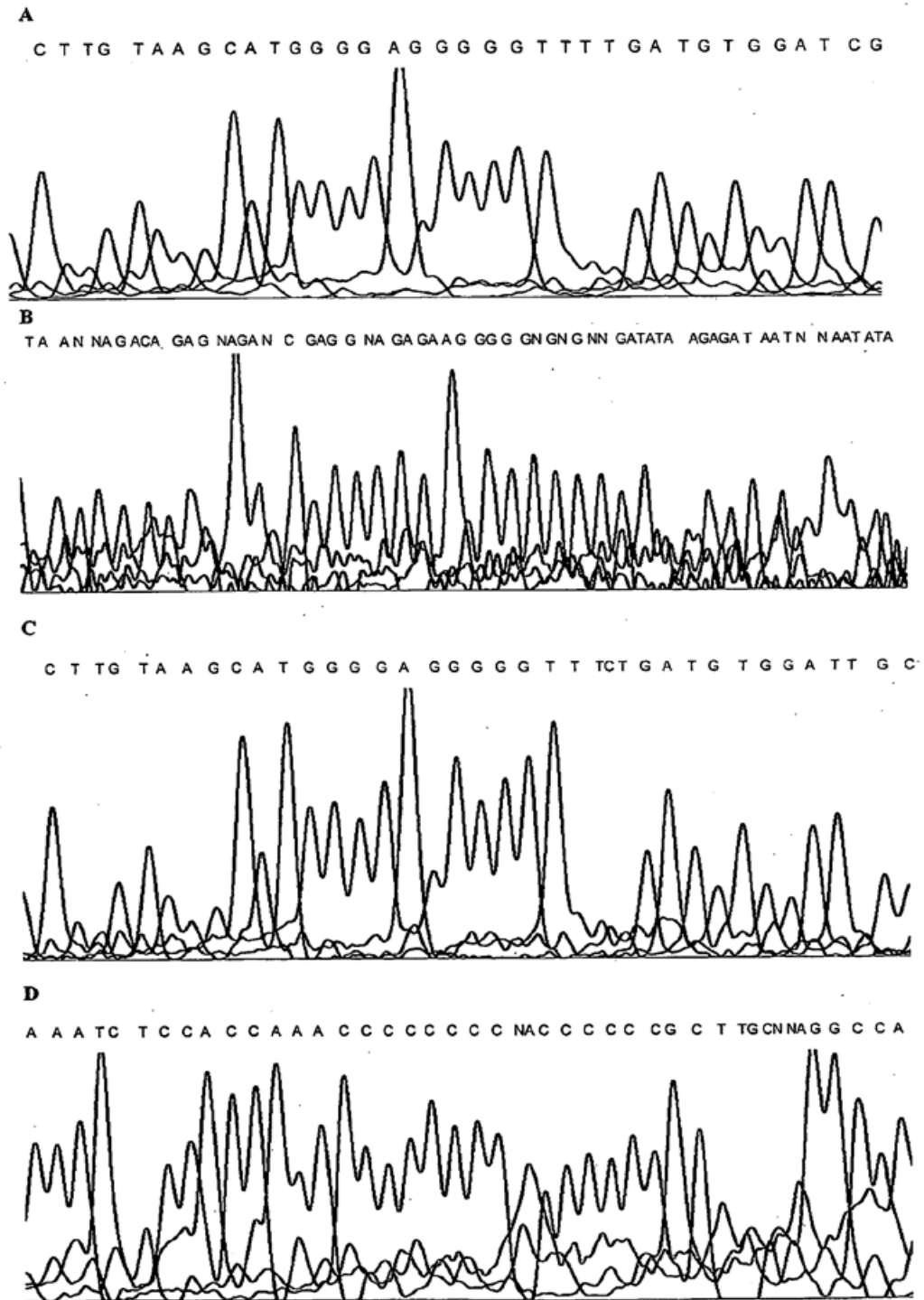


FIGURA 20

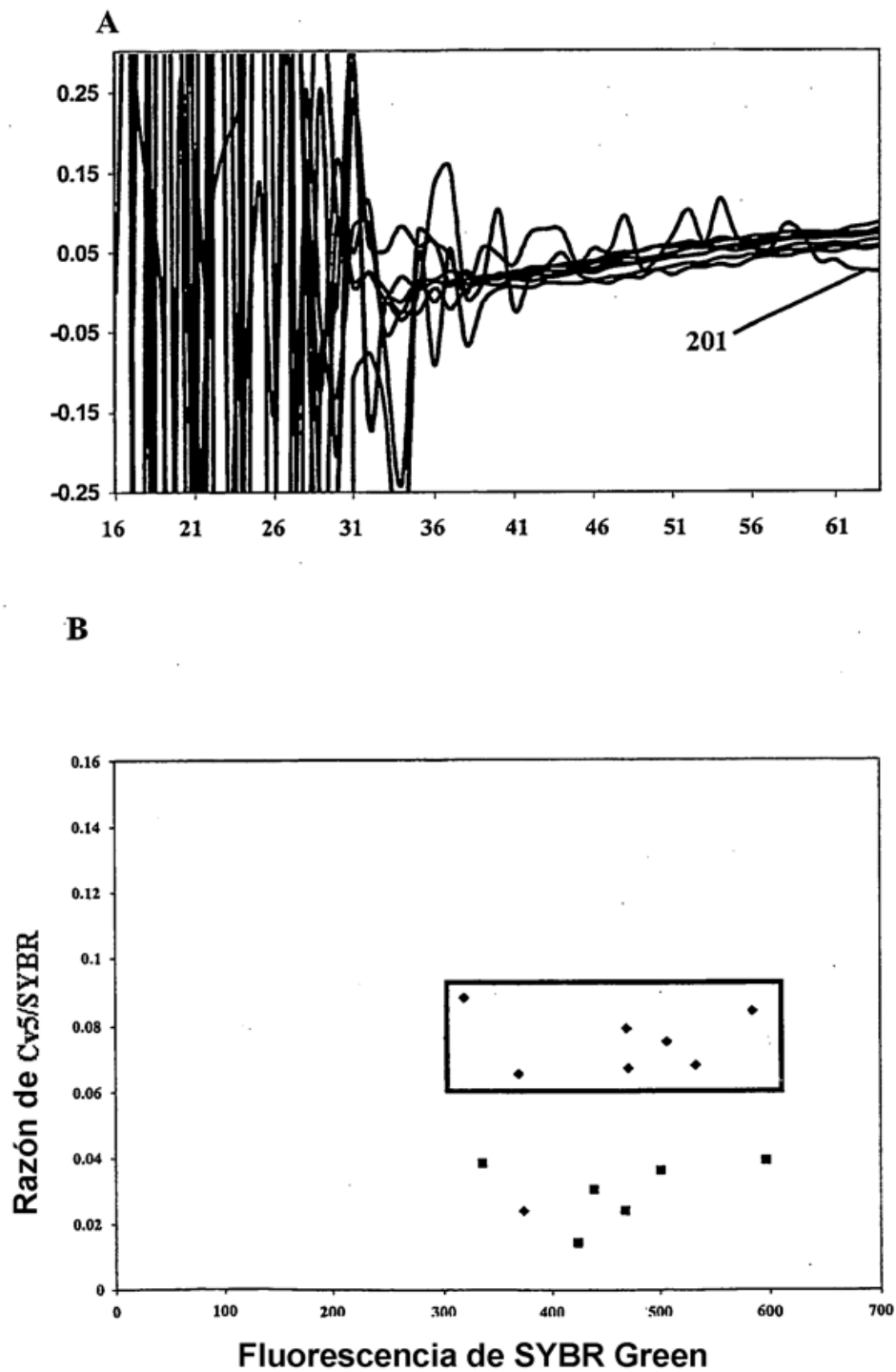


FIGURA 21

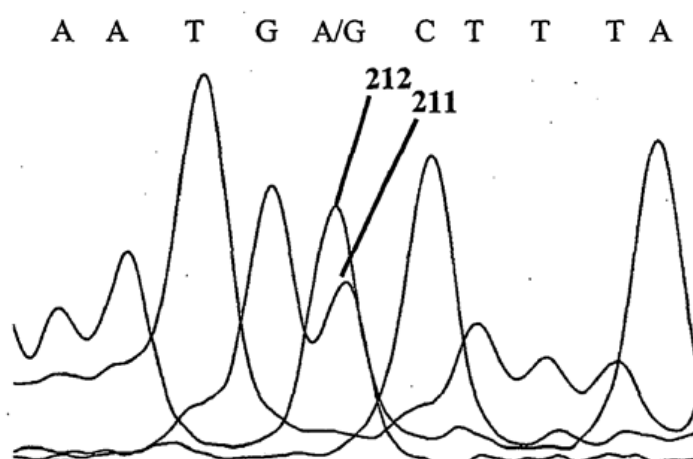


FIGURA 22

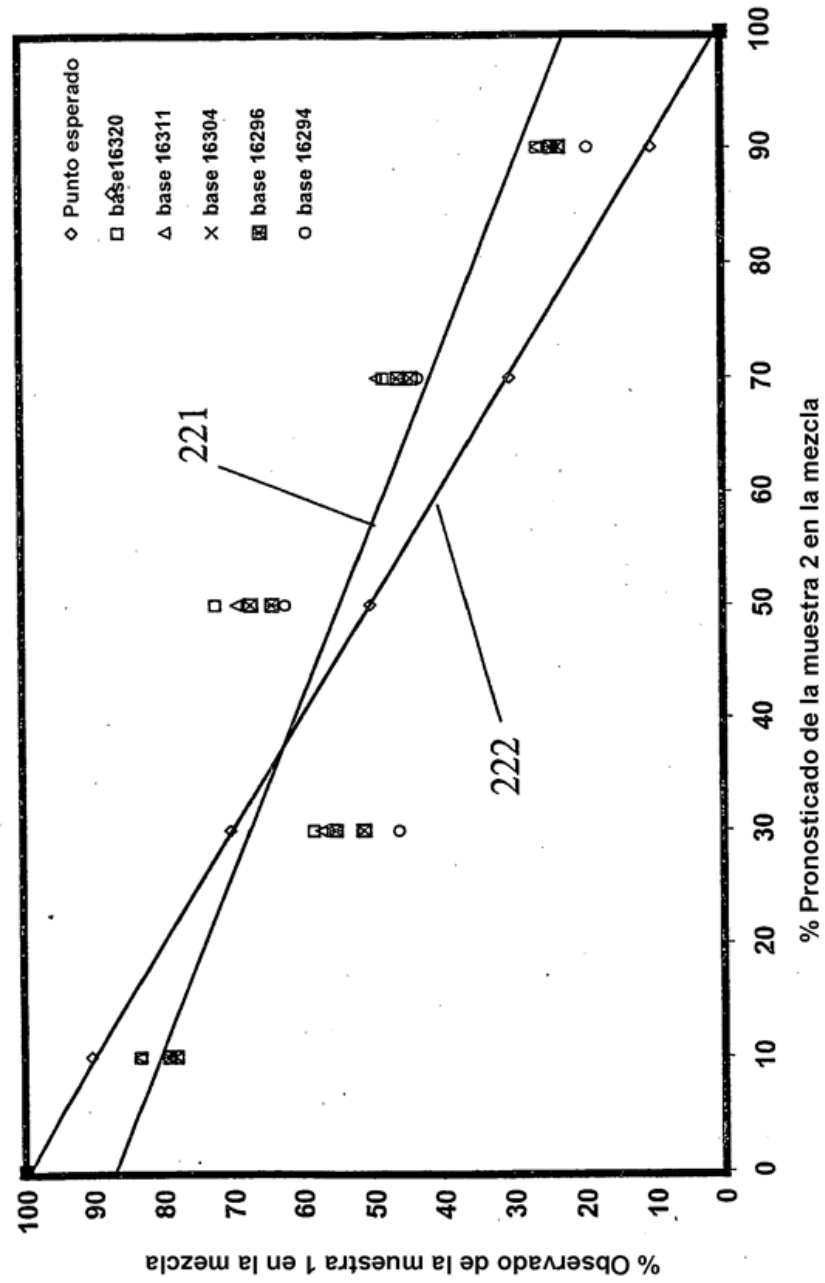


FIGURA 23

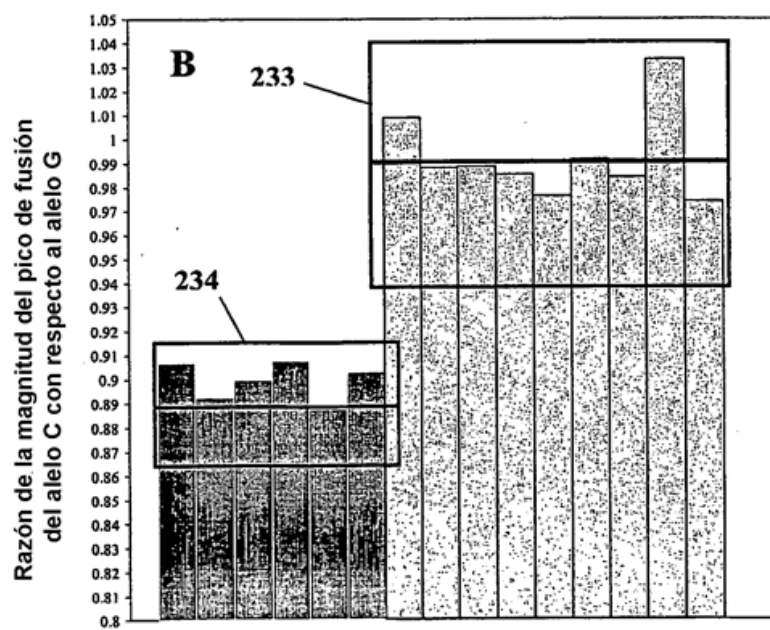
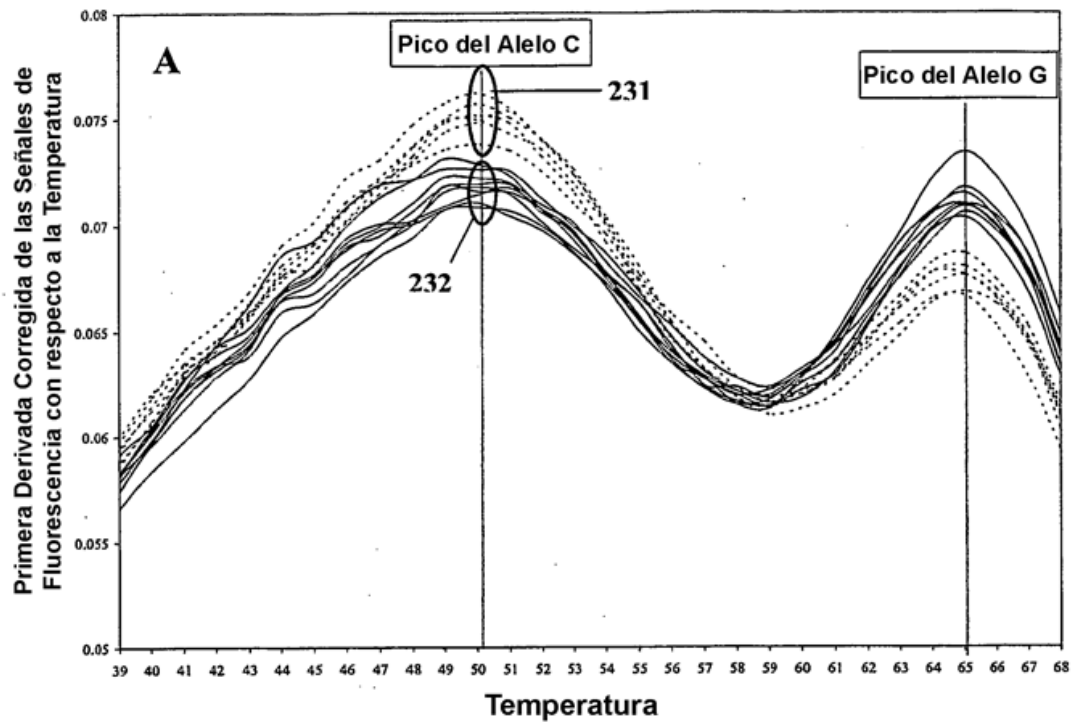


FIGURA 24

