



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 699**

51 Int. Cl.:
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02752409 .9**
96 Fecha de presentación : **16.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1415152**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2004**

54 Título: **Procedimiento, aparato y programas informáticos para verificar la integridad de una sonda.**

30 Prioridad: **16.07.2001 US 906897**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

73 Titular/es: **CEPHEID**
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, California 94089, US

72 Inventor/es: **Sakai, Stanley, H. y**
McMillan, William

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 365 699 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

Procedimientos, aparato y programas informáticos para verificar la integridad de una sonda

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los procedimientos para amplificar ácidos nucleicos proporcionan herramientas útiles para la detección de patógenos humanos, detección de polimorfismos genéticos humanos, detección de ARN y secuencias de ADN, para la clonación molecular, secuenciación de ácidos nucleicos y similares. En particular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta importante en la clonación de secuencias de ADN, medicina forense, pruebas de paternidad, identificación de patógenos, diagnóstico de enfermedades y otros procedimientos útiles en los que se desea la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich, ed., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds, 1990).

15 La PCR permite la copia, y la amplificación resultante, de un ácido nucleico diana. Brevemente, un ácido nucleico diana, por ejemplo el ADN, se combina con un cebador de sentido directo y de sentido contrario, dNTP, ADN polimerasa y otros componentes de reacción. Véase Innis y col. El cebador de sentido directo puede hibridarse con la hebra codificante de una secuencia de ADN de interés. El cebador de sentido contrario puede hibridarse con la hebra codificante de la secuencia de ADN, en la dirección 3' de la localización en la que el cebador de sentido directo se hibrida con la diana de ADN. En la primera ronda de amplificación, la ADN polimerasa extiende los cebadores de sentido contrario y de sentido directo que están hibridados con el ácido nucleico diana. Las primeras hebras se sintetizan como hebras largas de longitud indiscriminada. En la segunda ronda de amplificación, los cebadores de sentido contrario y de sentido directo se hibridan con el ácido nucleico diana parental y con las secuencias complementarias en las hebras largas. Entonces, la ADN polimerasa extiende los cebadores hibridados para formar hebras de longitud discreta que son complementarias entre sí. Las rondas posteriores sirven para amplificar predominantemente las moléculas de ADN de longitud discreta.

20 Las sondas de hibridación se usan actualmente para detectar y cuantificar ácidos nucleicos. Tales sondas son útiles para ensayos de hibridación que incluyen ensayos de hibridación *in situ*. Otro uso de estas sondas es para detectar y cuantificar productos de polinucleótidos de reacciones de amplificación. Hay muchos tipos diferentes de ensayos que emplean sondas de hibridación de ácidos nucleicos. Algunas de estas sondas generan señales con un cambio en la fluorescencia de un fluoróforo debido a un cambio en su interacción con otra molécula o resto. Normalmente, la interacción se provoca cambiando la distancia entre el fluoróforo y la molécula de interacción o resto. Estos ensayos se basan para la generación de señales en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o "FRET." La FRET utiliza un cambio en la fluorescencia producido por un cambio en la distancia que separa un primer fluoróforo de un aceptor de energía de resonancia interactuante, tanto otro fluoróforo como un extintor de la fluorescencia. Las combinaciones de un fluoróforo y una molécula interactuante o resto, que incluye moléculas extintoras de la fluorescencia o restos, se conocen como "pares de FRET." El mecanismo de la interacción de pares de FRET requiere que el espectro de absorción de un miembro del par se solape con el espectro de emisión del otro miembro, el primer fluoróforo. Si la molécula de interacción o resto es un extintor de la fluorescencia, su espectro de absorción debe solaparse con el espectro de emisión del fluoróforo. Stryer, L., Ann. Rev. Biochem. 1978, 47: 819-846; BIOPHYSICAL CHEMISTRY part II, Techniques for the Study of Biological Structure and Function (C. R. Cantor y P. R. Schimmel, eds., 1980), páginas 448-455, y Selvin, P. R., Methods in Enzymology 246: 300-335 (1995). Una interacción de FRET eficiente, o un grado sustancial de interacción de FRET, requiere que los espectros de absorción y emisión del par tengan un gran grado de solapamiento. La eficiencia de la interacción de FRET es linealmente proporcional al solapamiento. Haugland, R. P., Yguerabide, Jr., y Stryer, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 24-30 (1969). También se han descrito sondas de no FRET. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.150.097.

25 Un procedimiento para la detección de productos de amplificación es el ensayo de PCR de 5'-nucleasa (también denominado en lo sucesivo el ensayo TaqMan®) (Holland y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991); Lee y col., Nucleic Acids Res. 21: 3761-3766 (1993)). Este ensayo detecta la acumulación de un producto de PCR específico por hibridación y escisión de una sonda fluorogénica doblemente marcada (la sonda "TaqMan®") durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica consiste en un oligonucleótido marcado con tanto un colorante de indicador fluorescente como un colorante de extintor de la fluorescencia. Durante la PCR, esta sonda es escindida por la actividad de 5'-exonucleasa de ADN polimerasa si, y solo si, se hibrida con el segmento que se amplifica. La escisión de la sonda genera un aumento en la intensidad de fluorescencia del colorante indicador.

30 Otro procedimiento para detectar productos de amplificación que se basa en el uso de transferencia de energía es el procedimiento de "sonda fluorescente" descrito por Tyagi y Kramer (Nature Biotech. 14:303-309 (1996)), que también es el objeto de las patentes de EE.UU. nº 5.119.801 y 5.312.728. Este procedimiento emplea sondas de hibridación de oligonucleótidos que pueden formar estructuras de horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (tanto el extremo 5' como 3') hay un fluoróforo donante y en el otro extremo un resto aceptor. En el caso del procedimiento de Tyagi y Kramer, este resto aceptor es un extintor de la fluorescencia, es decir, el aceptor absorbe energía liberada por el donante, pero luego no fluoresce por sí mismo. Por tanto, si la sonda fluorescente está en la conformación

abierta, la fluorescencia del fluoróforo donante es detectable, mientras que si la sonda fluorescente está en la conformación de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donante se extingue. Si se emplea en PCR, la sonda fluorescente molecular que se hibrida con una de las hebras del producto de PCR está en la conformación "abierta", y la fluorescencia se detecta, mientras que aquellas que siguen sin hibridarse no fluorescerán (Tyagi y Kramer, Nature Biotechnol. 14: 303-306 (1996). Como resultado, la cantidad de fluorescencia aumentará a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR y, por tanto, puede usarse como una medida del progreso de la PCR.

Para tener confianza en la señal, o ausencia de la misma, de una sonda de hibridación tal como aquella descrita anteriormente, el usuario debe controlar la integridad de la sonda. Por ejemplo, si el fluoróforo se ha escindido de la sonda, o el cuerpo del polinucleótido se ha escindido de la sonda, la fluorescencia no refleja con exactitud la cantidad de sonda que se une a una diana. Un control típico de la integridad de la sonda implica una mezcla de reacción separada que contiene una cantidad conocida de diana. Por tanto, si la sonda produce la señal apropiada para la muestra de control conocida, entonces se supone que la sonda está intacta. Esta técnica tiene al menos dos inconvenientes. Primero, no refleja la posibilidad de que las muestras que van a probarse, a diferencia del control, tengan enzimas que pudieran degradar las sondas en las muestras. Segundo, la técnica requiere el uso de un recipiente de reacción adicional. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento rápido y eficiente para determinar la integridad de una sonda de hibridación directamente en la propia muestra de prueba. La presente invención trata este y otros problemas.

El documento US 6.174.670 describe procedimientos de monitorización de la hibridación durante la reacción en cadena de la polimerasa. Estos procedimientos se consiguen con un ciclado térmico rápido y el uso de colorantes de ADN bicatenario o sondas de hibridación específicas. Un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia comprende fluoresceína y Cy5 o Cy5.5. Los procedimientos para cuantificar el ADN amplificado y determinar su pureza se llevan a cabo por análisis de curvas de fusión y de rehibridación.

El documento WO 97/46707 describe un procedimiento y dispositivo de ciclado térmico. El dispositivo comprende una cámara de muestra cuya temperatura puede modularse rápidamente y con exactitud durante un intervalo de temperaturas necesario para llevar a cabo varios procedimientos biológicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa de ADN. Las muestras biológicas se colocan en tubos microcapilares de vidrio y luego se sitúan dentro de la cámara de muestra. Un controlador programable regula la temperatura de la muestra dentro de la cámara de muestra. La monitorización de la amplificación del ADN se monitoriza por fluorescencia una vez por ciclo o muchas veces por ciclo.

WITTEWER Y COL.: The lightcycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control' BIOTECHNIQUES vol. 22, nº 1, enero de 1997, páginas 176-181, XP001094113, describe fluorímetros de microvolumen experimentales y comerciales con un rápido control de la temperatura. Se usó óptica de fluorescencia adoptada de la citometría de flujo para interrogar muestras de 1-10 µl en capilares de vidrio. El control homogéneo de la temperatura y el rápido cambio de las temperaturas de la muestra (10°C/s) se obtuvieron por un vórtice de aire en circulación. Se construyó una versión de 32 muestras de 2 colores prototipo con un arco de xenón para la excitación, trayectorias de excitación y emisión separadas y tubos fotomultiplicadores para la detección. El LightCycler™ comercial, un instrumento de 24 muestras de 3 colores, usa un diodo emisor de luz azul para la excitación, epi-iluminación paraxial por la punta del capilar y fotodiodos para la detección. Las aplicaciones incluyen cuantificación de analitos y curvas de fusión de ácidos nucleicos con colorantes fluorescentes, ensayos enzimáticos con sustratos fluorescentes y técnicas que usan transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. La capacidad del microvolumen permite el análisis de muestras muy pequeñas o caras. Como un ejemplo de una aplicación, la amplificación de ADN de ciclo rápido se monitorizó continuamente por tres técnicas de fluorescencia diferentes que incluían el uso de colorante de ADN bicatenario SYBR® Green I, una sonda de hidrólisis de 5'-exonucleasa doblemente marcada y fluoresceína adyacente y sondas de hibridación marcadas con Cy5™. La amplificación y el análisis completo sólo requieren 10-15 min.

'LightCycler operator's manual, version 3.5' ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS, octubre de 2000, páginas 8-190, XP002966635, es el manual de usuario correspondiente.

LI J J Y COL.: "Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, RU, vol. 28, nº 11, 1 de junio de 2000 (01/06/2000), páginas E52-1, XP002244017 ISSN: 0305-1048, describe un procedimiento basado en sondas fluorescentes moleculares para ensayar la escisión de ADN monocatenario por nucleasas específicas de una única hebra. Una sonda fluorescente molecular, una sonda de ADN con forma de horquilla marcada con un fluoróforo y un extintor de la fluorescencia se usan como sustrato y la escisión enzimática conduce al potenciamiento de la fluorescencia en la sonda fluorescente molecular. Este procedimiento permite la detección en tiempo real de la escisión de ADN y hace que sea fácil caracterizar la actividad de ADN nucleasas y estudiar la reacción cinética de escisión en estado estacionario. La excelente sensibilidad, reproducibilidad y comodidad permitirá que las sondas fluorescentes moleculares sean ampliamente útiles para el estudio de reacciones de escisión de ADN monocatenario.

El documento WO 01/16367 describe ensayos de sondas de indicador-extintor de la fluorescencia de la amplificación de ácidos nucleicos tal como PCR, que se vuelven más significativos mediante la adición de reactivos

de control interno. Un polinucleótido de control interno se amplifica con cebadores de control interno y el producto se mide por correlación con el aumento de la fluorescencia por escisión de exonucleasa mediada por polimerasa o hibridación de la sonda de control interno. Sondas específicas para polinucleótidos diana y de control interno se marcan con indicadores espectralmente resolubles que permiten la detección y la medición simultánea de la amplificación de dianas y controles. Un kit de todos los reactivos de PCR puede dispensarse a cámaras de reacción en un sistema de alto rendimiento para el rápido y preciso ensayo de amplificación de ácidos nucleicos, con mediciones en tiempo real o de punto final. Las señales fluorescentes correlacionadas con niveles diana y de control interno son espectralmente resolubles y se miden simultáneamente. Un oligonucleótido de no extensión o "bloqueo" análogo a nucleico, complementario al polinucleótido de control interno, se añade a la mezcla de amplificación para descartar la amplificación del polinucleótido de control interno y sirve de control interno negativo. Los reactivos de control de la amplificación, kits y procedimientos proporcionan pruebas de control positivo y negativo que se producen dentro de, y pueden medirse dentro de, la cámara de reacción.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento como se define en la reivindicación 1 adjunta.

En algunas realizaciones, la etapa determinante comprende comparar la fluorescencia de la sonda en el primer y tercer instante de tiempo con al menos un valor umbral. En algunas realizaciones, la etapa determinante comprende comparar la fluorescencia de la sonda en el segundo y tercer instante de tiempo con al menos un valor umbral. En algunas realizaciones, la etapa determinante comprende comparar la diferencia de fluorescencia de la sonda en el primer y segundo instante de tiempo con el valor umbral.

En algunas realizaciones, la etapa de medición comprende la fluorescencia de la sonda después de la etapa de reducción a una temperatura a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda.

En algunas realizaciones, la señal de la sonda se mide en dos o más instantes de tiempo, y en la que la etapa determinante comprende comparar la señal en los dos o más instantes de tiempo con dos o más valores umbral. En algunas realizaciones, la sonda comprende un oligonucleótido marcado con un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia de forma que la sonda sea escindida por la actividad de 5'-exonucleasa de una ADN polimerasa cuando la sonda se hibrida con un ácido nucleico amplificado emitiendo así la fluorescencia.

En algunas realizaciones, la sonda es una sonda fluorescente molecular.

En algunas realizaciones, al menos parte del procedimiento se realiza durante una reacción de amplificación, comprendiendo la reacción de amplificación

(a) combinar en una mezcla acuosa:

- (i) una sonda diana, una primera sonda de control y una segunda sonda de control;
- (ii) un primer cebador de 5', un primer cebador de 3' y un molde diana, comprendiendo el molde diana un sitio de hibridación para el primer cebador de 5', primer cebador de 3' y la sonda diana;
- (iii) un primer molde de control, comprendiendo el primer molde de control un sitio de hibridación para el primer cebador de 5', primer cebador de 3' y la primera sonda de control; y
- (iv) un segundo cebador de 5', un segundo cebador de 3' y un segundo molde de control, comprendiendo el segundo molde de control un sitio de hibridación para el segundo cebador de 5', el segundo cebador de 3', la sonda diana y una segunda sonda de control;

(b) realizar una reacción de amplificación para crear productos de amplificación; y

(c) cuantificar la unión de la sonda diana, la primera sonda de control y la segunda sonda de control a los productos de amplificación.

En algunas realizaciones, el procedimiento se pone en práctica en al menos dos sondas diferentes en la mezcla, en el que las sondas se diseñan para hibridarse con diferentes secuencias de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la mezcla comprende además un colorante, comprendiendo el procedimiento además medir una señal del colorante y normalizar la señal de la sonda a la señal del colorante.

DEFINICIONES

Una "reacción de amplificación" se refiere a cualquier reacción química, que incluye enzimática, que produce un aumento de copias de una secuencia de ácidos nucleicos molde. Las reacciones de amplificación incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse las patentes de EE.UU. 4.683.195. y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds, 1990)), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Walker, y col. Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1):1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer, y col., J. Clin. Microbiol. 34:834-841 (1996); Vuorinen, y col., J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859 (1995)), amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton, Nature 350(6313):91-2 (1991), amplificación por círculo rodante (RCA) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12(1):75-99 (1999)); Hatch y col., Genet. Anal. 15(2):35-40 (1999)) y amplificación de señales de ADN ramificado

(ADNr) (véase, por ejemplo, Iqbal y col., Mol. Cell Probes 13(4):315-320 (1999)).

Un “producto de programa informático” se refiere a un programa de instrucciones ejecutable por una máquina tal como un ordenador o procesador para realizar una serie especificada de etapas. El producto de programa informático (por ejemplo, software) legible por un controlador puede comprender un medio de almacenamiento (por ejemplo, un disco) que expresa las instrucciones del programa. Alternativamente, el producto de programa informático puede ser un archivo electrónico guardado en la memoria del controlador o descargable al controlador.

Un “controlador” se refiere a un ordenador (por ejemplo, un ordenador personal o en red), procesador o microprocesador.

Un “mecanismo de detección” se refiere a un mecanismo para medir al menos una señal cuya intensidad está relacionada con la cantidad o concentración de una secuencia de ácidos nucleicos en una mezcla. Los mecanismos de detección preferidos miden señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, difracción o absorción de rayos X, magnetismo o actividad enzimática. Otro mecanismo de detección adecuado para su uso en la presente invención detecta y mide una o más señales eléctricas (por ejemplo, mediciones de conductancia eléctrica, inductancia, resistencia o capacitancia) indicativas de la cantidad o concentración de una secuencia de ácidos nucleicos.

El término “fluoróforo” se refiere a compuestos químicos que, cuando se excitan por exposición a longitudes de onda particulares de luz, emiten luz (es decir, fluorescen) a una longitud de onda diferente. Si la energía en estado excitado del fluoróforo se transfiere a un aceptor no fluoróforo, la fluorescencia del fluoróforo se extingue sin posterior emisión de fluorescencia por el aceptor. En este caso, el aceptor sirve de “agente extintor de la fluorescencia”.

El término “integridad de una sonda” se refiere a cómo de intacta está una sonda. Si se altera la integridad de la sonda, entonces la sonda tampoco sirve, por ejemplo, debido a que se altera su capacidad para emitir una señal en presencia de un ácido nucleico diana. La integridad puede alterarse, por ejemplo, por escisión del cuerpo de la sonda o por escisión del agente que genera la señal, por ejemplo, un fluoróforo o agente extintor de la fluorescencia.

El término “sonda fluorescente molecular” se refiere a una sonda descrita en, por ejemplo, Tyagi y Kramer (Nature Biotech. 14:303-309 (1996)) y las patentes de EE.UU. n.º 5.119.801 y 5.312.728. Por ejemplo, sondas fluorescentes moleculares normalmente comprenden un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia. El calentamiento de la sonda hace que la sonda cambie la conformación de una primera conformación a una segunda conformación, cambiando así la distancia entre el fluoróforo y el agente extintor de la fluorescencia de forma que la fluorescencia del fluoróforo se extingue o se altera en la primera conformación en comparación con la fluorescencia del fluoróforo en la segunda conformación.

“Normalizar” se refiere a un procedimiento para reescalar una cantidad. Por ejemplo, la salida de señal de una sonda se normaliza para reducir variaciones entre lecturas en una mezcla o entre mezclas. Las señales se normalizan normalmente a un valor de referencia particular o a una lectura de referencia.

El término “ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma tanto monocatenaria como bicatenaria. El término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos de esqueleto modificados o enlaces que son sintéticos, que se producen naturalmente y que se producen no naturalmente, que tienen propiedades de unión similares como las del ácido nucleico de referencia, y que son metabolizados de un modo similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metilribonucleótidos, ácidos nucleicos de péptidos (PNA).

Una “sonda” se refiere a una composición que comprende una secuencia de polinucleótidos que puede hibridarse con y detectar una secuencia de ácidos nucleicos de interés. Tales sondas son útiles, por ejemplo, en ensayos de hibridación que incluyen hibridaciones *in situ* por fluorescencia (FISH) (véanse, por ejemplo, Sokol y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11538-11543 (1998) y Matsuo, Biochimica Biophysica Acta 1379:178-184 (1998)) además de en reacciones de amplificación. Por ejemplo, las “sondas” pueden comprender polinucleótidos ligados a reactivos fluorescentes o radiactivos, permitiendo así la detección de estos reactivos. Ejemplos de sondas de la invención incluyen, por ejemplo, sondas fluorescentes moleculares (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.925.517 y Tyagi, S. y Kramer, F. R., Nature Biotechnology 14: 303-308 (1996)), “sondas escorpión” (véase, por ejemplo, Whitcombe, y col., Nature Biotechnology 17:804-807 (1999)) y sondas Taqman® (véase, por ejemplo, Livak, K.J., y col., PCR Methods Appl. 4(6): 357-362 (1995)), sondas de ácidos nucleicos de péptidos (PNA) (véase, por ejemplo, Ortiz, E., G. Estrada y P.M. Lizardi, Molecular and Cellular Probes 12, 219-226 (1998)), además de otras sondas que utilizan tecnología de FRET. Una “sonda intacta” se refiere a una sonda que no está escindida ni degradada.

Una “temperatura de autohibridación” de una sonda se refiere a la temperatura a o por debajo de la que una sonda forma una estructura secundaria suficiente para extinguir la fluorescencia de la sonda con respecto a la fluorescencia de la sonda cuando no se forma la estructura secundaria. Una temperatura de autohibridación de una

sonda se usa generalmente en referencia a sondas que comprenden un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia, haciendo el calentamiento de la sonda que la sonda cambie la conformación de una primera conformación a una segunda conformación, cambiando así la distancia entre el fluoróforo y el agente extintor de la fluorescencia de forma que la fluorescencia del fluoróforo se extingue o se altera en la primera conformación en comparación con la fluorescencia del fluoróforo en la segunda conformación. Ejemplos de sondas que pueden autohibridarse incluyen sondas fluorescentes moleculares y sondas escorpión.

Una “diana” o “ácido nucleico diana” se refiere a una secuencia de polinucleótidos monocatenaria o bicatenaria que trata de amplificarse en una reacción de amplificación.

Un “valor de fluorescencia diana” o “valor de la señal diana” se refiere a la señal producida por una sonda cuando está unida a una secuencia diana.

Un “molde” se refiere a una secuencia de polinucleótidos monocatenaria o bicatenaria que comprende el polinucleótido que va a amplificarse.

Un “valor de la señal de prueba” se refiere a la señal emitida de una sonda cuando la sonda no está unida ni hibridada con su ácido nucleico diana. Por ejemplo, una sonda molecular se probaría normalmente a una temperatura por encima de la temperatura a la que se hibridaría con su diana. Una sonda Taqman® puede probarse en presencia de una secuencia diana, mientras que la sonda Taqman® no sea activada por la actividad de 5'-exonucleasa de una polimerasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento general de determinación de la integridad de una sonda.

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de determinación de la integridad de una sonda.

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de determinación de la integridad de una sonda.

La Figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de determinación de la integridad de una sonda.

La Figura 5 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de determinación de la integridad de una sonda.

La Figura 6 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de determinación de la integridad de una sonda.

La Figura 7 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de determinación de la integridad de una sonda.

La Figura 8 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de normalización de la señal diana de una sonda a una señal de prueba de una sonda.

La Figura 9 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de normalización de la señal diana de una sonda.

La Figura 10 es un diagrama de flujo que ilustra algunas realizaciones de los procedimientos de normalización de la señal diana de una sonda.

La Figura 11 ilustra un ejemplo de una sonda fluorescente molecular.

La Figura 12 ilustra la fluorescencia de dos sondas diferentes específicas para una secuencia amplificada particular. La fluorescencia se mide con respecto al número de ciclos de amplificación.

La Figura 13 ilustra la diferencia en 100% de sondas fluorescentes moleculares intactas y 60% de sondas fluorescentes moleculares intactas a diferentes temperaturas.

La Figura 14 ilustra la relación entre la fracción de sonda fluorescente molecular intacta en una mezcla de reacción y la lectura de comprobación de la sonda calculada como la fluorescencia a T2 menos la fluorescencia a T1.

La Figura 15 ilustra la acumulación de un producto amplificado de varias reacciones diferentes en el que la señal no

está normalizada.

La Figura 16 ilustra la acumulación de productos amplificados de varias reacciones de amplificación diferentes en los que los valores de la señal para cada producto amplificado están normalizados a un valor de comprobación de la sonda respectivo.

La Figura 17 ilustra la acumulación de productos amplificados de varias reacciones de amplificación diferentes en los que los valores de la señal están normalizados a la diferencia entre dos valores de comprobación de la sonda medidos a temperaturas diferentes.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ESPECÍFICAS

I. INTRODUCCIÓN

La presente invención proporciona procedimientos, aparatos y programas informáticos para verificar la integridad de una sonda comparando la señal de una sonda con un valor umbral. Por tanto, los procedimientos de la invención, denominados generalmente en este documento el “ensayo de comprobación de la sonda”, eliminan la necesidad de usar un control positivo externo para confirmar la integridad de la sonda. Los procedimientos de la invención implican comparar la fluorescencia de una sonda fluorescente a una o más temperaturas con la fluorescencia de una sonda intacta o con un valor o intervalo predeterminado. Por ejemplo, la Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de comprobación de la sonda general de la invención. La variación de la fluorescencia de la sonda del valor comparativo indica que la sonda puede haber fallado. Por supuesto, aquellos expertos en la materia reconocerán que el ensayo de comprobación de la sonda es útil para detectar la integridad de cada sonda en una mezcla si más de una sonda está en una mezcla.

II. SONDAS QUE CAMBIAN LA CONFORMACIÓN EN RESPUESTA A CAMBIOS DE TEMPERATURA

Muchos tipos de sondas moleculares producen señales, normalmente en forma de fluorescencia, cuando la sonda se une a su ácido nucleico diana, pero no producen señal cuando están sin unir. Estas sondas se basan en la formación de un bucle de horquilla, o alguna otra estructura cuando la sonda no está uniéndose a la diana, para aproximar entre sí un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia, extinguiéndose así la señal del fluoróforo.

Para sondas que tienen fluorescencia alterada a diferentes temperaturas tales como sondas fluorescentes moleculares, la fluorescencia a una o más temperaturas puede usarse para determinar la integridad de la sonda. Tales sondas pueden ponerse en una mezcla de reacción y luego puede modularse la temperatura de la mezcla de reacción. Comparando la señal producida por la sonda a al menos un temperatura con un valor umbral puede determinarse la integridad de la sonda. Por ejemplo, la señal producida por la sonda puede medirse a uno o más de los siguientes instantes de tiempo y temperaturas: un primer instante de tiempo cuando la mezcla que contiene la sonda está a una temperatura T1 igual a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda; un segundo instante de tiempo cuando la mezcla se ha elevado a una temperatura T2 por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda; o un tercer instante de tiempo cuando la mezcla se ha enfriado hasta una temperatura T3 igual a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. Como se usa en todo este documento, la temperatura T1 representa una temperatura a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda, la temperatura T2 representa una temperatura por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda y la temperatura T3 representa una temperatura igual a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. La temperatura T3 puede ser igual a la temperatura T1 o la temperatura T3 puede diferenciarse de la temperatura T1 con tal que ambas temperaturas T1 y T3 sean iguales a o inferiores a la temperatura de autohibridación de la sonda.

Antes de empezar una hibridación (por ejemplo, antes de empezar la amplificación de la diana), la señal (por ejemplo, fluorescencia) de una sonda en la mezcla de reacción se lee en al menos uno de los siguientes instantes de tiempo: un primer instante de tiempo cuando la mezcla está a la temperatura T1; un segundo instante de tiempo cuando la mezcla se ha elevado a la temperatura T2; o un tercer instante de tiempo cuando la mezcla se ha enfriado hasta la temperatura T3. Las lecturas de la señal de la sonda a la temperatura T1, temperatura T2 o temperatura T3 que están fuera de los límites predeterminados para una sonda intacta completamente funcional sugieren que la integridad de la sonda es diferente de una sonda intacta completamente funcional e indican que fracasaría un ensayo de PCR u otras reacciones de amplificación monitorizadas por esa sonda. Por ejemplo, la Figura 7 es un diagrama de flujo que ilustra una etapa 170 de elevar la temperatura de una mezcla que contiene una sonda por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda, una etapa 172 de reducir la temperatura de la mezcla a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda, una etapa 174 de medir la señal de la sonda a o por debajo de la temperatura de autohibridación y una etapa 176 de comparar la señal de la sonda con al menos un valor umbral.

En algunas realizaciones, la señal inicial de una sonda se determina y se compara con la señal de una sonda intacta o un valor o intervalo predeterminado con una relación conocida con respecto a una sonda intacta. La variación de la fluorescencia inicial de la señal de una sonda intacta o un valor predeterminado indica la degradación de la sonda.

Valores umbral predeterminados que podrían incluir límites de aceptación superiores e inferiores pueden ser específicos para un lote de reactivo o aplicables a todos los lotes de reactivos.

5 En algunas realizaciones, la señal de la sonda se mide en más de un instante de tiempo para determinar la integridad de la sonda. Por ejemplo, la Figura 3 muestra una realización en la que la señal de la sonda se mide en dos instantes de tiempo. En la etapa 120, la señal de la sonda se mide a la temperatura T1 por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 122, la temperatura de la mezcla que contiene la sonda se eleva hasta la temperatura T2 por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 124, la temperatura de la mezcla se reduce hasta la temperatura T3 que es igual a o está por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 126, la señal de la sonda se mide a la temperatura T3. En la etapa 128, las señales medidas en los diferentes instantes de tiempo se comparan con al menos un valor umbral para determinar la integridad de la sonda. Por ejemplo, cada señal medida puede compararse con un único valor umbral o compararse con valores umbral superiores e inferiores que definen un intervalo aceptable para la señal.

15 La Figura 5 muestra una realización de la invención en la que la señal de la sonda se mide a dos temperaturas diferentes para determinar la integridad de la sonda. En la etapa 152, la señal de la sonda se mide a la temperatura T1 igual a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 154, la temperatura de la mezcla que contiene la sonda se eleva hasta la temperatura T2 por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 156, la señal de la sonda se mide a la temperatura T2. En la etapa 158, las señales medidas a las diferentes temperaturas se comparan con al menos un valor umbral para determinar la integridad de la sonda. Por ejemplo, la señal medida a la temperatura T1 puede compararse con un primer valor umbral y la señal medida a la temperatura T2 compararse con un segundo valor umbral. Alternativamente, la señal medida a la temperatura T1 puede compararse con un primer y segundo valor umbral que define un intervalo aceptable para la señal, y la señal medida a la temperatura T2 puede compararse con un tercer y cuarto valor umbral que define un intervalo aceptable para la señal.

La Figura 6 muestra otra realización de la invención en la que la señal de la sonda se mide a dos temperaturas diferentes para determinar la integridad de la sonda. En la etapa 160, la temperatura de la mezcla que contiene la sonda se eleva hasta la temperatura T2 por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 162, la señal de la sonda se mide a la temperatura T2. En la etapa 164, la temperatura de la mezcla se reduce hasta la temperatura T3 que es igual a o está por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 166, la señal de la sonda se mide a la temperatura T3. En la etapa 168, las señales medidas a las diferentes temperaturas se comparan con al menos un valor umbral para determinar la integridad de la sonda. Por ejemplo, la señal medida a la temperatura T2 puede compararse con un primer valor umbral y la señal medida a la temperatura T3 compararse con un segundo valor umbral. Alternativamente, la señal medida a la temperatura T2 puede compararse con un primer y segundo valor umbral que define un intervalo aceptable para la señal, y la señal medida a la temperatura T3 puede compararse con un tercer y cuarto valor umbral que define un intervalo aceptable para la señal.

40 En otras realizaciones, la diferencia de señales medidas a diferentes instantes de tiempo o temperaturas se calcula y se compara con al menos un valor umbral. Por ejemplo, la Figura 2 muestra una realización en que la diferencia de las señales de sondas medidas a las temperaturas T1 y T2 se usa para determinar la integridad de la sonda. En la etapa 110, la señal de la sonda se mide a la temperatura T1 a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 112, la temperatura de la mezcla que contiene la sonda se eleva hasta la temperatura T2 por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 114, la señal de la sonda se mide a la temperatura T2. En la etapa 116 se calcula la diferencia de las dos mediciones. En la etapa 118, la diferencia de las mediciones se compara con al menos un valor umbral. Por ejemplo, la diferencia en las mediciones puede compararse con un único valor umbral o compararse con valores umbral superiores e inferiores que definen un intervalo aceptable para la diferencia en mediciones.

50 La Figura 4 muestra otra realización de la invención en la que la diferencia de señales medidas a diferentes temperaturas se calcula y se compara con al menos un valor umbral. En la etapa 130, la temperatura de la mezcla que contiene la sonda se eleva hasta la temperatura T2 por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 132, la señal de la sonda se mide a la temperatura T2. En la etapa 134, la temperatura de la mezcla se reduce hasta la temperatura T3 que es igual a o está por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda. En la etapa 136, la señal de la sonda se mide a la temperatura T3. En la etapa 138 se calcula la diferencia de las dos mediciones tomadas a las temperaturas T2 y T3. En la etapa 140, la diferencia de las mediciones se compara con al menos un valor umbral. Por ejemplo, la diferencia en las mediciones puede compararse con un único valor umbral o compararse con valores umbral superiores e inferiores que definen un intervalo aceptable para la diferencia en mediciones.

65 A continuación se proporciona un resumen de algunos posibles escenarios de fallo de la sonda. Por ejemplo, si se escinde la estructura de la sonda, entonces la sonda no se autohibridará apropiadamente a la temperatura T3 y, por tanto, producirá una señal diferente, y normalmente mayor, que la señal medida a la temperatura T1. En una realización diferente, el agente extintor de la fluorescencia de la sonda se escinde. En esa situación, la señal medida a tanto la temperatura T1 como a la temperatura T3 será alta en comparación con el valor umbral (es decir,

basándose en un señal de sonda intacta). Además, la diferencia en las señales entre las temperaturas T1 y T2 o la diferencia en las señales entre las temperaturas T3 y T2 no se diferenciará significativamente debido a que el agente extintor de la fluorescencia no extinguirá el fluoróforo a ninguna temperatura.

Una lista de algunas posibles modificaciones de sondas y los efectos sobre la señal de la sonda (por ejemplo, fluorescencia) a diversos instantes de tiempo y temperaturas (un primer instante de tiempo de medición a la temperatura T1, un segundo instante de tiempo de medición a la temperatura T2 y un tercer instante de tiempo de medición a la temperatura T3) se describen en la Tabla 1. Posiblemente, las combinaciones de modificaciones de la sonda pueden producirse al mismo tiempo, pero sólo los resultados de modificaciones individuales se presentan en la tabla. Como se trata anteriormente, hay varias formas posibles por las que puede destruirse la integridad de una sonda. Sin embargo, aquellos expertos en la materia reconocerán que las sondas pueden fallar de formas adicionales y, por tanto, la siguiente tabla no debe interpretarse de ninguna forma que limita el alcance de la invención.

Tabla 1. Efectos de las modificaciones de la sonda sobre las intensidades de señal de las sondas.

Fallo	Descripción	Señal a T1 (con respecto a la referencia)	Señal a T2 (con respecto a la referencia)	Señal a T3 (con respecto a la referencia)	Señal T2-T1 (con respecto a la referencia)
1	Se escinde la sonda. Esto conduce a desestabilización de la estructura del tronco y separación del indicador y el extintor de la fluorescencia.	↑	↑	↑	↓
2	El indicador se desprende de la sonda.	↑	↑	↑	↓
3	El extintor de la fluorescencia se desprende de la sonda.	↑	↑	↑	↓
4	Se reduce la fluorescencia del indicador	↓	↓	↓	↓
5	Se degrada el extintor de la fluorescencia. La capacidad del extintor de la fluorescencia para extinguir la fluorescencia se reduce mientras que el extintor de la fluorescencia está unido a la sonda	↑	↑	↑	↓
6	La sonda se hibrida con restos no específicos en exceso presentes en la muestra	Sin cambio	Sin cambio	↑	Sin cambio

La evaluación de la integridad de la sonda por este enfoque sería aplicable cuando la sonda se diluyera en tampón, pero también podría aplicarse cuando la sonda estuviera en otra matriz tal como en una mezcla de reacción de PCR en tiempo real que contiene una muestra de prueba que incluye, por ejemplo, una muestra de paciente. Una mezcla de reacción típica contiene, por ejemplo, la muestra de prueba, sondas fluorescentes moleculares 200 nM, Taq polimerasa, Tris 50 mM, pH 8,3, MgCl₂ 8 mM, dATP 200 μM, dTTP 200 μM, dCTP 200 μM, dGTP 200 μM, KCl 50 mM, cebador directo 200 nM y cebador inverso 200 nM.

III. SONDAS LINEALES

El ensayo de comprobación de la sonda también puede usarse para evaluar la integridad de una sonda lineal. Las sondas fluorescentes lineales que se extinguen por un extintor de la fluorescencia unido tienen una fluorescencia de 'fondo' inherente. Sondas lineales a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, una sonda que comprende un oligonucleótido marcado con un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia de forma que la sonda se escinde por la actividad de 5'-exonucleasa de una ADN polimerasa cuando la sonda se hibrida con un ácido nucleico amplificado emitiendo así la fluorescencia (por ejemplo, una sonda TaqMan). La fluorescencia de fondo puede usarse como indicador de la integridad de la sonda y puede usarse por correlación como un indicador del rendimiento de la sonda en un ensayo de PCR en tiempo real. Ejemplos de modificación a sondas y los efectos

resultantes sobre la fluorescencia son como los siguientes en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos de las modificaciones de la sonda sobre las intensidades de señal de las sondas.

	Modificación de la sonda	Efecto sobre la señal de la sonda en comparación con un valor umbral
1	Se escinde la sonda.	Aumento
2	El indicador se desprende de la sonda.	Aumento
3	El extintor de la fluorescencia se desprende de la sonda.	Aumento
4	La capacidad del extintor de la fluorescencia para extinguir la fluorescencia se reduce mientras que el extintor de la fluorescencia todavía está unido a la sonda	Aumento
5	Se reduce la fluorescencia del indicador.	Disminución

5 Además, sondas lineales tales como sondas Taqman presentan un cambio en la fluorescencia cuando se calientan. Por tanto, como se ha descrito anteriormente en el contexto de las sondas fluorescentes moleculares, la señal de una sonda lineal a dos temperaturas diferentes puede medirse y usarse para determinar la integridad de la sonda. En algunas realizaciones se toman dos o más lecturas a diferentes temperaturas y el valor de la señal a cada temperatura se compara con su valor umbral respectivo. Alternativamente se toman dos o más lecturas a diferentes
10 temperaturas y la diferencia entre los dos o más valores de la señal se compara con un valor umbral.

Otras sondas útiles en los procedimientos de la invención incluyen aquellas sondas que no comprenden un agente extintor de la fluorescencia, pero que se extinguen hasta cierto grado por la propia secuencia de la sonda. Tales sondas pueden ser, por ejemplo, lineales o pueden comprender alguna estructura secundaria. Un ejemplo de tales
15 sondas son sondas "Light-up" que son sondas de ácido nucleico de péptido. Véanse, por ejemplo, Svanvik, N., y col. Anal. Biochem. 281:26-35 (2000); Svanvik, N., y col., Anal. Biochem. 287:179-182 (2000).

IV. VALORES UMBRAL PARA LA COMPARACIÓN CON LA SEÑAL DE LA SONDA

20 Como se trata anteriormente, una sonda intacta puede barrerse de lado a lado con una sonda de muestra y luego compararse con la señal de la sonda de muestra. Sin embargo, por comodidad y economía, en algunas realizaciones preferidas el valor umbral es un valor o intervalo predeterminado. Los valores o intervalos predeterminados de valores se determinan de una sucesión de experimentos de control para definir una señal típica de una sonda intacta. Siguiendo un análisis tal puede determinarse un intervalo estándar de valores. Estos valores
25 pueden entonces usarse para comparar con las señales de la sonda de muestra en un ensayo de comprobación de la sonda.

En algunas realizaciones, el valor umbral se calcula determinando un conjunto de valores de comprobación de la sonda que establece una correlación con resultados de PCR aceptables. Las mezclas de sondas compuestas por
30 diversas proporciones de sondas completamente funcionales y degradadas pueden evaluarse por ensayos de tanto comprobación de la sonda como de PCR para medir la capacidad de las mezclas de sondas para medir con exactitud cantidades diana. En realizaciones preferidas, el valor umbral se determina como el valor de comprobación de la sonda (es decir, la señal) de la mezcla de sonda que contiene la mayor proporción de sonda degradada y retiene un rendimiento de PCR aceptable. Aquellos expertos en la materia reconocerán que el valor umbral puede
35 ser un único valor umbral o un límite superior e inferior.

Como puede haber alguna imprecisión en las mediciones de comprobación de la sonda, pueden realizarse múltiples ensayos para añadir confianza estadística a la correlación y los valores umbral. Además, para eliminar la variación entre las lecturas de comprobación de la sonda, los valores de comprobación de la sonda brutos pueden normalizarse. Aquellos expertos en la materia reconocerán que cualquier valor asociado a una detección de señales de un instrumento de detección puede usarse para normalizar los valores de comprobación de la sonda. En realizaciones preferidas, un colorante pasivo se ejecuta en la muestra de comprobación de la sonda y el valor de comprobación de la sonda se normaliza a la señal del colorante. Los colorantes preferidos no son sustancialmente afectados por la presencia o asociación con ácidos nucleicos, particularmente ADN bicatenario. Tales colorantes
40 pueden incluir prácticamente cualquier colorante fluorescente que satisfaga este criterio que también sea espectralmente resoluble. Los colorantes preferidos incluyen colorantes de rodamina y colorantes de fluoresceína. La referencia pasiva podría estar en la misma matriz que la sonda o en una matriz separada, tal como un recipiente de reacción separado. La referencia pasiva podría estar libre en disolución o conjugada con una molécula más larga tal como un oligonucleótido o proteína. Alternativamente, los valores almacenados referentes a la calibración del instrumento de detección también pueden usarse como valores de normalización.
45
50

Para las sondas que cambian la conformación y la señal en respuesta a cambios de temperatura, los valores umbral

pueden determinarse a diversas temperaturas (por ejemplo, a temperaturas por debajo de y por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda cuando la sonda no está unida a un ácido nucleico diana). Además, también es útil la diferencia de la señal de la sonda entre diferentes temperaturas. Por ejemplo, la diferencia de la señal a una temperatura por debajo de y por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda puede monitorizarse usando mezclas de sondas que comprenden cantidades crecientes de sonda degradada. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 2. Entonces se usan las señales de mezclas que producen resultados aceptables como valor umbral.

En vez de referir los resultados del ensayo de comprobación de la sonda a límites predeterminados, las lecturas de fluorescencia de una sonda pueden compararse con una molécula de referencia pasiva que establece una correlación con la señal de una sonda intacta. Entonces, esta correlación se usa como un medio para evaluar la integridad y el rendimiento funcional de la sonda. Como un ejemplo, la lectura fluorescente de la molécula de referencia se lee a una temperatura especificada antes de o después de la determinación de la fluorescencia de una sonda. Se determina una relación entre la fluorescencia de la sonda y la referencia pasiva y basándose en estudios previos se usaría para discriminar entre sondas completamente funcionales y aquellas que no rendirán adecuadamente en un ensayo.

Pueden almacenarse valores o intervalos umbral predeterminados en una memoria de ordenador y accederse según sea necesario por un controlador.

V. ALTERNATIVAS A UN CONTROL EXTERNO

El ensayo de comprobación de la sonda como se describe en este documento en combinación con un control interno de PCR con cebadores compartidos puede sustituir un control positivo externo del ensayo. La mayoría de los ensayos, que incluyen aquellos basados en la amplificación, usa reacciones de control para validar el ensayo. Normalmente se realizan conjuntamente controles positivos y negativos separados con la reacción de prueba. El control negativo es una prueba para la posible contaminación del ensayo, mientras que el control positivo es una prueba para la integridad y el rendimiento funcional de los componentes de reacción.

Los controles internos son controles que se realizan en la misma reacción que una muestra de prueba y prueban la integridad del reactivo más la posible interferencia por la matriz de la muestra (Rosenstraus, y col., J. Clin. Microbiology 36:191-197 (1998)). En algunas reacciones de PCR, la diana de control interno y la diana específica del ensayo se amplifican con los mismos cebadores, es decir, cebadores compartidos. En estas reacciones, las sondas fluorescentes para detectar la diana específica del ensayo y el control interno son diferentes.

Para estos ensayos, los resultados de un ensayo de comprobación de la sonda y el control interno pueden usarse en lugar de un control positivo externo. El control interno valida la integridad de todos los componentes de los reactivos que incluyen los cebadores, pero no la integridad de las sondas. La integridad y el rendimiento funcional de las sondas pueden validarse realizando un ensayo de comprobación de la sonda, por ejemplo, comparando los valores de fluorescencia de al menos una de la temperatura T1, la temperatura T2 o la temperatura T3 con valores predeterminados. Por tanto, en conjunto, los resultados del ensayo de comprobación de la sonda y los resultados de PCR para el control interno definirán la integridad de todos los componentes de los reactivos de PCR, eliminándose así la necesidad de un control positivo externo.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención proporcionan la internalización completa de todos los controles. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ensayo de comprobación de la sonda como se describe en este documento se usa en combinación con moldes de control adicionales en una reacción de amplificación para controlar la calidad y la cantidad de componentes del ensayo, actividad enzimática, etc. En particular, una reacción de amplificación puede comprender al menos tres secuencias de polinucleótidos: un molde diana (T) y dos moldes de control (IC1 y IC2). Los dos moldes de control sirven para controlar la integridad de la reacción de amplificación. Los productos de amplificación de la diana y de los moldes de control pueden medirse cuantificando la unión de la sonda a los productos de reacción. Por tanto, cada producto de amplificación proporciona una diana para al menos una sonda correspondiente que es útil para detectar y cuantificar los productos de amplificación.

La invención proporciona un molde diana (T) que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con sitios de hibridación para un cebador diana de 5' y 3' (P1 y P2, respectivamente). El molde diana (T) comprende una secuencia de polinucleótidos que trata de amplificarse ("la secuencia diana"). Esta secuencia, o una subsecuencia de esta secuencia, proporciona una secuencia de hibridación para una sonda diana (HP1).

El primer molde de control (IC1) comprende las mismas secuencias de hibridación del cebador diana (es decir, para P1 y P2) que el molde diana (T) y una secuencia de hibridación de la sonda que es diferente del molde diana. Por tanto, la amplificación de este molde controla la integridad de la reacción general, por ejemplo, la función de la enzima, reactivos, cebadores diana, etc. Por ejemplo, si no se produce producto diana, pero el primer molde de control (IC1) se amplifica en una reacción, esto indica que las condiciones de amplificación (tampón, temperatura, cebadores, enzimas, etc.) pudieron amplificar un molde. Si el primer molde de control (IC1) no se amplifica, entonces es probable que la mezcla de reacción sea defectuosa y, por tanto, un producto negativo del molde pueda no ser

debido a la falta del molde.

El segundo molde de control (IC2) comprende secuencias de hibridación para la sonda diana (HP1) y una segunda sonda de control (HP3). Estas dos secuencias están flanqueadas por secuencias de hibridación para un par de segundos cebadores de control (P3 y P4). La amplificación de este molde proporciona una control para la unión de la sonda diana (HP1) a la secuencia diana. Por ejemplo, si la segunda sonda de control (HP3) no produce ninguna señal, entonces es probable que no haya amplificación del segundo molde de control (IC2). Sin embargo, si la segunda sonda de control (HP3) produce señal, pero no la sonda diana (HP1), entonces es probable que la sonda diana (HP1) haya dejado de funcionar.

Debido a que el segundo molde de control (IC2) tiene una copia de cada una de la secuencia de hibridación de la sonda diana y la secuencia de hibridación del segundo control, la señal de la sonda diana (HP1) y la segunda sonda de control (HP3) deberán ser sustancialmente iguales si el molde diana (T) no está presente. Si el molde diana (T) está presente, entonces deberán estar disponibles más secuencias de hibridación de la sonda diana (HP1) (es decir, productos de amplificación diana) con respecto a secuencias de hibridación de la segunda sonda de control (HP3). Por tanto, un reacción que funciona apropiadamente deberá tener mayor señal de una sonda diana (HP1) que de la segunda sonda de control (HP3). Esto es particularmente cierto en ciclos de amplificación más tempranos. Por tanto, en algunas realizaciones, las mediciones en tiempo real de la unión de la sonda pueden ser útiles, por ejemplo, para PCR cuantitativa.

Los estudios han mostrado que el número de copias inicial puede cuantificarse durante el análisis de PCR en tiempo real basado en el ciclo umbral (Ct). Véase, Higuchi, R., y col. *Biotechnology* 11:1026-1030 (1993). Ct se define como el ciclo al que se determina que la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del fondo. El umbral del ciclo es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias inicial. Cuanto más molde esté presente para empezar, menor será el número de ciclos que se necesitan para conseguir un punto en el que la señal fluorescente sea detectable por encima del fondo. La información cuantitativa basada en el ciclo umbral puede ser más precisa que la información basada en determinaciones del punto final debido a que se basa en una medición tomada durante la fase exponencial de la amplificación por PCR cuando la eficiencia de la PCR todavía tiene que influirse por reactivos limitantes, pequeñas diferencias en componentes de reacción o condiciones del ciclo.

La Tabla 3 demuestra cómo los valores umbral del ciclo son útiles para determinar la integridad de una reacción particular. La tabla proporciona valores Ct hipotéticos dependiendo de diferentes escenarios de reacción.

Tabla 3: Interpretación de los resultados de PCR en tiempo real basándose en valores umbral del ciclo de las sondas de hibridación 1, 2 y 3

Muestra	HP1: (diana y IC2)	HP2: (IC1)	HP3: (IC2)	Resultado de la prueba
Negativa, no inhibidora	Misma que HP3. Ct es inferior a o igual a Y	Ct es inferior a o igual a X	Misma que HP1. Ct es inferior a o igual a Y	Negativo
Positiva alta, no inhibidora	Ct es significativamente inferior a HP3 por un factor de z	Sin valor de Ct o Ct es inferior a o igual a X	Sin umbral de ciclo o Ct es mayor que HP1 e inferior a o igual a Y	Positivo
Positiva baja, no inhibidora	Ct es inferior a HP3	Ct es inferior a o igual a X	Ct es mayor que HP1 e inferior a o igual a Y	Positivo
Degradación del reactivo	Sin valor de Ct	Sin valor de Ct	Sin valor de Ct	Inválido
Negativa, inhibidores presentes en la muestra	Sin valor de Ct o Ct es igual a HP3	Sin valor de Ct o Ct es mayor que X o valor de punto final fluorescente bajo	Sin valor de Ct o Ct es mayor que Y o valor de punto final fluorescente bajo	Inválido
Positiva, inhibidores presentes en la muestra	Ct es inferior a HP3	Ct es mayor que X o valor de punto final fluorescente bajo	Ct es mayor que Y o valor de punto final fluorescente bajo	Resultado positivo; no puede cuantificarse debido a inhibidores

Muestra	HP1: (diana y IC2)	HP2: (IC1)	HP3: (IC2)	Resultado de la prueba
---------	--------------------	------------	------------	------------------------

z = factor que define la separación entre valores de Ct de HP1 y HP3

X = valor de Ct máximo para un resultado válido para la sonda 2 (IC1)

Y = valor de Ct máximo para un resultado válido para la sonda 3 (IC2)

VI. REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN E INSTRUMENTOS DE PROCESAMIENTO TÉRMICO

5 La amplificación de un molde de ARN o ADN usando reacciones es muy conocida (véanse las patentes de EE.UU. 4.683.195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds, 1990)). Los procedimientos para amplificar y detectar ácidos nucleicos por PCR usando una enzima termoestable se desvelan en la patente de EE.UU. nº 4.965.188. La amplificación por PCR de ADN implica ciclos repetidos de desnaturar por calor el ADN, hibridar dos cebadores de oligonucleótidos con secuencias que flanquean el segmento de ADN que va a amplificarse y extender los cebadores hibridados con ADN polimerasa. Los cebadores se hibridan con hebras opuestas de la secuencia diana y se orientan de manera que la síntesis de ADN por la polimerasa avance a través de la región entre los cebadores duplicando eficazmente la cantidad del segmento de ADN. Además, debido a que los productos de extensión también son complementarios a y pueden unirse a cebadores, cada ciclo sucesivo duplica esencialmente la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo previo. Esto produce la acumulación exponencial del fragmento diana específico a una tasa de aproximadamente 2^n por ciclo en la que n es el número de ciclos.

15 Procedimientos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR) pueden usarse para amplificar secuencias de ácidos nucleicos de secuencias de ADN diana directamente a partir de ARNm, de ADNc, de bibliotecas genómicas o bibliotecas de ADNc. La reacción se lleva a cabo preferentemente en un instrumento de procesamiento térmico para facilitar los tiempos de incubación a temperaturas deseadas. Los instrumentos de procesamiento térmico también pueden comprender opcionalmente al menos un mecanismo de detección para detectar secuencias de ácidos nucleicos de interés. Los instrumentos de procesamiento térmico preferidos incluyen el Smart Cycler® (Cepheid, Sunnyvale, CA), además de aquellos descritos en, por ejemplo, el documento WO 99/60380. Otros instrumentos adecuados se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.958.349; 5.656.493; 5.333.675; 5.455.175; 5.589.136 y 5.935.522.

25 También se conocen reacciones de amplificación isoterma y pueden usarse según los procedimientos de la invención. Ejemplos de reacciones de amplificación isoterma incluyen amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Walker, y col. Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1):1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer, y col., J. Clin. Microbiol. 34:834-841 (1996); Vuorinen, y col. J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859 (1995)), amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton, Nature 350(6313):91-2 (1991), amplificación por círculo rodante (RCA) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12(1):75-99 (1999)); Hatch y col., Genet. Anal. 15(2):35-40 (1999)) y amplificación de señales de ADN ramificado (ADNr) (véase, por ejemplo, Iqbal y col., Mol. Cell Probes 13(4):315-320 (1999)). Otros procedimientos de amplificación conocidos para aquellos expertos en la materia incluyen CPR (reacción de sondas cíclicas), SSR (replicación de secuencia autosostenida), SDA (amplificación por desplazamiento de hebra), QBR (Q-beta replicasa), Re-AMP (anteriormente RAMP), RCR (reacción de reparación en cadena), TAS (sistema de amplificación basado en transcripción) y HCS.

40 Los procedimientos para determinar la integridad de una sonda son particularmente útiles para analizar productos de reacciones de amplificación que incluyen reacciones de amplificación por PCR cuantitativa y/o en tiempo real. Se han descrito varios procedimientos para el análisis cuantitativo de secuencias de ácidos nucleicos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR con transcripción inversa (RT-PCR) permite el análisis de pequeñas cantidades de partida de ácido nucleico (por ejemplo, tan sólo un equivalente de célula).

45 Se ha desarrollado otro procedimiento, la PCR competitiva cuantitativa (QC-PCR), y se usa ampliamente para la cuantificación por PCR. La QC-PCR se basa en la inclusión de una cantidad conocida de un competidor de control interno en cada mezcla de reacción. Para obtener la cuantificación relativa, el producto de PCR diana desconocido se compara con el producto de PCR de competidor conocido. Se mide la cantidad relativa de ADN específico de diana y de competidor y esta relación se usa para calcular el número de partida de moldes diana. Cuanto mayor sea la relación de producto específico de diana con respecto a producto específico de competidor, mayor será la concentración de ADN de partida. El éxito de un ensayo de QC-PCR se basa en el desarrollo de un control interno que se amplifica con la misma eficiencia que la molécula diana. En el procedimiento de QC-PCR de cuantificación de ARN, un molde de ARN competitivo coincidente con la secuencia diana de interés, pero diferente de la misma en virtud de una delección interna introducida, se usa en una valoración competitiva de etapas de transcripción inversa y PCR, proporcionando un riguroso control interno. Se añaden cantidades crecientes de números de copias conocidos de molde competitivo a las porciones de replicación de la muestra de prueba, y la cuantificación se basa en la determinación de las cantidades relativas (no absolutas) de los productos amplificados de diferente tamaño derivados de los moldes naturales y competitivos.

60 Los procedimientos de la invención pueden usarse en reacciones de múltiplex tradicionales. La PCR de múltiplex produce la amplificación de múltiples fragmentos de polinucleótidos en la misma reacción. Véase, por ejemplo, PCR

PRIMER, A LABORATORY MANUAL (Dieffenbach, ed. 1995) Cold Spring Harbor Press, páginas 157-171. Por ejemplo, diferentes moldes diana pueden añadirse y amplificarse en paralelo en el mismo recipiente de reacción.

VII. SONDAS

Las sondas de la invención pueden hibridarse con una secuencia de polinucleótidos particular. Por tanto, las sondas de la invención pueden comprender una secuencia de polinucleótidos que es complementaria a la secuencia que va a detectarse. En algunas realizaciones, la sonda también comprende un fluoróforo o enzima, como se describe más adelante, que permite la detección de la unión de la sonda a su complemento.

La concentración de sonda debe ser suficiente para unirse a la cantidad de diana o secuencias de control que se amplifican de manera que se proporcione una evaluación precisa de la cantidad de secuencia amplificada. Aquellos expertos en la materia reconocerán que la cantidad de concentración de sonda variará según la afinidad de unión de la sonda, además de la cantidad de secuencia que va a unirse. Concentraciones de sonda típicas oscilarán de 0,01 μM a 0,5 μM .

La presente invención puede emplear muchas sondas de hibridación de ácidos nucleicos diferentes. Normalmente, para la generación de señales, las sondas utilizan un cambio en la fluorescencia de un fluoróforo debido a un cambio en su interacción con otra molécula o resto provocado por el cambio de la distancia entre el fluoróforo y la molécula de interacción o resto.

Estos ensayos se basan para la generación de señales en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o "FRET", según la cual un cambio en la fluorescencia es producido por un cambio en la distancia que separa un primer fluoróforo de un aceptor de energía de resonancia interactuante, tanto otro fluoróforo como un extintor de la fluorescencia. Las combinaciones de un fluoróforo y una molécula interactuante o resto, que incluyen moléculas extintoras de la fluorescencia o restos, se conocen como "pares de FRET." El mecanismo de la interacción de pares de FRET requiere que el espectro de absorción de un miembro del par se solape con el espectro de emisión del otro miembro, el primer fluoróforo. Si la molécula de interacción o resto es un extintor de la fluorescencia, su espectro de absorción debe solaparse con el espectro de emisión del fluoróforo. Stryer, L., *Ann. Rev. Biochem.* 47: 819-846 (1978); *BIOPHYSICAL CHEMISTRY* part II, Techniques for the Study of Biological Structure and Function, C. R. Cantor y P. R. Schimmel, páginas 448-455 (W. H. Freeman y Co., San Francisco, EE.UU., 1980); y Selvin, P. R., *Methods in Enzymology* 246: 300-335 (1995). La interacción de FRET eficiente requiere que los espectros de absorción y emisión del par tengan un gran grado de solapamiento. La eficiencia de interacción de FRET es linealmente proporcional a ese solapamiento. Véase Haugland, R. P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 24-30 (1969). Normalmente se requiere una gran magnitud de señal (es decir, un alto grado de solapamiento). Por tanto, los pares de FRET, que incluyen pares de fluoróforo-extintor de la fluorescencia, se eligen basándose en esto.

Un par de FRET adecuado desvelado en Matayoshi y col. 1990, *Science* 247: 954-958, incluye DABCYL como resto extintor de la fluorescencia (o marca extintora de la fluorescencia) y EDANS como fluoróforo (o marca fluorescente). El espectro de absorción de DABCYL tiene un alto grado de solapamiento con el espectro de emisión de EDANS, haciendo que éstos dos sean un buen par de FRET.

Se conoce una variedad de sondas de hibridación de ácidos nucleicos marcados y ensayos de detección que utilizan FRET y pares de FRET. Un esquema tal se describe por Cardullo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8790-8794 (1988) y en Heller y col., documento EP 0070685. Usa una sonda que comprende un par de oligodesoxinucleótidos complementarios a regiones contiguas de una hebra de ADN diana. Una molécula de sonda contiene una marca fluorescente, un fluoróforo, en su extremo 5', y la otra molécula de sonda contiene una marca fluorescente diferente, también un fluoróforo, en su extremo 3'. Cuando la sonda se hibrida con la secuencia diana, las dos marcas se ponen muy juntas entre sí. Cuando la muestra se estimula por luz de una frecuencia apropiada se produce la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de una marca a la otra. FRET produce un cambio medible en la respuesta espectral de las marcas, señalando la presencia de dianas. Una marca podría ser un "extintor de la fluorescencia", que en la presente solicitud indica un resto interactivo (o molécula) que libera la energía aceptada como calor.

Otro esquema en fase de disolución utiliza una sonda que comprende un par de oligodesoxinucleótidos y un par de FRET. Sin embargo, aquí las dos moléculas de sondas son completamente complementarias entre sí y a hebras complementarias de un ADN diana (Morrison y Stols, *Biochemistry* 32: 309-3104 (1993) y Morrison, documento EP 0 232 967 A2. Cada molécula de sonda incluye un fluoróforo conjugado con su extremo 3' y un resto extintor de la fluorescencia conjugado con su extremo 5'. Cuando las dos moléculas de la sonda de oligonucleótidos están hibridadas entre sí, el fluoróforo de cada una se mantiene en estrecha proximidad al resto extintor de la fluorescencia de la otra. Con la sonda en esta conformación, si el fluoróforo es estimulado entonces por luz de una longitud de onda apropiada, la fluorescencia es extinguida por el resto extintor de la fluorescencia. Sin embargo, cuando cualquier la molécula de sonda está unida a una diana, el efecto extintor de la fluorescencia de la molécula de sonda complementaria está ausente. En esta conformación se genera una señal. Las moléculas de la sonda son demasiado largas para autoextinguirse por FRET cuando están en la conformación unida a diana.

Un esquema en fase de disolución que utiliza pares de FRET y el fenómeno conocido como desplazamiento de hebra se describe por Diamond y col., patente de EE.UU. nº 4.766.062; Collins y col., patente de EE.UU. nº 4.752.566; Fritsch y col., patentes de EE.UU. nº 4.725.536 y 4.725.537. Normalmente, estos ensayos implican una sonda que comprende un complejo de ácido nucleico bimolecular. Una única hebra más corta que comprende un subconjunto de la secuencia diana se hibrida con una única hebra más larga que comprende la región de unión diana entera de la sonda. Por tanto, la sonda en esta configuración comprende tanto porciones monocatenarias como bicatenarias. Estas sondas pueden comprender adicionalmente tanto una marca de ³²P unida a la hebra más corta como un resto de fluoróforo y de extintor de la fluorescencia que podrían mantenerse en proximidad entre sí cuando la conformación de la sonda sea ese complejo. En la solicitud de patente europea 0 601 889 A3 se describe otro tipo de ensayo de sonda molecular que utiliza un par de FRET.

Otro tipo de ensayo de sonda de hibridación de ácidos nucleicos que utiliza un par de FRET es el ensayo "TaqMan®" descrito en Gelfand y col., patente de EE.UU. nº 5.210.015, y Livak y col., patente de EE.UU. nº 5.538.848. La sonda es un oligonucleótido monocatenario marcado con un par de FRET. En un ensayo TaqMan®, una ADN polimerasa libera un único o múltiples nucleótidos por escisión de la sonda de oligonucleótidos cuando se hibrida con una hebra diana cuya liberación proporciona una forma de separar la marca de extintor de la fluorescencia y la marca de fluoróforo del par de FRET.

Todavía otro tipo de ensayo de sonda de hibridación de ácidos nucleicos que utiliza pares de FRET se describe en Tyagi y col., patente de EE.UU. nº 5.925.517, que utiliza sondas de oligonucleótidos marcadas que se denominan en lo sucesivo "sondas fluorescibles moleculares." Véase Tyagi, S. y Kramer, F. R., Nature Biotechnology 14: 303-308 (1996). Una sonda fluorescible molecular es un oligonucleótido cuyas regiones de extremo se hibridan entre sí en ausencia de diana, pero se separan si la porción central de la sonda se hibrida con su secuencia diana. La rigidez del híbrido sonda-diana excluye la existencia simultánea de tanto el híbrido sonda-diana como el híbrido intramolecular formado por las regiones de extremo. Por consiguiente, la sonda se somete a un cambio conformacional en el que el híbrido más pequeño formado por las regiones de extremo se disocia y las regiones de extremo se separan entre sí por el híbrido sonda-diana rígido. Para sondas fluorescibles moleculares, una secuencia de reconocimiento de diana central está flanqueada por brazos que se hibridan entre sí cuando la sonda no está hibridada con una hebra de diana, formando una estructura de "horquilla", estando la secuencia de reconocimiento de la diana (que comúnmente se denomina en lo sucesivo la "secuencia de la sonda") en el bucle monocatenario de la estructura de horquilla, y las secuencias de brazo forman un híbrido de tronco bicatenario. Cuando la sonda se hibrida con una diana, es decir, cuando la secuencia de reconocimiento de la diana se hibrida con una secuencia diana complementaria, se forma una hélice relativamente rígida, haciendo que el híbrido de tronco se desenrolle y separando a la fuerza los brazos.

Las moléculas extintoras de la fluorescencia e incluso otros fluoróforos pueden servir de restos extintores de la fluorescencia eficientes para fluoróforos cuando se unen a sondas de hibridación de ácidos nucleicos de forma que el resto que fluoresce y el resto extintor de la fluorescencia estén en contacto, incluso cuando se respeten las reglas de FRET. Además, los espectros de absorción de un par de cromóforos (que fluorescen o que no fluorescen), incluso cromóforos idénticos, en una sonda así construida, se altera de un modo detectable.

En FRET, un primer fluoróforo absorbe a una primera longitud de onda y emite a una segunda longitud de onda más larga. Un segundo cromóforo (es decir, tanto un fluoróforo como un extintor de la fluorescencia) que está próximo al primero (el intervalo de FRET es según se informa 10-100 Å) y a tal grado que su espectro de absorción se solapa con esa emisión, absorbe algo o la mayoría de la energía emitida. Si el segundo cromóforo es un fluoróforo, el cromóforo vuelve a emitir a una tercera longitud de onda todavía más larga. Alternativamente, si el cromóforo es un extintor de la fluorescencia, el cromóforo libera la energía como calor. La FRET progresa en la dirección de longitud de onda creciente.

Las sondas fluorescentes de no FRET también están englobadas por la invención. Véase, por ejemplo, Tyagi y col., patente de EE.UU. nº 6.150.097 ("la patente '097"). Por ejemplo, la patente '097 describe cómo los cambios en los espectros de absorción del par de marca pueden usarse como señal detectable como una alternativa al cambio en la fluorescencia. Cuando se utiliza en cambio en la absorción, el par de marca puede incluir dos cromóforos cualesquiera, es decir, fluoróforos, extintores de la fluorescencia y otros cromóforos. El par de marca puede incluso ser cromóforos idénticos.

VIII. CUANTIFICACIÓN DE LA UNIÓN DE LA SONDA

La unión de una sonda a su secuencia de hibridación complementaria permite al usuario cuantificar la acumulación de una secuencia particular sin necesariamente eliminar el contenido del recipiente de reacción. En general puede usarse cualquier tipo de marca que permita la detección y la diferenciación de diferentes sondas según los procedimientos de la invención.

La acumulación de producto amplificado puede cuantificarse mediante cualquier procedimiento conocido para aquellos en la materia. Por ejemplo, la fluorescencia de una sonda puede detectarse por medición de luz a una

frecuencia particular. Similarmente, la acumulación de diversos productos químicos creados mediante una reacción enzimática ligada a la sonda puede medirse, por ejemplo, midiendo la absorbancia de luz a una longitud de onda particular. En otras realizaciones, las reacciones de amplificación pueden cuantificarse directamente transfiriéndolas a un soporte sólido e hibridándolas con una sonda de ácido nucleico radiactiva. Una vez se lava la sonda sin unir, la cantidad de sonda puede cuantificarse midiendo la radiactividad como es conocido para aquellos expertos en la materia. Otras variaciones de esta técnica emplean el uso de quimioluminiscencia para detectar acontecimientos de hibridación.

La medición de productos de amplificación puede realizarse después de haberse completado la reacción o puede medirse en "tiempo real" (es decir, a medida que se produce la reacción). Si la medición del producto amplificado acumulado se realiza después de completarse la amplificación, entonces pueden añadirse reactivos de detección (por ejemplo, sondas) después de la reacción de amplificación. Alternativamente, las sondas pueden añadirse a la reacción antes de o durante la reacción de amplificación, permitiéndose así la medición de los productos amplificados tanto después de completarse la amplificación como en tiempo real. Se prefieren las mediciones en tiempo real ya que permiten la medición en cualquier ciclo de la reacción dado y, por tanto, proporcionan más información sobre la acumulación de productos durante toda la reacción. Para la medición del producto de amplificación en tiempo real se prefiere el uso de sondas fluorescentes.

Un experto reconocerá que puede usarse un gran número de fluoróforos diferentes. Algunos fluoróforos útiles en los procedimientos y composición de la invención incluyen: fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), carboxitetraclorofluoresceína (TET), NHS-fluoresceína, 5- y/o 6-carboxifluoresceína (FAM), 5- (o 6-) yodoacetamidofluoresceína, 5-[[2(y 3)-5-(acetilmercapto)-succinil]amino]fluoresceína (SAMSA-fluoresceína), y otros derivados de fluoresceína, rodamina, cloruro de sulfonilo de rodamina B Lissamine, cloruro de sulfonilo Texas red, 5- y/o 6-carboxirodamina (ROX) y otros derivados de rodamina, cumarina, 7-amino-metil-cumarina, ácido 7-amino-4-metilcumarina-3-acético (AMCA) y otros derivados de cumarina, fluoróforos BODIPY™, fluoróforos Cascade Blue™ tales como sal de trisodio de ácido 8-metoxipireno-1,3,6-trisulfónico, fluoróforos Lucifer yellow tales como 3,6-disulfonato-4-amino-naftalimida, derivados de ficobiliproteínas, colorantes Alexa Fluor (disponibles de Molecular Probes, Eugene, OR) y otros fluoróforos conocidos para aquellos expertos en la materia. Para una lista general de fluoróforos útiles véase Hermanson, G.T., BIOCONJUGATE TECHNIQUES (Academic Press, San Diego, 1996). Por tanto, cada sonda fluorescerá a una longitud de onda diferente y puede detectarse individualmente sin interferencia de las otras sondas.

IX. NORMALIZACIÓN DE LAS SEÑALES DE LA SONDA

La invención también proporciona el uso del ensayo de comprobación de la sonda para normalizar señales de hibridación que incluye, por ejemplo, lecturas durante la amplificación en tiempo real. La salida de la señal de una sonda se normaliza para reducir variaciones entre lecturas en una mezcla o entre mezclas. Por ejemplo, todos los sistemas ópticos, que incluyen sistemas de PCR en tiempo real, tienen variación de sitio de reacción a sitio de reacción que complica la comparación de resultados entre sitios. Los procedimientos previamente descritos usados para compensar estas diferencias incluyen 'normalizar' las lecturas para cada sitio incluyendo un colorante de referencia pasiva en la mezcla de reacción. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.736.333.

Sin embargo, en lugar de usar un colorante separado para normalizar las señales de la sonda, la señal de "fondo" inherente de las sondas puede usarse para normalizar las curvas de crecimiento por amplificación. Antes de iniciarse una PCR u otra reacción de amplificación se mide una señal inicial (por ejemplo, fluorescencia) de la sonda. Este valor de la señal inicial se usa entonces para normalizar los valores de la señal diana de la sonda obtenida durante la amplificación (es decir, para normalizar los valores de la señal medida cuando la sonda se hibrida con un ácido nucleico diana). Véase, por ejemplo, la Figura 8. Cada valor de la señal diana de la sonda puede normalizarse al valor de la señal inicial de la sonda de varias formas que incluyen multiplicar el valor de la señal diana de la sonda por un factor de escala que representa el valor de la señal inicial o usar transformaciones lineales basadas en el valor de la señal inicial. En algunas realizaciones preferidas, los valores de la señal diana se normalizan dividiendo cada valor de la señal diana entre el valor de la señal inicial. La normalización puede aplicarse a reacciones que emplean señales de la sonda que incluyen, por ejemplo, sondas fluorescentes lineales (por ejemplo TaqMan®) y sondas fluorescentes que se extinguen cuando se autohibridan.

Además, con respecto a las sondas que cambian las conformaciones en respuesta a cambios de temperatura (por ejemplo, sondas fluorescibles moleculares), el valor de la señal inicial de la sonda puede medirse tanto a la temperatura T1 por debajo de o igual a la temperatura de autohibridación de la sonda, o a la temperatura T2 por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda, o a la temperatura T3 por debajo de o igual a la temperatura de autohibridación de la sonda. Este valor de la señal inicial de la sonda medida a tanto a la temperatura T1, la temperatura T2 como a la temperatura T3 se usa entonces para normalizar los posteriores valores de la señal diana de la sonda medida cuando la sonda se hibrida con un ácido nucleico diana. En otra realización preferida de la invención, la diferencia entre dos valores de la señal inicial medidos a diferentes temperaturas se usa como factor de normalización. Véase, por ejemplo, las Figuras 9 y 10. Por ejemplo, la diferencia entre la señal de la sonda inicial a la temperatura T2 y a la temperatura T1 o la diferencia entre las señales de la sonda inicial a la temperatura T2 y a la temperatura T3 puede usarse como factor de normalización para normalizar

los valores de la señal diana. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 3.

Los valores de la señal normalizados descritos anteriormente son útiles para el análisis cuantitativo. En algunos aspectos de la invención, la cantidad o concentración de partida inicial de un ácido nucleico diana se determina usando los valores de la señal normalizados. Las Figuras 8-10 ilustran realizaciones de la invención en las que la señal diana normalizada se usa opcionalmente para cuantificar una cantidad o concentración inicial de un ácido nucleico diana. La determinación de una cantidad de partida normalmente implica desarrollar primero una curva de calibración usando dos o más patrones (por ejemplo, al menos dos cantidades de partida conocidas diferentes de una secuencia de ácidos nucleicos de calibración). La curva de calibración relaciona el número de ciclos umbral con el logaritmo de la cantidad o concentración de partida. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0640828, Orlando y col., Clin. Chem. Lab. Med. 36(5):255-69 (1998); Gililand, G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2725-2729 (1990). Según un aspecto de la presente invención, una cantidad o concentración de partida inicial de una secuencia de ácidos nucleicos diana se determina calculando valores de la señal normalizados para la secuencia diana como se ha descrito anteriormente, determinando el número de ciclos umbral para la secuencia de ácidos nucleicos diana usando los valores de la señal normalizados e insertando el número de ciclos umbral en la ecuación de la curva de calibración para dar la cantidad de partida inicial

Los estudios han mostrado que el número de copias inicial puede cuantificarse durante análisis de PCR en tiempo real basado en el ciclo umbral. Véase, Higuchi, R., y col. Biotechnology 11:1026-1030 (1993). El ciclo umbral se define como el ciclo al que se determina que la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del fondo. El ciclo umbral es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias inicial. Cuanto más molde esté presente para empezar, menor será el número de ciclos que se necesitan para conseguir un punto en el que la señal fluorescente sea detectable por encima del fondo. Según otro aspecto de la presente invención, la curva de calibración que relaciona el número de ciclos umbral con el logaritmo del número de copias inicial también puede derivarse usando valores de la señal normalizados de los al menos dos patrones. Por ejemplo, un valor de la señal inicial (o diferencia entre valores de la señal inicial medida a dos temperaturas diferentes) se mide para cada uno de los dos o más patrones usados para derivar la curva de calibración. Las posteriores señales medidas para cada uno de estos patrones durante la amplificación están entonces normalizadas al valor de la señal inicial respectivo (o diferencia entre valores de la señal inicial) medido para el patrón. Los valores umbral normalizados para cada estándar pueden entonces usarse para determinar el número de ciclos umbral para el patrón. Una vez se determina el número de ciclos umbral para cada patrón, una curva de calibración se deriva de los números de ciclos umbral y cantidades de partida conocidas de los patrones. Esta curva de calibración puede usarse para determinar una cantidad de partida de concentración de un ácido nucleico diana en una muestra como se ha descrito anteriormente. Los patrones usados para derivar la curva de calibración pueden amplificarse en el mismo recipiente de reacción con la secuencia de ácidos nucleicos diana (patrones internos) o en una reacción de amplificación separada (patrones externos). Aunque actualmente se prefieren las técnicas de cuantificación que emplean los números de ciclos umbral, también es posible cuantificar la cantidad o concentración de partida inicial de un ácido nucleico diana usando análisis del punto final de los valores de la señal normalizados.

X. APARATOS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona aparatos que son útiles para realizar los procedimientos de la invención. Según algunas realizaciones, la invención proporciona un aparato para probar la integridad de al menos una sonda para la detección de un ácido nucleico, en el que la sonda, cuando se introduce en una reacción de amplificación, detecta la acumulación de un ácido nucleico emitiendo una señal. El aparato comprende al menos (a) un sistema de control de la temperatura para cambiar la temperatura de la mezcla de reacción; (b) al menos un mecanismo de detección para medir la fluorescencia de la al menos una sonda; y (c) un controlador en comunicación con el sistema de control de la temperatura y el mecanismo de detección. En algunas realizaciones, el controlador está programado para realizar las etapas de: (i) medir la señal de la sonda en uno o más instantes de tiempo; y (ii) determinar la integridad de la sonda comparando la señal de la sonda en uno o más instantes de tiempo con al menos un valor umbral.

En algunas realizaciones, el mecanismo de detección detecta fluorescencia. Los mecanismos de detección generalmente comprenden un tubo fotomultiplicador, CCD, fotodiodo u otro detector conocido. En algunas realizaciones, cada detector es un fotodiodo PIN. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 99/60380. Mecanismos de detección adecuados para su uso en el aparato y los procedimientos de la presente invención incluyen mecanismos de detección que miden señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, difracción o absorción de rayos X, magnetismo o actividad enzimática. Marcas adecuadas para marcar secuencias de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, fluoróforos, cromóforos, isótopos radiactivos, reactivos con densidad electrónica, enzimas y ligandos que tienen componentes de unión específica (por ejemplo, biotina-avidina). Otro mecanismo de detección adecuado para su uso en la presente invención detecta y mide una o más señales eléctricas (por ejemplo, mediciones de conductancia eléctrica, inductancia, resistencia o capacitancia) indicativas de la cantidad o concentración de una secuencia de ácidos nucleicos.

Además, en algunas realizaciones, el controlador está programado para medir la fluorescencia de la sonda en dos o más instantes de tiempo seleccionados del grupo de un primer, segundo y tercer instante de tiempo, estando la temperatura de la mezcla a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda en el primer instante de

tiempo, estando la temperatura de la mezcla por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda en el segundo instante de tiempo y estando la temperatura de la mezcla a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda en el tercer instante de tiempo. Similarmente, la etapa de detección puede comprender comparar la fluorescencia de la sonda en dos o más instantes de tiempo con dos o más valores umbral. En algunas realizaciones, el controlador envía señales al sistema de control de la temperatura para cambiar la temperatura de la mezcla de reacción.

En algunas realizaciones, el controlador está programado para alterar la temperatura de una mezcla de reacción. Por ejemplo, el controlador puede enviar señales al sistema de control de la temperatura para enfriar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura inferior o igual a la temperatura de autohibridación de la sonda antes del primer instante de tiempo y entre el segundo y el tercer instante de tiempo y para elevar la temperatura de la mezcla de reacción por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda entre el primer y el segundo instante de tiempo.

En otras realizaciones se proporciona un aparato para normalizar la fluorescencia de al menos una sonda para cuantificar un polinucleótido en una muestra. En algunas realizaciones, la sonda puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico diana y la sonda que comprende un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia, en el que el calentamiento de la sonda hace que la sonda cambie de conformación de una primera conformación a una segunda conformación, cambiando así la distancia entre el fluoróforo y el agente extintor de la fluorescencia de forma que la fluorescencia del fluoróforo se extinga o altere en la primera conformación en comparación con la fluorescencia del fluoróforo en la segunda conformación. El aparato comprende, por ejemplo, (a) al menos un mecanismo de detección para medir la fluorescencia de la sonda; y (b) un controlador en comunicación con el mecanismo de detección. El controlador está programado, por ejemplo, para realizar las etapas que comprenden (i) medir un primer valor de fluorescencia de la sonda a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda, un segundo valor de fluorescencia de la sonda por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda y un valor de fluorescencia diana de la sonda unida a un polinucleótido diana. El controlador puede programarse adicionalmente para normalizar el valor de fluorescencia diana usando cualquiera de las técnicas de normalización previamente descritas, por ejemplo, dividiendo el valor de fluorescencia diana entre la diferencia del segundo valor de fluorescencia y el primer valor de fluorescencia.

Como se observa anteriormente, algunas sondas útiles en los procedimientos de la invención cambian la conformación en respuesta a temperatura, mientras que otras sondas útiles en la invención no cambian la conformación en respuesta a temperatura. Por ejemplo, sondas útiles en los procedimientos de la invención incluyen sondas fluorescentes moleculares, además de sondas Taqman®. Para tales sondas, el controlador puede programarse para enviar señales al detector para medir una señal de la sonda. En estas realizaciones, el controlador en comunicación con el mecanismo de detección está programado para realizar las etapas que comprenden medir un valor de la señal de prueba de la sonda, medir un valor de la señal diana de la sonda unida a un polinucleótido diana; y normalizar el valor de la señal diana dividiendo el valor de fluorescencia diana entre el valor de la señal de prueba de la sonda.

En algunas de las realizaciones enumeradas anteriormente, el aparato comprende además una sistema de control de la temperatura para elevar la temperatura de la mezcla de reacción por encima de una temperatura de autohibridación de la sonda y para enfriar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura inferior o igual a la temperatura de autohibridación de la sonda.

XI. PRODUCTOS DE PROGRAMA INFORMÁTICO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona productos de programa informático que son útiles para realizar los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un producto de programa informático legible por una máquina que comprende al menos un mecanismo de detección para medir en uno o más instantes de tiempo una señal de al menos una sonda para la detección de una secuencia de ácidos nucleicos, y que comprende una sistema de control de la temperatura para cambiar la temperatura de una mezcla de reacción que contiene la sonda. El producto de programa informático incorpora un programa de instrucciones ejecutable por la máquina para realizar las etapas que comprenden medir la señal de la sonda en uno o más instantes de tiempo y determinar la integridad de la sonda comparando la fluorescencia de la sonda en el uno o más instantes de tiempo con al menos un valor umbral. En algunas realizaciones, la señal producida por la sonda es fluorescencia.

En algunas realizaciones, el producto legible por ordenador recibe datos correspondientes a la señal de la sonda mediante un mecanismo de detección. Entonces se obtiene al menos un valor umbral, tanto de un mecanismo de detección como recuperando el valor umbral de la memoria.

En algunas realizaciones, el programa de instrucciones comprende (a) medir la fluorescencia de la sonda en dos o más instantes de tiempo seleccionados del grupo que consiste en un primer, segundo y tercer instante de tiempo, estando la temperatura de la mezcla a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda en el primer instante de tiempo, estando la temperatura de la mezcla por encima de la temperatura de autohibridación de la

sonda en el segundo instante de tiempo y estando la temperatura de la mezcla a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda en el tercer instante de tiempo; y (b) determinar la integridad de la sonda comparando la fluorescencia de la sonda en los dos o más instantes de tiempo con dos o más valores umbral. En algunas de estas realizaciones, el programa de instrucciones comprende además la etapa de elevar la temperatura de la mezcla de reacción por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda y posteriormente enfriar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura inferior o igual a la temperatura de autohibridación de la sonda.

En algunas realizaciones, la etapa determinante comprende comparar tanto (a) la diferencia de fluorescencia de la sonda en el primer y segundo instante de tiempo con el valor umbral como (b) la diferencia de fluorescencia de la sonda en el segundo y tercer instante de tiempo con el valor umbral.

Como se ha descrito en este documento, el valor umbral se basa normalmente en la señal de una sonda intacta. Además, el programa de instrucciones puede comprender una etapa de determinación de la integridad de al menos dos sondas diferentes en la mezcla de reacción, pudiendo las sondas unirse a diferentes secuencias de ácidos nucleicos.

En otro aspecto de la invención se proporciona un programa informático que ejecuta las etapas de (a) medir un primer valor de fluorescencia de la sonda a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda; (b) medir un segundo valor de fluorescencia de la sonda por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda; (c) medir un valor de fluorescencia diana de la sonda unida a un polinucleótido diana; y (d) normalizar el valor de fluorescencia diana al valor de fluorescencia diana por la diferencia del segundo valor de fluorescencia y el primer valor de fluorescencia. El producto de programa informático puede normalizar el valor de fluorescencia diana usando cualquiera de las técnicas de normalización previamente descritas, por ejemplo, dividiendo el valor de fluorescencia diana entre la diferencia del segundo valor de fluorescencia y el primer valor de fluorescencia. Normalmente, la máquina comprende además un sistema de control de la temperatura para elevar la temperatura de una mezcla de reacción que contiene la sonda por encima de una temperatura de autohibridación de la sonda y para enfriar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura inferior o igual a la temperatura de autohibridación de la sonda. Además, en algunas realizaciones, el programa de instrucciones comprende las etapas de elevar la temperatura de una mezcla de reacción que contiene la sonda por encima de una temperatura de autohibridación de la sonda y enfriar la temperatura de la mezcla de reacción a una temperatura inferior o igual a la temperatura de autohibridación de la sonda.

Además, el programa informático puede incorporar un programa de instrucciones ejecutable por la máquina para realizar las etapas que comprenden (a) medir un valor de la señal de prueba de la sonda; (b) medir un valor de la señal diana de la sonda unida a un polinucleótido diana; y (c) normalizar el valor de la señal diana dividiendo el valor de la señal diana entre el valor de la señal de prueba de la sonda. Por ejemplo, el producto de programa informático puede normalizar el valor de la señal diana usando cualquiera de las técnicas de normalización previamente descritas, por ejemplo, dividiendo el valor de la señal diana entre el valor de la señal de prueba.

EJEMPLO

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

EJEMPLO 1

Este ejemplo ilustra un procedimiento para evaluar la integridad de sondas fluorescentes que se extinguen cuando se autohibridan comparando las intensidades de fluorescencia de las sondas con valores predeterminados.

Una sonda fluorescente molecular está marcada en el extremo 5' con FAM como indicador y en el extremo 3' con un extintor de la fluorescencia no fluorescente DABCYL. Los 6 nucleótidos internos del extremo 5' son homólogos a los 6 nucleótidos en el extremo 3'. A temperaturas suficientemente bajas y en presencia de sal suficiente, estas secuencias se hibridan para formar una estructura de "tronco" y la sonda fluorescente forma una estructura de horquilla que pone en estrecha proximidad el indicador fluorescente y el extintor de la fluorescencia (Figura 11). Esto conduce a una extinción del indicador de fluorescencia.

La integridad de la sonda puede determinarse leyendo la intensidad de fluorescencia de la sonda a una o más temperaturas. A una temperatura por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de la secuencia del tronco y en presencia de una concentración adecuada de sales, la fluorescencia será baja debido a que el indicador se extinguirá. Dependiendo de la temperatura, la elevación de la temperatura desnaturará parcialmente o completamente la secuencia del tronco y conducirá a un aumento en la fluorescencia.

Cuando se compara con los resultados para sondas intactas completamente funcionales, las lecturas de fluorescencia de una sonda de prueba pueden dar la oportunidad de ver la integridad de la sonda. Puede establecerse una correlación entre las lecturas de fluorescencia y el rendimiento funcional de la sonda en un ensayo de PCR. Por tanto, los resultados de este "ensayo de comprobación de la sonda" pueden usarse como una medida del rendimiento funcional de la sonda en un ensayo.

Las Figuras 12 y 13 muestran los resultados del ensayo de comprobación de la sonda y los resultados de PCR para una sonda intacta y una mezcla de sondas intactas y escindidas. En ambos casos, la concentración final de la sonda fue 200 nM. La fluorescencia de la mezcla de reacción de PCR se determinó a 50°C (temperatura T1) y 63°C (temperatura T2) y de nuevo a 50°C (temperatura T3). Véase la Tabla 4. Hay una diferencia significativa en las lecturas de fluorescencia de comprobación de la sonda de mezclas de reacción de PCR que contienen 100% de sondas intactas y 60% de sondas intactas (Figura 13) y esta diferencia puede guardar relación con un escaso rendimiento de la PCR.

Tabla 4. Resultados de comprobación de la sonda para sondas fluorescentes moleculares intactas y parcialmente intactas.

% de sonda intacta	Fluorescencia a T1	Fluorescencia a T2	Fluorescencia a T3	Fluorescencia T2-T1
100	200	359	199	159
60%	705	740	700	35

EJEMPLO 2

Este ejemplo ilustra la determinación de un valor umbral basado en resultados de mezclas de sondas degradadas e intactas.

Se prepararon mezclas de sonda intacta completamente funcional y sondas escindidas y se evaluaron por tanto un ensayo de comprobación de la sonda como por PCR en tiempo real. Las mezclas de sondas oscilaron del 100% al 0% de sonda intacta en intervalos del 10% (por ejemplo, 90%, 80%, 70%, etc.). Las sondas no funcionales en este ejemplo fueron sondas que se escindieron en la secuencia de bucle. La escisión conduce a una inestabilidad de la secuencia del tronco y a un posterior aumento de la fluorescencia de la sonda a temperaturas por debajo de la temperatura de hibridación de la secuencia del tronco.

Los resultados de la cuantificación en tiempo real se obtuvieron para un molde diana usando mezclas de sonda intacta y escindida. Además, un ensayo de comprobación de la sonda se realizó para cada mezcla de sondas. Para la comprobación de sondas, la fluorescencia de las mezclas de reacción de PCR se leyó a 2 temperaturas, T1 (una temperatura por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda) y T2 (una temperatura por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda). Entonces, la diferencia en estas lecturas de fluorescencia (T2-T1) se usó como el valor de comprobación de la sonda.

Las mezclas de sondas que contuvieron entre el 100 y el 80% de sonda intacta tuvieron un rendimiento de PCR aceptable y tuvieron un aumento de las lecturas de fluorescencia a aproximadamente 35 ciclos. Mayores proporciones de sonda degradada en la mezcla conducen a escasos resultados de PCR. Por ejemplo, la mezcla de 70% de sondas intactas no demostró un aumento significativo en la fluorescencia en posteriores números de ciclo. Para mezclas con incluso menos sonda intacta, las lecturas de fluorescencia cayeron en función del número de ciclos. Basándose en estos resultados, un valor de comprobación de la sonda umbral (T2-T1) de 100 unidades de fluorescencia (Figura 14) podría usarse para predecir el rendimiento de PCR de una mezcla de sondas escindidas e intactas.

EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra la utilidad del procedimiento de comprobación de la sonda para mejorar la precisión de las lecturas de fluorescencia.

Para demostrar la capacidad de la funcionalidad de la comprobación de la sonda para mejorar la precisión de lecturas ópticas para la instrumentación de fluorescencia, y en particular para instrumentos tales como el Smart Cycler® (Cepheid, Sunnyvale, CA) que contienen un fluorómetro diferente para cada sitio de reacción, se realizaron ensayos de PCR usando dos instrumentos diferentes, y se comparó la precisión de los valores de punto final entre familias de curvas con y sin normalización de la comprobación de la sonda. Para la prueba se preparó una PCR para la detección de estreptococos del grupo B que comprendía tampón Tris 50 mM, MgCl₂ 8 mM, 450 µg/ml de BSA, 400 nM de cebador directo, 400 nM de cebador inverso, 200 nM de sonda de FAM SagB1, 200 µM de mezcla dNTP, 1,25 unidades de Taq polimerasa y 9000 copias de ADN genómico GBS. Se llenaron dieciséis recipientes de reacción Smart Cycler de 25 µl y se colocaron en el Smart Cycler®. La comprobación de la sonda se realizó justo antes de la PCR, primera lectura a 50°C (temperatura T1), luego a 63°C (temperatura T2) y de nuevo a 50°C (temperatura T3), sin resta del fondo de la fluorescencia. Entonces se inició la PCR, primero manteniendo a 95°C durante 180 segundos y luego realizando 45 ciclos de PCR (95°C durante 5 segundos; 56°C durante 14 segundos con lectura óptica; y 72°C durante 5 segundos). Se realizaron ocho reacciones en cada uno de dos instrumentos diferentes, y los datos se exportaron a una hoja de cálculo de Excel para el análisis y la representación gráfica.

Se hicieron dos gráficas analizando los datos de dos formas, una sin normalización de la comprobación de la sonda

5 y una con normalización de la comprobación de la sonda. La Figura 15 muestra 16 reacciones sin normalización y es una representación de valores de fluorescencia con fondo restado frente al número de ciclos. Entonces los datos se normalizaron usando el ensayo de comprobación de la sonda, es decir, cada valor de fluorescencia, con fondo restado, o bien se dividió entre el valor de la temperatura T2 de comprobación de la sonda de su sitio de reacción respectivo o bien se dividió entre la diferencia entre el valor de la señal de comprobación de la sonda a la temperatura T2 y el valor de la señal de comprobación de la sonda a la temperatura T3. Las Figuras 16 y 17 muestran 16 reacciones con normalización de la comprobación de la sonda.

10 Luego se calculó la CV en % (desviación estándar/media x 100) y el valor máx-mín en % (valor máximo - valor mínimo / media x 100) para cada conjunto de datos, y se muestra en la siguiente tabla.

Conjunto de datos	N	% de CV	% (máx-min)
Sin normalizar	16	7,9	25,4
Normalizado (T2)	16	3	11,6
Normalizado (T2-T3)	16	2,9	12,5

15 Estos datos muestran claramente que la medición de comprobación de la sonda puede usarse para mejorar significativamente la precisión de lecturas de fluorescencia. Este trabajo proporciona un medio de compensación para posibles desviaciones en componentes del sistema óptico. Para procedimientos cuantitativos que se basan en lecturas de fluorescencia de punto final, la exactitud y la precisión de la cuantificación mejora al menos aproximadamente 3 veces.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de medición del carácter intacto de al menos una sonda para detectar un ácido nucleico diana en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, comprendiendo el procedimiento,
- 5 (a) proporcionar una mezcla que comprende al menos una sonda de autohibridación, sonda que puede hibridarse con el ácido nucleico diana;
- (b) medir una señal fluorescente de la sonda cuando la sonda no está hibridada con el ácido nucleico diana en uno o más instantes de tiempo seleccionados del grupo que consiste en un primer, segundo y tercer instante de tiempo, estando la temperatura de la mezcla a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda en un primer instante de tiempo, habiéndose elevado la temperatura de la mezcla a una temperatura por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda en un segundo instante de tiempo y habiéndose reducido la temperatura de la mezcla a una temperatura a o por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda en un tercer instante de tiempo; y
- 10 (c) determinar el carácter intacto de la sonda comparando la señal de la sonda en el uno o más instantes de tiempo con al menos un valor umbral predeterminado indicativo de la señal de la sonda cuando la sonda está intacta;
- en el que la sonda comprende un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia, y el calentamiento de la sonda de una temperatura por debajo de la temperatura de autohibridación de la sonda a una temperatura por encima de la temperatura de autohibridación de la sonda hace que la sonda cambie la conformación de una primera conformación de autohibridación a una segunda conformación, cambiando así la distancia entre el fluoróforo y el agente extintor de la fluorescencia de forma que la fluorescencia del fluoróforo se extingue en la primera conformación en comparación con la fluorescencia del fluoróforo en la segunda conformación.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende además medir la señal de la sonda en dos o más instantes de tiempo; y la etapa (c) comprende además determinar la integridad de la sonda comparando la diferencia en la señal de la sonda en los dos o más instantes de tiempo con el al menos un valor umbral.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende medir la fluorescencia de la sonda en el primer o tercer instante de tiempo.
- 30 4. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende medir la fluorescencia de la sonda en el segundo instante de tiempo.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa determinante comprende comparar la fluorescencia de la sonda en el primer y tercer instante de tiempo con al menos un valor umbral indicativo de la señal de la sonda cuando la sonda está intacta.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa determinante comprende comparar la fluorescencia de la sonda en el segundo y tercer instante de tiempo con al menos un valor umbral indicativo de la señal de la sonda cuando la sonda está intacta.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa determinante comprende comparar la diferencia de fluorescencia de la sonda en el primer y segundo instante de tiempo con el valor umbral indicativo de la señal cuando la sonda está intacta.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de medición comprende medir la fluorescencia de la sonda en el tercer instante de tiempo.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa determinante comprende comparar la señal en los dos o más instantes de tiempo con dos o más valores umbral indicativos de la señal de la sonda cuando la sonda está intacta.
- 50 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sonda comprende un oligonucleótido marcado con un fluoróforo y un agente extintor de la fluorescencia de forma que la sonda es escindida por la actividad de 5'-exonucleasa de una ADN polimerasa cuando la sonda se hibrida con un ácido nucleico amplificado emitiendo así la fluorescencia.
- 55 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sonda es una sonda fluorescente molecular.
- 60 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos parte del procedimiento se realiza durante una reacción de amplificación, comprendiendo la reacción de amplificación
- (a) combinar en una mezcla acuosa:
- (i) una sonda diana, una primera sonda de control y una segunda sonda de control;
- (ii) un primer cebador de 5', un primer cebador de 3' y un molde diana, comprendiendo el molde diana un sitio de hibridación para el primer cebador de 5', el primer cebador de 3' y la sonda diana;
- 65 (iii) un primer molde de control, comprendiendo el primer molde de control un sitio de hibridación para el

- primer cebador de 5', el primer cebador de 3' y la primera sonda de control; y
(iv) un segundo cebador de 5', un segundo cebador de 3' y un segundo molde de control, comprendiendo el segundo molde de control un sitio de hibridación para el segundo cebador de 5', el segundo cebador de 3', la sonda diana y una segunda sonda de control;
- 5 (b) realizar una reacción de amplificación para crear productos de amplificación; y
(c) cuantificar la unión de la sonda diana, la primera sonda de control y la segunda sonda de control a los productos de amplificación.
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento se pone en práctica en al menos dos sondas diferentes en la mezcla, en el que las sondas se diseñan para hibridarse con diferentes secuencias de ácidos nucleicos.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mezcla comprende además un colorante, comprendiendo el procedimiento además medir una señal del colorante y normalizar la señal de la sonda a la señal del colorante.

FIGURA 1

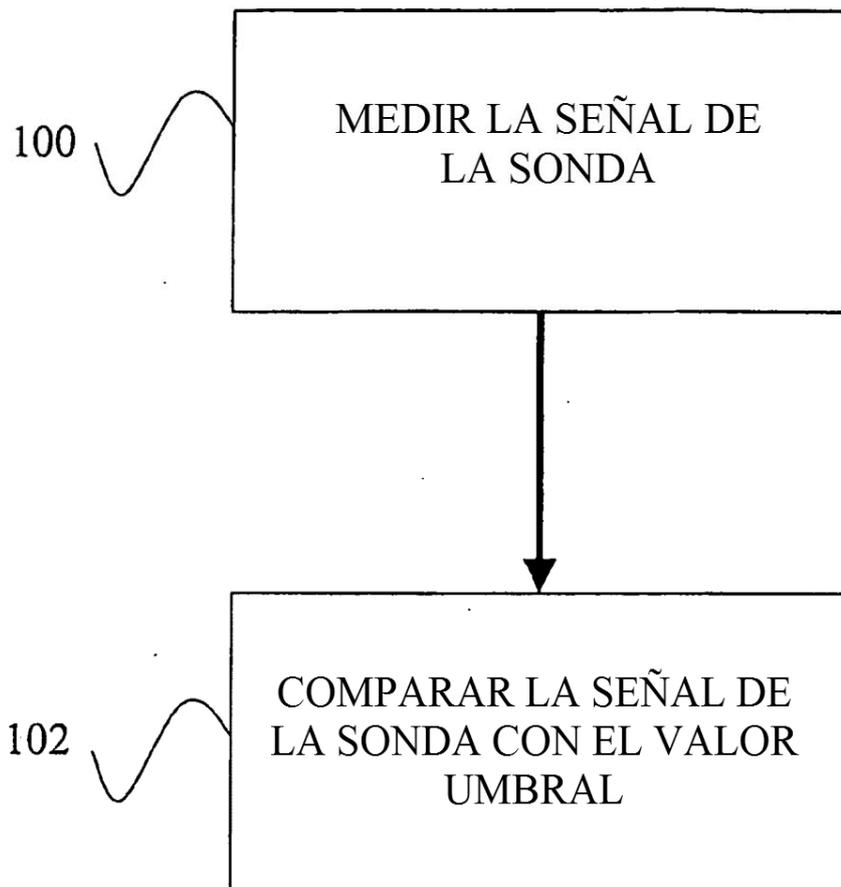


FIGURA 2

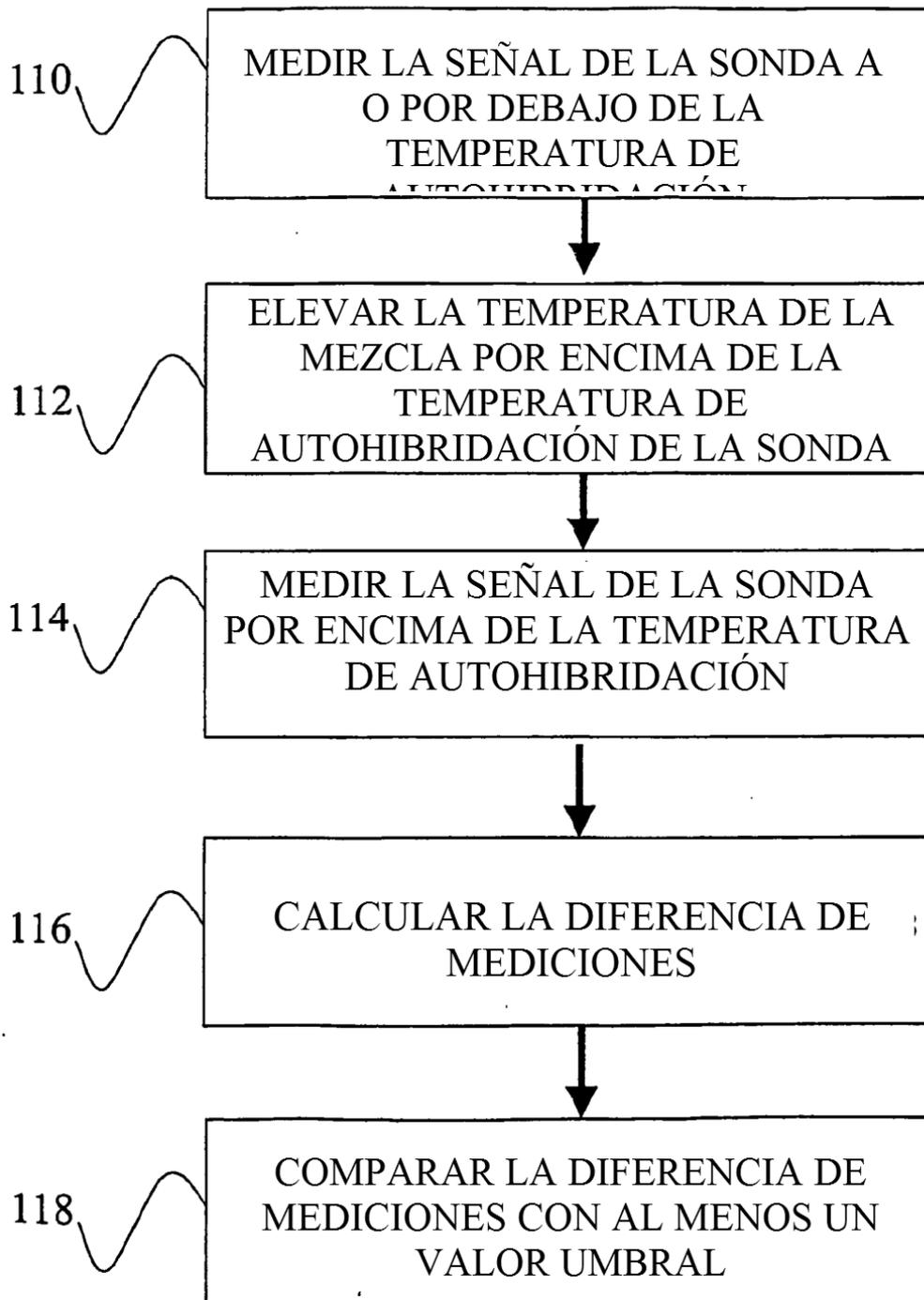


FIGURA 3

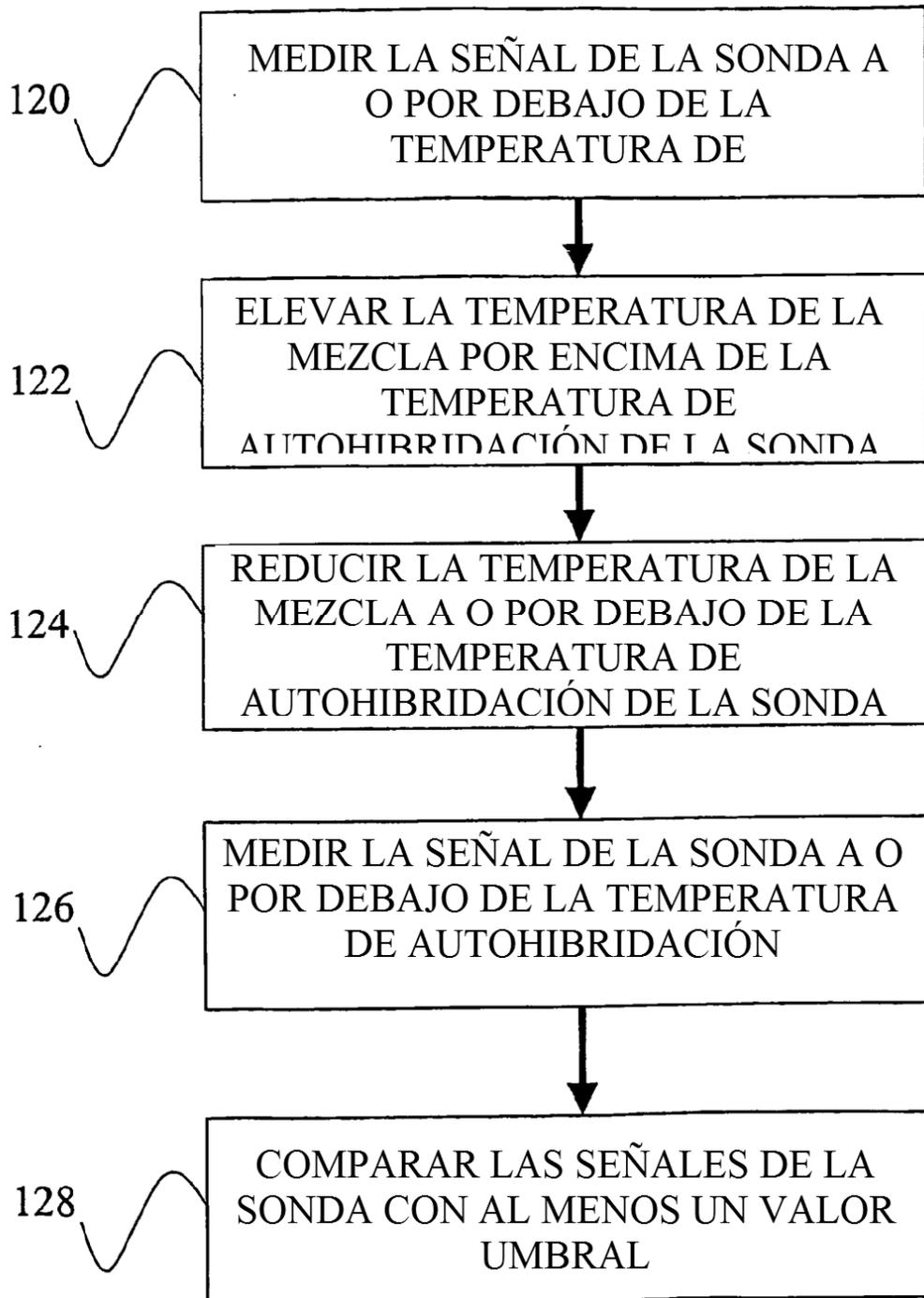


FIGURA 4

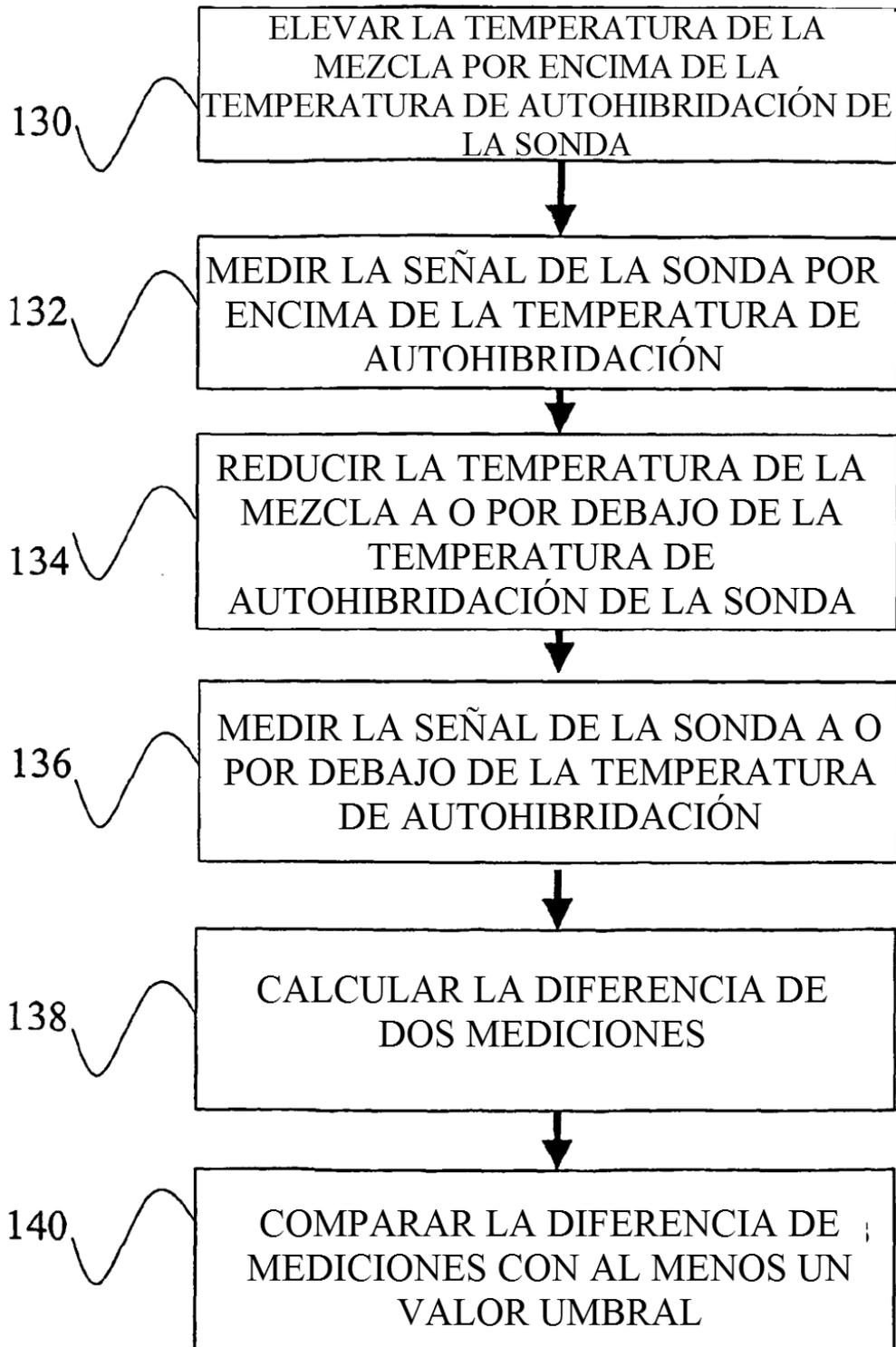


FIGURA 5

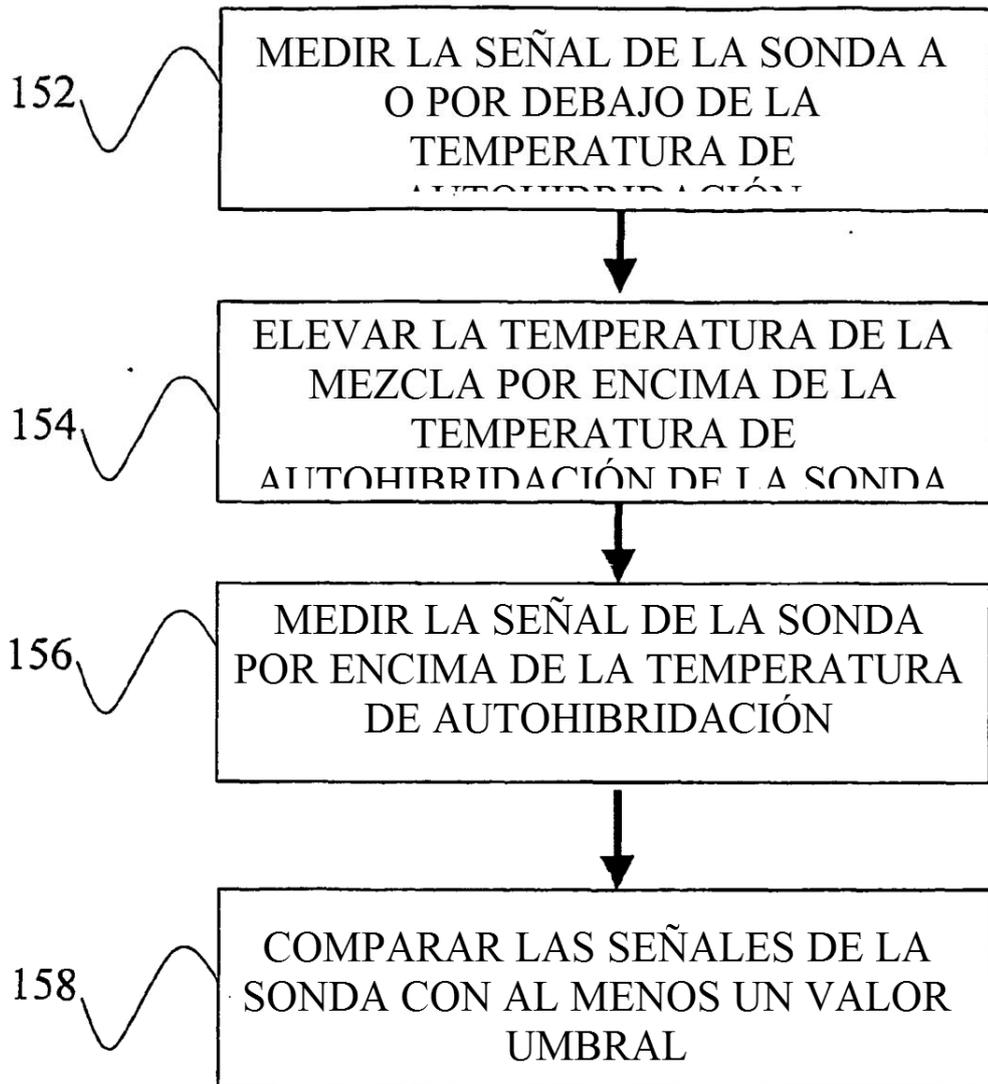


FIGURA 6

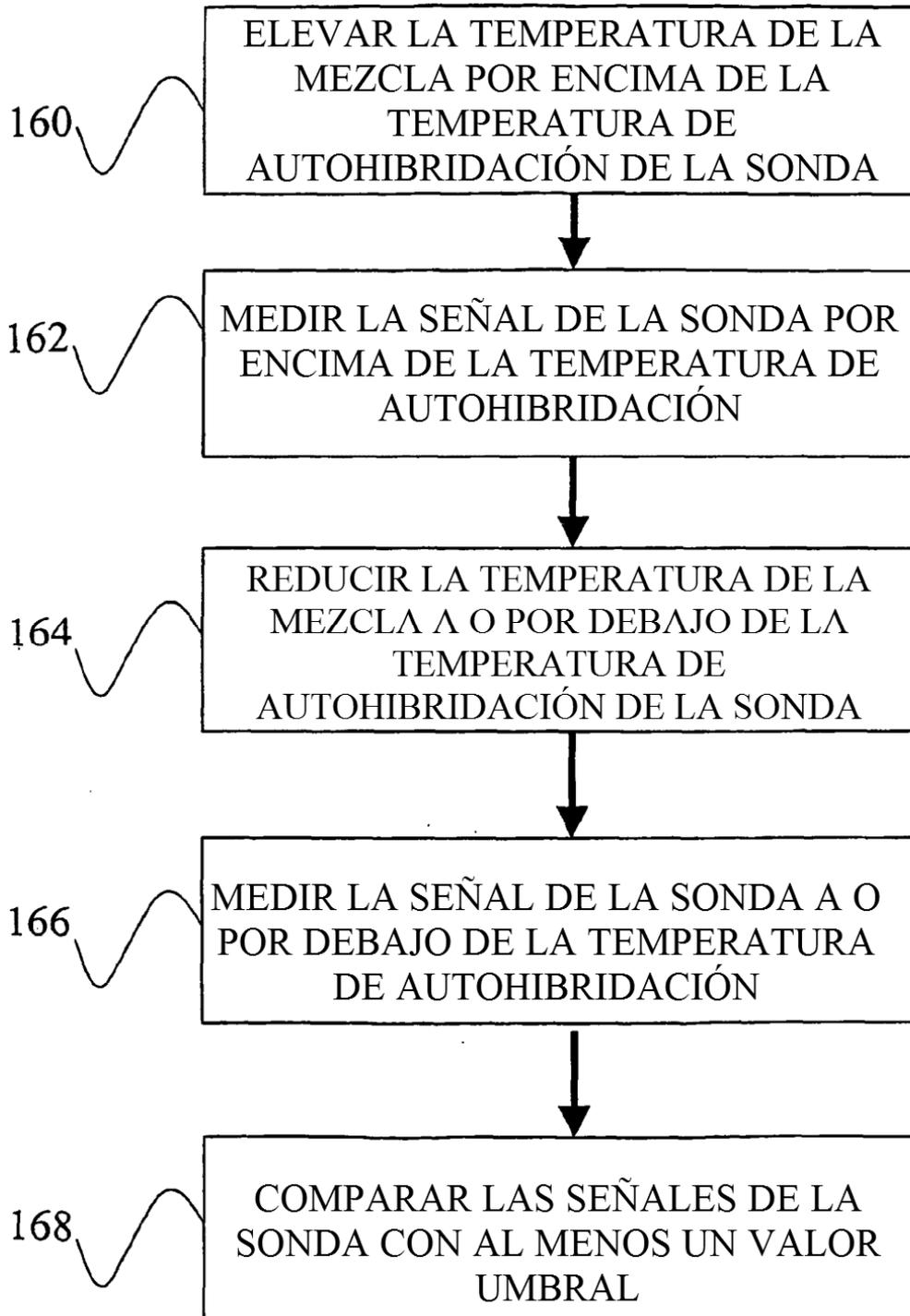


FIGURA 7

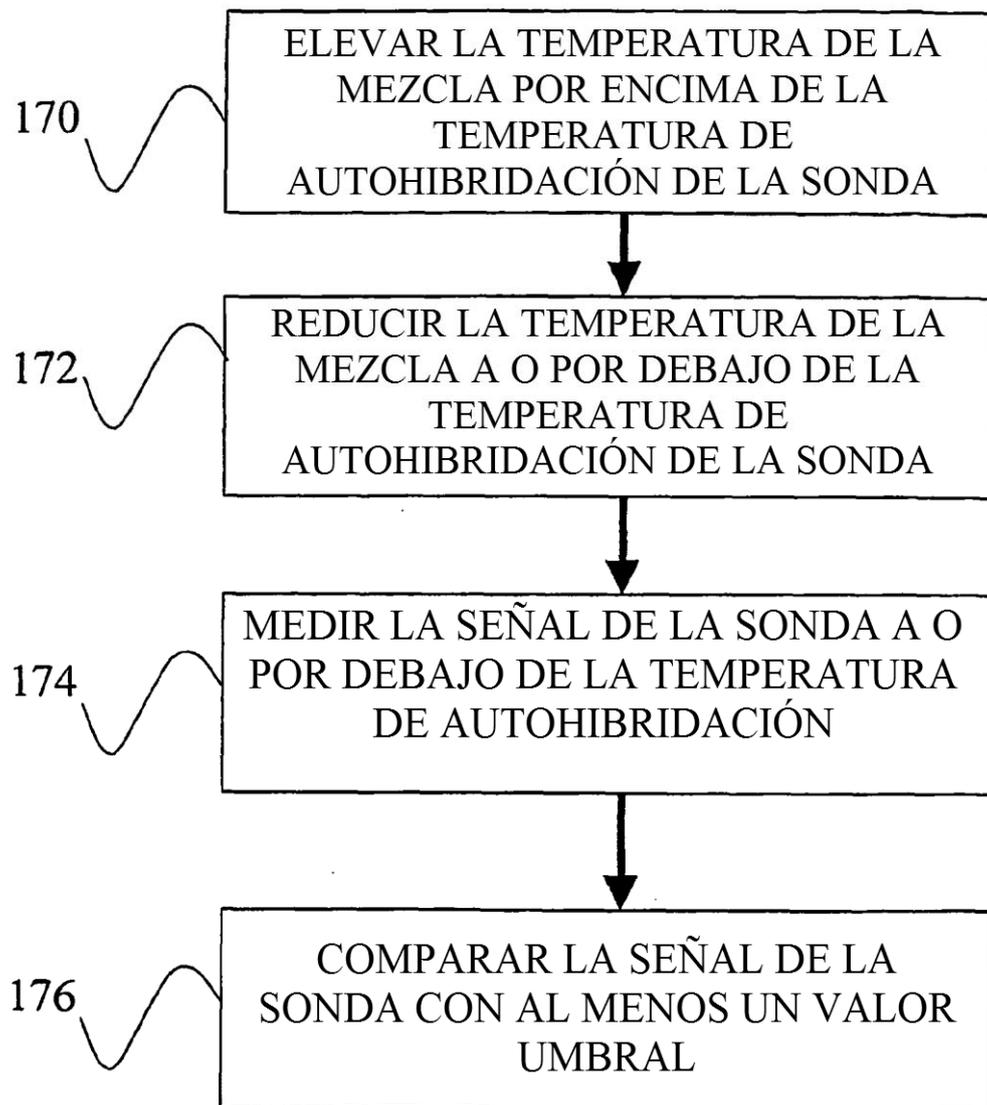


FIGURA 8

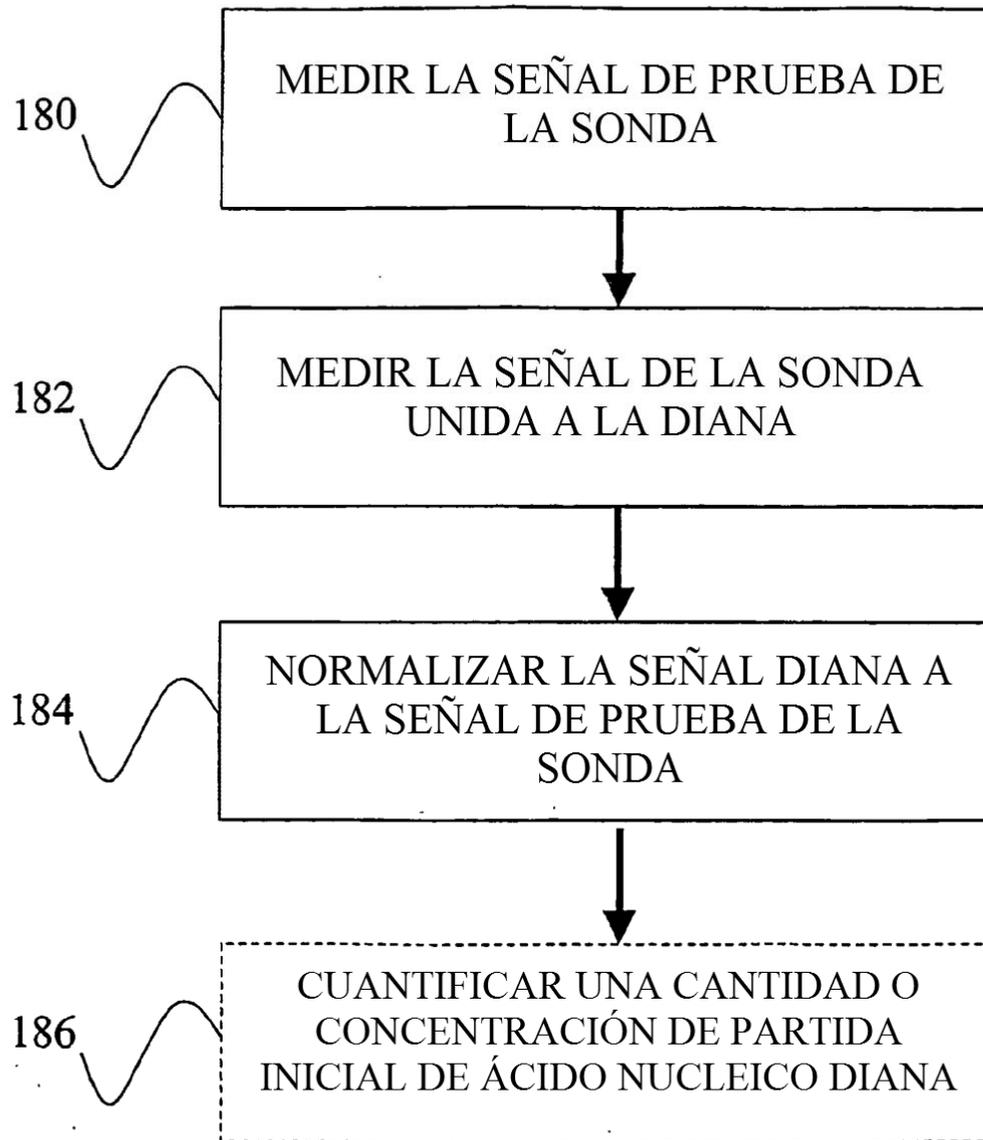


FIGURA 9

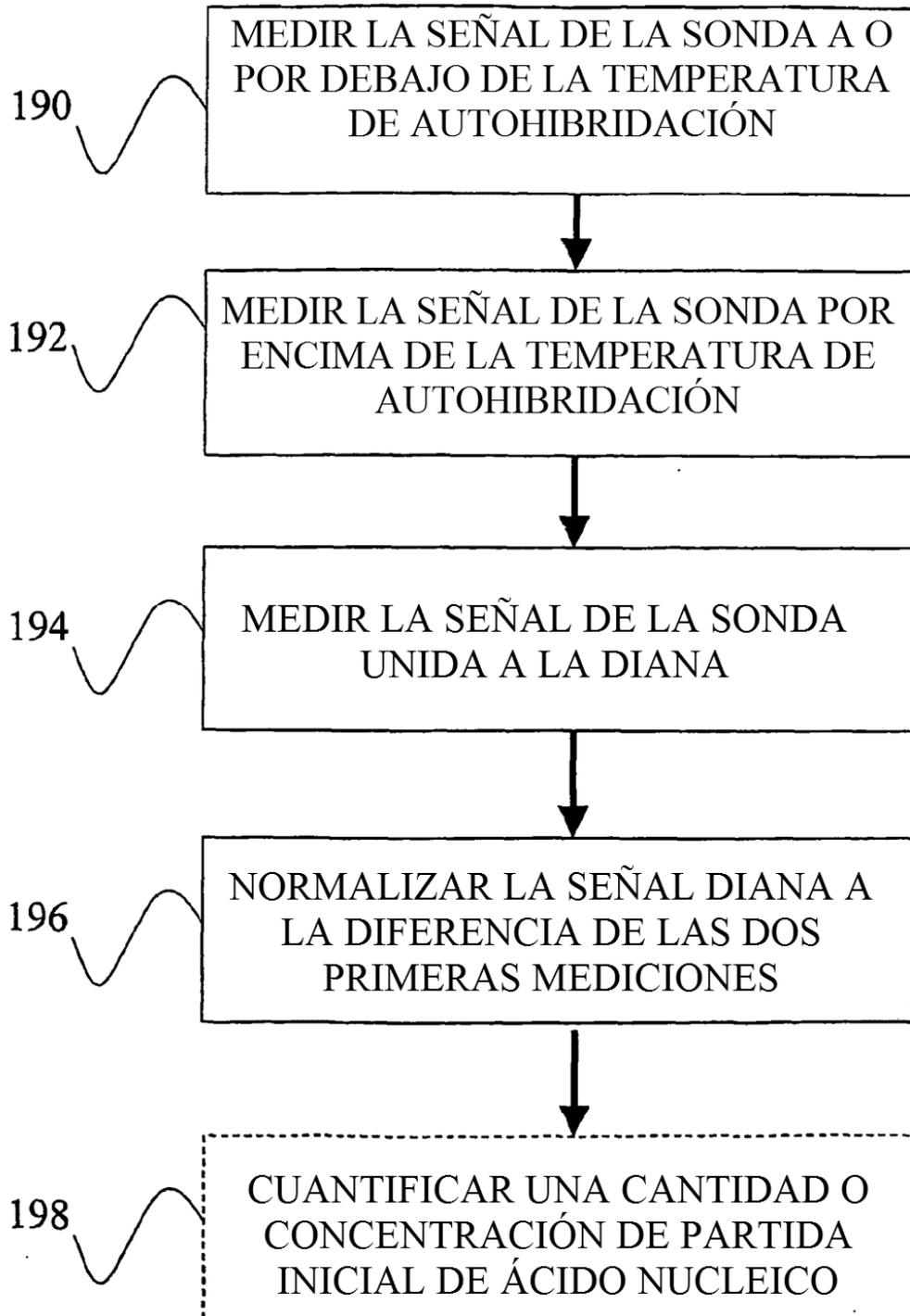


FIGURA 10

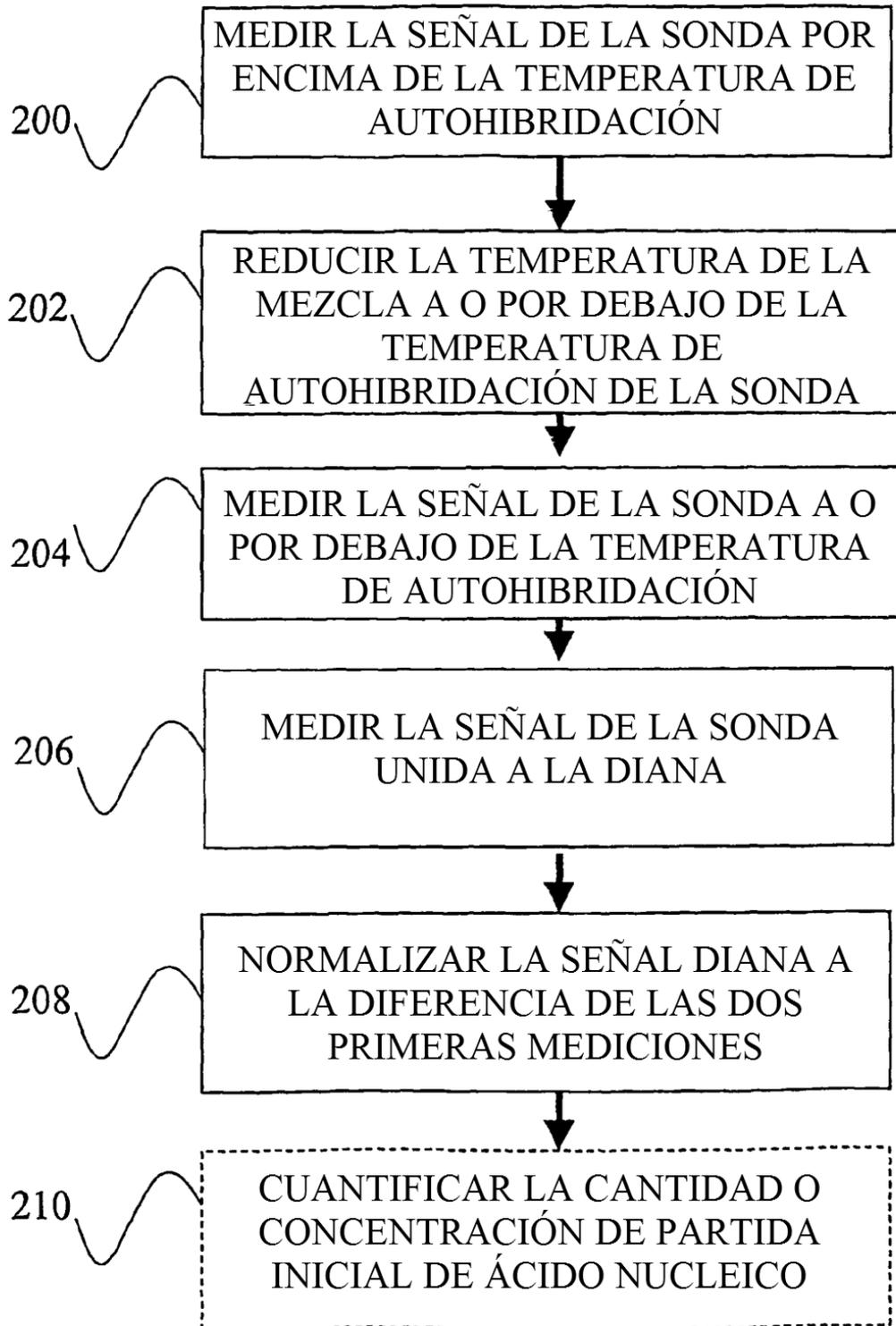


FIGURE 11

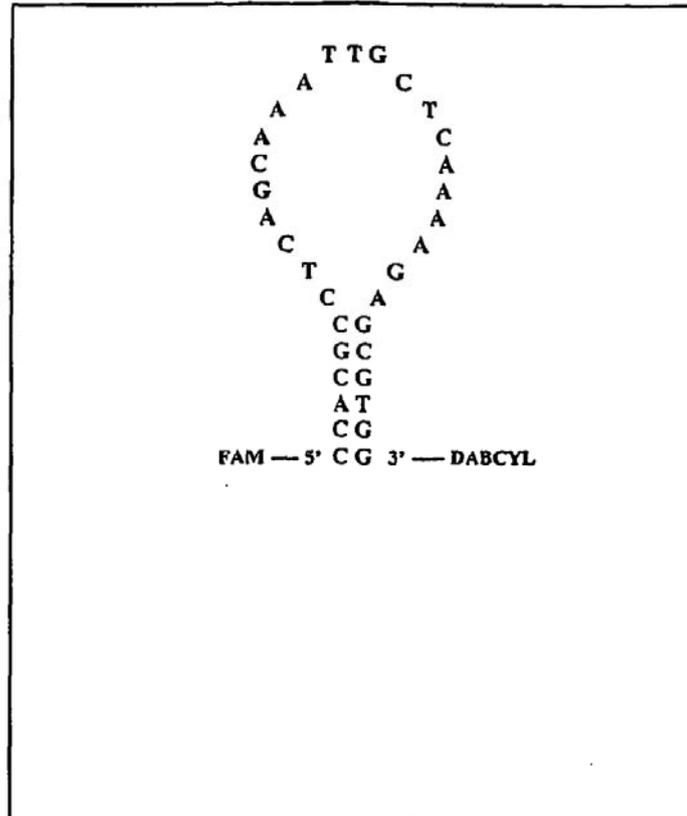


FIGURA 12

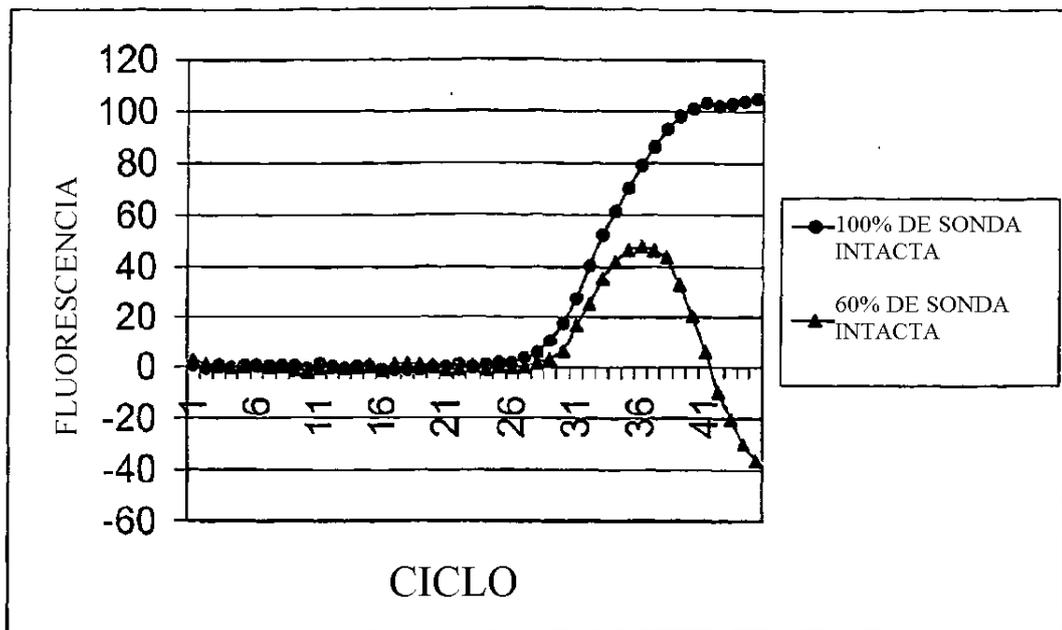


FIGURA 13

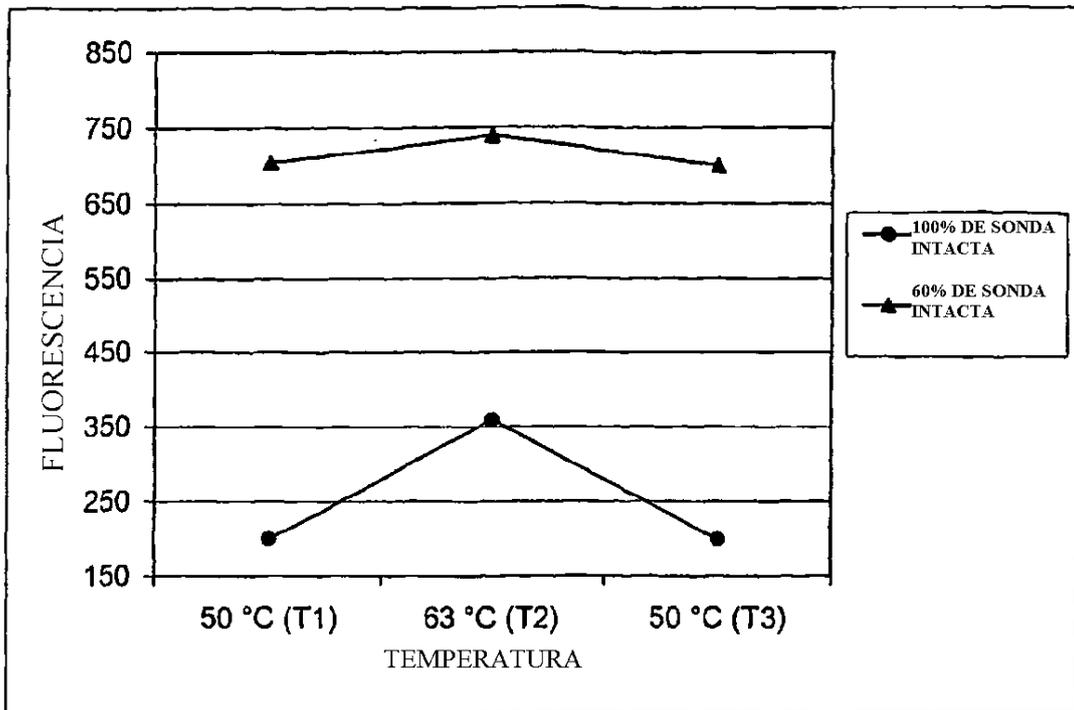


FIGURA 14

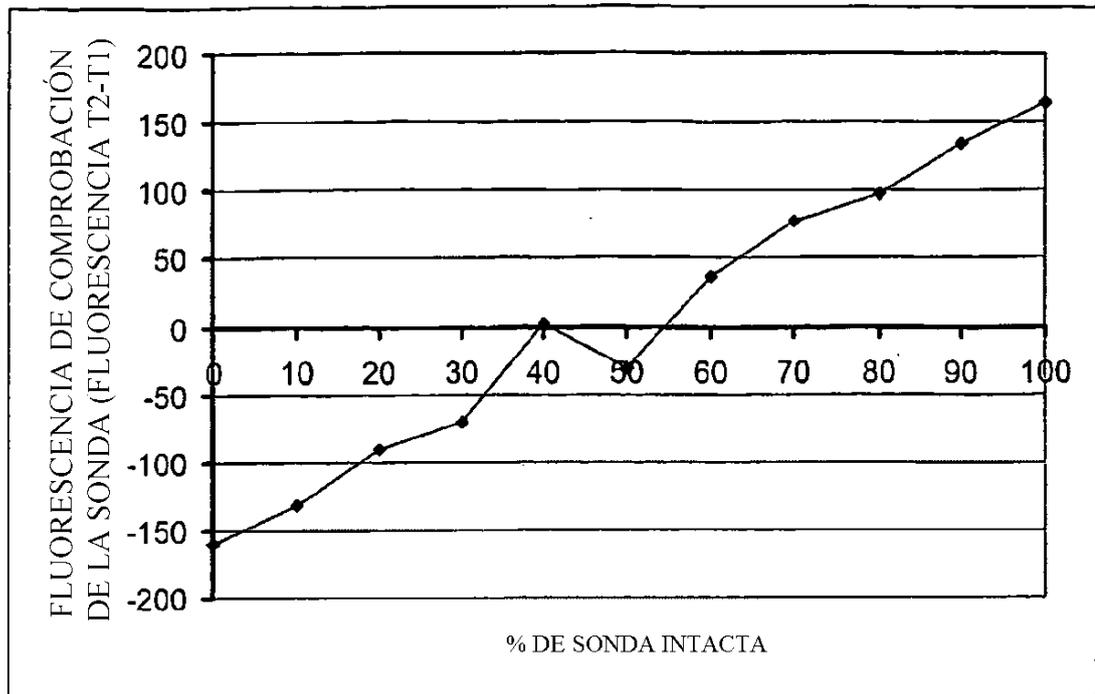


FIGURA 15

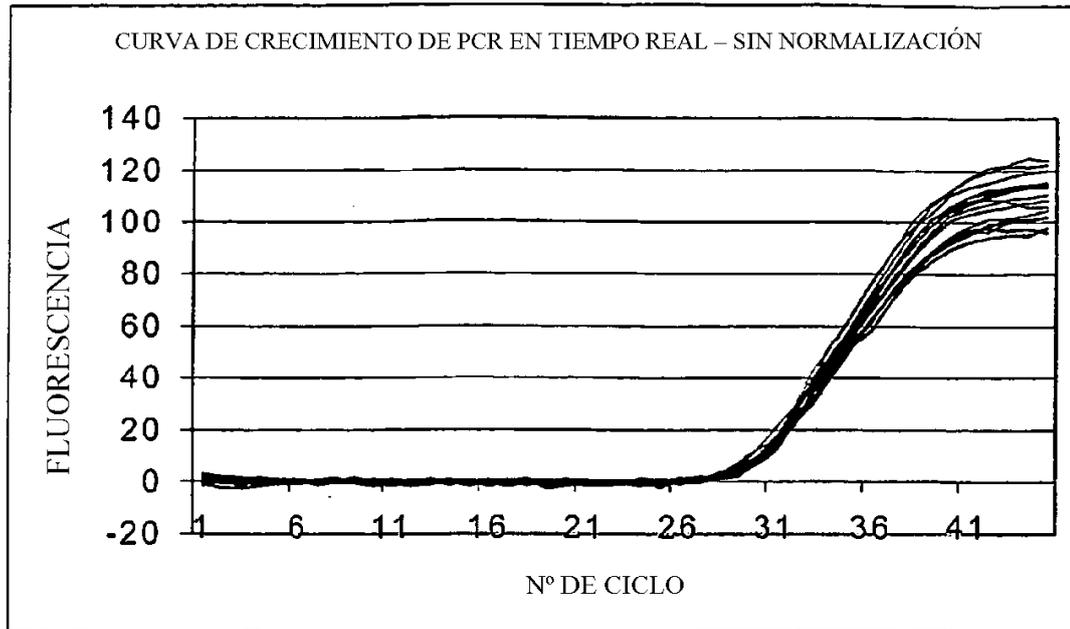


FIGURA 16

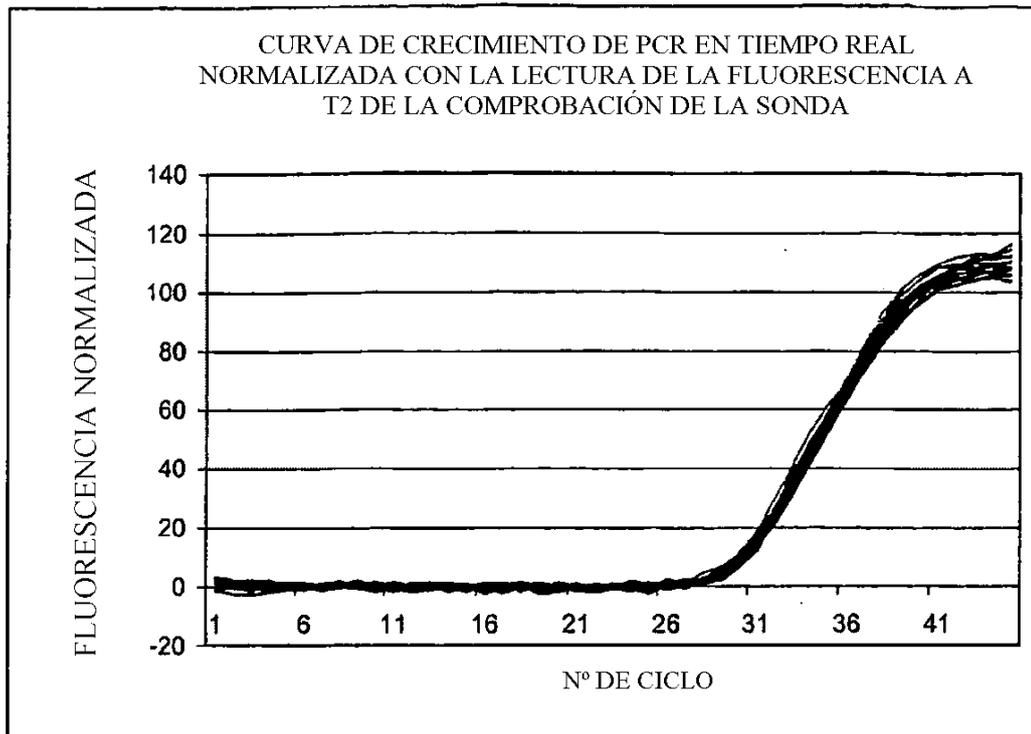


FIGURA 17

