



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 893**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **09168656 .8**

(96) Fecha de presentación : **28.06.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2128269**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

(54) Título: **Modificadores de la emisión lumínica y usos de los mismos en la detección, amplificación y análisis de ácidos nucleicos.**

(30) Prioridad: **30.06.2005 US 695991 P**

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.10.2011

(72) Inventor/es: **Gupta, Amar P. y**
Will, Stephen Gordon

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.10.2011

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Modificadores de la emisión lumínica y usos de los mismos en la detección, amplificación y análisis de ácidos nucleicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la biología molecular y de la química de los ácidos nucleicos. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos y reactivos para modificar la emisión de luz a partir de ácidos nucleicos marcados, con el fin de llevar a cabo la detección, análisis y cuantificación homogéneas en tiempo real de secuencias de ácidos nucleicos utilizando sondas de marcaje único. Además, también se describe la utilización de dichos modificadores de la emisión lumínica en la reducción del fondo y en otros usos.

Antecedentes de la invención

El desarrollo de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) ha revolucionado la ciencia del análisis e ingeniería genéticas. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza comúnmente para amplificar ácidos nucleicos diana específicos utilizando ácidos nucleicos cebadores seleccionados, por ejemplo para facilitar la detección del ácido nucleico diana como parte de una aplicación diagnóstica, forense u otra aplicación. Los cebadores típicamente funcionan en parejas que se diseñan para la extensión de una hacia la otra para cubrir la región diana seleccionada. Un ciclo de PCR típico incluye una etapa de desnaturalización a temperatura elevada (por ejemplo 85°C o más) durante la que las cadenas de los ácidos nucleicos de doble cadena se separan, una etapa de hibridación a baja temperatura (por ejemplo 45°C a 65°C) durante la que los cebadores se hibridan con las cadenas individuales separadas, y una etapa de extensión a temperatura intermedia (por ejemplo aproximadamente 72°C), durante la que una ácido-nucleico polimerasa extiende los cebadores. También se utilizan procedimientos de termociclado a dos temperaturas. Estos procedimientos generalmente incluyen una etapa de desnaturalización a temperatura elevada y una etapa de hibridación-extensión a temperatura reducida. Para producir una cantidad detectable del producto de PCR o amplicón particular, estos ciclos generalmente se repiten entre aproximadamente 25 y 45 veces.

También se describen PCRs en muchas patentes US diferentes, incluyendo, por ejemplo, la patente US nº 4.683.195, patente US nº 4.683.202 y la patente US nº 4.965.188. Además también se describen técnicas de tipo PCR en diversas otras publicaciones, tales como Innis *et al.* (editores), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Elsevier Science & Technology Books, 1990; Innis *et al.* (editores), PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press, 1999; Edwards *et al.*, Real Time PCR, Taylor & Francis, Inc., 2004, y Rapley *et al.*, Molecular Analysis and Genome Discovery, John Wiley & Sons, Inc., 2004.

También se han desarrollado muchas variaciones de la técnica PCR, así como otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Entre los ejemplos de ellas se incluyen la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) (Joyce, 2002, "Quantitative RT-PCR. A review of current methodologies", Methods Mol. Biol. 193:83-92, y Emrich *et al.*, 2002, "Quantitative detection of telomerase componentes by real-time, online RT-PCR analysis with the LightCycler", Methods Mol. Biol. 191:99-108), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Lee, 1996, "Ligase chain reaction", Biologicals 24(3):197-9), la reacción en cadena de la polimerasa/ligasa (Barany *et al.*, 1991, "The ligase chain reaction in a PCR world", PCR Methods Appl. 1(1):5-16), la Gap-LCR (Abravaya *et al.*, 1995, "Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)", Nucleic Acids Res. 23(4):675-82), la amplificación por desplazamiento de cadena (Walker, 1993, "Empirical aspects of strand displacement amplification", PCR Methods Appl. 3(1):1-6), la amplificación lineal ligada (LLA) (Killeen *et al.*, 2003, "Linked linear amplification for simultaneous analysis of the two most common hemochromatosis mutations", Clin. Chem. 49(7):1050-7), amplificación por círculo rodante (RCA) (Nilsson *et al.*, 2002, "Real-time monitoring of rolling-circle amplification using a modified molecular beacon design", Nucleic Acids Res. 30(14):e66), la amplificación mediada por transcripción (TMA) (Emery *et al.*, 2000, "Evaluation of performance of the Gen-Probe human immunodeficiency virus type 1 viral load assay using primary subtype A, C, and D isolates from Kenya", J. Clin. Microbiol. 38:2688-2695), la amplificación basada en una secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) (Mani *et al.*, 1999, "Plasma RNA viral load as measured by the branched DNA and nucleic acid sequence-based amplification assays of HIV-1", J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 22:208-209, y Berndt *et al.*, 2000, "Comparison between a nucleic acid sequence-based amplification and branched DNA test for quantifying HIV RNA load in blood plasma", J. Virol. Methods 89:177-181), y replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Mueller *et al.*, 1997, "Self-sustained sequence replication (3SR): an alternative to PCR", Histochem. Cell Biol. 108:431-7).

Se han desarrollado diversas estrategias para detectar productos de amplificación, incluyendo aquellas que implican sondas 5'-nucleasa, balizas moleculares o cebadores SCORPION®, entre muchos otros. A título ilustrativo, una ensayo de 5'-nucleasa típicamente utiliza la actividad nucleasa 5' a 3' de determinadas ADN polimerasas para cortar las sondas 5'-nucleasa durante el curso de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos ensayos permiten tanto amplificar una diana como liberar marcajes para la detección, generalmente sin recurrir a múltiples etapas de manipulación de los productos amplificados. Algunas sondas 5'-nucleasa incluyen grupos de marcaje, tales como un pigmento informador fluorescente y un pigmento receptor. En el caso de que la sonda se encuentre intacta, la proximidad del pigmento informador al pigmento receptor generalmente resulta en la supresión de la fluorescencia

del informador. Sin embargo, en muchos casos una sonda intacta produce una determinada cantidad de fluorescencia residual o de línea base. Durante una reacción de 5'-nucleasa, el corte de la sonda separa el pigmento informador del pigmento receptor, resultando en un incremento detectable de fluorescencia procedente del informador. La acumulación de productos de PCR o de amplicones típicamente se detecta indirectamente mediante el seguimiento de este incremento de fluorescencia en tiempo real.

Aunque muchos formatos preexistentes de detección de amplificación de ácidos nucleicos son simples y robustos, siguen existiendo algunos problemas. Por ejemplo, muchos de dichos formatos de detección utilizan sondas con marcaje doble (por ejemplo una sonda que incluye grupos donantes y aceptores). La fabricación de estas sondas de marcaje doble generalmente implica procedimientos de síntesis, purificación y control de la calidad que son complejos, laboriosos y caros. Además, la fluorescencia de línea base de las sondas de marcaje doble típicamente debe encontrarse comprendida en un intervalo determinado de rendimiento óptimo. Además, determinadas sondas de marcaje doble pueden adolecer de inestabilidad, resultando en la deriva de la línea base, lo que impacta negativamente sobre el tiempo de almacenamiento. Además, la inserción de un marcaje interno típicamente conduce, tras la hibridación, a la desestabilización del dúplex, que generalmente es necesario compensar.

Todos los problemas anteriormente indicados pueden evitarse utilizando sondas de marcaje único no desactivadas para detectar los productos de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se ha descrito la utilización de bromuro de etidio y de algunos otros pigmentos ligantes de ADN para desactivar la fluorescencia de los oligonucleótidos de una manera dependiente de la longitud de secuencia. La patente EP nº 0 699 768 da a conocer métodos para la detección de una sonda oligonucleótida que se marca con un marcaje emisor de luz que contiene una secuencia que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana en presencia de un compuesto ligante de ADN (es decir, bromuro de etidio, naranja de acridina y agentes ligantes de ADN no intercalantes, tales como verde malaquita). La patente WO nº 99/28500 se refiere a un método para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra, en la que un agente ligante de dúplex de ADN (es decir SYBR verde 1) no capaz de unirse a ácidos nucleicos monocatenarios se añade a la muestra con el fin de absorber energía fluorescente de una sonda o de donar energía fluorescente a una sonda, comprendiendo la sonda una molécula reactiva. Sin embargo, estos pigmentos generalmente no pueden utilizarse para la detección en tiempo real, por ejemplo debido a su reducida afinidad de unión al ADN a temperaturas más altas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, existe una necesidad de aditivos de mezcla de reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que presenten la capacidad de unirse y de desactivar sondas de marcaje único a las temperaturas más altas utilizadas típicamente para la detección en tiempo real.

Además, la detección multiplex de la amplificación de ácidos nucleicos utilizando sondas 5'-nucleasa, balizas moleculares o sondas FRET, entre otros métodos de detección, típicamente incluye el agrupado de sondas fluorescentes desactivadas o no desactivadas, por ejemplo para mejorar el rendimiento del ensayo comparado con protocolos que utilizan sondas únicas en una reacción dada. A título ilustrativo, se utilizan comúnmente ensayos multiplex para detectar múltiples marcadores genotípicos o patógenos en muestras obtenidas de pacientes como parte de procedimientos diagnósticos. En estos formatos la línea base global o fluorescencia de fondo procedente de las sondas agrupadas se incrementa aditivamente a medida que se incrementa el número de sondas en la mezcla de reacción. Esta fluorescencia de línea base también se incrementa en esencialmente cualquier sistema de ensayo al incrementar la cantidad de una única sonda. La fluorescencia de línea base generalmente afecta adversamente al rendimiento de un ensayo dado debido a que, por ejemplo, reduce la sensibilidad de detección y el rango dinámico del ensayo. Por consiguiente, la fluorescencia de línea base limita efectivamente el número total de sondas fluorescentes y/o la cantidad de una sonda dada que puede añadirse a un ensayo particular.

Aunque son conocidas de la técnica una amplia diversidad de estrategias de hibridación y amplificación de ADN, siguen existiendo determinados problemas. Por ejemplo, los elevados niveles de divergencia de las secuencias (es decir la heterogeneidad de las secuencias) en los virus ARN/ADN, tales como VIH, VCH y VPH dificulta particularmente la estandarización de los métodos para la amplificación, genotipado y/o detección de ácidos nucleicos. Esta heterogeneidad de las secuencias víricas impide el desarrollo de ensayos que presentan una sensibilidad uniformemente elevada para todos los genotipos y subtipos víricos diferentes. Las diferencias de secuencias entre la diana experimental y los cebadores y/o sondas (por ejemplo las sondas para la detección y/o genotipado vírico) que resultan en no correspondencias del dúplex comprometen el rendimiento del ensayo y pueden resultar en resultados falsos negativos o en la clasificación errónea. La no detección de la multitud de genotípicos víricos relevantes puede presentar consecuencias negativas significativas, particularmente en aplicaciones tales como el cribado de muestras clínicas.

Los ensayos cuantitativos (por ejemplo los ensayos para evaluar la carga vírica) son todavía más vulnerables a la heterogeneidad de las secuencias de los analitos, debido a que las eficiencias de amplificación/detección más bajas podrían atribuirse falsamente a cantidades más bajas de diana presentes en una muestra (en ausencia de información definitiva del genotipo). Debido a que los ensayos basados en ácidos nucleicos dependen de la hibridación, las no correspondencias de cebador/sonda pueden reducir significativamente la exactitud de la cuantificación.

Con el fin de minimizar dichas diferencias, preferentemente se seleccionan los cebadores y sondas de entre regiones conservadas de los genomas víricos. Sin embargo, esto resulta cada vez más difícil en vista de dos factores principales: (i) muchos virus, por ejemplo el VIH y el virus de la influenza, muestran tasa rápida de mutagénesis y de evolución del genoma, e (ii) el número de genotipos y subtipos víricos conocidos continúa creciendo, mientras que los aislados nuevamente descubiertos continúa expandiendo el alcance de la diversidad genómica conocida. En algunos casos, la asignación de información de genotipo vírico resulta crítica para la estratificación del paciente y las decisiones de tratamiento terapéutico, debido a que se observan diferencias en la respuesta a la terapia según el genotipo vírico. En estos casos, resulta más deseable amplificar y detectar regiones relativamente menos conservadas del genoma vírico para diferenciar adecuadamente entre los diversos genotipos.

Las no correspondencias de cebador/sonda pueden superarse en cierto grado incluyendo una multiplicidad de cebadores y sondas específicas de un genotipo, o alternativamente, incorporando análogos de bases que incrementen la estabilidad de los dúplex ADN-ADN o ARN-ARN. Sin embargo, estas soluciones resultan de utilidad limitada y incrementan drásticamente la complejidad y costes del ensayo. Aunque la secuenciación proporciona la resolución más alta en la asignación de genotipo, su aplicación en un contexto clínico de alto rendimiento sigue siendo inviable.

Tal como se ha ilustrado anteriormente, existe una necesidad en la técnica de métodos mejorados para el análisis de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, existe una necesidad en la técnica de métodos mejorados para la detección, identificación, amplificación, caracterización y cuantificación (por ejemplo determinación de la T_m) de los ácidos nucleicos, especialmente en el caso de que la heterogeneidad de las secuencias y las no correspondencias de los dúplex puedan interferir con los métodos utilizados en la actualidad. En el comentario anteriormente proporcionado, los retos del análisis de ácidos nucleicos se ilustran en el contexto de la amplificación, detección y genotipado de dianas víricas. Sin embargo, estos retos no son exclusivos de las dianas víricas, y en efecto resultan relevantes en una amplia diversidad de aplicaciones de análisis de ácidos nucleicos, tales como el ensayo de patógenos microbianos, el ensayo genético y los ensayos ambientales.

Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona métodos para modular la emisión de luz (por ejemplo emisiones de luz de línea base) a partir de ácidos nucleicos marcados, incluyendo sondas 5'-nucleasa. Por ejemplo, determinadas modificaciones de la emisión de luz descritas en la presente invención reducen las emisiones lumínicas de sondas marcadas en solución a temperaturas elevadas y bajo otras condiciones de reacción utilizadas típicamente para la detección en tiempo real. Además, al contrario que otros diversos desactivadores en solución, los modificadores de emisión de luz de la invención no resultan perjudiciales para el rendimiento de las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y conservan suficiente afinidad de unión de ácidos nucleicos a las temperaturas elevadas comúnmente utilizadas en estas reacciones, de manera que puede llevarse a cabo la detección en tiempo real. Entre los enfoques de detección en tiempo real indicados en la presente invención se incluyen la utilización de sondas de marcaje único, sondas de marcaje múltiple o ambos de tipos de sonda conjuntamente en una mezcla de reacción dada. Además de mezclas de reacción y métodos para modificar las emisiones lumínicas a partir de sondas marcadas, también se proporcionan kits y sistemas relacionados.

En un aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción que incluye por lo menos un oligonucleótido marcado. El oligonucleótido (por ejemplo un oligonucleótido monocatenario, etc.) se marca con por lo menos un grupo emisor de luz (por ejemplo un pigmento fluorescente o similar). La mezcla de reacción también incluye por lo menos un modificador soluble de la emisión lumínica que modifica (por ejemplo reduce, etc.) una emisión lumínica procedente del oligonucleótido marcado. En algunas formas de realización, el oligonucleótido marcado comprende una sonda 5'-nucleasa.

En otro aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción que incluye por lo menos un oligonucleótido que comprende por lo menos dos grupos de marcaje, en el que por lo menos uno de los grupos de marcaje es emisor de luz. En algunas realizaciones, por ejemplo, el oligonucleótido comprende una sonda 5'-nucleasa. La mezcla de reacción también incluye por lo menos un modificador de la emisión lumínica (por ejemplo un modificador soluble de la emisión lumínica, etc.) que modifica una emisión lumínica de línea base procedente del oligonucleótido a una temperatura de por lo menos aproximadamente 40°C. En determinadas realizaciones, el modificador de la emisión lumínica reduce la emisión de línea base de luz procedente del oligonucleótido.

En otro aspecto, la invención se refiere a una mezcla de reacción que incluye por lo menos un oligonucleótido (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa, etc.) que comprende por lo menos dos grupos de marcaje en los que por lo menos uno de los grupos de marcaje es emisor de luz. Esta mezcla de reacción también incluye por lo menos un pigmento diazina y/o tiazina soluble que reduce la emisión lumínica de línea base del oligonucleótido. Típicamente el pigmento diazina y/o tiazina reduce la emisión lumínica de línea base del oligonucleótido a una temperatura de por lo menos aproximadamente 40°C.

En algunas realizaciones, las mezclas de reacción indicadas en la presente memoria comprenden una pluralidad de oligonucleótidos que se utilizan, por ejemplo, como parte de una reacción 5'-nucleasa multiplex o en otra aplicación.

En estas realizaciones, por lo menos uno de los oligonucleótidos generalmente comprende por lo menos un grupo de marcaje que difiere del grupo de marcaje de otro oligonucleótido. Típicamente los diferentes grupos de marcaje comprenden diferentes grupos de marcaje emisores de luz (por ejemplo diferentes pigmentos fluorescentes, etc.) y el modificador de la emisión lumínica (por ejemplo un pigmento diazina, un pigmento tiazina y/o similar) modifica (por ejemplo reduce) las emisiones de línea base de luz desde cada uno de los oligonucleótidos. En algunas realizaciones las mezclas de reacción de la invención se empaquetan en kits.

Las mezclas de reacción indicadas en la presente memoria opcionalmente incluyen diversos otros componentes. En algunas realizaciones, por ejemplo, las mezclas de reacción incluyen componentes que resultan útiles para llevar a cabo ensayos de amplificación/detección de ácidos nucleicos, tal como uno o más de entre: un tampón, una sal, un ión metálico, un nucleótido que incorpora biocatalizador que presenta una actividad nucleasa 5' a 3' (por ejemplo una ADN polimerasa Taq, etc.), una pirofosfatasa, un cebador ácido nucleico, un ácido nucleico de molde, un amplicón, un nucleótido, glicerol, dimetilsulfóxido, poli-rA (u otro ácido nucleico portador) o similar. Las mezclas de reacción y otros aspectos relacionados de la invención típicamente carecen sustancialmente de bromuro de etidio.

En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra. El método incluye: (a) proporcionar por lo menos un oligonucleótido marcado (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa, etc.). El oligonucleótido se marca con por lo menos un grupo emisor de luz. Además, por lo menos una subsecuencia del oligonucleótido marcado es suficientemente complementaria respecto de por lo menos una subsecuencia de por lo menos un ácido nucleico diana y/o respecto de por lo menos una subsecuencia de un amplicón del ácido nucleico diana para que el oligonucleótido marcado se hibride con el ácido nucleico diana y/o con el amplicón del ácido nucleico diana bajo por lo menos una condición seleccionada (por ejemplo una temperatura de hibridación, una temperatura de extensión y/o similar). El método también incluye: (b) proporcionar por lo menos un modificador soluble de la emisión lumínica que modifica en mayor grado una emisión lumínica del oligonucleótido marcado que de un fragmento marcado del oligonucleótido. Además, el método incluye: (c) amplificar el ácido nucleico en la muestra en presencia del oligonucleótido marcado y del modificador soluble de la emisión lumínica en una reacción de amplificación que comprende la condición seleccionada, de manera que el oligonucleótido marcado, hibridado con el ácido nucleico diana o con el amplicón del ácido nucleico diana, se corte produciendo por lo menos un fragmento oligonucleótido marcado. El método incluye además: (d) detectar la emisión lumínica procedente por lo menos del fragmento oligonucleótido marcado durante (c), por ejemplo, como parte de un procedimiento de monitorización en tiempo real.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para modificar una emisión de línea base de luz procedente de un oligonucleótido marcado. El método incluye: (a) proporcionar por lo menos un oligonucleótido que comprende por lo menos dos grupos de marcaje, en el que por lo menos uno de los grupos de marcaje es emisor de luz. El método también incluye: (b) poner en contacto el oligonucleótido con por lo menos un modificador de la emisión lumínica (por ejemplo un pigmento diazina, un pigmento tiazina, y similar) que modifica una emisión lumínica de línea base procedente del oligonucleótido a una temperatura de por lo menos aproximadamente 40°C (por ejemplo bajo condiciones de detección en tiempo real, etc.). En determinadas realizaciones, (b) comprende poner en contacto el oligonucleótido y el modificador de la emisión lumínica en solución. Típicamente, el método también incluye detectar la emisión lumínica del oligonucleótido marcado antes, durante y/o después de (b).

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir una emisión lumínica de línea base procedente de un oligonucleótido marcado. El método incluye: (a) proporcionar por lo menos un oligonucleótido que comprende por lo menos dos grupos de marcaje en los que por lo menos uno de los grupos de marcaje es emisor de luz. El método incluye además: (b) poner en contacto el oligonucleótido con por lo menos un pigmento diazina y/o pigmento tiazina, reduciendo de esta manera la emisión de línea base de luz del oligonucleótido marcado. En algunas realizaciones el oligonucleótido y el pigmento diazina y/o el pigmento tiazina se ponen en contacto a una temperatura de por lo menos aproximadamente 40°C. Típicamente, (b) incluye poner en contacto el oligonucleótido y el pigmento diazina y/o el pigmento tiazina en solución. Además, el método incluye generalmente detectar la emisión lumínica del oligonucleótido marcado antes, durante y/o después de (b).

En determinadas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, los métodos comprenden amplificar por lo menos un ácido nucleico diana. Típicamente, por lo menos una subsecuencia del oligonucleótido es suficientemente complementaria respecto de por lo menos una subsecuencia del ácido nucleico diana y/o respecto de por lo menos una subsecuencia de un amplicón del ácido nucleico diana para que el oligonucleótido se hibride con el ácido nucleico diana y/o con el amplicón del ácido nucleico diana. En algunas de las realizaciones, por ejemplo, el oligonucleótido comprende una sonda 5'-nucleasa y el método comprende amplificar el ácido nucleico diana bajo condiciones en las que la sonda 5'-nucleasa resulta cortada. En estas realizaciones, el método generalmente incluye detectar el corte de la sonda 5'-nucleasa. El ácido nucleico diana típicamente se correlaciona con un diagnóstico de por lo menos un trastorno genético y/o por lo menos un estado de enfermedad de un sujeto, que comprende una copia del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones múltiplex de los métodos descritos en la presente memoria, los métodos incluyen poner en contacto una pluralidad de oligonucleótidos con el modificador de la emisión lumínica (por ejemplo un pigmento

diazina, un pigmento tiazina y/o similar). En estas realizaciones, por lo menos uno de los oligonucleótidos típicamente comprende por lo menos un grupo de marcaje que difiere de un grupo de marcaje de otro oligonucleótido. Los diferentes grupos de marcaje generalmente comprenden diferentes grupos de marcaje emisores de luz y el modificador de la emisión lumínica modifica (por ejemplo reduce) las emisiones de línea base de luz de cada uno de los oligonucleótidos.

A título ilustrativo adicional, algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria comprenden poner en contacto uno o más oligonucleótidos de marcaje único (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa, etc.) con el modificador de la emisión lumínica (por ejemplo un pigmento diazina, un pigmento tiazina y/o similar). Típicamente un grupo de marcaje de por lo menos uno de los oligonucleótidos de marcaje único es emisor de luz y el modificador de la emisión lumínica modifica (por ejemplo reduce) una emisión lumínica del oligonucleótido con un único marcaje emisor de luz.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit que incluye: (a) por lo menos un modificador de la emisión lumínica (por ejemplo uno o más pigmentos seleccionados de entre un pigmento diazina, un pigmento tiazina, y similares) que modifica las emisiones lumínicas de línea base procedentes de los oligonucleótidos marcados a una temperatura de por lo menos aproximadamente 40°C. El kit también incluye: (b) instrucciones para modificar una emisión lumínica (por ejemplo una emisión lumínica de línea base, etc.) procedente de por lo menos un oligonucleótido que comprende por lo menos un grupo de marcaje emisor de luz con el modificador de la emisión lumínica. Generalmente, el kit incluye por lo menos un recipiente para el empaquetamiento del modificador de la emisión lumínica y/o las instrucciones.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un kit que incluye: (a) por lo menos un pigmento diazina y/o un pigmento tiazina. El kit también incluye: (b) instrucciones para reducir una emisión lumínica de por lo menos un oligonucleótido que comprende por lo menos un grupo de marcaje emisor de luz con el pigmento diazina y/o el pigmento tiazina. El kit también incluye típicamente por lo menos un recipiente para empaquetar el pigmento diazina y/o el pigmento tiazina y/o las instrucciones.

En algunas realizaciones, los kits descritos en la presente memoria también incluyen diversos otros componentes. Con fines ilustrativos, estos kits opcionalmente incluyen por lo menos un ácido nucleico cebador que es por lo menos parcialmente complementario respecto de por lo menos una subsecuencia de un ácido nucleico diana. En determinadas realizaciones, los kits incluyen el oligonucleótido. Opcionalmente, el oligonucleótido comprende una sonda 5'-nucleasa. En algunas realizaciones los kits incluyen por lo menos un oligonucleótido de marcaje único que comprende un grupo de marcaje emisor de luz. Por ejemplo, el oligonucleótido de marcaje único opcionalmente comprende un ácido nucleico cebador que es por lo menos parcialmente complementario respecto de por lo menos una subsecuencia de por lo menos un ácido nucleico diana. En las realizaciones de dichos kits que incluyen ácidos nucleicos cebadores, los kits también incluyen típicamente instrucciones para amplificar uno o más segmentos del ácido nucleico diana con el ácido nucleico cebador, incorporando por lo menos un nucleótido un biocatalizador que presenta una actividad nucleasa 5' a 3' y uno o más nucleótidos. En estas realizaciones, los kits también incluyen generalmente por lo menos un nucleótido que incorpora biocatalizador que presenta una actividad nucleasa 5' a 3' y/o uno o más nucleótidos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema que incluye: (a) por lo menos un oligonucleótido (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa, etc.) que comprende por lo menos un grupo de marcaje emisor de luz. El sistema también incluye: (b) por lo menos un modificador de la emisión lumínica (por ejemplo por lo menos un pigmento diazina, un pigmento tiazina y/o similares) que modifica una emisión lumínica de línea base procedente del oligonucleótido a una temperatura de por lo menos aproximadamente 40°C. Además, el sistema también incluye: (c) por lo menos un detector que detecta la luz emitida por el oligonucleótido y/o por lo menos un fragmento del oligonucleótido.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un sistema que incluye: (a) por lo menos un oligonucleótido (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa, etc.) que comprende por lo menos un grupo de marcaje emisor de luz. Además, el sistema también incluye (b) por lo menos un pigmento soluble diazina y/o tiazina, y (c) por lo menos un detector que detecta la luz emitida por el oligonucleótido y/o por lo menos un fragmento del oligonucleótido.

En determinadas realizaciones los sistemas descritos en la presente memoria incluyen determinados otros componentes. Por ejemplo, los sistemas opcionalmente incluyen por lo menos un dispositivo lógico operablemente conectado al detector. El dispositivo lógico generalmente incluye uno o más grupos de instrucciones que escalan las emisiones lumínicas detectadas mutuamente. En algunas realizaciones de dichos sistemas, por lo menos un recipiente comprende el oligonucleótido y el modificador de la emisión lumínica (por ejemplo por lo menos un pigmento diazina, pigmento tiazina y/o similar). En estas realizaciones, los sistemas típicamente incluyen: (d) por lo menos un modulador térmico que se comunica térmicamente con el recipiente para modular la temperatura del recipiente, y/o (e) por lo menos un componente de transferencia de fluidos que transfiere fluido hacia y/o desde el recipiente. Generalmente el oligonucleótido y el grupo de marcaje emisor de luz se encuentran presentes en solución. En algunas realizaciones el recipiente también incluye componentes que pueden utilizarse para llevar a cabo diversos ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, tales como uno o más de entre, por

ejemplo, un tampón, una sal, un ión metálico, un nucleótido que incorpora un biocatalizador que presenta una actividad nucleasa 5' a 3', una pirofosfatasa, un ácido nucleico cebador, un ácido nucleico molde, un amplicón, un nucleótido, glicerol, dimetilsulfóxido, poli-rA o similar.

- 5 Los modificadores de la emisión lumínica utilizados en las mezclas de reacción, métodos, kits y sistemas descritos en la presente invención generalmente incluyen grupos desactivadores solubles. En algunas realizaciones, los modificadores de la emisión lumínica carecen sustancialmente de fluorescencia intrínseca, por lo menos bajo condiciones de detección de la emisión lumínica seleccionadas (por ejemplo a longitudes de onda de detección de 600 nm o inferiores, etc.). Típicamente, los modificadores de la emisión lumínica descritos en la presente invención se asocian (por ejemplo se intercalan, se unen o similar) a oligonucleótidos, tales como las sondas 5'-nucleasa indicadas en la presente memoria. En determinadas realizaciones, por ejemplo, un modificador de la emisión lumínica comprende uno o más pigmentos seleccionados de entre, por ejemplo, un pigmento diazina, un pigmento tiazina y similar. Entre los pigmentos diazina ejemplares se incluyen un pigmento azocarmina, un pigmento fenazina, un pigmento oxazina, cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina (es decir, verde Janus B) y similares. Entre los ejemplos de pigmentos tiazina adecuados se incluyen azul de metileno, verde de metileno, tionina, azul de 1,9-dimetilmetileno, dimetiltionina-sim, azul de toluidina O nuevo azul de metileno, violeta de metileno bernthsen, azur A, azur B, azur C y similar.

- 20 La invención proporciona una diversidad de composiciones y métodos que encuentran utilidad en la detección, amplificación y análisis de ácidos nucleicos. Más específicamente, estos métodos utilizan propiedades ventajosas y previamente no identificadas de los pigmentos tiazina y diazina.

- En algunas realizaciones, los métodos de la invención aprovechan la capacidad previamente no identificada de los pigmentos tiazina de estabilizar los ácidos nucleicos dúplex. Este método resulta ampliamente aplicable a cualquier manipulación de ácidos nucleicos que utiliza moléculas dúplex de ácidos nucleicos y/o metodologías de hibridación. Esencialmente, los métodos para producir un dúplex estabilizado de ácidos nucleicos utilizan las etapas siguientes: (a) proporcionar una muestra que contiene, o que se sospecha que contiene, una molécula diana de ácidos nucleicos; un oligonucleótido complementario o parcialmente complementario a la molécula diana de ácidos nucleicos, y por lo menos un pigmento tiazina presente a una concentración efectiva para estabilizar un dúplex formado entre la molécula diana de ácidos nucleicos y el oligonucleótido, y (b) alternativamente, (i) hibridar el ácido nucleico diana y el oligonucleótido en presencia del pigmento tiazina, o (ii) hibridar el ácido nucleico diana y el oligonucleótido, seguido de la mezcla con el pigmento tiazina bajo condiciones en las que puede formarse un dúplex, produciendo por lo menos un dúplex estabilizado de ácidos nucleicos. En estos métodos, la estabilidad del dúplex de ácidos nucleicos de (b) se mejora en comparación con la estabilidad del mismo dúplex de ácidos nucleicos que comprende el ácido nucleico diana y el oligonucleótido en ausencia del pigmento tiazina o con una concentración reducida del pigmento tiazina. Estos métodos opcionalmente incluyen la demostración de la estabilidad de los ácidos nucleicos dúplex en presencia y en ausencia o con una concentración reducida del pigmento tiazina, que puede conseguirse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo incluyendo (i) un análisis de la temperatura de disociación (T_m), (ii) una determinación de CT, o (iii) un ensayo de 5'-nucleasa. En algunos aspectos los métodos opcionalmente incluyen detectar el ácido nucleico dúplex estabilizado bajo condiciones que proporcionan una estabilidad mejorada.

- No se pretende que el tipo, naturaleza, configuración, estructura o secuencia del dúplex que se estabiliza se encuentren limitados en ningún aspecto. Por ejemplo, en dichos métodos, el dúplex estabilizado de ácidos nucleicos puede comprender una o más, dos o más, o tres o más apareamientos incorrectos de nucleobases. Los dúplex de correspondencia perfecta también pueden estabilizarse. En algunos aspectos, el oligonucleótido en el dúplex estabilizado resulta efectivo para cebar una reacción de extensión de ácidos nucleicos al encontrarse hibridado con el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, las reacciones de hibridación forman parte de una reacción de amplificación por PCR, en la que se utiliza una pareja de oligonucleótidos en la hibridación con la molécula diana de ácidos nucleicos, en la que cada uno de los cebadores oligonucleótidos resulta efectivo para cebar una reacción de extensión de ácidos nucleicos al encontrarse hibridado al ácido nucleico diana. En algunos aspectos, la reacción de hibridación incluye una sonda oligonucleótida marcada que es complementaria, o parcialmente complementaria, a la molécula diana de ácidos nucleicos. En algunos aspectos, la molécula diana de ácidos nucleicos es un amplicón.

- 55 Los ácidos nucleicos utilizados en los métodos de la invención no se encuentran limitados a las estructuras oligoméricas naturales o a bases naturales. Por ejemplo, una o más de las moléculas en el dúplex puede comprender uno o más nucleótidos naturales, nucleótidos modificados, análogos de nucleótido, una o más bases no naturales, enlaces internucleótido no naturales, esqueletos de nucleótidos no naturales, o cualquier combinación de los mismos.

- 60 Típicamente, en los métodos para estabilizar dúplex de ácidos nucleicos, el complejo estabilizado de hibridación es un complejo de hibridación intermolecular, en el que las cadenas hibridantes antiparalelas son dos moléculas separadas de ácidos nucleicos. Sin embargo, en algunas adaptaciones de los métodos para estabilizar ácidos nucleicos dúplex, el complejo estabilizado de hibridación es un complejo de hibridación intramolecular, en el que las

cadena hibridantes antiparalelas de hecho se encuentran en una única molécula de ácidos nucleicos, como es el caso de una configuración molecular de tipo baliza.

Un requisito de dichos métodos para la estabilización de dúplex es la presencia de un pigmento tiazina. Puede utilizarse cualquier pigmento tiazina, por ejemplo, aunque sin limitarse a ellos, azul de metileno, verde de metileno, tionina, dimetiltionina-sim, azul de toluidina O, azul de metileno nuevo, violeta de metileno Bernthsen, azur A, azur B, azur C y azul de 1,9-dimetilmetileno. La concentración del pigmento que se utiliza para mejorar la estabilidad del dúplex no se encuentra particularmente limitada. En algunos aspectos, se encuentra presente por lo menos un pigmento tiazina a una concentración de por lo menos 10 µg/ml. En algunos aspectos, la hibridación comprende la hibridación en presencia de un pigmento tiazina a una concentración comprendida entre aproximadamente 10 µg/ml y 50 µg/ml, o alternativamente, a una concentración comprendida entre aproximadamente 20 µg/ml y 40 µg/ml. En algunas realizaciones, el pigmento tiazina se utiliza a una concentración de aproximadamente 40 µg/ml.

En algunas realizaciones, la invención proporciona kits para la ejecución de los métodos de estabilización de ácidos nucleicos dúplex. Estos kits pueden contener cualquier reactivo u otros componentes que resultan necesarios o que simplifican cualquiera de los métodos de estabilización de dúplex. En algunos aspectos, estos kits pueden contener un oligonucleótido complementario o parcialmente complementario a una molécula de ácidos nucleicos diana de interés, y por lo menos un pigmento tiazina presente a una concentración efectiva para estabilizar un dúplex formado entre la molécula diana de ácidos nucleicos y el oligonucleótido. Los kits de la invención pueden incluir instrucciones para el usuario del kit, y también pueden incluir uno o más recipientes para alojar la totalidad o cualquier subconjunto de componentes del kit.

En algunos aspectos, la invención proporciona sistemas integrados para la ejecución de los métodos para estabilizar ácidos nucleicos dúplex. Los sistemas pueden incluir instrumentación y medios para interpretar y analizar datos recogidos, especialmente en los que los datos recogidos se someten a análisis posterior utilizando algoritmos y/o información almacenada electrónicamente (por ejemplo el análisis de datos de fluorescencia recogidos, etc.). Cada parte de un sistema integrado se encuentra funcionalmente interconectada, y en algunos casos, físicamente conectada. En algunas realizaciones, el sistema integrado es automático, en el que no hay necesidad de ninguna manipulación de la muestra ni de instrumentación por parte de un operador tras iniciar la puesta en práctica de los métodos. Un sistema de la invención puede incluir instrumentación. Por ejemplo, la invención puede incluir un detector, tal como un detector de fluorescencia (por ejemplo un espectrofotómetro de fluorescencia), y un dispositivo de ciclado térmico o termociclador. En algunas realizaciones, el dispositivo de ciclado térmico y el detector son un instrumento integrado, en el que el ciclado térmico y la detección de la emisión (por ejemplo la detección de la fluorescencia) se realizan en el mismo dispositivo. Un detector, por ejemplo un espectrofotómetro de fluorescencia, puede conectarse a un ordenador que controle los parámetros de funcionamiento del espectrofotómetro y/o de almacenamiento de los datos recogidos del detector. El ordenador también puede conectarse operativamente con el dispositivo de ciclado térmico para controlar la temperatura, temporización y/o tasa de cambio de la temperatura del sistema. El ordenador integrado también puede contener el "módulo de correlación", en el que se analizan los datos recogidos del detector. En algunas realizaciones, el módulo de correlación comprende un programa informático de cálculo.

En la presente invención se proporciona una diversidad de usos de los pigmentos tiazina y diazina como modificaciones solubles de la emisión lumínica. En un aspecto, los métodos de la invención aprovechan las propiedades previamente no identificadas de modificación de la emisión lumínica de los pigmentos tiazina y diazina mediante la utilización de los pigmentos como desactivadores solubles en una pareja de donante/desactivador. En las configuraciones FRET tradicionales, el grupo desactivador de FRET típicamente se integra en la misma molécula de ácidos nucleicos que el donante FRET, o alternativamente, se integra en una molécula separada de ácidos nucleicos. La invención proporciona métodos que son una simplificación de los métodos utilizados en la técnica, en donde la invención proporciona métodos en los que el grupo desactivador se sustituye por una molécula desactivadora soluble que puede ser un pigmento tiazina o diazina, o cualquier molécula estructuralmente relacionada con los mismos que conserve la propiedad requerida de desactivación de la emisión de luz. El abanico de usos de los pigmentos tiazina y diazina como desactivadores solubles no se encuentra limitado, y en efecto puede adaptarse para el uso en la mayoría de casos en los que se utiliza un grupo desactivador tradicional.

Por ejemplo, en algunos aspectos, la invención proporciona método para determinar la temperatura de disociación (T_m) de un complejo de hibridación, comprendiendo el método las etapas siguientes:

- (a) proporcionar (i) una sonda que comprende un grupo emisor de luz, (ii) una diana de hibridación que es complementaria o parcialmente complementaria a la sonda, e (iii) un modificador soluble de la emisión lumínica que comprende un pigmento tiazina o diazina, en donde el modificador soluble de la emisión lumínica es capaz de desactivar el grupo emisor de luz,
- (b) hibridar la sonda con la diana de hibridación bajo condiciones en las que puede producirse el apareamiento de bases, formando un complejo diana de hibridación,
- (c) alterar la temperatura del complejo diana de hibridación en presencia del modificador soluble de la emisión lumínica y medir una emisión del grupo emisor de luz,

(d) correlacionar la emisión medida del grupo emisor de luz con la presencia del complejo diana de hibridación como función de la temperatura, determinando de esta manera la T_m del complejo diana de hibridación basándose en la emisión medida.

En estos métodos de determinación de la T_m, el grupo emisor de luz puede ser un grupo donante, y el modificador de la emisión lumínica puede ser un desactivador. En estos métodos, la alteración de la temperatura puede ser incrementar la temperatura (curva de disociación) o reducir la temperatura (curva de hibridación). En algunos aspectos, se utiliza un intervalo de temperaturas en la etapa de medición, por ejemplo un intervalo de temperaturas de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 95°C.

En algunos aspectos, la diana de hibridación es un amplicón correspondiente a un ácido nucleico diana, en el que el amplicón típicamente se genera en una reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo en una amplificación por PCR asimétrica). En la mayoría de casos en los que se utiliza PCR, la amplificación por PCR utiliza una pareja de cebadores de amplificación específica de un ácido nucleico diana de interés, una ADN polimerasa ADN-dependiente termoestable, desoxirribonucleótidos trifosfato libres y un tampón de reacción de ADN polimerasa adecuado. En algunas realizaciones la generación del amplicón se realiza mediante transcripción inversa de un ácido nucleico ARN diana y amplificación mediante una reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).

Las dianas para el análisis de T_m no se encuentran limitadas en ningún aspecto. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un genoma vírico. El ácido nucleico diana opcionalmente puede proporcionarse en una muestra, que puede ser, por ejemplo, sangre, suero o plasma humanos.

Los métodos para la determinación de la T_m pueden contener por lo menos un desactivador soluble que puede ser un pigmento diazina o un pigmento tiazina; por ejemplo, aunque sin limitarse a ellos, azul de metileno, verde de metileno, tionina, dimetiltionina-sim, azul de toluidina O, azul de metileno nuevo, violeta de metileno bermthsen, azur A, azur B, azur C, azul de 1,9-dimetilmetileno, pigmento azocarmín, un pigmento fenazina, un pigmento oxazina y cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina.

Los ácidos nucleicos utilizados en los métodos de la invención para la determinación de la T_m no se encuentran limitados a las estructuras oligoméricas naturales o bases naturales. Por ejemplo, una o más de las moléculas en el dúplex puede comprender uno o más nucleótidos naturales, nucleótidos modificados, análogos de nucleótidos, una o más bases no naturales, enlaces internucleótido no naturales, esqueletos de nucleótidos no naturales o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones la invención proporciona kits para la ejecución de los métodos para la determinación de la T_m. Estos kits pueden contener cualquier reactivo que resulte necesario o que simplifique la utilización de los métodos para la determinación de la T_m. En algunos aspectos estos métodos pueden contener: (a) por lo menos una sonda que comprende un grupo emisor de luz, en donde la sonda es complementaria o parcialmente complementaria a una diana de hibridación de interés, (b) por lo menos un modificador soluble de la emisión lumínica que comprende un pigmento tiazina o diazina, en donde el modificador soluble de la emisión lumínica es capaz de desactivar el grupo emisor de luz, y (c) uno o más recipientes que comprenden la sonda, el modificador soluble de emisión lumínica, o tanto la sonda como el modificador de la emisión lumínica. En algunos aspectos el grupo emisor de luz es un grupo donante de FRET. En algunos aspectos, el modificador de la emisión lumínica es un desactivador de FRET. En algunas realizaciones, los kits también contienen instrucciones para determinar la T_m de un complejo de hibridación que comprende la sonda y la diana de hibridación.

Opcionalmente, los kits de la invención para la determinación de la T_m pueden incluir uno o más componentes adicionales seleccionados de entre una transcriptasa inversa, por lo menos un cebador adecuado para el inicio de la transcripción inversa a partir de un ARN diana, una ADN polimerasa ADN-dependiente termoestable y/o un enzima que presente actividades de polimerasa tanto ADN-dependientes como ARN-dependientes (es decir, una transcriptasa inversa), desoxirribonucleótidos trifosatos libres, muestras de estandarización, muestras de control positivo, muestras de control negativo, tampones adecuados para reacciones enzimáticas, tubos de recolección de muestras y tubos de reacción de amplificación.

En algunos aspectos la invención proporciona sistemas integrados para la ejecución de los métodos para la determinación de la T_m. Los sistemas pueden incluir instrumentación y medios para interpretar y analizar los datos recogidos, especialmente en el caso de que los datos recogidos se sometan a un análisis posterior utilizando algoritmos y/o información almacenada electrónicamente (por ejemplo los datos de fluorescencia recogidos se traducen para formar un valor de T_m). Cada parte de un sistema integrado se encuentra funcionalmente interconectado, y en algunos casos, físicamente conectado. Entre los sistemas de la invención para llevar a cabo la determinación de la T_m de un complejo de hibridación se incluyen:

(a) una muestra o mezcla de reacción que comprende: (i) una sonda de ácidos nucleicos que comprende un grupo emisor de luz que emite una señal, (ii) un ácido nucleico diana que es complementario, o parcialmente complementario, a la sonda de ácidos nucleicos, e (iii) un pigmento tiazina o diazina,

(b) un dispositivo de control térmico para regular la temperatura de la muestra o mezcla de reacción en un intervalo de temperaturas, en el que el rango incluye: (i) una temperatura a la que esencialmente todas las moléculas de sonda se hibridan con la diana de hibridación bajo un conjunto dado de condiciones de hibridación, (ii) una temperatura a la que el 50% de los complejos de hibridación diana se disocian bajo las condiciones de hibridación, e (iii) una temperatura a la que esencialmente no se hibrida ninguna molécula de sonda con la diana de hibridación y esencialmente no se encuentra ningún complejo de hibridación bajo las condiciones de hibridación,

(c) un detector para medir la señal procedente de la muestra en el intervalo de temperaturas, y

(d) un módulo de correlación que se acopla operablemente al detector y recibe mediciones de señal dentro del intervalo de temperaturas, en el que el módulo de correlación correlaciona la intensidad de la señal con la presencia de un complejo de hibridación que comprende la sonda y la diana de hibridación mezcladas con el pigmento tiazina o diazina como función de la temperatura, determinando de esta manera la T_m del complejo de hibridación diana.

En algunos aspectos, el grupo emisor de luz es un grupo donante de FRET.

Definiciones

Antes de describir en detalle la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se encuentra limitada a oligonucleótidos, métodos, composiciones, kits, sistemas, ordenadores o medios legibles por ordenador particulares, que pueden, evidentemente, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria presenta el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretender ser limitante. Además, a menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado entendido comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Durante la descripción y en las reivindicaciones de la presente invención, se utilizará la terminología y variantes gramaticales siguientes según las definiciones proporcionadas a continuación.

La expresión “**actividad 5' a 3' nucleasa**” se refiere a una actividad exonucleasa 5' a 3' asociada a algunos biocatalizadores que incorporan nucleótidos, tales como ácido-nucleico polimerasas, en las que se eliminan nucleótidos secuencialmente desde el extremo 5' de un oligonucleótido; una actividad 5' a 3' endonucleasa en la que el corte se produce a más de un enlace fosfodiéster (nucleótido) del extremo 5', o ambas actividades. Un sustrato ejemplar para el corte dependiente de 5' a 3' endonucleasa en un complejo de hibridación sonda-molde es un ácido nucleico monocatenario desplazado, una estructura de tipo horquilla, produciéndose la hidrólisis en el enlace fosfodiéster que une la región desplazada con la parte de pares de bases de la cadena, tal como se comenta en, por ejemplo, Holland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-80, 1991.

La expresión “**sonda 5'-nucleasa**” se refiere a un oligonucleótido que comprende por lo menos un grupo de marcaje emisor de luz y que se utiliza en una reacción de 5'-nucleasas para llevar a cabo la detección de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, por ejemplo, una sonda 5'-nucleasa incluye únicamente un único grupo emisor de luz (por ejemplo un pigmento fluorescente, etc.). En determinadas realizaciones, entre las sondas 5'-nucleasa se incluyen regiones de autocomplementariedad, de manera que las sondas son capaces de formar estructuras de horquilla bajo condiciones seleccionadas. Típicamente los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria modifican la emisión lumínica de sondas 5'-nucleasa de longitud completa intactas en mayor grado que de los fragmentos marcados de dichas sondas, los fragmentos de las cuales son generados a partir de las sondas de longitud completa durante las etapas de corte exonucleolítico y/o endonucleolítico de las reacciones de 5'-nucleasa. A modo de ilustración adicional, en algunas realizaciones una sonda 5'-nucleasa comprende por lo menos dos grupos de marcaje y emite radiación de intensidad creciente tras cortar uno de los dos marcajes, o de otro modo, tras separarse del oligonucleótido. En determinadas realizaciones, por ejemplo, se marca una sonda 5'-nucleasa con dos pigmentos fluorescentes diferentes, por ejemplo un pigmento informador en el extremo 5'-terminal y un pigmento o grupo desactivador 3'-terminal. En algunas realizaciones, las sondas 5'-nucleasa se marcan en una o más posiciones diferentes de las posiciones terminales, o además de las mismas. En el caso de que la sonda se encuentre intacta, la transferencia de energía típicamente se produce entre los dos fluoróforos de manera que la emisión de fluorescencia a partir del pigmento informador resulta desactivada por lo menos en parte. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de polimerasa, por ejemplo, una sonda 5'-nucleasa unida al ácido nucleico molde es cortada por la actividad 5' a 3' nucleasa de, por ejemplo, una polimerasa Taq u otra polimerasa que presente esta actividad, de manera que la emisión de fluorescencia del pigmento informador ya no resulta desactivada. Las sondas 5'-nucleasa ejemplares también se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 5.210.015, nº 5.994.056y nº 6.171.785. En otras realizaciones, se utilizan dos sondas diferentes, una marcada con un pigmento informador y la otra con un pigmento desactivador, en una disposición que permite que se produzca la transferencia de energía de resonancia fluorescente al hibridarse ambos al ácido nucleico diana. En todavía otras realizaciones, puede marcarse una sonda 5'-nucleasa con dos o más pigmentos informadores diferentes y el extremo 3' con un pigmento o grupo desactivador.

La expresión “**reacción de 5'-nucleasa**” o “**ensayo de 5'-nucleasa**” de ácidos nucleicos diana o molde, cebador y sonda (por ejemplo sondas 5'-nucleasa, etc.) se refiere a la degradación de una sonda que se encuentra hibridada con el ácido nucleico molde durante la extensión del cebador por un biocatalizador que incorpora nucleótidos que presenta una actividad 5' a 3' nucleasa, tal como se describe adicionalmente después. Las reacciones de 5'-

nucleasa también se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 6.214.979, nº 5.804.375, , nº 5.487.972 y nº 5.210.015.

El término “**amplicón**” se refiere a una molécula preparada mediante la amplificación de una molécula de ácidos nucleicos, por ejemplo tal como se produce en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, tal como una reacción en cadena de polimerasa (“PCR”), una amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), una amplificación mediada por transcripción (TMA), una reacción en cadena de ligasa (LCR) u otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos. Típicamente, un amplicón es una copia de un ácido nucleico seleccionado (por ejemplo un ácido nucleico molde o diana) o es complementario al mismo.

La expresión “**reacción de amplificación**” se refiere a una reacción que implica la replicación de una o más secuencias de ácidos nucleicos o complementos de las mismas. Entre las reacciones de amplificación ejemplares se incluyen PCR, reacciones en cadena de ligasa (LCR), entre muchas otras.

La expresión “**emisión lumínica de línea base**” en el contexto de un oligonucleótido marcado se refiere a una emisión detectable de luz del oligonucleótido antes de ponerlo en contacto con un modificador de la emisión lumínica. Determinadas sondas 5'-nucleasa, por ejemplo, emiten cantidades detectables de luz residual a pesar de la presencia de uno o más grupos desactivadores incorporados en el diseño de la sonda. Esta emisión de luz de línea base o de fondo tiende a limitar la proporción de señal a ruido de las reacciones de 5'-nucleasa. Además, esta emisión de línea base de luz generalmente se incrementa aditivamente en los formatos multiplex de detección, en los que se agrupan múltiples sondas marcadas. Este incremento aditivo de la emisión de luz de línea base también se produce al incrementar la cantidad de una sonda única en una aplicación determinada.

El término “**corte**” en el contexto de las reacciones de 5'-nucleasa se refiere a la degradación o fragmentación (hidrólisis) de las sondas 5'-nucleasa por la actividad 5' a 3' nucleasa asociadas a diversas polimerasas utilizadas típicamente en dichas reacciones.

Un “**complemento**” de un ácido nucleico se refiere a por lo menos un segmento de ácidos nucleicos que puede combinarse en una asociación antiparalela o hibridarse con por lo menos una subsecuencia de dicho ácido nucleico. La asociación antiparalela puede ser intramolecular, por ejemplo en forma de un bucle de horquilla dentro de un ácido nucleico, o intermolecular, tal como en la hibridación entre sí de dos o más ácidos nucleicos monocatenarios. Determinadas bases no presentes comúnmente en los ácidos nucleicos naturales pueden incluirse en los ácidos nucleicos a los que se hace referencia en la presente memoria y entre ellas se incluyen, por ejemplo, inosina, 7-deazaguanina y aquéllas comentadas posteriormente. No es necesario que la complementariedad sea perfecta; los dúplex estables, por ejemplo, pueden contener pares de bases desapareados o bases desapareadas. Los expertos en la materia de la tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar la estabilidad del dúplex mediante la consideración empírica de varias variables, incluyendo, por ejemplo, la longitud de una región de complementariedad, la composición de bases y la secuencia de nucleótidos en una región de complementariedad, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases desapareadas.

El término “**correspondiente**” se refiere a idéntico o complementario a una secuencia designada de nucleótidos en un ácido nucleico. La aplicación exacta del término resultará evidente para el experto en la materia a partir del contexto en el que se utiliza el término.

La expresión “**pigmento diazina**” se refiere a cualquier clase de compuesto químico orgánico que contenga un anillo de benceno en el que dos de los átomos e carbono hayan sido sustituidos por átomos de nitrógeno. Entre los pigmentos diazina ejemplares se incluyen un pigmento azocarmín, un pigmento fenazina, un pigmento oxazina y cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina (Janus verde B o verde diazina 5). Los ácidos nucleicos “**se hibridan**” al emparejarse cadenas individuales de una pareja de ácidos nucleicos, proporcionando una secuencia bicatenaria de ácidos nucleicos. La hibridación se produce debido a una diversidad de fuerzas bien caracterizadas, incluyendo los enlaces de hidrógeno, la exclusión de solvente y el apilamiento de bases. Puede encontrarse una guía extensa de la hibridación de ácidos nucleicos en: Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte 1, capítulo 2, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, 1993.

La expresión “**en solución**” se refiere a un ensayo o condición de reacción en la que los componentes del ensayo o reacción no se encuentran unidos a un soporte sólido en un medio fluido.

Un “**marcaje**” o “**grupo de marcaje**” se refiere a un grupo unido (covalente o no covalentemente), o capaz de unirse a una molécula, dicho grupo proporcionando, o siendo capaz de proporcionar, información sobre la molécula (por ejemplo información descriptiva, identificatoria, etc., de la molécula) u otra molécula con la que interacciona (por ejemplo, se hibrida) la molécula marcada. Entre los marcajes ejemplares se incluyen marcajes fluorescentes (incluyendo, por ejemplo, desactivadores o absorbedores), marcajes no fluorescentes, marcajes colorimétricos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes bioluminiscentes, marcajes radioactivos, grupos modificadores de la masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos, enzimas (incluyendo, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa, etc.) y similares.

A título ilustrativo adicional, entre los marcajes fluorescentes pueden incluirse pigmentos que se encuentran negativamente cargados, tales como pigmentos de la familia de la fluoresceína, o pigmentos de carga neutra, tales como pigmentos de la familia de la rodamina, o pigmentos de carga positiva, tales como pigmentos de la familia de la cianina. Entre los pigmentos de la familia de la fluoresceína se incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Entre los pigmentos de la familia de la rodamina se incluyen, por ejemplo, rojo de Texas, ROX, R110, R6G y TAMRA. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G u TAMRA se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Perkin-Elmer, Inc. (Wellesley, MA, USA) y el rojo de Tejas se encuentra disponible comercialmente de, por ejemplo, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Entre los pigmentos de la familia de la cianina se incluyen, por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7, y se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA). Se hace referencia en la presente memoria a marcajes adicionales, o de otra manera son conocidos de la técnica.

La expresión “**modificador de la emisión lumínica**” se refiere a una sustancia que se asocia no covalentemente a un ácido nucleico en una mezcla y que modifica la emisión detectable de radiación de una fuente de radiación asociada al ácido nucleico al encontrarse próxima la sustancia a la fuente de radiación. En algunas realizaciones, por ejemplo, determinados modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria reducen o desactivan la emisión de luz que de otra manera sería emitida (por ejemplo una emisión de luz de línea base) por oligonucleótidos que incluyen por lo menos un grupo emisor de luz (por ejemplo sondas de 5'-nucleasa, etc.) al poner en contacto los modificadores de emisión lumínica con dichos oligonucleótidos. Los modificadores de la emisión lumínica típicamente son solubles y en estas realizaciones también se denominan “**desactivadores solubles**” o “**modificadores solubles de la emisión lumínica**”. Además, sin limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que un modificador de la emisión lumínica generalmente se une a ácidos nucleicos de una manera dependiente de la longitud. Es decir, los modificadores de la emisión lumínica típicamente se unen a ácidos nucleicos más largos en mayor grado que a ácidos nucleicos relativamente más cortos. Por consiguiente, el grado con el que un modificador de la emisión lumínica modifica la emisión de luz de un ácido nucleico marcado dado típicamente es proporcional a la longitud de dicho ácido nucleico. Por ejemplo, en el caso de que un oligonucleótido marcado se corte en una reacción de 5'-nucleasa, un modificador particular de la emisión lumínica generalmente modificará (por ejemplo desactivará, etc.) la emisión de luz de fragmentos marcados del oligonucleótido en menor grado que de un oligonucleótido intacto. Entre los modificadores ejemplares de la emisión lumínica se incluyen diversos pigmentos diazina y tiazina, que se describen en mayor detalle en la presente memoria.

La expresión “**grupo de marcaje emisor de luz**” se refiere a un grupo de marcaje que genera o que es capaz de generar radiación detectable o luz. Determinados grupos de marcaje emisores de luz generan luz, por ejemplo mediante fluorescencia, quimioluminiscencia, bioluminiscencia o similar.

El término “**mezcla**” se refiere a una combinación de dos o más componentes diferentes. La expresión “**mezcla de reacción**” se refiere a una mezcla que comprende moléculas que pueden participar y/o facilitar una reacción dada. A título ilustrativo, una mezcla de reacción de amplificación generalmente incluye una solución que contiene reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, y que típicamente contiene cebadores, un ácido nucleico polimerasa, dNTPs y un catión metálico divalente en un tampón adecuado. Una mezcla de reacción se denomina “completa” si contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, e “incompleta” si contiene únicamente un subconjunto de los reactivos necesarios. El experto en la materia entenderá que los componentes de la reacción se almacenan rutinariamente como soluciones separadas, conteniendo cada una un subconjunto de los componentes totales, por conveniencia, estabilidad de almacenamiento o para permitir el ajuste dependiente de la aplicación de las concentraciones de los componentes, y que los componentes de la reacción se combinan antes de la reacción para crear una mezcla de reacción completa. Los componentes de la reacción también pueden formularse en una forma seca, por ejemplo tabletas, y después reconstituirse previamente a la utilización. Además, el experto en la materia entenderá que los componentes de la reacción se empaquetan separadamente para la comercialización y que los kits comerciales útiles pueden contener cualquier subconjunto de los componentes de reacción que incluye los cebadores modificados de la invención.

El término “**parte**” o “**grupo**” se refiere a una de las porciones en las que una entidad, tal como una molécula, se divide (por ejemplo un grupo funcional, un grupo sustituyente o similar). Por ejemplo, una sonda puede considerarse un oligonucleótido que opcionalmente comprende un grupo desactivador, un grupo de marcaje o similar.

La expresión “**ácido nucleico**” se refiere a un polímero de monómeros que puede corresponder a un polímero de ribosa ácido nucleico (ARN) o de desoxirribosa ácido nucleico (ADN), o a un análogo de los mismos. Esto incluye polímeros de nucleótidos, tales como ARN o ADN, así como formas modificadas de los mismos, péptidos de ácidos nucleicos (PNAs), ácidos nucleicos bloqueados (LNATMs) y similares. En determinadas aplicaciones, el ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómero, por ejemplo subunidades tanto de ARN como de ADN. Un ácido nucleico puede ser, o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero desnudo de ADN o ARN, un amplicón, un oligonucleótido, un cebador, una sonda, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario o bicatenario. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

Un ácido nucleico típicamente es monocatenario o bicatenario y generalmente contiene enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, tal como se indica de manera general en la presente memoria, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden presentar esqueletos alternativos, incluyendo, por ejemplo y sin limitación, fosforamida (Beaucage *et al.*, Tetrahedron 49(10):1925, 1993, y las referencias en el mismo; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800, 1970; Sprinzl *et al.*, Eur. J. Biochem. 81:579, 1977; Letsinger *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:3487, 1986; Sawai *et al.*, Chem. Lett. 805, 1984; Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988; y Pauwels *et al.*, Chemica Scripta 26:1419, 1986, fosforotioato (Mag *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:1437, 1991 y patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 111:2321, 1989), enlaces O-metil-fosforoamidita (Eckstein, 5
10
Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press, 1992) y esqueletos y enlaces de péptidos ácidos nucleicos (Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895, 1992; Meier *et al.*, Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008, 1992; Nielsen, Nature 365:566, 1993; y Carlsson *et al.*, Nature 380:207, 1996). Entre otros análogos de ácidos nucleicos se incluyen aquellos con esqueletos con carga positiva (Denpcy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097, 1995); esqueletos no iónicos (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, nº 5.602.240, nº 5.216.141 y nº 4.469.863; 15
Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423, 1991; Letsinger *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988; Letsinger *et al.*, Nucleoside & Nucleotide 13:1597, 1994; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", editor Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395, 1994; Jeffs *et al.*, J. Biomolecular NMR 34:17, 1994; Tetrahedron Lett. 37:743, 1996) y esqueletos no ribosa, incluyendo aquellos indicados en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506, y en los capítulos 6 y 7, ASC 20
Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, editor Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos en la definición de ácido nucleico (Jenkins *et al.*, Chem. Soc. Rev., páginas 169-176, 1995). También se describen varios análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawis C & E News, 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato pueden realizarse para facilitar la adición de grupos adicionales, tal como grupos de 25
marcaje, o para alterar la estabilidad y la vida media de dichas moléculas en ambientes fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas naturales que se encuentran típicamente en ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), entre los análogos de ácidos nucleicos se incluyen aquellos que 30
presentan bases heterocíclicas no naturales u otras bases modificadas, muchos de los cuales se describen, o a los que de otra manera se hace referencia en la presente memoria. En particular, se describen adicionalmente muchas bases no naturales en, por ejemplo, Seela *et al.*, Helv. Chim. Acta 74:1790, 1991, Grein *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:971-976, 1994, y Seela *et al.*, Helv. Chim. Acta. 82:1640, 1999. A título ilustrativo adicional, determinadas bases utilizadas en nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de disociación (Tm) se encuentran opcionalmente incluidas. Por ejemplo, entre algunas de ellas se incluyen 7-deazapurinas (por ejemplo 7- 35
deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.990.303. Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6- 40
diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo y similares.

También se describen ejemplos adicionales de bases y nucleótidos modificados en, por ejemplo, las patentes US nº 5.484.908, nº 5.645.985, nº 5.830.653, nº 6.639.059, nº 6.303.315 y solicitud publicada de patente US nº 2003/0092905. 45

El término "**nucleótido**" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo un éster fosfato de un nucleósido. A título ilustrativo, un nucleótido puede incluir 1, 2, 3 ó más grupos fosfato unidos covalentemente a una posición 5' de un grupo azúcar del nucleósido. 50

La expresión "**biocatalizador incorporador de nucleótido**" se refiere a un catalizador que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Los biocatalizadores incorporadores de nucleótidos típicamente son enzimas. Un "**enzima**" es un catalizador basado en una proteína que actúa reduciendo la energía de activación de una reacción química que implica otros compuestos o "sustratos". Un "**enzima incorporador de nucleótidos**" se refiere a un enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Entre los enzimas ejemplares 55
incorporadores de nucleótidos se incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas, ARN polimerasas, terminal-transferasas, transcriptasas inversas, telomerasas, polinucleótido fosforilasas y similares. Otros biocatalizadores pueden basarse en ADN ("ADNzimas") o en ARN ("ribozimas"). La expresión "**enzima termoestable**" se refiere a un enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y conserva suficiente actividad catalítica al someterlo a temperaturas elevadas durante periodos seleccionados de tiempo. Por ejemplo, una polimerasa termoestable conserva suficiente actividad para llevar a cabo reacciones posteriores de extensión de cebador al someterla a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para llevar a cabo la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble cadena. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de los ácidos nucleicos son bien conocidas de la técnica y se ejemplifican en las patentes US nº 4.683.202, y nº 4.683.195. Tal como se utiliza en la presente 65
memoria, una polimerasa termoestable típicamente resulta adecuada para una reacción de ciclado térmico, tal como

una PCR o una reacción de 5'-nucleasa. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la polimerización de nucleótidos de una manera apropiada para formar productos de extensión de cebador complementarios a un ácido nucleico molde.

- 5 El término **“oligonucleótido”** o **“polinucleótido”** se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo nucleótidos), típicamente más de tres unidades monoméricas, y más típicamente más de diez unidades monoméricas. El tamaño exacto de un oligonucleótido generalmente depende de diversos factores, incluyendo la función o uso final del oligonucleótido. Los oligonucleótidos opcionalmente se preparan mediante cualquier método adecuado, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación de ADN, la transcripción inversa, la clonación y la digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un método tal como el método fosfotriéster de Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; el método de triéster de Mateucci *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981, los métodos de síntesis automática, o el método de soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, u otros métodos conocidos de la técnica.

La expresión **“sonda de ácidos nucleicos”** o **“sonda”** se refiere a un oligonucleótido marcado o no marcado capaz de hibridarse selectivamente con un ácido nucleico diana o molde bajo condiciones adecuadas. Típicamente una sonda es suficientemente complementaria de una secuencia diana específica contenida en una muestra de ácidos nucleicos para formar un dúplex estable de hibridación con la secuencia diana bajo una condición de hibridación seleccionada, tal como, aunque sin limitación, una condición de hibridación astringente. Un ensayo de hibridación llevado a cabo utilizando la sonda bajo condiciones de hibridación suficientemente astringentes permite la detección selectiva de una secuencia diana específica. La expresión **“región hibridante”** se refiere a aquella región de un ácido nucleico que es exacta o sustancialmente complementaria respecto de la secuencia diana, y por lo tanto se hibrida con la misma. Para la utilización en un ensayo de hibridación para la discriminación de diferencias de nucleótidos individuales en la secuencia, la región hibridante típicamente presenta una longitud comprendida entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos. Aunque la región hibridante generalmente se refiere al oligonucleótido completo, la sonda puede incluir secuencias de nucleótidos adicionales que funcionan, por ejemplo, como sitios de unión de molécula conectora, proporcionando un sitio para unir la secuencia de la sonda a un soporte sólido o similar, como sitios para la hibridación de otros oligonucleótidos, como sitios de enzimas de restricción o sitios de unión para otros enzimas ligantes de ácidos nucleicos, etc. En determinadas realizaciones, se incluye una sonda de la invención en un ácido nucleico que comprende uno o más marcajes (por ejemplo un pigmento informador, un grupo desactivador, etc.), tal como una sonda 5'-nucleasa, una sonda FRET, una baliza molecular, o similar, que también puede utilizarse para detectar la hibridación entre la sonda y los ácidos nucleicos diana en una muestra. En algunas realizaciones, la región hibridante de la sonda es completamente complementaria a la secuencia diana. Sin embargo, en general, la complementariedad completa no resulta necesaria (es decir, los ácidos nucleicos pueden ser parcialmente complementarios entre sí); los dúplex estables pueden contener bases mal apareadas o desapareadas. La modificación de las condiciones astringentes puede resultar necesario para permitir la formación de un dúplex de hibridación estable con uno o más apareamientos incorrectos de pares de bases o con bases desapareadas. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, proporcionan directrices para una modificación adecuada. La estabilidad del dúplex de diana/sonda depende de varias variables, incluyendo la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y la secuencia del oligonucleótido, la temperatura y las condiciones iónicas. El experto en la materia reconocerá que, en general, el complemento exacto de una sonda dada de manera similar resulta útil como sonda. El experto en la materia también reconocerá que, en determinadas realizaciones, también pueden utilizarse ácidos nucleicos de sonda como ácidos nucleicos cebadores. Entre los ácidos nucleicos sonda ejemplares se incluyen las sondas 5'-nucleasa, las balizas moleculares, entre muchas otras conocidas por el experto en la materia.

- 50 Un **“ácido nucleico cebador”** o **“cebador”** es un ácido nucleico que puede hibridarse con un ácido nucleico diana o molde y permitir la extensión o elongación de cadena utilizando, por ejemplo, un biocatalizador incorporador de nucleótidos, tal como una polimerasa, bajo condiciones de reacción apropiadas. Un ácido nucleico cebador es típicamente un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo un oligodesoxirribonucleótido monocatenario, etc.). Aunque opcionalmente se utilizan otras longitudes de ácido nucleico cebador, típicamente comprenden regiones hibridantes de longitudes comprendidas entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos. Los ácidos nucleicos cebadores cortos generalmente utilizan temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con los ácidos nucleicos de molde. Un ácido nucleico cebador que sea por lo menos parcialmente complementario a una subsecuencia de un ácido nucleico molde típicamente resulta suficiente para la hibridación con el molde y se produzca la extensión. Un ácido nucleico cebador puede marcarse (por ejemplo un cebador SCORPION®, etc.), en caso que se desee, mediante la incorporación de un marcaje detectable mediante, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas, químicas u otras técnicas. A título ilustrativo, entre los marcajes útiles se incluyen isótopos radioactivos, pigmentos fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (tal como se utilizan comúnmente en los ensayos ELISA), biotina o haptenos, y proteínas para los que se encuentran disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchas de estos marcajes y otros marcajes se describen en mayor detalle en la presente invención y/o de otra manera son conocidos de la técnica. Un

experto en la materia podrá apreciar que, en determinadas realizaciones, también pueden utilizarse ácidos nucleicos cebadores como ácidos nucleicos sonda.

- Un “grupo desactivador” o “desactivador” se refiere a un grupo que reduce y/o es capaz de reducir la emisión detectable de radiación, por ejemplo radiación fluorescente o luminiscente, de una fuente (“donante”) que de otra manera habría emitido dicha radiación a una λ_{max} particular. Un desactivador típicamente reduce la radiación detectable emitida por la fuente en por lo menos 50%, típicamente en por lo menos 80%, y más típicamente en por lo menos 90%. Determinados desactivadores pueden reemitir la energía absorbida procedente de, por ejemplo, un pigmento fluorescente en una señal característica de dicho desactivador, y de esta manera el desactivador también puede ser un “marcaje”. Este fenómeno se conoce generalmente como transferencia de energía de resonancia fluorescente, o FRET. Alternativamente, un desactivador puede disipar la energía absorbida procedente de un pigmento fluorescente en una forma diferente de la luz, por ejemplo en forma de calor. Entre las moléculas comúnmente utilizadas en la FRET se incluyen, por ejemplo, fluoresceína, FAM, JOE, rodamina, R6G, TAMRA, ROX, DABCYL y EDANS. El carácter del pigmento fluorescente como donante o aceptor se define a partir de sus espectros de excitación y emisión, y el pigmento fluorescente con el que se aparea. Por ejemplo, FAM resulta excitado más eficientemente por luz con una longitud de onda de 488 nm, y emite luz con un espectro de entre 500 y 650 nm, y un máximo de emisión en 525 nm. FAM es un marcaje donante adecuado para la utilización con, por ejemplo, TAMRA como desactivador, que presenta su máximo de excitación a 514 nm. Entre los desactivadores ejemplares no fluorescentes u oscuros que disipan energía absorbida procedente de un pigmento fluorescente se incluyen los desactivadores Black Hole Quenchers™ comercializados por Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA) y los ECLIPSE® Dark Quenchers (Epoch Biosciences, Bothell, WA, USA). Los desactivadores Black Hole Quenchers™ (BHQ) son estructuras que comprenden por lo menos tres radicales seleccionados de entre compuestos arilo o heteroarilo sustituidos o no sustituidos, o combinaciones de los mismos, en los que por lo menos dos de los residuos se encuentran unidos mediante un enlace diazo exocíclico (ver, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 01/86001). También se proporcionan desactivadores ejemplares en, por ejemplo, la patente US nº 6.465.175. Los desactivadores son tanto molécula que no reemiten la luz absorbida como luz de una longitud de onda más larga (no fluorescente) o que reemiten la luz a una longitud de onda que se encuentra fuera del rango que se detecta (fluorescente).
- En su sentido más amplio, el término “desactivador” se refiere a cualquier molécula que es capaz de reducir una emisión lumínica. Se indica que existen casos en los que un desactivador no es necesariamente un desactivador FRET. No existe ningún requisito de que un desactivador funciona mediante un mecanismo “FRET” estricto, y en efecto un desactivador puede funcionar mediante cualquier mecanismo. No existe ningún requisito para un solapamiento espectral entre el fluoróforo y el desactivador. Se indica que la desactivación puede incluir la desactivación dinámica (Forster, Dexter, etc.) y la desactivación estática (complejo de estado fundamental). Los mecanismos de desactivación pueden implicar transferencia de energía, transferencia de fotoelectrones, transferencia electrónica acoplada a protones, formación de dímeros entre fluoróforos situados próximamente entre sí, interacciones transitorias en estado excitado, desactivación por colisión, o formación de especies no fluorescentes en estado fundamental (ver, por ejemplo, Principles of Fluorescence Spectroscopy, de Joseph Lakowicz, y Handbook of Fluorescent Probes, de Richard Haugland).

Una “secuencia” de un ácido nucleico se refiere al orden e identidad de los nucleótidos en el ácido nucleico. Una secuencia típicamente se lee en la dirección 5' a 3'.

- La expresión “oligonucleótido de marcaje único” se refiere a un oligonucleótido que incluye únicamente un grupo de marcaje. En determinadas realizaciones, el grupo de marcaje es emisor de luz.

- Una sustancia es “soluble” en el caso de que sea capaz de encontrarse libre en solución. Por ejemplo, los modificaciones solubles de emisión lumínica típicamente interaccionan no covalentemente con ácidos nucleicos al encontrarse libres en solución.

- Las expresiones “astringente” o “condiciones astringentes”, tal como se utilizan en la presente memoria, indican condiciones de hibridación de baja fuerza iónica y temperatura elevada, tal como es bien conocido de la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, editores, J. Wiley & Sons Inc., New York, 1997); Tijssen, *supra*, 1993. Generalmente las condiciones astringentes se selecciona que sean aproximadamente 5°C a 30°C inferiores al punto térmico de disociación (T_m) para la secuencia especificada a una fuerza iónica y pH definidos. Alternativamente, se selecciona que las condiciones astringentes sean aproximadamente 5°C a 15°C inferiores a la T_m para la secuencia especificada a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos determinados) a la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (debido a que las secuencias diana se encuentran presentes en exceso, a la T_m , el 50% de las sondas se hibridan en el equilibrio).

Un “**sujeto**” se refiere a un organismo. Típicamente el organismo es un organismo mamífero, particularmente un organismo humano. En determinadas realizaciones, por ejemplo, un sujeto es un paciente que se sospecha que presenta un trastorno genético, estado de enfermedad u otra condición.

- 5 Una “**subsecuencia**”, “**segmento**” o “**fragmento**” se refiere a cualquier porción de una secuencia de ácidos nucleicos completa.

- 10 Un “**pigmento tiazina**” se refiere a cualquiera de entre una clase de compuestos químicos orgánicos que contiene un sistema anular aromático tricíclico fusionado, en el que dos de los carbonos en el anillo central se han sustituido por un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre. Entre los pigmentos tiazina ejemplares se incluyen azul de metileno, verde de metileno, tionina, azul de 1,9-dimetilmetileno, dimetiltionina-sim, azul de toluidina O, azul de metileno nuevo, violeta de metileno Bernthsen, azul A, azul B y azul C.

- 15 La expresión “ácido nucleico molde” o “ácido nucleico diana” se refiere a un ácido nucleico que debe amplificarse, detectarse o, de otra manera, analizarse.

- 20 Los objetos se “comunican térmicamente” entre sí en el caso de que la energía térmica se transfiera o sea capaz de transferirse entre los objetos. En determinadas realizaciones de los sistemas descritos en la presente invención, por ejemplo, los moduladores térmicos se comunican térmicamente con los recipientes con el fin de modular la temperatura de los mismos.

- 25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “**T_m**” se utiliza en referencia a la “temperatura de disociación”. La temperatura de disociación es la temperatura a la que la mitad de una población de polinucleótidos o de oligómeros de nucleobases de doble cadena (por ejemplo complejos de hibridación), en homodúplex o heterodúplex, se disocia en cadenas individuales. La predicción de una **T_m** de un polinucleótido dúplex considera la secuencia de bases, así como otros factores, entre ellos las características estructurales y de secuencia y la naturaleza de los enlaces oligoméricos. Los métodos para predecir y determinar experimentalmente la **T_m** son conocidos de la técnica.

- 30 Por ejemplo, una **T_m** se determina tradicionalmente a partir de una curva de disociación, en la que una molécula dúplex de ácido nucleico se calienta en un programa de temperatura controlada y se monitoriza el estado de asociación/disociación de las dos cadenas individuales en el dúplex y se proporciona en un gráfico hasta alcanzar una temperatura a la que las dos cadenas se encuentran completamente disociadas. La **T_m** se lee de dicha curva de disociación. Alternativamente, puede determinarse una **T_m** a partir de una curva de hibridación, en la que se calienta una molécula dúplex de ácidos nucleicos hasta una temperatura a la que las dos cadenas se encuentran completamente disociadas. A continuación, se baja la temperatura en un programa de temperatura controlada, y se monitoriza el estado de asociación/disociación de las dos cadenas individuales en el dúplex y se proporciona en un gráfico hasta alcanzar una temperatura a la que las dos cadenas se encuentran completamente hibridadas. La **T_m** se lee de dicha curva de hibridación.

- 45 No se pretende que la invención se encuentre limitada a ningún método particular de determinación de la **T_m**. Los métodos para la determinación experimental de la **T_m** son ampliamente conocidos de la técnica y se describen en una diversidad de fuentes, por ejemplo en Liew *et al.*, “Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphism by High-Resolution Melting of Small Amplicons”, *Clinical Chemistry* 50(7):1156-1164, 2004; Reed y Wittwer, “Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis”, *Clinical Chemistry* 50(10):1748-1754, 2004; Zhou *et al.*, “Closed-Tube Genotyping with Unlabeled Oligonucleotide Probes and a Saturating DNA Dye”, *Clinical Chemistry* 50(8):1328-1335, 2004; y Zhou *et al.*, “High-resolution DNA melting curve analysis to establish HLA genotypic identity”, *Tissue Antigens* 64:156-164, 2004. La instrumentación de análisis de curvas de disociación/hibridación se encuentra disponible comercialmente de una diversidad de fabricantes.

- 55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “**muestra**” se utiliza en su sentido más amplio, y se refiere a cualquier material que se somete a análisis. El término “**muestra**” se refiere típicamente a cualquier tipo de material de origen biológico, por ejemplo cualquier tipo de material obtenido de animales o plantas. Una muestra puede ser, por ejemplo, cualquier fluido o tejido, tal como sangre o suero, y además, puede ser sangre humana o suero humano. Una muestra puede ser un cultivo de células o tejidos, cultivos de microorganismos (procarióticos o eucarióticos), o cualquier fracción o productos producidos o derivados de materiales biológicos (vivos o anteriormente vivos). Opcionalmente, una muestra puede purificarse, purificarse parcialmente, no purificarse, enriquecerse o amplificarse. En el caso de que una muestra se purifique o enriquezca, la muestra puede comprender principalmente un componente, por ejemplo ácidos nucleicos. Más específicamente, por ejemplo, una muestra purificada o amplificada puede comprender ARN celular total, ARNm celular total, ADNc, ARNc, o un producto amplificado derivado de los mismos.

- 65 La muestra utilizada en los métodos de la invención puede proceder de cualquier fuente, y no se encuentra limitada. Dicha muestra puede ser una cantidad de tejido o fluido aislado a partir de uno o más individuos, incluyendo, aunque

sin limitación, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre completa, productos sanguíneos, líquido espinal, saliva, líquido peritoneal, líquido linfático, humor acuoso o vítreo, líquido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, productos sanguíneos, semen, líquido seminal, líquidos vaginales, efusión pulmonar, líquido serosal, órganos, lavado bronquio-alveolar, tumores, tejidos incluidos en parafina, etc. Las muestras también pueden incluir

constituyentes y componentes de cultivos celulares *in vitro*, incluyendo, aunque sin limitación, medio condicionado resultante del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células recombinantes, componentes celulares, etc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “de tipo virus de la hepatitis C” se refiere a la categorización de un virus de la hepatitis C (VHC) a partir de su organización genómica. La categorización de un aislado de VHC en una categoría particular de tipo refleja su grado de relación genómica con otros aislados de VHC y su grado relativamente menor de relación con otros aislados de VHC. Tal como se utiliza en la presente memoria, la nomenclatura de tipado de VHC es consistente con la ampliamente adoptada nomenclatura propuesta por Simmonds *et al.*, Hepatology 19:1321-1324, 1994. Ver, también, Zein, “Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes”, Clinical Microbiol. Reviews 13(2):223-235, 2000; Maertens y Stuyver, “Genotypes and Genetic Variation of Hepatitis C Virus”, páginas 182 a 233, 2000, en: Harrison y Zuckerman (editores), The Molecular Medicine of Viral Hepatitis, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Inglaterra). El sistema de Simmonds *et al.*, 1994, clasifica los aislados de VHC conocidos en once (11) genotipos de VHC, es decir genotipos 1 a 11. Cada genotipo se subdivide adicionalmente en agrupaciones denominadas subtipos, que reflejan el grado de relación entre cepas del mismo genotipo. Un subtipo de VHC se indica por una letra romana minúscula después del genotipo, por ejemplo subtipo 1a, subtipo 1c, subtipo 6a, etc. Las variantes genéticas que se encuentran dentro de un aislado individual se denominan cuasiespecies. Se conocen en todo el mundo aproximadamente 78 subtipos de VHC que abarcan la totalidad de los 11 genotipos; el número de subtipos no es estático, a medida que se estudian y secuencian más aislados de VHC, es probable que se identifiquen subtipos adicionales (y posiblemente genotipos). Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “tipos víricos” puede referirse a genotipos o a subtipos.

Algunos informes (ver, por ejemplo, Robertson *et al.*, Arch. Virol. 143(12):2493-2503, 1998) sugieren que la organización genómica vírica se representa mejor mediante la creación de clados víricos, reflejando la observación de que algunos genotipos de VHC se encuentran más estrechamente relacionados entre sí que a otros genotipos de VHC. En este sistema, los clados 1, 2, 4 y 5 corresponden a los genotipos 1, 2, 4 y 5, mientras que el clado 3 comprende los genotipos 3 y 10, y el clado 6 comprende los genotipos 6, 7, 8, 9 y 11. La descripción de la presente invención no utiliza la nomenclatura de clados. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “derivado a partir de” se refiere a un componente que se aísla a partir de, o que se prepara utilizando, una muestra especificada, molécula, organismo o información de la molécula u organismo especificado. Por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos que se deriva de un virus de la hepatitis C puede ser, por ejemplo, una molécula del genoma de VHC, o alternativamente, un transcrito del genoma de VHC, o alternativamente, un ácido nucleico sintético que comprende una secuencia polinucleótida que corresponde a una secuencia polinucleótida de VHC.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “monitorizar” se refiere a un seguimiento, ensayo, recogida de datos y/o cuantificación periódicos o continuos. La monitorización puede ser automática, y la información (por ejemplo una base de datos) recogida durante la monitorización puede imprimirse o compilarse en un formato legible por ordenador y/o de almacenamiento informático.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “correlacionar” se refiere a establecer una relación entre dos o más variables, valores o entidades. En el caso de que dos variables se correlacionen, la identificación de una de dichas variables puede utilizarse para determinar el valor de la otra variable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “kit” se utiliza en referencia a una combinación de artículos que facilitan un procedimiento, método, ensayo, análisis o manipulación de una muestra. Los kits pueden contener instrucciones escritas que describen cómo utilizar el kit (por ejemplo instrucciones que describen los métodos de la presente invención), reactivos químicos o enzimas necesarios para el método, cebadores y sondas, así como otros componentes cualesquiera.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “PCR asimétrica” se refiere a la amplificación preferente por PCR de una cadena de un ADN diana mediante el ajuste de las concentraciones molares de los cebadores en una pareja de los mismos de manera que resulten desiguales. Una reacción de PCR asimétrica produce un producto predominantemente monocatenario y una cantidad menor de un producto bicatenario como resultado de las concentraciones desiguales de cebadores. A medida que se produce la PCR asimétrica, el cebador de menor concentración se incorpora cuantitativamente en un amplicón de ADN bicatenario, mientras que el cebador a concentración más alta continua cebando la síntesis del ADN, resultando en una acumulación continua de un producto monocatenario.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y B ilustran esquemáticamente un ensayo que incluye modificadores de la emisión lumínica según una realización de la invención

Las figuras 2A y B ilustran esquemáticamente otro ensayo que incluye modificadores de la emisión lumínica según una realización de la invención

5 La figura 3 es un diagrama de flujo que muestra un sistema representativo según una realización de la invención.

10 La figura 4 es un gráfico (la ordenada representa el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración de azul de metileno nuevo ($\mu\text{g/ml}$)) que muestra la desactivación de fluorescencia de ADN monocatenario (ss) y bicatenario (ds) y dímero de timidina con cantidades crecientes de azul de metileno nuevo en mezclas separadas de transcripción inversa-en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

15 La figura 5 es un gráfico (las ordenadas representan el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración de modificador de la emisión lumínica ($\mu\text{g/ml}$)) que muestra la desactivación de fluorescencia de ADN ss con cantidades crecientes de seis pigmentos tiazina diferentes en un cóctel que contiene todos los componentes de una mezcla de RT-PCR.

20 La figura 6 es un gráfico (las ordenadas representan el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración de modificador de la emisión lumínica ($\mu\text{g/ml}$)) que muestra la desactivación de la fluorescencia de ADNds con cantidades crecientes de seis pigmentos tiazina diferentes en un cóctel que contiene todos los componentes de una mezcla de RT-PCR.

25 La figura 7 es un gráfico (las ordenadas representan el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración de modificador de la emisión lumínica ($\mu\text{g/ml}$)) que muestra la desactivación de la fluorescencia de ADN dinucleótido con cantidades crecientes de seis pigmentos tiazina diferentes en un cóctel que contiene todos los componentes de una mezcla de RT-PCR.

30 La figura 8 es un gráfico (las ordenadas representan el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración de modificador de la emisión lumínica ($\mu\text{g/ml}$)) que muestra la desactivación de la fluorescencia de ADNss con cantidades crecientes de azul de metileno en un cóctel que contiene todos los componentes de una mezcla de RT-PCR, con o sin poli rA.

35 La figura 9 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestran la detección mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN del virus de la hepatitis C (VHC) con una sonda de VHC con marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul B.

40 La figura 10 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la fluorescencia como función del número de ciclos utilizando una sonda de VHC con marcaje único en reacciones de PCR cinética del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en presencia de diversas concentraciones de azul B.

45 La figura 11 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR del ADN del VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul B.

La figura 12 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno nuevo.

50 La figura 13 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR del ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno nuevo.

55 La figura 14 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul de 1,9-dimetilmetileno.

60 La figura 15 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul de 1,9-dimetilmetileno.

65 La figura 16 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul A.

La figura 17 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul C.

5 La figura 18 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de tionina.

10 La figura 19 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de verde de metileno.

15 La figura 20 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra una comparación entre azul A, azul B y azul C en la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de concentraciones de 40 µg/ml del pigmento azul.

20 La figura 21 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra una comparación entre azul A, azul B, azul C, azul de metileno, azul de toluidina, tionina y verde de metileno, en la detección por PCR de ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de concentraciones de 40 µg/ml del pigmento tiazina.

25 La figura 22 es una fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra un análisis de reacciones de PCR del VHC con 20.000 copias de ADN del VHC, diversas sondas y diversas cantidades de azul de metileno. Los paneles A y B representan reacciones por duplicado.

30 La figura 23 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR del ADN del IQS (estándar de cuantificación interno) con una sonda de marcaje único marcada con HEX en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno.

35 La figura 24 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección simultánea por PCR del ADN de VHC y de IQS con una combinación de sondas de marcaje único marcadas con FAM y HEWX en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno.

40 La figura 25 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra una comparación entre las señales obtenidas de una sonda de marcaje único y una sonda de marcaje doble en ausencia de un modificador de la emisión lumínica. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia o en ausencia de ácido nucleico portador, polirA.

45 La figura 26 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestran una comparación entre las señales obtenidas de una sonda de marcaje único y de una sonda de marcaje doble en presencia de 30 µg/ml de un modificador de la emisión lumínica, azul B. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia o en ausencia de ácido nucleico portador, polirA.

50 La figura 27 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra una comparación entre las señales obtenidas de una sonda de marcaje único y de una sonda de marcaje doble en presencia de 30 µg/ml de un modificador de la emisión lumínica, azul B. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia o en ausencia de ácido nucleico portador, polirA.

55 La figura 28 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de titulaciones de ADN molde que incluían una sonda de marcaje único y azul de metileno.

60 La figura 29 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de titulaciones de un ARN molde que incluía una sonda de marcaje único y azul de metileno.

65 La figura 30 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la comparación entre las señales obtenidas de una sonda de marcaje único y de una sonda de marcaje doble en presencia de 40 µg/ml de un modificador de la emisión lumínica, azul de metileno, en la detección de 2.200.000 copias introducidas de ADN del VIH.

La figura 31 es una fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra un análisis de las reacciones de PCR de VHC y de VIH con 2 a 200.000 copias introducidas de ADN, en presencia de 40 µg/ml de azul de metileno. Los paneles A y B representan las reacciones del VHC y del VIH, respectivamente.

La figura 32 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR del ADN de HCV con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno nuevo al medir la fluorescencia a 40°C.

La figura 33 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección por PCR del ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno nuevo, al medir la fluorescencia a 40°C.

La figura 34 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra una comparación entre la detección por PCR del ADN de VHC con una sonda de marcaje único en presencia de 40 µg/ml de azul de metileno nuevo, al medir la fluorescencia a dos temperaturas diferentes: 58°C o 40°C.

La figura 35 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-BHQ y diversas cantidades de azul de metileno.

La figura 36 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con el doble de la cantidad de una sonda de marcaje doble FAM-BHQ que se utilizó en los ensayos representados en la figura 35 y diversas cantidades de azul de metileno.

La figura 37 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la comparación entre los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección de VHC con dos niveles diferentes de una sonda de marcaje doble FAM-BHQ y diversas cantidades de azul de metileno.

La figura 38 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia relativa obtenidos en ensayos de 5'-nucleasas de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-BHQ y diversas cantidades de azul de metileno.

La figura 39 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-BHQ y diversas cantidades de azul de dimetil-metileno.

La figura 40 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia relativa obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-BHQ y diversas cantidades de azul de dimetil-metileno.

La figura 41 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-BHQ y diversas cantidades de azul de metileno nuevo.

La figura 42 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia relativa obtenidos en ensayo de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-BHQ y diversas cantidades de azul de metileno nuevo.

La figura 43 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia relativa obtenidos en ensayo de 5'-nucleasa de detección de ADN de IQS con una sonda de marcaje doble HEX-CY5 y diversas cantidades de azul de metileno.

La figura 44 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia relativa obtenidos en ensayo de 5'-nucleasa de detección de ADN de IQS con una sonda de marcaje doble HEX-CY5 y diversas cantidades de azul de metileno.

La figura 45 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia relativa obtenidos en ensayo de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-CY5 y diversas cantidades de verde Janus B.

La figura 46 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-CY5 y diversas cantidades de azul de toluidina.

La figura 47 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-CY5 y diversas cantidades de azul puro BO de Victoria.

La figura 48 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-CY5 y diversas cantidades de azul A.

La figura 49 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-CY5 y diversas cantidades de verde de metileno.

La figura 50 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-CY5 y diversas cantidades de tionina.

La figura 51 es un gráfico de amplificación (las ordenadas representan la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los niveles de fluorescencia de línea base obtenidos en ensayos de 5'-nucleasa de detección del VHC con una sonda de marcaje doble FAM-CY5 y diversas cantidades de azul B.

La figura 52A proporciona la secuencia de nucleótidos de una sonda específica de VHC marcada con FAM.

La figura 52B proporciona un análisis de la temperatura de disociación (T_m) que muestra la fluorescencia de origen en un gráfico como función de la temperatura utilizando la sonda de genotipado del HCV de marcaje único mostrada en la figura 52A y ácidos nucleicos diana sintéticos. La reacción de disociación no incluía un desactivador soluble. Se midió la fluorescencia utilizando un filtro de excitación a 485 nm con una anchura de banda de 20 nm y un filtro de emisión a 520 nm con una anchura de banda de 10 nm. Los resultados de los siete experimentos independientes se solapan sobre el mismo gráfico. Se muestra un conjunto representativo de los datos.

La figura 53 proporciona un análisis de la curva de disociación que muestra la fluorescencia de origen en un gráfico como función de la temperatura utilizando una sonda de genotipado de VHC de marcaje único y ácidos nucleicos diana sintéticos. Las condiciones experimentales fueron idénticas a las utilizadas en la figura 52B, excepto en que se incluyeron en las reacciones 10 µg/ml del modificador soluble de emisión lumínica (es decir, un desactivador soluble) azul de metileno.

La figura 54 proporciona un análisis de la curva de disociación bajo las mismas condiciones utilizadas en la figura 53, excepto en que se incluyeron en las reacciones 20 µg/ml del desactivador soluble azul de metileno.

La figura 55 proporciona el gráfico de primera derivada del análisis de la curva de disociación mostrada en la figura 54. Se indican los genotipos del VHC y los valores de T_m observados experimentalmente.

La figura 56 proporciona un gráfico de primera derivada de un análisis de curva de disociación (T_m) utilizando una sonda de genotipado de HCV de marcaje único FAM, un ácido nucleico diana sintético correspondiente al

genotipo 1a/b del VHC y cuatro concentraciones crecientes de azul de metileno. Se muestran las secuencias de la sonda y del molde sintético, que forman un dúplex de correspondencia perfecta. Los resultados de los cuatro experimentos independientes se proporcionan solapados en el mismo gráfico. Se muestra un subconjunto representativo de los datos.

La figura 57 proporciona un gráfico de primera derivada de un análisis de la curva de disociación (T_m) utilizando una sonda de genotipado de VHC de marcaje único FAM, un ácido nucleico diana sintético correspondiente al genotipo 6 del VHC y cuatro concentraciones crecientes de azul de metileno. Se muestran las secuencias de la sonda y del molde sintético, que forman un dúplex con un apareamiento incorrecto. Los resultados de los cuatro experimentos independientes se proporcionan solapados en el mismo gráfico. Se muestra un subconjunto representativo de los datos.

La figura 58 proporciona un gráfico de primera derivada de un análisis de la curva de disociación (T_m) utilizando una sonda de genotipado de VHC de marcaje único FAM, un ácido nucleico diana sintético correspondiente al genotipo 5 del VHC y cuatro concentraciones crecientes de azul de metileno. Se muestran las secuencias de la sonda y del molde sintético, que forman un dúplex con dos posiciones de apareamiento incorrecto. Los resultados de los cuatro experimentos independientes se proporcionan solapados en el mismo gráfico. Se muestra un subconjunto representativo de los datos.

La figura 59 proporciona un gráfico de primera derivada de un análisis de la curva de disociación (T_m) utilizando una sonda de genotipado de VHC de marcaje único FAM, un ácido nucleico diana sintético correspondiente al genotipo 2a/c del VHC y cuatro concentraciones crecientes de azul de metileno. Se muestran las secuencias de la sonda y del molde sintético, que forman un dúplex con tres posiciones de apareamiento incorrecto. Los resultados de los cuatro experimentos independientes se proporcionan superpuestos en el mismo gráfico. Se muestra un subconjunto representativo de los datos.

La figura 60 proporciona un resumen en gráfico de columnas de las determinaciones de la T_m utilizando las sondas de VHC indicadas con los diversos moldes sintéticos del VHC mostrados. Las determinaciones de la T_m se realizaron utilizando diversas concentraciones de desactivador soluble de azul de metileno nuevo, tal como se indica. En un conjunto de determinaciones de la T_m , se utilizó una sonda no marcada conjuntamente con el indicador verde SYBR[®]. Se muestra un subconjunto representativo de los datos.

La figura 61 proporciona un resumen de gráfico de columnas de las determinaciones de la T_m utilizando la sonda del VHC proporcionadas en la figura 52A y moldes sintéticos manipulados que contenían apareamientos incorrectos de una sola base en diversas combinaciones de apareamiento incorrecto. Las determinaciones de la T_m se realizaron utilizando dos concentraciones diferentes de desactivador soluble de azul de metileno, tal como se indica. También se muestra en el gráfico de columnas los valores predichos de T_m de los diversos dúplex (en ausencia de azul de metileno) generados por el software Visual OMP (DNA Software Inc., Ann Arbor, MI).

La figura 62 proporciona secuencias de nucleótidos correspondientes o derivadas del genoma del VIH que resultan útiles en la invención. Entre las secuencias se incluyen la región cebadora de amplificación directa SK145 del VIH, el complemento inverso de la región cebadora de amplificación inversa GAG 152 y el complemento inverso de la región sonda de cuantificación de 5'-nucleasa GAG108FBHQ29I del VIH.

La figura 63 proporciona un gráfico con los resultados de la cuantificación de la amplificación del ARN de VIH (RT-PCR) utilizando los cebadores de amplificación SK145BU y GAG152BU y la sonda de cuantificación 5'-nucleasa GAG108FBHQS9I. Se utilizan diversos ARN molde de VIH (10^6 copias cada uno) en las reacciones de amplificación, tal como se muestra. No se encuentra pigmento tiazina en las reacciones. Los resultados de cada análisis de genotipo se proporcionan solapados en el mismo gráfico. Se muestra un subconjunto representativo de los datos. Se proporciona el número C_T para los diversos genotipos del VIH sometidos a ensayo. Se proporciona el número C_T de los diversos genotipos de VIH sometidos a ensayo.

La figura 64 proporciona un gráfico con los resultados de un análisis de cuantificación de la amplificación del ARN de VIH idéntico al descrito en la figura 63, excepto en que cada una de las reacciones también contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de azul de metileno nuevo.

La figura 65 proporciona un gráfico con los resultados de la cuantificación de la amplificación de ARN de VIH (RT-PCR) utilizando los cebadores de amplificación SK145BU y GAG152BU y la sonda de cuantificación 5'-nucleasa GAG108FBHQ29I. Se utilizó un molde de ARN correspondiente al genotipo 110-5 del VIH en la reacción de amplificación (10^6 copias). Este genotipo resulta en un total de seis apareamientos incorrectos bajo el cebador directo y un apareamiento incorrecto bajo la sonda de cuantificación 5'-nucleasas. Se utilizaron en las reacciones concentraciones crecientes de azul de metileno nuevo. Los resultados de cada análisis se proporcionan superpuestos en el mismo gráfico. Se muestra un subconjunto representativo de los datos. Se proporciona el número C_T de cada una de las diversas reacciones de amplificación.

La figura 66 proporciona un gráfico con los resultados de la cuantificación de la amplificación del ARN del VIH (RT-PCR) utilizando los cebadores de amplificación SK145B7 y GAG152BU. Se utilizó un ARN molde correspondiente al genotipo 110-5 del VIH en la reacción de amplificación (10^6 copias). La detección y amplificación del amplicón se realizó mediante la adición de verde SYBR[®] a la reacción. Se utilizaron en las reacciones diferentes concentraciones de verde SYBR[®] de Molecular Probes (1X, que es una dilución 1:10.000 de la solución madre de pigmento SYBR[®], y 4X, que es una dilución 1:2.500 de la solución madre de pigmento) y azul de metileno nuevo (0 a 50 µg/ml). Los resultados de cada análisis se proporcionan superpuestos en el mismo gráfico. Se muestra un subconjunto representativo de los datos. Se indica el número C_T observado para cada reacción.

Descripción detallada

Introducción

La presente invención proporciona métodos simples y robustos y otros aspectos relacionados con la modulación de las emisiones lumínicas de ácidos nucleicos marcados. A título ilustrativo, los ácidos nucleicos marcados, tales como las sondas de 5'-nucleasa, las balizas moleculares, los cebadores SCORPION[®], las sondas de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), etc., se utilizan comúnmente para detectar ácidos nucleicos en diversas aplicaciones, incluyendo el genotipado, el diagnóstico, medicina forense, entre muchos otros bien conocidos por el experto en la materia. Muchas de dichas sondas incluyen grupos de marcaje emisores de luz, tales como pigmentos informadores fluorescentes y grupos desactivadores que reducen la emisión detectable de luz de los grupos emisores de luz al encontrarse dos grupos adecuadamente próximos entre sí. Aunque estos grupos desactivadores reducen las emisiones detectables de luz, esta reducción con frecuencia es incompleta. Es decir, estas sondas múltiplemente marcadas frecuentemente presentan una emisión asociada de luz residual o de línea base. A medida que se incrementa la cantidad de sonda en una mezcla de reacción, sea debido a la utilización de múltiples conjuntos de diferentes sondas en aplicaciones múltiplex, o cantidades más altas de una sonda dada en esencialmente cualquier aplicación, esta emisión de luz de línea base también tiende a incrementarse. Las emisiones de luz de línea base tales como estas típicamente impactan negativamente sobre el rendimiento de ensayos que implican dichas sondas mediante, por ejemplo, la limitación de la sensibilidad (es decir, la capacidad del ensayo de discriminar entre diferencias pequeñas de concentración del analito) y el rango dinámico (es decir, el rango útil del ensayo que se extiende desde la concentración más baja a la que pueden realizarse mediciones cuantitativas (límite de cuantificación, o LOQ) hasta la concentración a la que la curva de calibración se aparta de la linealidad (límite de linealidad, LOL) de detección). De esta manera, determinados modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria se utilizan para reducir adicionalmente, si no eliminar, dicha emisiones de luz de línea base en algunas realizaciones, con el fin de mejorar el rendimiento de ensayos que incluyen estos tipos de sondas marcadas.

Además de proporcionar enfoques para modular las emisiones de luz de sondas que comprenden múltiples marcajes, tales como aquéllas que presentan parejas de grupos informador y desactivador, la invención también proporciona lo necesario para la modulación de las emisiones de luz de sondas, incluyendo cada una únicamente un solo grupo emisor de luz. Estos enfoques también pueden utilizarse para llevar a cabo la detección en tiempo real de ácidos nucleicos diana, incluyendo los ensayos basados en transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR cinética) con rangos dinámicos de la señal que resultan adecuados para la detección altamente sensible. De manera similar a otros enfoques múltiplex descritos en la presente memoria, en determinadas realizaciones puede utilizarse un único tipo de modificador de la emisión lumínica para desactivar múltiples sondas de marcaje único que presentan diferentes grupos emisores de luz en la misma mezcla de reacción para llevar a cabo la detección simultánea de múltiples ácidos nucleicos diana. Además, las sondas de marcaje único típicamente resultan más fáciles de sintetizar y menos caras de producir que las sondas de marcaje múltiple.

A modo de visión general, la invención proporciona mezclas de reacción que incluyen oligonucleótidos marcados emisores de luz (por ejemplo sondas de 5'-nucleasa, etc.) y modificadores de la emisión lumínica (por ejemplo modificadores solubles de la emisión lumínica) que modifican la emisión de luz de los oligonucleótidos. Entre los modificadores ejemplares de la emisión lumínica se incluyen una diversidad de pigmentos diazina y tiazina. En determinadas realizaciones estas mezclas de reacción, o componentes de las mismas, se incluyen en kits. También se proporcionan métodos para modificar la emisión de luz de oligonucleótidos marcados, por ejemplo como parte de ensayos de amplificación de ácidos nucleicos en los que se detectan ácidos nucleicos diana en tiempo real. Además, también se proporcionan sistemas para detectar la luz emitida por oligonucleótidos marcados presentes en las mezclas de reacción indicadas en la presente memoria. Estos aspectos y una diversidad de otros aspectos y características de la presente invención resultarán evidentes tras una revisión completa de la presente exposición.

A título ilustrativo, las figuras 1A y B muestran esquemáticamente un ensayo en el que se utilizaron modificadores de la emisión lumínica para desactivar sustancialmente emisiones lumínicas de una sonda de 5'-nucleasa que se encontraba marcada con un único grupo emisor de luz (por ejemplo un pigmento fluorescente, etc.). Tal como se muestra en la figura 1A, la mezcla de reacción incluye el ácido nucleico diana **100**, el cebador **102**, la sonda **104** y la polimerasa **110** (que presenta una actividad de nucleasa 5' a 3'). El fluoróforo **106** se encuentra covalentemente

unido en el extremo 5' terminal de la sonda **104** o en una posición próxima a dicho extremo. Tal como se muestra adicionalmente, la mezcla de reacción también incluye el modificador de la emisión lumínica **108**, que se asocia no covalentemente al ácido nucleico diana **100** y al cebador **102**. El modificador **108** de la emisión lumínica también se asocia no covalentemente a la sonda **104**, desactivando sustancialmente la fluorescencia emitida por la sonda **104**. Tal como se muestra en la fig. 1B, a medida que transcurre el ensayo, la polimerasa **110** corta fragmentos de la sonda **104**, que se encuentra unida al ácido nucleico diana **100**. Durante este proceso, un fragmento que comprende el fluoróforo **106** resulta liberado de la parte restante de la sonda **104**. Como consecuencia, resulta un incremento detectable de la fluorescencia, debido a que la fluorescencia emitida por el fluoróforo **106** del fragmento se encuentra menos desactivada que la sonda **104** antes del corte. Es decir, los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria típicamente desactivan o reducen las emisiones lumínicas de los ácidos nucleicos marcados de una manera dependiente de la longitud.

A título ilustrativo adicional, las figuras 2A y B ilustran esquemáticamente un ensayo en el que se utilizan modificadores de la emisión lumínica para reducir las emisiones de línea base de una sonda de 5'-nucleasa con doble marcaje. Tal como se muestra en la fig. 2A, una mezcla de reacción incluye el ácido nucleico diana **200**, el cebador **202**, la sonda **204** y la polimerasa **212** (que presenta una actividad nucleasa 5' a 3'). El fluoróforo **208** se encuentra covalentemente unido a un extremo 5' de la sonda **204** y el desactivador **206** se encuentra covalentemente unido a un extremo 3'-terminal de la sonda **204**. Aunque no se muestra en la presente memoria, el fluoróforo **208** o el desactivador **206** pueden unirse opcionalmente a residuos internos de la sonda **204**. Tal como se muestra adicionalmente, la mezcla de reacción también incluye el modificador **210** de la emisión lumínica, que se asocia no covalentemente al ácido nucleico diana **200** y al cebador **202**. El modificador **210** de la emisión lumínica también se asocia no covalentemente a la sonda **204**, reduciendo la fluorescencia de línea base emitida por la sonda **204**. Tal como se muestra en la figura 2B, a medida que transcurre el ensayo, la polimerasa **212** corta fragmentos de la sonda **204**, que se encuentra unida al ácido nucleico diana **200**. De manera similar al procedimiento descrito anteriormente con respecto a las figuras 1A y B, se libera un fragmento que comprende el fluoróforo **208** y resulta un incremento detectable de la fluorescencia.

Mezclas de reacción

Las mezclas de reacción de la invención pueden utilizarse en una amplia diversidad de aplicaciones en las que resulte deseable modificar la emisión de luz de ácidos nucleicos marcados. En algunas realizaciones, por ejemplo, las mezclas de reacción indicadas en la presente memoria se utilizan para llevar a cabo ensayos homogéneos de amplificación/detección (por ejemplo PCR en tiempo real, etc.), particularmente en formatos múltiplex en los que se agrupan sondas de marcaje múltiple. Algunos de los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria reducen la emisión de línea base de luz de las sondas marcadas bajo las variadas condiciones de temperatura y otras condiciones de reacción utilizadas típicamente en estos tipos de ensayo, al contrario que muchos compuestos anteriormente conocidos. Además de los modificadores de la emisión lumínica y los oligonucleótidos marcados, a continuación se describen en mayor detalle otros reactivos que se incluyen opcionalmente en las mezclas de reacción de la invención.

Modificadores de la emisión lumínica

Los modificadores de la emisión lumínica utilizados en las mezclas de reacción y otros aspectos de la invención típicamente incluyen una diversidad de propiedades por las que resultan perfectamente adecuados para modular o modificar las emisiones de luz de sondas marcadas en diversos tipos de reacciones de amplificación y ensayos de ácidos nucleicos. A título ilustrativo, estos modificadores de la emisión lumínica típicamente se unen a ácidos nucleicos tanto monocatenarios (por ejemplo sondas monocatenarias) como a ácidos nucleicos bicatenarios (por ejemplo sondas monocatenarias hibridadas a ácidos nucleicos diana). Además, sin restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria generalmente se unen a ácidos nucleicos y modifican la emisión lumínica de marcajes asociados a los ácidos nucleicos de una manera dependiente de la longitud. Es decir, el grado en que un modificador de la emisión lumínica modifica la emisión de luz de un oligonucleótido marcado dado es típicamente proporcional a la longitud de dicho oligonucleótido. Por ejemplo, un modificador particular de la emisión lumínica generalmente modificará la emisión de luz de los fragmentos marcados del oligonucleótido en menor grado que del oligonucleótido intacto o de longitud completa, por ejemplo antes del corte en una reacción de 5'-nucleasa. Un modificador dado de la emisión lumínica típicamente también es capaz de modificar eficazmente la emisión lumínica de una diversidad de diferentes grupos emisores de luz. En otras palabras, las modificaciones (por ejemplo la desactivación) realizadas por estos modificadores de la emisión lumínica generalmente son independientes del solapamiento espectral, es decir son universales, y, sin restringirse a ninguna teoría particular referida a su funcionamiento, es probable que se produzcan a partir de la formación de complejo en estado fundamental. Ésta es una propiedad importante, por ejemplo en ensayos múltiplex en los que se utilizan comúnmente múltiples sondas marcadas con diferentes fluoróforos o con otros grupos de marcaje.

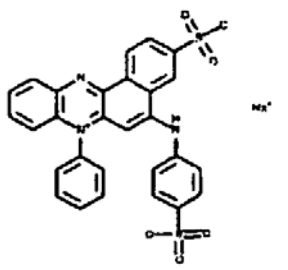
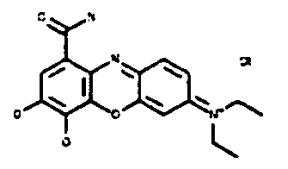
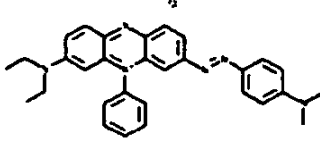
A título ilustrativo adicional, los modificadores de la emisión lumínica de la invención generalmente permanecen unidos, y modifican las emisiones lumínicas de, pro ejemplo, sondas de longitud completa a temperaturas utilizadas comúnmente en, por ejemplo, la monitorización mediante PCR cinética (por ejemplo temperaturas de hibridación comprendidas entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 60°C; temperaturas de extensión comprendidas

entre aproximadamente 65°C y aproximadamente 80°C, temperaturas de la etapa de hibridación-extensión comprendidas entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 80°C para PCRs de dos etapas, etc.). Las condiciones de reacción de PCR adecuadas también se describen posteriormente y en, por ejemplo, Gelfand *et al.* (editores), PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Elsevier Science & Technology Books, 1999.

Además, los modificadores de la emisión lumínica de la invención presentan la capacidad de unirse y de modificar las emisiones lumínicas de sondas de longitud completa en mezclas de reacción que incluyen diversos otros componentes de PCR, tales como tampones, sales, iones metálicos, cebadores, dNTPs, ddNTPs u otros nucleótidos terminadores, glicerol, DMSO, poli-rA y similares. Los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria también generalmente no interfieren apreciablemente en ninguna de las etapas utilizadas en la PCR (por ejemplo la hibridación, la extensión y la desnaturalización). En las aplicaciones de RT-PCR, los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria también típicamente no inhiben significativamente las etapas de transcripción inversa. Una ventaja adicional de dichos modificadores de la emisión lumínica es que continúan modificando la emisión lumínica de las sondas de longitud completa incluso en presencia de grandes cantidades de amplicones acumulados con poca contribución a estos productos de PCR. A título de ejemplo adicional, los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria tampoco presentan suficiente, si alguna, fluorescencia intrínseca en determinadas regiones del espectro visible que pueda interferir o sesgar la detección en el ensayo. Muchos de dichos atributos también se ilustran en los ejemplos proporcionados posteriormente o, de otra manera, a los que se hace referencia en la presente memoria.

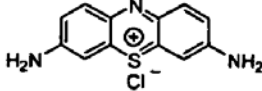
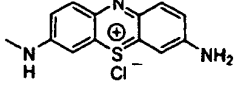
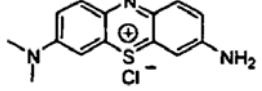
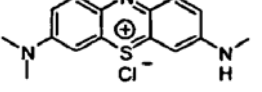
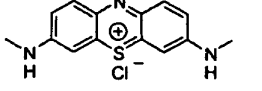
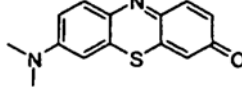
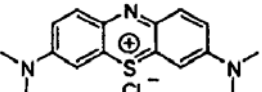
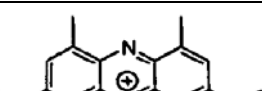
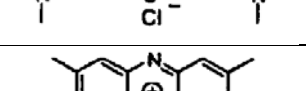
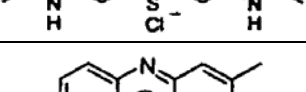
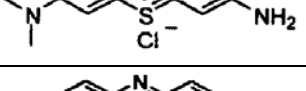
Muchos modificadores diferentes de la emisión lumínica resultan adecuados para la utilización en las mezclas de reacción y en otros aspectos de la invención. Típicamente, los modificadores de la emisión lumínica son compuestos solubles ligantes de ácidos nucleicos que son capaces de modificar la emisión lumínica de oligonucleótidos marcados, tales como las sondas de 5'-nucleasa, las balizas moleculares, o similares, a temperaturas de reacción comúnmente utilizadas al llevar a cabo etapas de reacción de PCR en tiempo real, tal como a temperaturas de hibridación de por lo menos aproximadamente 40°C, etc. En algunas realizaciones, por ejemplo, los modificadores de la emisión lumínica de la invención incluyen diversos pigmentos diazina y tiazina. Entre los pigmentos diazina ejemplares que pueden utilizarse como modificadores de la emisión lumínica se incluyen, por ejemplo, pigmentos azocarmín (por ejemplo azocarmín A, azocarmín B ($C_{28}H_{17}N_3O_9S_3Na_2$), azocarmín G ($C_{28}H_{18}N_3O_6S_2Na$), etc.), pigmentos fenazina, pigmentos oxazina (por ejemplo azul Celestine ($C_{17}H_{18}ClN_3O_4$), etc.), cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina (por ejemplo verde Janus B o verde diazina 5 ($C_{30}H_{31}N_6Cl$)) y similares. Las estructuras químicas de algunos de dichos pigmentos diazina se presentan en la Tabla I.

TABLA I

AZOCARMÍN G	
AZUL CELESTINE	
VERDE JANUS B	

A título ilustrativo adicional, entre los pigmentos tiazina ejemplares que pueden utilizarse como modificadores de la emisión lumínica se incluyen, por ejemplo, azul de metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), verde metileno ($C_{16}H_{17}ClN_4O_2S$), tionina ($C_{12}H_{10}ClN_3S$), dimetiltionina-sim, azul de toluidina O ($C_{15}H_{16}N_3SCl$), azul de metileno nuevo ($C_{18}H_{22}ClN_3S$), violeta de metileno Bernthsen, azur A ($C_{14}H_{14}ClN_3S$), azur B ($C_{15}H_{16}ClN_3S$), azur C ($C_{13}H_{12}ClN_3S$) y similares. Las estructuras químicas de algunos de estos pigmentos tiazina se presentan en la Tabla II.

TABLA II

TIONINA	
AZUR C	
AZUR A	
AZUR B	
DIMETILTIONINA-SIM	
VIOLETA DE METILENO BERNTHSEN	
AZUL DE METILENO	
AZUL DE 1,9-DIMETILMETILENO	
AZUL DE METILENO NUEVO	
AZUL DE TOLUIDINA O	
VERDE DE METILENO	

La cantidad del modificador particular de emisión lumínica incluida en una mezcla de reacción dada típicamente depende del grado de modificación buscado. Típicamente, el grado de modificación de la emisión lumínica es proporcional a la cantidad de modificador de emisión lumínica presente en una mezcla de reacción. Aunque opcionalmente se utilizan otras cantidades, los modificadores de la emisión lumínica se encuentran típicamente presentes a una concentración comprendida entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 100 µg/ml de mezcla de reacción, más típicamente entre aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 75 µg/ml de mezcla de reacción, y todavía más típicamente entre aproximadamente 15 µg/ml y 50 µg/ml de mezcla de reacción (por ejemplo aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, etc.). En algunas realizaciones, las mezclas de reacción incluyen concentraciones de modificador de la emisión lumínica en exceso de las concentraciones de amplicón. Los efectos de diversas concentraciones de modificador de la emisión lumínica en mezclas de reacción se ilustran adicionalmente en los ejemplos proporcionados posteriormente. En algunas realizaciones puede utilizarse más de un modificador de la emisión lumínica en la misma mezcla de reacción. En estas realizaciones, los diferentes modificadores de la emisión lumínica se encuentran opcionalmente presentes a la misma concentración o a concentraciones diferentes en la mezcla de reacción particular. A título de ejemplo, una mezcla de reacción puede incluir 20 µg de azul de metileno nuevo por ml de mezcla de reacción y 30 µg de azul de

metileno por ml de mezcla de reacción. Los modificadores de emisión lumínica se encuentran fácilmente disponibles de diversos proveedores comerciales, incluyendo, por ejemplo, Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA).

Oligonucleótidos marcados

5 Las mezclas de reacción de la invención incluyen oligonucleótidos marcados además de modificadores de la emisión lumínica. El experto en la materia puede utilizar diversos enfoques para diseñar oligonucleótidos para la utilización como sondas (por ejemplo sondas de 5'-nucleasa, balizas moleculares, sondas FRET, etc.) y/o cebadores. A título ilustrativo, el paquete informático DNASTar, disponible de DNASTAR Inc. (Madison, WI, USA) puede utilizarse para las alineaciones de secuencias. Por ejemplo, pueden cargarse las secuencias de ácidos nucleicos diana y de ácidos nucleicos no diana en el programa EditSeq de DNASTar como archivos individuales, por ejemplo como parte de un procedimiento para identificar regiones en estas secuencias que presentan una similitud de secuencias reducida. A título ilustrativo adicional, pueden abrirse parejas de archivos de secuencias en el programa de alineación de secuencias MegAlign de DNASTar y aplicarse el método de alineación Clustal W. Los parámetros utilizados para las alineaciones Clustal W opcionalmente son las configuraciones por defecto en el programa. MegAlign típicamente no proporciona un resumen del porcentaje de identidad entre dos secuencias. Esto generalmente se calcula manualmente. A partir de las alineaciones, típicamente se identifican las regiones que presentan, por ejemplo, un porcentaje de identidad inferior al seleccionado, pudiendo seleccionar las secuencias oligonucleótidas en estas regiones. También se utilizan opcionalmente muchos otros algoritmos y paquetes informáticos de alineación de secuencias. Los algoritmos de alineación de secuencias también se describen en, por ejemplo, Notredame *et al.*, "T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment", J. Mol. Biol. 302:205-217, 2000; Edgar, "MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity", BMC Bioinformatics 5:113, 2004; Mount, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, y Durbin *et al.*, Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids, Cambridge University Press, 1998.

25 A título ilustrativo adicional, puede llevarse a cabo una alineación óptima de secuencias para su comparación, por ejemplo mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, y mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (por ejemplo GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (Madison, WI, U.S.A.) o incluso mediante inspección visual.

35 Otro algoritmo de ejemplo que resulta adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencias es el algoritmo BLAST, que se describe en, por ejemplo, Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990. El software para ejecutar versiones de los análisis BLAST se encuentra disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information, en la dirección de internet ncbi.nlm.nih.gov/ desde el 30 de junio de 2005.

40 Un ejemplo adicional de un algoritmo útil de alineación de secuencias es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas por parejas. También puede generar un gráfico de árbol que muestre las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Fent & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360, 1987.

45 Las sondas y cebadores oligonucleótidos se preparan opcionalmente utilizando esencialmente cualquier técnica conocida de la técnica. En determinadas realizaciones, por ejemplo, las sondas y cebadores oligonucleótidos se sintetizan químicamente utilizando esencialmente cualquier método de síntesis de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, el método de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, 1981. A título ilustrativo adicional, los oligonucleótidos también pueden sintetizarse utilizando un método de triéster (ver, por ejemplo, Capaldi *et al.*, "Highly efficient solid phase synthesis of oligonucleotide analogs containing phosphorodithioate linkages", Nucleic Acids Res. 28(9):e40, 1981, y Eldrup *et al.*, "Preparation of oligodeoxyribonucleoside phosphorodithioates by a triester method", Nucleic Acids Res. 22(10):1797-1804). También pueden utilizarse otras técnicas de síntesis conocidas de la técnica, incluyendo, por ejemplo, la utilización de un sintetizador automático, tal como se describe en Needham-VanDevanter *et al.*, Nucleic Acids Res. 12:6159-6168, 1984. Se encuentra comercialmente disponible una amplia diversidad de equipos para la síntesis automática de oligonucleótidos. También se utilizan opcionalmente enfoques de síntesis de multinucleótidos (por ejemplo síntesis de trinucleótidos, etc.). Además, los ácidos nucleicos cebadores opcionalmente incluyen diversas modificaciones. En determinadas realizaciones, por ejemplo, los cebadores incluyen moléculas conectoras de sitio de restricción, por ejemplo, para facilitar la clonación posterior del amplicón o similar. A título ilustrativo adicional, los cebadores también se modifican opcionalmente para mejorar la especificidad de las reacciones de amplificación, tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 6.001.611. También pueden sintetizarse cebadores y sondas con diversas otras modificaciones (por ejemplo sitios de restricción, sitios de unión de enzima, etc.), tal como se describe en la presente memoria o como, de otra manera, es conocido de la técnica.

Las sondas y/o cebadores utilizados en las mezclas de reacción, métodos y otros aspectos de la invención típicamente se marcan para permitir la detección de los dúplex de hibridación sonda-diana. En general, un marcaje puede ser cualquier grupo que pueda unirse a un ácido nucleico y proporcionar una señal detectable (por ejemplo una señal cuantificable). Los marcajes pueden unirse a oligonucleótidos directa o indirectamente mediante una diversidad de procedimientos conocidos de la técnica. A título ilustrativo, dependiendo del tipo de marcaje utilizado, el marcaje puede unirse a un nucleótido terminal (extremo 5' o 3' de un oligonucleótido cebador y/o sonda) o no terminal, y puede unirse indirectamente mediante moléculas conectoras o brazos espaciadores de diversos tamaños y composiciones. Mediante la utilización de reactivos fosforamídita disponibles comercialmente, pueden producirse oligonucleótidos que contienen grupos funcionales (por ejemplo tioles o aminas primarias) en el extremo 5' o 3' mediante una fosforamídita apropiadamente protegida, y pueden marcarse dichos oligonucleótidos utilizando protocolos descritos en, por ejemplo, Innis *et al.* (editores), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Elsevier Science & Technology Books, 1990, Innis.

Opcionalmente se utiliza esencialmente cualquier grupo de marcaje para marcar una sonda y/o cebador mediante técnicas bien conocidas de la técnica. En algunas realizaciones, por ejemplo, los marcajes comprenden un pigmento fluorescente (por ejemplo un pigmento rodamina (por ejemplo R6G, R110, TAMRA, ROX, etc.), un pigmento fluoresceína (por ejemplo JOE, VIC, TET, HEX, FAM, etc.), un pigmento halofluoresceína, un pigmento cianina (por ejemplo CY3, CY3.5, CY5, CY5.5, etc.), un pigmento BODIPY[®] (por ejemplo FL, 530/550, TR, TMR, etc.), un pigmento ALEXA FLUOR[®] (por ejemplo 488, 532, 546, 568, 594, 555, 653, 647, 660, 680, etc.), un pigmento diclororodamina, un pigmento de transferencia de energía (por ejemplo los pigmentos BIGDYE TM v1, v2, v3, etc.), pigmentos lucifer (por ejemplo amarillo Lucifer, etc.), CASCADE BLUE[®], verde Oregon y similares. Se proporcionan ejemplos adicionales de pigmentos fluorescentes en, por ejemplo, Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, novena edición, 2003, y actualizaciones del mismo. Los pigmentos fluorescentes generalmente se encuentran fácilmente disponibles de diversos proveedores comerciales, incluyendo, por ejemplo, Molecular Probes Inc. (Eugene, OR), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ), Applied Biosystems (Foster City, CA), etc. Entre otros marcajes se incluyen, por ejemplo, biotina, marcajes débilmente fluorescentes (Yin *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 69(7):3938, 2003; Babendure *et al.*, Anal. Biochem. 317(1):1, 2003, y Jankowiak *et al.*, Chem. Res. Toxicol. 16(3):304, 2003), marcajes no fluorescentes, marcajes colorimétricos, marcajes quimioluminiscentes (Wilson *et al.*, Analyst 128(5):40, 2003, y Roda *et al.*, Luminescence 18(2):72, 2003), marcajes Raman, marcajes electroquímicos, marcajes bioluminiscentes (Kitayama *et al.*, Photochem. Photobiol. 77(3):333, 2003; Arakawa *et al.*, Anal. Biochem. 314(2):206, 2003, y Maeda, J. Pharm. Biomed. Anal. 30(6):1725, 2003) y un reactivo de marcaje alfa-metil-PEG, tal como se describe en, por ejemplo, la solicitud provisional de patente US nº 60/428.484. También se describe adicionalmente el marcaje de ácidos nucleicos posteriormente.

Además, que un pigmento fluorescente sea un donante o un aceptor generalmente se define a partir de sus espectros de excitación y emisión, y el pigmento fluorescente con el que se encuentra emparejado. Entre las moléculas fluorescentes comúnmente utilizadas como grupos desactivadores en sondas y cebadores se incluyen, por ejemplo, fluoresceína, FAM, JOE, rodamina, R6G, TAMRA, ROX, DABCYL y EDANS. Muchos de estos compuestos se encuentran disponibles de los proveedores comerciales anteriormente indicados. Entre los desactivadores ejemplares no fluorescentes u oscuros que disipan energía absorbida de un pigmento fluorescente se incluyen los desactivadores Black Hole QuenchersTM o BHQTM, que se encuentran disponibles comercialmente de Biosearch Technologies Inc. (Novato, CA, USA).

A título ilustrativo adicional, puede encargarse específicamente o rutinariamente esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, estándar o no estándar) de cualquiera de entre una diversidad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company, The Great American Gene Company, ExpressGen Inc., Operon Technologies Inc., Prologo LLC y muchos otros.

En determinadas realizaciones, se incluyen nucleótidos modificados en sondas y cebadores. A título ilustrativo, la introducción de sustituciones de nucleótidos modificados en secuencias oligonucleótidas puede, por ejemplo, incrementar la temperatura de disociación de los oligonucleótidos. En algunas realizaciones, lo anterior puede proporcionar una mayor sensibilidad en comparación con oligonucleótidos no modificados correspondientes, incluso en presencia de una o más apareamientos incorrectos en la secuencia entre el ácido nucleico diana y el oligonucleótido particular. Entre los nucleótidos modificados ejemplares que pueden sustituirse o añadirse en oligonucleótidos se incluyen, por ejemplo, C5-etil-dC, C5-etil-dU, 2,6-diaminopurinas, C5-propinil-dC, C7-propinil-dA, C7-propinil-dG, C5-propargilamino-dC, C5-propargilamino-dU, C7-propargilamino-dA, C7-propargilamino-dG, 7-deaza-2-desoxixantósina, análogos pirazolopirimidina, pseudo-dU, nitropirrol, nitroindol, 2'-O-metil Ribo-U, 2'-O-metil Ribo-C, una 8-aza-dA, una 8-aza-dG, una 7-deaza-dA, una 7-deaza-dG, N4-etil-dC, N6-metil-dA, etc. A título ilustrativo adicional, entre otros ejemplos de oligonucleótidos modificados se incluyen aquellos que presentan uno o más monómeros INATM. También se describen análogos de nucleótidos tales como los anteriormente indicados, en, por ejemplo, la patente US nº 6.639.059, titulada "SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES", concedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine *et al.*, patente US nº 6.303.315, titulada "ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES", concedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv, y la solicitud de patente US nº de publicación 2003/0092905, titulada "SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES", de Kochkine *et al.*, publicada el 15 de mayo de 2003. Los oligonucleótidos que

comprenden monómeros LNATM se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Exiqon A/S (Vedbæk, Dinamarca). Se hace referencia en la presente memoria a modificaciones adicionales de oligonucleótidos, incluyendo en las definiciones proporcionadas anteriormente.

- 5 Los oligonucleótidos marcados, tales como las sondas 5'-nucleasa, las sondas de hibridación, los cebadores SCORPION[®] y las balizas moleculares se describen adicionalmente en la presente memoria.

Reactivos de amplificación de ácidos nucleicos

- 10 Las mezclas de reacción de la invención típicamente incluyen cantidades seleccionadas de modificadores de la emisión lumínica y oligonucleótidos marcados, tal como se describe en la presente memoria. Además, las mezclas de reacción también incluyen generalmente diversos reactivos que resultan útiles para llevar a cabo reacciones de amplificación o detección de ácidos nucleicos, tales como la monitorización por PCR en tiempo real o los ensayos de 5'-nucleasa. Entre los reactivos ejemplares de amplificación de ácidos nucleicos se incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos cebadores, ácidos nucleicos molde o diana, biocatalizadores incorporadores de nucleótidos (por ejemplo
- 15 ADN polimerasas, etc.), nucleótidos extendibles, nucleótidos terminadores, tampones, sales, amplicones, glicerol, iones metálicos, dimetilsulfóxido (DMSO), polirA (un ácido nucleico portador para dianas de bajo número de copia) y similares. En algunas realizaciones, por ejemplo, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se llevan a cabo utilizando dichas mezclas de reacción para realizar la detección de ácidos nucleicos diana en muestras, por ejemplo para ayudar en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades. También se describen adicionalmente métodos de
- 20 amplificación y detección de ácidos nucleicos posteriormente.

- Las mezclas de reacción se producen generalmente mediante la combinación de modificadores seleccionados de emisión lumínica y oligonucleótidos marcados con cantidades de los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos que resultan suficientes para llevar a cabo el método de amplificación particular de ácidos nucleicos seleccionado.
- 25 Las cantidades de reactivos de amplificación de ácidos nucleicos que deben incluirse en una mezcla de reacción dada son bien conocidas por el experto en la materia en vista del método seleccionado de amplificación de ácidos nucleicos. Sin embargo, a título ilustrativo, cada uno de los ácidos nucleicos cebadores y nucleótidos extendibles (por ejemplo cuatro dNTPs (dGTP, dCTP, dATP, dTTP) se encuentra presente en un gran exceso molar en las mezclas de reacción en determinadas realizaciones. Los ácidos nucleicos sonda y cebadores que pueden utilizarse
- 30 en las mezclas de reacción de la invención se describen en la presente memoria. Los nucleótidos extendibles adecuados se encuentran fácilmente disponibles de muchos proveedores comerciales, incluyendo, por ejemplo, Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA), Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) y similares.

- 35 Los biocatalizadores incorporadores de nucleótidos utilizados en las mezclas de reacción y otros aspectos de la invención típicamente comprenden enzimas, tales como polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas, polinucleótido fosforilasas y similares. En determinadas realizaciones, por ejemplo, el enzima incluye una actividad de 5'-3' nucleasa, una actividad exonucleasa 3'-5' y/o es un enzima termoestable. El enzima opcionalmente se derivado de un organismo, tal como *Thermus antranikianii*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species* Z05, *Thermus species* sps 17, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Anaerocellum thermophilum*, *Bacillus caldotenax*, *Bacillus stearothermophilus* o similares.

- 45 En determinadas realizaciones, también se añaden reactivos adicionales a las mezclas de reacción de la invención. A título ilustrativo, las mezclas de reacción también incluyen opcionalmente pirofosfatasa (por ejemplo una pirofosfatasa termoestable), por ejemplo para la utilización en la minimización de la pirofosforólisis, dUTP y uracil-N-glucosilasa (UNG) (por ejemplo una UNG termoestable), por ejemplo para la protección frente a la contaminación cruzada, y similares.

- 50 Métodos de modificación de las emisiones lumínicas procedentes de oligonucleótidos marcados
La invención también proporciona métodos para modificar las emisiones lumínicas (por ejemplo las emisiones lumínicas de línea base) de oligonucleótidos marcados. Típicamente, estos métodos se llevan a cabo como parte de ensayos que implican la detección de ácidos nucleicos diana, por ejemplo para proporcionar información
- 55 diagnóstica, genética u otra información sobre sujetos de los que se derivaron los ácidos nucleicos diana. En algunas realizaciones, los modificadores de la emisión lumínica utilizados en dichos métodos reducen la emisión lumínica de oligonucleótidos marcados. Esto generalmente mejora las características de rendimiento, tales como la sensibilidad y el rango dinámico del ensayo particular (por ejemplo una técnica de PCR en tiempo real) en el que se utilizan los modificadores de emisión lumínica descritos en la presente invención.

- 60 En la práctica de los métodos de la presente invención se utilizan opcionalmente muchas técnicas convencionales de biología molecular. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, Ausubel *et al.* (editores), Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I, II y III, 1997 (Ausubel 1); Ausubel *et al.* (editores), Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 5a edición, John Wiley & Sons Inc., 2002 (Ausubel 2); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a edición,
- 65

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 (Sambrook); Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques: Methods in Enzymology, volumen 152, Academic Press Inc. (Berger); Vorbruggen *et al.*, Handbook of Nucleoside Synthesis, Organic Reactions Series nº 60, John Wiley & Sons Inc., 2001; Gait (editor), Oligonucleotide Synthesis, Oxford University Press, 1984; Hames y Higgins, Nucleic Acid Hybridization, Practical Approach Series, Oxford University Press, 1997; y Hames y Higgins (editores), Transcription and Translation, Practical Approach Series, Oxford University Press, 1984.

Entre los ejemplos de tipos generales de tecnologías de análisis de ácidos nucleicos que pueden utilizarse o adaptarse para la utilización para analizar ácidos nucleicos diana en mezclas de reacción o procedentes de las mismas, de la invención se incluyen diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Una característica común de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos es que típicamente están diseñados para amplificar secuencias de ácidos nucleicos que son específicas del organismo que se detecta. Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos generalmente presentan una mayor sensibilidad que otros enfoques de análisis de ácidos nucleicos. Esta sensibilidad, que se mejora adicionalmente con la utilización de los modificadores de emisión lumínica de la invención, típicamente es atribuible a su capacidad de producir una señal positiva a partir de tan solo una única copia del ácido nucleico diana. Entre los métodos de amplificación que opcionalmente se utilizan o se adaptan para detectar ácidos nucleicos diana se incluyen, por ejemplo, diversos métodos de amplificación mediados por polimerasa, ligasa o transcriptasa inversa, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la PCR de transcripción inversa (RT-PCR), NASBA, TMA, SDA y similares. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre la utilización de estos y otros métodos de amplificación y diversos enfoques a la preparación de muestras par estos ensayos en cualquiera de entre una diversidad de textos estándares, incluyendo, por ejemplo, Berger, Sambrook, Ausubel 1 y 2, e Innis, citados anteriormente. Los diversos ensayos comerciales de amplificación de ácidos nucleicos que se adaptan opcionalmente para la utilización con los modificadores de emisión lumínica y métodos de la invención generalmente difieren en sus métodos de amplificación y en sus secuencias de ácidos nucleicos diana. Entre los ejemplos de estos ensayos comerciales se incluyen los ensayos AMPLICOR® y COBAS AMPLICOR® (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA), que utilizan reacciones en cadena de polimerasa (PCR); el ensayo LCx® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), que utiliza reacciones en cadena de ligasa (LCR), el ensayo ET BDProbeTec™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., USA), que utiliza la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); el ensayo NucliSens EasyQ (bioMérieux, Durham, NC), que utiliza la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y el ensayo APTIMA™ (Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA), que utiliza la amplificación mediada por la transcripción (TMA). La amplificación y detección de ácidos nucleicos se describe adicionalmente después.

En determinadas realizaciones, por ejemplo, los modificadores de la emisión lumínica de la invención se utilizan en diversas reacciones de 5'-nucleasa para modificar (por ejemplo para reducir) las emisiones lumínicas de sondas de 5'-nucleasa. Muchos ensayos de 5'-nucleasa son bien conocidos por el experto en la materia. También se describen ejemplos de dichas reacciones en, por ejemplo, las patentes US nº 5.210.015, nº 6.214.979, nº 5.804.375 y nº 5.487.972, *supra*.

A modo de breve ilustración, en una reacción de 5'-nucleasa, se pone en contacto un ácido nucleico diana con un cebador y una sonda (por ejemplo una sonda de 5'-nucleasa, etc.) bajo condiciones en las que el cebador y la sonda se hibridan con una cadena del ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana, el cebador y la sonda también se ponen en contacto con una cantidad seleccionada de un modificador de la emisión lumínica y un ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de nucleasa 5' a 3'. Las ácido nucleico polimerasas que presentan actividad de nucleasa 5' a 3' pueden cortar la sonda hibridada con el ácido nucleico diana cadena abajo del cebador. El extremo 3' del cebador proporciona el sitio de unión inicial para la polimerasa. La polimerasa unidad corta fragmentos de la sonda tras encontrarse con el extremo 5' de la sonda.

El cebador y la sonda pueden diseñarse para que se hibriden en estrecha proximidad en el ácido nucleico diana, de manera que la unión de la ácido-nucleico polimerasa al extremo 3' del cebador lo ponga en contacto con el extremo 5' de la sonda en ausencia de extensión del cebador. La expresión "corte independiente de la polimerización" se refiere a este proceso. Alternativamente, en el caso de que el cebador y la sonda se hibriden a regiones más espaciadas del ácido nucleico diana, la polimerización típicamente se produce antes de que la ácido-nucleico polimerasa se encuentre con el extremo 5' de la sonda. A medida que continúa la polimerización, la polimerasa progresivamente corta fragmentos del extremo 5' de la sonda. Este proceso de corte continúa hasta la desestabilización del resto de la sonda en grado suficiente para que se disocie de la molécula de molde. La expresión "corte dependiente de la polimerización" se refiere a este proceso.

Una ventaja del corte independiente de la polimerización radica en la eliminación de la necesidad de amplificar el ácido nucleico. Con la condición de que el cebador y la sonda se encuentren unidos contiguamente al ácido nucleico, pueden producirse rondas secuenciales de hibridación de la sonda y corte de fragmentos. De esta manera, puede generarse una cantidad suficiente de fragmentos, permitiendo la detección en ausencia de polimerización.

En cualquiera de los dos procesos, se proporciona una muestra que se cree que contiene el ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana contenido en la muestra en primer lugar puede transcribirse inversamente formando ADNc, en

caso necesario, y después desnaturalizarse utilizando cualquier método de desnaturalización adecuado, incluyendo métodos físicos, químicos o enzimáticos, que son conocidos por el experto en la materia. Un enfoque físico ejemplar para llevar a cabo la separación de cadenas implica el calentamiento del ácido nucleico hasta su completa desnaturalización (>99%). La desnaturalización por calor típica implica temperaturas comprendidas entre aproximadamente 85°C y aproximadamente 105°C durante periodos de tiempo comprendidos entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 minutos. A modo de alternativa a la desnaturalización, el ácido nucleico puede existir en forma monocatenaria en la muestra, tal como, por ejemplo los virus de ARN o ADN monocatenarios.

El ácido nucleico diana desnaturalizado típicamente se incuba con un cebador, una sonda y el modificador de emisión lumínica seleccionado bajo condiciones de hibridación que permiten que el cebador y la sonda se unan a la cadena de ácido nucleico diana y que el modificador de emisión lumínica se una a por lo menos la sonda. En algunas realizaciones, pueden utilizarse dos cebadores para amplificar el ácido nucleico diana. Los dos cebadores se seleccionan típicamente de manera que sus posiciones relativas a lo largo del ácido nucleico diana permitan que un producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, en el momento de separarse el producto de extensión de su molde (complemento), sirva como molde para la extensión del otro cebador, rindiendo una cadena replicada de longitud definida. En formatos múltiplex, típicamente se utilizan múltiples sondas en un único recipiente de reacción para detectar simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana.

Debido a que las cadenas complementarias típicamente son más largas que la sonda o que el cebador, las cadenas presentan más puntos de contacto y de esta manera presentan una mayor probabilidad de unirse entre sí a lo largo de un periodo de tiempo dado. Por consiguiente, típicamente se utiliza un exceso molar elevado de sonda y cebador para favorecer la hibridación de cebador y sonda respecto a la rehibridación de la cadena de molde.

Los cebadores presentan generalmente una longitud y complementariedad suficientes para que se unan selectivamente a ácidos nucleicos diana bajo condiciones seleccionadas para permitir que se produzca el corte independiente o dependiente de la polimerización. La longitud y composición exactas del cebador dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura de la reacción de hibridación, la fuente y composición del cebador, la proximidad del sitio de hibridación de la sonda al sitio de hibridación del cebador, y la proporción entre las concentraciones de cebador y sonda. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador típicamente incluye aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, aunque puede contener más o menos nucleótidos.

La sonda generalmente se hibrida a su ácido nucleico diana complementario antes de que la ácido-nucleico polimerasa encuentre esa región en el ácido nucleico diana, permitiendo de esta manera que la actividad de nucleasa 5' a 3' del enzima corte fragmentos de la sonda. Para incrementar la probabilidad de que la sonda se hibride al ácido nucleico diana antes de que la polimerasa alcance esta región de hibridación, puede utilizarse una diversidad de técnicas. Por ejemplo, los cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el ácido nucleico. Por lo tanto, puede diseñarse que la sonda sea más larga que el cebador de manera que la sonda se hibride preferentemente al ácido nucleico diana a temperaturas más altas en comparación con la hibridación del cebador. A título ilustrativo adicional, pueden utilizarse cebadores y sondas que presenten una estabilidad térmica diferente. Por ejemplo, puede seleccionarse la composición de nucleótidos de la sonda para que presente un contenido mayor de G/C y, en consecuencia, una mayor estabilidad térmica que el cebador. Opcionalmente, pueden incorporarse nucleótidos modificados en cebadores o sondas para proporcionar una estabilidad térmica más alta o baja en comparación con cebadores o sondas que presenten únicamente nucleótidos no modificados. Se han descrito anteriormente nucleótidos modificados ejemplares. Los parámetros de termociclado también pueden modificarse para aprovechar la diferente estabilidad térmica de sonda y cebador. Por ejemplo, tras una etapa de desnaturalización del termociclado, puede introducirse una temperatura intermedia que permita la unión de la sonda pero no la unión del cebador. A continuación, la temperatura puede reducirse adicionalmente para permitir la hibridación del cebador. Para favorecer preferentemente la unión de la sonda frente al cebador también puede utilizarse un exceso molar elevado de sonda respecto a la concentración de cebador. Dichas concentraciones de sonda típicamente se encuentran comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 veces más que la concentración respectiva del cebador, que generalmente es de entre aproximadamente $0,5 \times 10^{-7}$ y 5×10^{-7} M.

La extensión dependiente de molde de los cebadores generalmente está catalizada por un biocatalizador incorporador de nucleótidos (por ejemplo una polimerasa, etc.) en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro desoxiribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) o análogos en una mezcla de reacción que también incluye modificadores de la emisión lumínica y sales apropiadas, cationes metálicos y tampones. Anteriormente se han descrito adicionalmente mezclas de reacción. Los biocatalizadores adecuados incorporadores de nucleótidos son enzimas que es conocido que catalizan la síntesis de ADN dependiente de cebador y molde y que presentan actividad de nucleasa 5' a 3'. Entre las ADN polimerasas ejemplares de este tipo se incluyen la ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa *Tth*, la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*, la ADN polimerasa Taq, la ADN polimerasa ZO5 de *Thermus* sp., la ADN polimerasa de *Thermatoga maritima*, la ADN polimerasa de *Thermatoga neopolitana* y la ADN polimerasa de *Thermosipho africanus*. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con estas ADN polimerasas son bien conocidas de la técnica. Típicamente, el biocatalizador incorporador

de nucleótidos corta eficientemente la sonda y libera fragmentos marcados, de manera que se genera directa o indirectamente una señal detectable.

Los productos de la síntesis son generalmente moléculas dúplex que incluyen las cadenas de molde y las cadenas de extensión de cebadores. Los productos secundarios de esta síntesis son fragmentos de sonda, que pueden incluir una mezcla de mononucleótido, dinucleótido y fragmentos nucleótidos más grandes. La repetición de ciclos de desnaturalización, hibridación de sonda y cebador y extensión de cebador y corte de la sonda resultan en la acumulación exponencial de la región definida por los cebadores y la generación exponencial de fragmentos marcados. Se llevan a cabo suficientes ciclos para conseguir una cantidad detectable de fragmentos de sonda, que es generalmente varios órdenes de magnitud superior a la señal de fondo. La utilización de modificadores de la emisión lumínica tal como se ha descrito en la presente memoria puede reducir efectivamente el número de ciclos realizados antes de producirse una señal detectable respecto a ensayos que no reducen dichas señales de fondo.

En determinadas realizaciones, las reacciones de PCR se llevan a cabo como un procedimiento automático, que utiliza un enzima termoestable. En este procedimiento, la mezcla de reacción se cicla a través de una etapa de desnaturalización, una etapa de hibridación de sonda y cebador y una etapa de síntesis en la que el corte y el desplazamiento ocurren simultáneamente con la extensión del molde dependiente del cebador. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se llevan a cabo utilizando un sistema. Estos sistemas se describen en mayor detalle posteriormente. Opcionalmente pueden utilizarse ciclos térmicos, tales como aquellos disponibles comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), que están diseñados para la utilización con enzimas termoestables.

Las polimerasas termoestables típicamente se utilizan en procesos automáticos que realizan la desnaturalización de productos de extensión bicatenarios mediante la exposición de los mismos a temperaturas elevadas (por ejemplo aproximadamente 95°C) durante el ciclo de la PCR. Por ejemplo, la patente US nº 4.889.818, titulada "PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME", concedida el 26 de diciembre de 1989 a Gelfand *et al.*, da a conocer un enzima termoestable representativo aislado de *Thermus aquaticus*. Entre las polimerasas termoestables representativas se incluyen, por ejemplo, polimerasas extraídas de las bacterias termoestables *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (que presenta un óptimo de temperatura algo menor que las demás temperaturas indicadas), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga maritima*, *Thermatoga neopolitana*, *Thermosipho africanus*, *Thermococcus littoralis* y *Methanothermus fervidus*.

La hibridación de sondas a ácidos nucleicos diana puede conseguirse seleccionando condiciones de hibridación apropiadas. La estabilidad del híbrido de ácidos nucleicos de sonda:diana típicamente se selecciona para que resulte compatible con el ensayo y las condiciones de lavado de manera que se formen híbridos detectables estables únicamente entre las sondas y los ácidos nucleicos diana. La manipulación de uno o más de los diferentes parámetros de ensayo determina la sensibilidad y especificidad exactas de un ensayo de hibridación particular.

Más específicamente, la hibridación entre bases complementarias de ADN, ARN, APN, o combinaciones de ADN, ARN y APN se produce bajo una amplia diversidad de condiciones que varían en temperatura, concentración salina, fuerza electrostática, composición del tampón y similar. Los ejemplos de estas condiciones y los métodos para aplicarlas se describen en, por ejemplo, Tijssen, Hybridization with Nucleic Acid Probes, vol. 24, Elsevier Science, 1993, y en Hames y Higgins, *supra*. La hibridación generalmente tiene lugar entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 70°C durante periodos de entre aproximadamente un minuto y aproximadamente una hora, dependiendo de la naturaleza de la secuencia que debe hibridarse y su longitud. Sin embargo, se reconoce que las hibridaciones pueden producirse en segundos u horas, dependiendo de las condiciones de la reacción. A título ilustrativo, las condiciones de hibridación típicas para una mezcla de dos 20-meros es llevar la temperatura hasta 68°C, seguido del enfriamiento hasta la temperatura ambiente (22°C) durante cinco minutos, o a temperaturas muy bajas, tales como 2°C, en 2 microlitros. La hibridación entre ácidos nucleicos puede facilitarse utilizando tampones tales como Tris-EDTA (TE), Tris-HCl y HEPES, soluciones salinas (por ejemplo NaCl, KCl, CaCl₂), u otras soluciones acuosas, reactivos y compuestos químicos. Entre los ejemplos de estos reactivos se incluyen proteínas ligantes monocatenarias, tales como proteína RecA, proteína 32 del gen T4, proteína ligante monocatenaria de *E. coli* y proteínas ligantes del surco mayor o menor de los ácidos nucleicos. Entre otros ejemplos de dichos reactivos y compuestos químicos se incluyen iones divalentes, iones polivalentes y sustancias intercalantes, tales como bromuro de etidio, actinomicina D, soralén y angelicina.

En la presente invención puede utilizarse esencialmente cualquier método disponible para detectar ácidos nucleicos diana. Entre los enfoques comunes se incluyen la detección de la amplificación en tiempo real con sondas 5'-nucleasa, los cebadores SCORPION® o las balizas moleculares, la detección de pigmentos intercalantes, la detección de marcajes incorporados en las sondas de amplificación o los ácidos nucleicos amplificados mismos, por ejemplo tras la separación electroforética de los productos de amplificación respecto del marcaje no incorporado, los ensayos basados en la hibridación (por ejemplo los ensayos basados en matrices) y/o la detección de reactivos secundarios que se unen a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se diseña opcionalmente una sonda 5'-nucleasa o una baliza molecular para que incluya una secuencia oligonucleotídica que presente como diana un ácido nucleico particular (por ejemplo un ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, el virus de la

inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus del papiloma, *Plasmodium falciparum*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*, entre muchos otros). Las balizas moleculares y sondas 5'-nucleasas se describen en mayor detalle posteriormente. Estos enfoques generales también se describen en, por ejemplo, Sambrook y en Ausubel 1 y 2.

En determinadas realizaciones, se utilizan sistemas de ensayo PCR en tiempo real que incluyen una o más sondas 5'-nucleasa para detectar ácidos nucleicos diana amplificados en presencia de los modificadores de la emisión lumínica indicados en la presente memoria. Tal como se ha descrito anteriormente, estos sistemas funcionan mediante la utilización de la actividad nucleasa endógena de determinadas polimerasas, cortando un desactivador u otro marcaje de una sonda que comprende el desactivador y marcaje, resultando en la activación del marcaje. La polimerasa típicamente sólo corta el desactivador o marcaje tras iniciarse la replicación, es decir, al unirse el oligonucleótido al molde y extender la polimerasa el cebador. De esta manera, un ácido nucleico apropiadamente marcado y una polimerasa que comprende la actividad nucleasa apropiada pueden utilizarse para detectar un ácido nucleico diana de interés. El análisis del producto de PCR en tiempo real mediante, por ejemplo FRET o similar (y la PCR cinética de transcripción inversa relacionada) proporciona una técnica bien conocida para la monitorización mediante PCR en tiempo real que ha sido utilizada en una diversidad de contextos, que puede adaptarse para la utilización con los métodos descritos en la presente memoria (ver Laurendeau *et al.*, "TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency", Clin. Chem. 45(7):982-6, 1999; Laurendeau *et al.*, "Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay", Clin. Chem. 59(12):2759-65, 1999; y Kreuzer *et al.*, "LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts", Cancer Research 59(13):3171-4, 1999).

Entre los sistemas ejemplares comercialmente disponibles que se utilizan opcionalmente para detectar ácidos nucleicos diana utilizando las mezclas de reacción indicadas en la presente memoria se incluyen, por ejemplo, un sistema COBAS® TaqMan®, un analizador COBAS AMPLICOR® o un sistema LightCycler®, que se encuentran disponibles de Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA), un sistema LUMINEX 100™, que se encuentra disponible de Luminex Corporation (Austin, TX, USA), un sistema ABI PRISM® 7700, que se encuentra disponible de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) y similares. También se describen otros sistemas posteriormente.

Las balizas moleculares son oligonucleótidos diseñados para la detección y cuantificación en tiempo real de ácidos nucleicos diana. Los extremo 5' y 3' de las balizas moleculares comprenden colectivamente una pareja de grupos, que proporcionan propiedades detectables de la baliza molecular. Uno de los extremos se encuentra unido a un fluoróforo y el otro se encuentra unido a una molécula desactivadora capaz de desactivar una emisión fluorescente del fluoróforo. A título ilustrativo, un ejemplo de pareja de fluoróforo-desactivador puede utilizar un fluoróforo tal como EDANS o fluorescéina, por ejemplo, en el extremo 5' y un desactivador tal como Dabcyl, por ejemplo, en el extremo 3'. En el caso de que la baliza molecular se encuentre presente libre en solución, es decir, no hibridada a un segundo ácido nucleico, el tallo de la baliza molecular resulta estabilizado por el apareamiento de bases complementarias. Este emparejamiento autocomplementario resulta en una estructura de "horquilla" de la baliza molecular en la que los grupos fluoróforo y desactivador se encuentran próximos entre sí. En esta conformación, el grupo fluorescente resulta desactivado por el grupo desactivador. El bucle de la baliza molecular típicamente comprende la sonda oligonucleótida y de acuerdo con ello es complementaria a una secuencia que debe detectarse en el ácido nucleico diana, de manera que la hibridación del bucle con su secuencia complementaria en la diana fuerza la disociación del tallo, alejando de esta manera el fluoróforo del desactivador. Esto resulta en la activación del fluoróforo, provocando un incremento de la fluorescencia de la baliza molecular.

Los detalles sobre los métodos estándares de preparación y utilización de balizas moleculares están bien establecidos en la literatura y se encuentran disponibles balizas moleculares de varias fuentes comerciales de reactivos. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre los métodos de preparación de balizas moleculares y su utilización en, por ejemplo, Leone *et al.*, "Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA", Nucleic Acids Res. 26:2150-2155, 1995; Kostrikis *et al.*, "Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles", Science 279:1228-1229, 1998; Fang *et al.*, "Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies", J. Am. Chem. Soc. 121:2921-2922, 1999; y Marras *et al.*, "Multiplex detection of single-nucleotide variation using molecular beacons", Genet. Anal. Biomol. Eng. 14:151-156, 1999. Una diversidad de proveedores comerciales produce balizas moleculares estándares y personalizadas, incluyendo Oswel Research Products Ltd. (Reino Unido), Research Genetics (una división de Invitrogen, Huntsville, AL, USA), The Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, USA) y Gorilla Genomics, LLC (Alameda, CA, USA). Una diversidad de kits que utiliza balizas moleculares también se encuentra disponible comercialmente, tal como los kits Sentinel™ de discriminación de alelos de baliza molecular, de Stratagene (La Jolla, CA, USA) y diversos kits de Eurogentec SA (Bélgica) e Isogen Bioscience BV (Países Bajos).

Los cebadores SCORPION® se utilizan en enfoques basados en fluorescencia para la detección específica de productos de PCR (Whitcombe *et al.*, Nat. Biotechnol. 17:804-807, 1999; Whitcombe *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 65:2333, 1999; y Thelwell *et al.*, Nucl. Acids Res. 28:3752-3761, 2000). Un cebador SCORPION® generalmente incluye una secuencia de sonda específica que se mantiene en una configuración de horquilla mediante secuencias

complementarias de tallo en los lados 5' y 3' de la sonda. El marcaje fluorescente unido al extremo 5' se desactiva con un grupo desactivador unido al extremo 3' del bucle. La horquilla se une al extremo 5' de un cebador típicamente mediante un bloqueador de PCR. Tras la extensión del cebador durante la amplificación por PCR, la secuencia de sonda específica es capaz de unirse a su complemento dentro de la misma cadena de ADN. Este suceso de hibridación abre la horquilla, de manera que la fluorescencia ya no se encuentra desactivada y se observa un incremento de la señal. El bloqueador de PCR impide la lectura ininterrumpida, lo que puede conducir a la apertura de la horquilla en ausencia de la secuencia diana específica. Dicha lectura ininterrumpida conduciría a la detección de productos de PCR no específicos, tales como dímeros cebadores o sucesos de cebado incorrecto. Los cebadores SCORPION[®] también se describen en, por ejemplo, Huang *et al.*, "Real-time quantitative assay of telomerase activity using the duplex scorpion primer", *Biotechnol. Lett.* 26(11):891-895, 2004; Asselbergs *et al.*, "Rapid detection of apoptosis through real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction measurement of the small cytoplasmic RNA Y1", *Anal. Biochem.* 318(2):221-229, 2003; y Nuovo *et al.*, "In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers", *J. Histochem. Cytochem.* 47(3):273-280, 1999.

15 Sistemas

La invención también proporciona sistemas para detectar ácidos nucleicos diana. El sistema incluye uno o más oligonucleótidos marcados y uno o más modificadores de la emisión lumínica tal como se describe en la presente memoria. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos se disponen ordenadamente sobre un soporte sólido, mientras que en otras, se proporcionan en uno o más recipientes, por ejemplo para ensayos realizados en solución. El sistema también incluye por lo menos un detector (por ejemplo un espectrómetro, etc.) que detecta la unión entre los ácidos nucleicos y/o los amplicones de los mismos en la muestra y los oligonucleótidos. Además, los sistemas también incluyen opcionalmente por lo menos un modulador térmico (por ejemplo un dispositivo de ciclado térmico, etc.) operablemente conectado al recipiente o soporte sólido para modular la temperatura en el recipiente o sobre el soporte sólido y/o por lo menos un componente de transferencia de fluidos (por ejemplo un pipeteador automático, etc.) que transfiere fluido a l recipiente o soporte sólido y/o desde los mismos, por ejemplo para poner en práctica una o más técnicas de amplificación de ácidos nucleicos y/o ensayos de hibridación de ácidos nucleicos en el recipiente o sobre el soporte sólido.

Los detectores típicamente están estructurados para detectar señales detectables producidas, por ejemplo, en otro componente, o próximos al mismo, del sistema de ensayo dado (por ejemplo en un recipiente, sobre un soporte sólido, etc.). Los detectores de señales adecuados que opcionalmente se utilizan, o se adaptan para la utilización, en la presente invención detectan, por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia, radioactividad, absorbancia, índice refractivo, luminiscencia, masa o similar. Los detectores opcionalmente monitorizan una o una pluralidad de señales procedentes de cadena arriba y/o abajo de la realización de, por ejemplo, una etapa de ensayo dada. Por ejemplo, los detectores opcionalmente monitorizan una pluralidad de señales ópticas, que corresponden en posición a resultados "en tiempo real". Entre los detectores o sensores ejemplares se incluyen tubos fotomultiplicadores, matrices de CCDs, sensores ópticos, sensores de temperatura, sensores de presión, sensores de pH, sensores de conductividad, detectores de escaneo o similares. Entre los detectores ejemplares más específicos que se utilizan opcionalmente para la puesta en práctica de los métodos de la invención se incluyen, por ejemplo, detectores de dispersión lumínica por resonancia, espectroscopios de emisión, espectroscopios de fluorescencia, espectroscopios de fosforescencia, espectroscopios de luminiscencia, espectrofotómetros, fotómetros y similares. También se describen detectores en, por ejemplo, Skoog *et al.*, *Principles of Instrumental Analysis*, 5a edición, Harcourt Brace College Publishers, 1998, y Currell, *Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality*, John Wiley & Sons Inc., 2000.

Los sistemas de la invención típicamente también incluyen controladores que se encuentran operablemente conectados a uno o más componentes (por ejemplo detectores, moduladores térmicos, componentes de transferencia de fluidos, etc.) del sistema para controlar el funcionamiento de los componentes. Más específicamente, generalmente se incluyen controladores como componentes separados o integrales del sistema que se utilizan, por ejemplo, para recibir datos procedentes de detectores, para afectar y/o regular la temperatura en los recipientes, para afectar y/o regular el flujo de fluido hacia o desde recipientes seleccionados, o similares. Los controladores y/o otros componentes del sistema se acoplan opcionalmente a un procesador apropiadamente programado, ordenador, dispositivo digital u otro dispositivo informático (por ejemplo, un convertidor de analógico a digital o de digital a analógico, según resulte necesario), que funciona ordenando el funcionamiento de estos instrumentos de acuerdo con instrucciones preprogramadas o introducidas por el usuario, la recepción de datos e información de dichos instrumentos, y la interpretación, manipulación e información de dicha información para el usuario. Los controladores adecuados son generalmente conocidos de la técnica y se encuentran disponibles de diversas fuentes comerciales.

Cualquier controlador u ordenador opcionalmente incluye un monitor, que con frecuencia es una pantalla de tubo de rayos catódicos ("CRT"), una pantalla plana (por ejemplo una pantalla de cristal líquido de matriz activa, una pantalla de cristal líquido, etc.) u otros. Los circuitos electrónicos con frecuencia se alojan en una caja, que incluye numerosos chips o circuitos integrados, tales como un microprocesador, memoria, circuitos de interfaz, y otros. La caja también incluye opcionalmente una unidad de disco duro, una unidad de disco flexible, una unidad extraíble de alta capacidad, tal como un CD-ROM grabable y otros elementos periféricos comunes. Los dispositivos de entrada,

tales como un teclado o un ratón, opcionalmente permiten la interacción con un usuario. Estos componentes se ilustran en mayor detalle posteriormente.

El ordenador típicamente incluye software apropiado para recibir instrucciones del usuario, en forma de datos introducidos por el usuario en un conjunto de campos de parámetros, por ejemplo en un GUI, o en forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo preprogramadas para una diversidad de diferentes operaciones específicas. A continuación, el software convierte estas instrucciones en lenguaje apropiado para ordenar que se activen uno o más controladores que llevarán a cabo la operación deseada. El ordenador seguidamente recibe los datos de, por ejemplo, sensores/detectores incluidos en el sistema, e interpreta los datos, proporcionando un formato comprensible para el usuario o utilizando los datos para indicar instrucciones adicionales para el controlador, de acuerdo con la programación, por ejemplo tal como el control de reguladores del flujo de fluidos en respuesta a datos de peso del fluido recibidos de balanzas o similares.

La figura 3 es un esquema que muestra un sistema representativo que incluye un dispositivo lógico en el que pueden realizarse diversos aspectos de la presente invención. Tal como entenderá el experto en la materia a partir de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, la invención opcionalmente se implementa en forma de hardware y/o de software. En algunas realizaciones, se implementan diferentes aspectos de la invención en lógica de lado del cliente o en lógica del lado del servidor. Tal como se entenderá en la técnica, la invención, o componentes de la misma, puede presentarse en realizaciones de un componente de programa de medios (por ejemplo un componente de medios fijo) que contenga instrucciones lógicas y/o datos que, al cargarlos en un dispositivo de computación configurado correctamente, causan que el dispositivo funcione según la invención. Tal como también se entenderá en la técnica, puede proporcionarse un medio fijo que contenga instrucciones lógicas a un observador en un medio fijo para la carga física en un ordenador del observador o un medio fijo que contenga instrucciones lógicas puede residir en un servidor remoto al que accede un observador a través de un medio de comunicación con el fin de descargar un componente del programa.

En particular, la figura 3 ilustra esquemáticamente un ordenador 300 al que se encuentran operablemente conectados detector 302, componente de transferencia de fluidos 304 y modulador térmico 308. Opcionalmente, uno o más de estos componentes se encuentran operablemente conectados al ordenador 300 mediante un servidor (no mostrado en la figura 3). Durante el funcionamiento, el componente de transferencia de fluidos 304 típicamente transfiere mezclas de reacción o componentes de las mezclas a un recipiente multipocillo 306. El ciclado térmico típicamente lo lleva a cabo un modulador térmico 308, que comunica térmicamente con el recipiente multipocillo 306. El detector 302 típicamente detecta señales detectables (por ejemplo emisiones fluorescentes, etc.) producidas durante las reacciones de ciclado térmico.

Kits

Las mezclas de reacción o componentes de las mismas (por ejemplo sondas o modificadores de la emisión lumínica) utilizados en los métodos de la presente invención opcionalmente se empaquetan en kits. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales convenientemente empaquetados necesarios para la hibridación, amplificación y detección de ácidos nucleicos diana, tales como tampones, enzimas, estándares de ADN, sales, iones metálicos, cebadores, nucleótidos extendibles o terminadores, glicerol, dimetilsulfóxido, polirA, etc., así como instrucciones para llevar a cabo un ensayo particular. Típicamente se proporcionan componentes del kit, tales como sondas y modificadores de la emisión lumínica, en uno o más recipientes. En algunas de dichas realizaciones los kits incluyen además por lo menos una pirofosfatasa (por ejemplo una pirofosfatasa termoestable), por ejemplo para la utilización en la minimización de la pirofosforólisis y/o la uracil-N-glucosilasa (UNG), por ejemplo, para la utilización en aplicaciones en las que resulta deseable la protección frente a la contaminación cruzada. Pueden empaquetarse dos o más de los componentes del kit dentro del mismo recipiente.

Utilización de modificadores solubles de la emisión lumínica en determinaciones de la T_m

La invención proporciona métodos para determinar la temperatura de disociación (T_m) de un complejo de hibridación, en los que se utiliza la tecnología de modificadores solubles de la emisión lumínica enseñada en la presente invención. Las determinaciones de la T_m utilizan un sistema de modificador soluble de la emisión lumínica (es decir, un desactivador soluble) para monitorizar la curva de disociación o de hibridación del dúplex.

Esencialmente se hibrida una sonda marcada con un grupo emisor de luz adecuado (por ejemplo un donante) con una diana, formando un complejo de hibridación. El dúplex de hibridación resultante (por ejemplo el complejo de hibridación diana) puede presentar una complementariedad completa (es decir, del 100%) o parcial (es decir, inferior al 100%). Cualquier ácido nucleico dúplex (con complementariedad completa o parcial) se caracteriza por una T_m particular bajo un conjunto dado de condiciones de hibridación. Esta característica hace que las determinaciones de la T_m resultan útiles en aplicaciones tales como diagnósticos (por ejemplo la detección de SNP, la detección y escaneo de mutaciones, el genotipado vírico, el ensayo para cepas resistentes a fármacos, etc.).

Antes, durante o después de la formación del dúplex, la reacción se mezcla con un desactivador soluble adecuado. Este desactivador soluble comprende un pigmento tiazina o un pigmento diazina, en donde el desactivador soluble es capaz de desactivar el grupo emisor de luz presente en la sonda (formando de esta manera una pareja de

donante-aceptor). Puede utilizarse en los métodos de determinación de la T_m de la invención cualquier pigmento tiazina o diazina proporcionado en la presente invención. Se indica que tiazina, fenotiazina, tiazinas catiónicas, tiazinio y fenotiazinio son todos sinónimos de un nombre genérico para la familia de pigmentos que presentan un sistema aromático de 3 anillos fusionados que contiene un nitrógeno y un azufre en el anillo central. Además, adicionalmente a las estructuras de tiazina y diazina particulares enseñadas en la presente invención, también pueden utilizarse con los métodos de la invención variantes estructurales relacionadas de dichas moléculas que conservan la propiedad de desactivador soluble, y se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención.

Un desactivador soluble de pigmento tiazina o diazina actúa uniéndose a ácidos nucleicos tanto monocatenarios como bicatenarios, aunque presenta una afinidad reducida para los ácidos nucleicos monocatenarios. Se encuentra contemplado que la unión a los ácidos nucleicos monocatenarios se deba a estructuras secundarias parciales en un estado helicoidal aleatorio. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que el modo de unión predominante es la intercalación, aunque también resulta posible la unión a surcos menores y mayores, dependiendo del contexto de secuencia y de las condiciones de hibridación (ver Rohs *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 122:2860-2866, 2000; y Tuite *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 116:7548-7556, 1994). De esta manera, el donante de fluorescencia, unido a la sonda que forma el complejo de hibridación con un polinucleótido diana, queda sometido a un efecto de desactivación por parte del desactivador soluble intercalado que presenta afinidad para el ácido nucleico bicatenario debido a la estrecha proximidad entre el desactivador y el grupo donante presente en la sonda. Sin embargo, para poner en práctica o para utilizar la invención no resulta necesario comprender los mecanismos moleculares del fenómeno de desactivación.

En el caso de que la solución que contiene el complejo de hibridación se somete a calentamiento (como en el análisis T_m de una curva de disociación), la sonda finalmente se disocia del polinucleótido diana, reduciendo de esta manera la afinidad del desactivador para el ácido nucleico, lo que resulta en una menor proximidad entre desactivador soluble y sonda donante y la observación de un incremento de la fluorescencia procedente del donante. De esta manera, puede realizarse el seguimiento de la formación/disociación de los complejos de hibridación en una reacción utilizando un sistema que presente un desactivador soluble.

Tras la formación del dúplex bajo condiciones en las que puede producirse el apareamiento de bases, se eleva la temperatura de la reacción del complejo de hibridación diana y se mide y monitoriza la emisión del donante a lo largo de un intervalo de temperaturas, formando de esta manera una curva de disociación. Puede utilizarse un intervalo de temperaturas de, por ejemplo, entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 95°C. Alternativamente, la sonda, el desactivador soluble y la diana pueden iniciarse a una temperatura elevada (por ejemplo aproximadamente 95°C) y realizarse un seguimiento de la emisión del donante durante la reducción de la temperatura de la reacción (por ejemplo hasta aproximadamente 20°C), generando de esta manera una curva de hibridación.

Los Ejemplos proporcionados en la presente memoria que ilustran las determinaciones de la T_m utilizan sonda oligonucleótida de marcaje único, en la que la sonda se marca con FAM (6-carboxi-fluoresceína), que sirve como grupo donante emisor de luz en la pareja de donante/desactivador con el desactivador soluble. Resultará evidente para el experto que no se pretende que la presente invención se encuentre limitada a la utilización de FAM como el grupo donante. En efecto, la técnica se encuentra repleta de descripciones de otros grupos de marcaje, todos ellos útiles con la invención como grupos donantes emisores de luz. Se pretende que estos grupos adicionales emisores de luz también se encuentren comprendidos dentro del alcance de la invención.

Tanto en el caso de una curva de hibridación como en el de una curva de disociación, la emisión medida procedente del donante se correlaciona con un valor particular de asociación/disociación del dúplex, y se deriva una T_m, en donde T_m es aquella temperatura a la que la mitad de una población de complejos de hibridación se disocia en cadenas individuales.

La invención proporciona numerosos ejemplos de determinaciones de T_m utilizando sistemas de desactivador soluble de la invención. Por ejemplo, ver los Ejemplos 19 a 22. Muchos de los Ejemplos proporcionados en la presente invención utilizando los reactivos desactivadores solubles en métodos de genotipado vírico, por ejemplo genotipado de VHC. En estos métodos, se utilizan diversas secuencias genómicas víricas como dianas de hibridación para una sonda que se marca con un grupo emisor de luz (por ejemplo un donante tal como FAM). La adaptación de estos métodos encuentra un uso particular en la detección y genotipado vírico en muestras clínicas, por ejemplo muestras de pacientes. Sin embargo, no se pretende que los métodos de determinación de la T_m de la invención se encuentren limitados a aplicaciones de genotipado vírico. Es decir, no se pretende que las dianas de hibridación sean material vírico o ácidos nucleicos derivados de material vírico. En efecto, una amplia diversidad de aplicaciones además del genotipado vírico resultarán inmediatamente evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, las determinaciones de T_m que utilizan reactivos desactivadores solubles pueden resultar útiles en la amplificación, detección y análisis acoplados en un formato de tubo cerrado y mediante la utilización de sondas de marcaje único. Estos métodos encuentran utilidad en una amplia diversidad de aplicaciones, por ejemplo, aunque sin limitación, aplicaciones como SNP y detección de mutaciones, haplotipado, detección de microsatélites, caracterización de genotipos de patógenos y caracterización de cepas resistentes a fármacos.

La hibridación de la diana de hibridación no se encuentra particularmente limitada. En algunos aspectos, la diana de hibridación puede ser un amplicón, por ejemplo un amplicón producido por una reacción en cadena de polimerasa. En algunos aspectos, la amplificación por PCR puede utilizar una amplificación asimétrica. En el caso en el que el ácido nucleico diana sea una molécula de ARN, la amplificación por PCR puede utilizar una PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

Kits para la determinación de la T_m

La invención proporciona artículos manufacturados, por ejemplo kits para facilitar los métodos de la presente invención, por ejemplo métodos para llevar a cabo determinaciones de la T_m. Estos kits encuentran utilidad para el médico clínico, quien puede utilizar las evaluaciones de la T_m, por ejemplo, para realizar determinaciones de genotipado vírico. Los materiales y reactivos para llevar a cabo estos métodos pueden proporcionarse en kits para facilitar la ejecución de los métodos.

En algunas realizaciones, los kits de determinación de la T_m son kits diagnósticos, en los que la información obtenida de la realización de los métodos que permiten los kits se utiliza, por ejemplo, para identificar el genotipo de un virus en una muestra obtenida de un paciente.

En determinadas realizaciones la invención proporciona kits adecuados para llevar a cabo la amplificación de una diana además de la determinación de la T_m diana, por ejemplo mediante la incorporación de reactivos de PCR o de RT-PCR.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits para determinar la temperatura de disociación (T_m) de un complejo de hibridación particular, en donde la determinación de la T_m utiliza un sistema de modificador soluble de la emisión lumínica (por ejemplo un desactivador soluble) para monitorizar la curva de disociación o de hibridación del dúplex. Entre estos kits se incluyen, aunque sin limitación, (i) por lo menos una sonda marcada con un grupo emisor de luz adecuado (por ejemplo un donante), (ii) un modificador soluble de la emisión lumínica, tal como un pigmento tiazina o diazina, en donde el pigmento es capaz de desactivar el grupo emisor de luz, e (iii) uno o más recipientes que contienen la sonda, el desactivador soluble o ambos.

Los kits también pueden incluir opcionalmente reactivos para la recolección de muestras (por ejemplo la recolección de una muestra de sangre), reactivos para la recolección y purificación de ARN de sangre, una transcriptasa inversa, cebadores adecuados para la transcripción inversa y síntesis de ADNc de primera cadena y de segunda cadena (es decir, el inicio de la transcriptasa inversa), por ejemplo para producir un amplicón vírico, una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN y desoxirribonucleótidos trifosfato libres. En algunas realizaciones, el enzima que comprende actividad de transcriptasa inversa y actividad de ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN son el mismo enzima, por ejemplo polimerasa de *Thermus* sp. ZO5 o polimerasa de *Thermus thermophilus*. Los kits de la invención también pueden incluir opcionalmente muestras de estandarización (por ejemplo ácidos nucleicos moldes de estandarización a concentraciones conocidas para evaluar la sensibilidad del método de T_m); muestras de control positivo (por ejemplo ácidos nucleicos moldes de secuencia definida con valores de T_m conocidos determinados previamente), muestras de control negativo (por ejemplo tampones o mezclas de reacción que no contienen ningún ácido nucleico diana), tampones adecuados para reacciones enzimáticas, tubos de recolección de muestra y tubos de reacción de amplificación.

Sistemas de determinación de la T_m

En algunas realizaciones, la invención proporciona sistemas integrados para realizar determinaciones de la T_m. Los sistemas pueden incluir instrumentación y medios para interpretar y analizar los datos recogidos, especialmente en el caso de que los medios para derivar la T_m comprendan algoritmos y/o información almacenada electrónicamente (por ejemplo datos de fluorescencia recogidos, correlaciones predeterminadas de la T_m, etc.). Cada parte de un sistema integrado se encuentra funcionalmente interconectada, y en algunos casos, físicamente conectada. En algunas realizaciones, el sistema integrado es automático, en el que no hay ninguna necesidad de que un operador manipule la muestra o los instrumentos tras el inicio del análisis de la T_m.

Un sistema de la invención puede incluir instrumentación. Por ejemplo, la invención puede incluir un detector, tal como un detector de fluorescencia (por ejemplo un espectrofotómetro de fluorescencia). Puede utilizarse uno o más detectores conjuntamente con la invención, por ejemplo para monitorizar/medir la emisión procedente del grupo emisor de luz en la sonda de T_m. Un detector puede presentar la forma de un lector de placas multipocillo para facilitar una capacidad de alto rendimiento al ensayo de la T_m.

En algunas realizaciones el sistema integrado incluye un dispositivo de ciclado térmico, o termociclador, a fin de controlar la temperatura del análisis de la T_m de disociación. En algunas realizaciones, el dispositivo de ciclado térmico y el detector son un instrumento integrado, en el que el ciclado térmico y la detección de la emisión (por ejemplo la detección de la fluorescencia) se realizan en el mismo dispositivo.

Puede conectarse un detector, por ejemplo un espectrofotómetro de fluorescencia, a un ordenador para controlar los parámetros operacionales del espectrofotómetro (por ejemplo la longitud de onda de excitación y/o la longitud de

onda de la emisión detectada) y/o de almacenamiento de los datos recogidos procedentes del detector (por ejemplo mediciones de fluorescencia durante un análisis de la curva de disociación). El ordenador también puede conectarse operablemente al dispositivo de ciclado térmico para controlar la temperatura, la temporización y/o la tasa de cambio de la temperatura en el sistema. El ordenador integrado también puede contener un "módulo de correlación" en el que los datos recogidos del detector se analizan y en el que se determina (electrónicamente) la T_m del complejo de hibridación diana. En algunas realizaciones, el módulo de correlación comprende un programa informático que calcula la T_m basándose en las lecturas de fluorescencia del detector, y en algunos casos, deriva opcionalmente información del genotipo vírico de una muestra desconocida basándose en el resultado de la T_m . En algunas realizaciones, el módulo de correlación compara la T_m de la muestra desconocida con una base de datos (o tabla) de valores de T_m para tipos víricos conocidos para establecer una correlación entre la T_m de la muestra desconocida y el genotipo vírico de la muestra desconocida.

En algunos aspectos un sistema de la invención para la determinación de la T_m de un complejo de hibridación comprende una mezcla de reacción (por ejemplo que puede incluir o no una muestra) que incluye: (i) una sonda de ácidos nucleicos que comprende un grupo emisor de luz que emite una señal, (ii) un ácido nucleico diana de hibridación que es complementario o parcialmente complementario a la sonda de ácidos nucleicos, e (iii) un pigmento tiazina o diazina. El sistema también incluye un dispositivo de control térmico para regular la temperatura de la reacción de disociación en un intervalo de temperaturas, en donde el intervalo de temperaturas incluye una temperatura a la que esencialmente todas las moléculas de sonda se hibridan con la diana de hibridación bajo un conjunto dado de condiciones de hibridación, una temperatura a la que el 50% de los complejos de hibridación diana se disocian, y una temperatura a la que esencialmente ninguna molécula de sonda se hibrida con la diana de hibridación y no se encuentra esencialmente ningún complejo de hibridación bajo las condiciones de hibridación. El sistema puede incluir además un detector para medir la señal procedente de la reacción de disociación en el intervalo de temperaturas, y también un módulo de correlación que se encuentra operablemente acoplado al detector y recibe mediciones de señal en el intervalo de temperaturas, en donde el módulo de correlación correlaciona la intensidad de la señal con la presencia de un complejo de hibridación que comprende la sonda y la diana de hibridación mezclados con el pigmento tiazina o diazina como una función de la temperatura, determinando de esta manera la T_m del complejo de hibridación diana. En algunos aspectos el grupo emisor de luz en la sonda es un grupo donante FRET.

Utilización de pigmentos tiazina para la estabilización de dúplex Una diversidad de técnicas de ácidos nucleicos adolecen de apareamientos incorrectos de secuencias durante la amplificación y/o detección de ácidos nucleicos. La presente invención proporciona soluciones a este problema, al proporcionar métodos para la estabilización de dúplex de ácidos nucleicos. Estos métodos para la estabilización de dúplex de ácidos nucleicos resultan efectivos para estabilizar los dúplex de ácidos nucleicos que contienen posiciones únicas de mal apareamiento, así como dúplex con múltiples posiciones de mal apareamiento. En efecto, los métodos descritos en la presente memoria incluso pueden estabilizar adicionalmente dúplex de ácidos nucleicos perfectamente apareados. La estabilización adicional de dúplex perfectamente apareados permite la conservación de dúplex intactos de ácidos nucleicos bajo condiciones en las que, de otra manera, se disociaría el dúplex.

Tal como se proporciona en la presente exposición, se identifican en la presente memoria varios compuestos que pueden unirse y estabilizarse significativamente apareamientos incorrectos en dúplex de ácidos nucleicos. Dichos compuestos son miembros de la familia del pigmento tiazina, por ejemplo, aunque sin limitación, tionin (también conocida como tionina), azul de metileno, azul de metileno nuevo, azul de 1,9-dimetilmetileno, verde metileno, azul A, azul B, azul C y azul de toluidina.

Puede utilizarse cualquier pigmento tiazina proporcionado en la presente memoria en los métodos de estabilización de dúplex de la invención. Además, adicionalmente a las estructuras particulares de tiazina enseñadas en la presente memoria, también pueden utilizarse con los métodos de la invención variantes estructurales relacionadas de dichas moléculas que conserven la propiedad esencial de estabilización. Estas moléculas relacionadas se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención.

Mediante la utilización de pigmentos tiazina y compuestos relacionados como aditivos para reacciones de hibridación, la amplificación y detección de ácidos nucleicos puede mejorarse ampliamente en aquellas situaciones en las que existen polimorfismos en las sondas y/o cebadores. De hecho, éstas son las aplicaciones más exigentes, en las que el aditivo de estabilización no debe afectar adversamente a la actividad enzimática (por ejemplo en la amplificación por PCR o por RT-PCR). Cualquier aplicación en la que la estabilización de apareamientos incorrectos resulte necesaria se beneficiará de estos protocolos. Además, las aplicaciones con una estabilización mejorada de un dúplex perfectamente apareado también se beneficiarán de estos protocolos. Cualquier tipo de hibridación de ácidos nucleicos que rinda un complejo de hibridación de ácidos nucleicos puede beneficiarse de los métodos de la invención. Lo anterior incluye, aunque sin limitación, por ejemplo, la hibridación de uno o más cebadores de PCR enzimáticamente extendibles a una secuencia diana; la hibridación de cualquier molécula de ácidos nucleicos en la que el sitio de hibridación sirva como punto de inicio que resulte efectivo para cebar una reacción de extensión de ácidos nucleicos; la hibridación de una sonda 5'-nucleasa a una diana; la hibridación de cualquier tipo de sonda marcada (o no marcada) a una diana, tal como las utilizadas en la transferencia southern o northern; y la utilización

de sondas de ácidos nucleicos en cualquier tipo de cribado, tal como en el cribado de una biblioteca genómica o de una biblioteca de ADNc. En algunas realizaciones, la molécula diana de ácidos nucleicos en la hibridación es un amplicón.

5 En algunos aspectos, mediante la utilización de los pigmentos tiazina y compuestos relacionados como aditivos de reacciones de hibridación, la amplificación y detección de ácidos nucleicos puede mejorarse ampliamente en aquellas situaciones en las que existan polimorfismos de las sondas y/o cebadores, por ejemplo en el análisis de genotipado vírico.

10 La invención proporciona numerosos ejemplos de estabilización de dúplex utilizando pigmentos tiazina. Por ejemplo, ver los Ejemplos 20 a 25. Muchos de los Ejemplos proporcionados en la presente memoria utilizando sistemas de modelos víricos VHC o VIH para ilustrar las propiedades ventajosas de los métodos de la invención con respecto a la estabilización de dúplex. Sin embargo, no se pretende que los métodos de estabilización de dúplex de la invención se encuentren limitados a las aplicaciones de hibridación vírica. Es decir, no se pretende que los dúplex
15 estabilizados comprendan material vírico o ácidos nucleicos derivados de material vírico. En efecto, una amplia diversidad de otras aplicaciones además del análisis genético vírico resultarán inmediatamente evidentes para el experto en la materia.

20 Esencialmente, los métodos para estabilizar los dúplex de ácidos nucleicos consisten en exponer el dúplex de ácidos nucleicos al pigmento estabilizador tiazina. El pigmento tiazina puede mezclarse con el dúplex en cualquier punto, por ejemplo antes de la formación del dúplex, o tras la formación del dúplex. La tiazina puede encontrarse presente o ausente durante la rehibridación de las dos o más cadenas individuales de ácido nucleico que forman el dúplex. En el caso de que el pigmento tiazina se encuentre ausente durante la formación del dúplex, el pigmento puede añadirse tras la formación del dúplex.

25 La estabilidad mejorada del dúplex utilizando los métodos de estabilización de la invención puede apreciarse utilizando cualquier ensayo adecuado para la determinación de la estabilidad de un dúplex. Por ejemplo, la T_m de un dúplex de ácidos nucleicos en ausencia de un pigmento tiazina puede compararse a la T_m del mismo dúplex de ácidos nucleicos en presencia del pigmento tiazina bajo las mismas condiciones de hibridación. Alternativamente,
30 puede construirse una curva de crecimiento C_T (por ejemplo una curva de crecimiento C_T que utilice una sonda de ensayo 5'-nucleasa) bajo condiciones similares, en la que el valor de C_T en ausencia del pigmento tiazina se compara con el valor de C_T en presencia del pigmento tiazina. Se indica que, al utilizar un valor de C_T para ilustrar la estabilidad de los dúplex, el valor de C_T puede ser un reflejo de la estabilidad del dúplex de uno o de los dos cebadores de amplificación, y además, que también refleja la estabilidad de cualquier dúplex que contenga sonda
35 utilizada para realizar el seguimiento de la acumulación de amplicón (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa en un ensayo de 5'-nucleasa). Resulta significativo que, al realizar determinaciones de C_T para la evaluación de la estabilidad de un dúplex, no resulta necesaria la utilización de un ensayo de 5'-nucleasa para realizar el seguimiento de la acumulación de amplicón. Tal como se ilustra en el Ejemplo 25, puede utilizarse un sistema de seguimiento sin sonda, tal como mediante el seguimiento de la acumulación de amplicón utilizando un indicador ácido nucleico
40 bcatenario, tal como verde SYBR[®].

Estos métodos para comparar la estabilidad del dúplex en sistemas sin pigmento frente a sistemas con pigmento también se aplican a la comparación de la estabilidad de un dúplex estabilizado con una de dos concentraciones diferentes de un pigmento tiazina, por ejemplo, una concentración alta y una concentración baja.

45 La presente invención proporciona métodos para estabilizar dúplex de ácidos nucleicos, en los que los dúplex pueden ser dúplex perfectamente apareados, o pueden contener cualquier número de posiciones desapareadas. Por ejemplo, estos métodos para la estabilización de dúplex de ácidos nucleicos resultan efectivos para estabilizar dúplex de ácidos nucleicos que contienen una o más posiciones incorrectamente apareadas, dos o más posiciones incorrectamente apareadas, o tres o más posiciones incorrectamente apareadas.

En los métodos para la estabilización de dúplex de ácidos nucleicos, la concentración del pigmento tiazina que se utiliza en el método no se encuentra particularmente limitada. En algunos aspectos, se utiliza una concentración de por lo menos 10 µg/ml. En otros aspectos, se utiliza cualquier concentración comprendida dentro de un intervalo de
55 concentraciones, por ejemplo una concentración comprendida entre aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 50 µg/ml. Alternativamente, se utiliza un intervalo de concentraciones de entre aproximadamente 20 µg/ml y aproximadamente 40 µg/ml. En algunos aspectos se utiliza una concentración de pigmento tiazina de aproximadamente 40 µg/ml.

60 Típicamente, en los métodos para estabilizar dúplex de ácidos nucleicos, el complejo de hibridación estabilizado es un complejo de hibridación intermolecular, en el que las cadenas hibridantes antiparalelas son dos moléculas separadas de ácidos nucleicos. Sin embargo, en algunas adaptaciones de los métodos para estabilizar dúplex de ácidos nucleicos, el complejo de hibridación estabilizado es un complejo de hibridación intramolecular, en el que las cadenas hibridantes antiparalelas de hecho se encuentran en una única molécula de ácidos nucleicos, tal como en
65 el caso de una configuración de tipo baliza molecular.

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas en la presente memoria se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada. También se entiende que el experto en la materia podrá concebir diversas modificaciones o cambios a la luz de los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria y que ellos deben considerarse comprendidos dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud y alcance según las reivindicaciones adjuntas.

Los presentes ejemplos muestran datos de rendimiento obtenidos para determinados ensayos de 5'-nucleasa en los que se utilizaron modificadores de la emisión lumínica de la presente invención.

jemplo 1**Protocolos generales para ensayos de desactivación de la fluorescencia**

Las tablas incluidas en la presente sección indican los componentes de reacción, condiciones y procedimientos respectivos que se utilizaron en los análisis a los que se hace referencia en los ejemplos proporcionados posteriormente, a menos que se indique lo contrario. En general, se midió la fluorescencia de oligonucleótidos marcados en soluciones tanto con un desactivador soluble como sin el mismo. En determinados análisis, por ejemplo, se midió una serie de sondas marcadas con FAM en el extremo 5' en soluciones de 400 µl que contenían un tampón de reacción de PCR (indicado posteriormente) y diversas concentraciones de desactivadores solubles. Para detectar la fluorescencia del marcaje FAM en estos análisis, se seleccionó una longitud de onda de la luz de excitación de 485 nanómetros, y la fluorescencia se midió a una longitud de onda de 520 nanómetros.

MÉTODOS GENERALES UTILIZADOS PARA LAS EVALUACIONES DE PCR**TABLA III**

Mezcla de reacción para análisis de desactivación utilizando un oligonucleótido monocatenario fluorescente:	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP dCTP dGTP	300 µM cada uno
dUTP	550 µM
SK145BU (cebador de amplificación falso)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
GAG152BU (cebador de amplificación falso)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
GAG108AF (oligonucleótido fluorescente)	0,1 µM
UNG (Uracil-N-glucosilasa)	10 U/reacción (rx)
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
EDTA	5 mM
Mn(OAc) ₂	3 mM
Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 µg/ml

TABLA IV

Mezcla de reacción para análisis de desactivación utilizando un oligonucleótido bicatenario fluorescente:	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP dCTP dGTP	300 µM cada uno
dUTP	550 µM

SK145BU (cebador de amplificación falso)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
GAG152BU (cebador de amplificación falso)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
Mezcla de reacción para análisis de desactivación con un oligonucleótido bicatenario fluorescente	
Componente	Concentración
GAG108AF (oligonucleótido fluorescente)	0,1 µM
GAG100C (complemento de GAG108AF)	0,1 µM
UNG (Uracil-N-glucosilasa)	10 U/reacción
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
EDTA	5 mM
Mn(OAc) ₂	3 mM
Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 µg/ml

TABLA V

Mezcla de reacción para análisis de desactivación utilizando un dinucleótido fluorescente:	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP dCTP dGTP	300 µM cada uno
dUTP	550 µM
SK145BU (cebador de amplificación falso)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
GAG152BU (cebador de amplificación falso)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
FAM-TT (dinucleótido fluorescente)	0,1 µM
UNG (Uracil-N-glucosilasa)	10 U/reacción
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
EDTA	5 mM
Mn(OAc) ₂	3 mM
Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 µg/ml

INFORMACIÓN DE SECUENCIA

5

TABLA VI

Secuencias del VHC		
Cebador de amplificación	Secuencia	SEC ID nº
ST280ATBUA1	GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTX en donde X=N6-t-butilbencil-dA	1
ST77IAATBA1	GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAX en donde X=N6-t-butilbencil-dA	2
ST650AAFBBHQ2 Sonda 5'-nucleasa desactivada	ECGGTGTACTCACCGJTTCCGCAGACCACTATGP en donde E=FAM; J=BHQ-2; P=fosfato terminal	3
ST650ACY5F14IN Sonda 5'-nucleasa desactivada	ECGGTGTACTCACCGJGTTCCGCAGACCACTATGP en donde E=CY5; J=cx-FAM; P=fosfato terminal	4
ST650A_5'-FL Sonda de marcaje único	ECGGTGTACTCACCGTTCGCAGACCACTATGP en donde E=FAM; P=fosfato terminal	5

TABLA VII

Secuencias del VHC		
Cebador de amplificación	Secuencia	SEC ID nº
SK145BU	AGTGGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAX en donde X=N6-t-butilbencil-dA	6

GAG152BU	GGTACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTTCX en donde X=N6-t-butilbencil-dA	7
GAG100C (complemento de GAG108)	TAAAAGATACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAP en donde P=fosfato terminal	8
GAG108_5'-FAM Sonda de marcaje único	ETCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTATCTTTTAP en donde E=FAM; P=fosfato terminal	9

TABLA VIII

Cuantificación estándar (CS)		
Cebador de amplificación	Secuencia	SEC ID nº
ST280ATBUA1	GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTX en donde X=N6-t-butilbencil-dA	10
ST771AATBA1	GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAX en donde X=N6-t-butilbencil-dA	11
ST2535_5'-HEX Sonda de marcaje único	ETGGACTCAGTCCTCTGGTCATCTCACCTTCTP en donde E=HEX; P=fosfato terminal	12

TABLA IX

Mezcla de reacción para PCR del VHC utilizando una sonda fluorescente de marcaje único	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP dCTP dGTP	300 µM cada uno
dUTP	550 µM
ST280ATBUA1 cebador de amplificación	0,4 µM (40 pmoles/rx)
ST778AATBA1 cebador de amplificación	0,4 µM (40 pmoles/rx)
ST650_5'-FAM (sonda fluorescente de marcaje único)	0,1 µM (10 pmoles/rx)
UNG (Uracil N-glucosilasa)	10 U/reacción
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
Mn(OAc) ₂	3 mM
Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 µg/ml
ADN diana del VHC	2x10 ⁶ copias por reacción

5

TABLA X

Mezcla de reacción para PCR del VHC utilizando una sonda 5'-nucleasa desactivada	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP dCTP dGTP	300 µM cada uno
dUTP	550 µM
ST280ATBUA1 cebador de amplificación	0,4 µM (40 pmoles/rx)
ST778AATBA1 (cebador de amplificación)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
ST650AAFBHQ2 o ST650ACY5F14IN (sonda 5'-nucleasa desactivada)	0,1 a 0,2 µM (10 a 20 pmoles/rx)
UNG (Uracil-N-glucosilasa)	10 U/reacción
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
Mn(OAc) ₂	3 mM

Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 µg/ml
ADN diana del VHC	2x10 ⁶ copias por reacción

TABLA XI

Mezcla de reacción para PCR del VHC utilizando una sonda fluorescente de marcaje único	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP dCTP dGTP	300 µM cada uno
dUTP	550 µM
SK145BU (cebador de amplificación)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
GAG152BU (cebador de amplificación)	0,4 µM (40 pmoles/rx)
GAG180AF (sonda fluorescente de marcaje único)	0,1 µM
UNG (Uracil-N-glucosilasa)	10 U/reacción
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
Mn(OAc) ₂	3 mM
Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 µg/ml
ADN diana del VHC	2x10 ⁶ copias por reacción

TABLA XII

Mezcla de reacción para PCR del VHC utilizando una sonda fluorescente de marcaje único	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP dCTP dGTP	300 µM cada uno
dUTP	550 µM
ST280ATBUA1 cebador de amplificación	0,4 µM (40 pmoles/rx)
ST778AATBA1 cebador de amplificación	0,4 µM (40 pmoles/rx)
ST650AABHQ2 ó ST650ACY5F14IN sonda 5'-nucleasa desactivada	0,1 a 0,2 µM (10 a 20 pmoles/rx)
UNG (Uracil-N-glucosilasa)	10 U/reacción
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
Mn(OAc) ₂	3 mM
Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 µg/ml
ADN diana del VHC	2x10 ⁶ copias por reacción

5

TABLA XIII

Mezcla de reacción para PCR del VHC utilizando una sonda fluorescente de marcaje único	
Componente	Concentración
portador poli-rA	9 µg/ml
Glicerol	6,2%
DMSO	7,5%
Tricina, pH 8,3	50 mM
KOAc	100 mM
dATP	300 µM cada uno
dCTP	

dGTP	
dUTP	550 μ M
SK145BU (cebador de amplificación)	0,4 μ M (40 pmoles/rx)
GAG152BU (cebador de amplificación)	0,4 μ M (40 pmoles/rx)
GAG108AF (sonda fluorescente de marcaje único)	0,1 μ M
UNG (Uracil-N-glucosilasa)	10 U/reacción
ADN polimerasa ZO5	40 U/reacción
Mn(OAc) ₂	3 mM
Modificador de la emisión lumínica	0 a 50 μ g/ml
ADN diana del VHC	2x10 ⁶ copias por reacción

CONDICIONES DE TERMOCICLADO

Las tablas siguientes, Tablas XIV a XVII, dan a conocer reacciones de termociclado de PCR representativas utilizadas en la invención. En cada tabla, las reacciones de ciclado se indican con flechas de doble cabeza, y las reacciones se repitieron el número total de ciclos indicado. En los casos en que se proporciona un intervalo de temperaturas, se indica que se llevaron a cabo diferentes experimentos utilizando valores únicos de temperatura que se encontraban comprendidos dentro del intervalo. Tras completar las reacciones, las muestras se mantuvieron indefinidamente a 4°C.

TABLA XIV
PCR del VHC y de QS

Termociclado

Etapas 1 50°C/5m

Etapas 2 95°C/2m

Etapas 3 95°C/15s



2 ciclos

58°C/50s

Etapas 4 95°C/15s



60 ciclos

Etapas 5 50-58°C/50s

4°C/inf.

TABLA XV
RT-PCR del VHC

Termociclado

Etapa 1	50°C/5m
Etapa 2	59°C/30m
Etapa 3	95°C/2m
Etapa 4	95°C/15s



2 ciclos

58°C/50s

Etapa 5	95°C/15s
----------------	-----------------



60 ciclos

50-58°C/50s

Etapa 6	4°C/inf.
----------------	-----------------

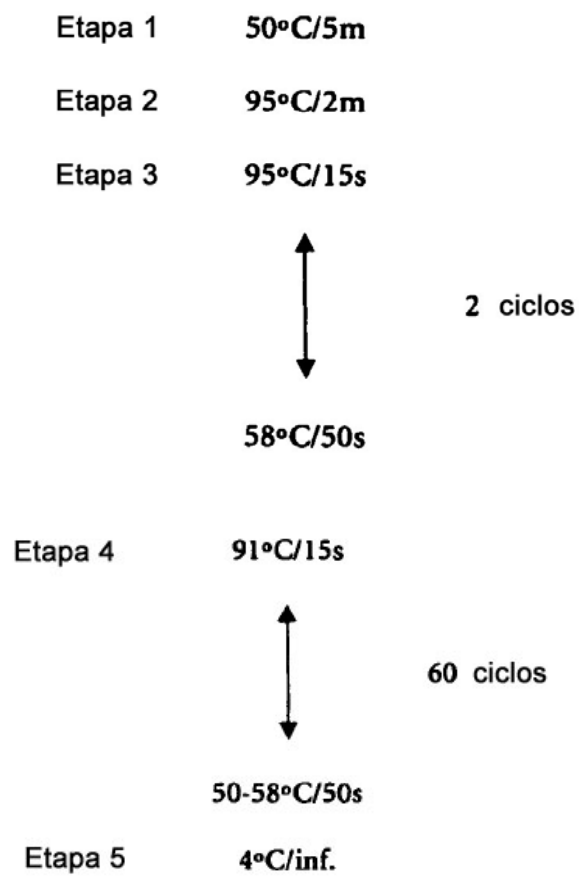
5

10

TABLA XVI

PCR del VIH

Termociclado



5

10

TABLA XVII
RT-PCR del VIH

Termociclado

Etapa 1 50°C/5m

Etapa 2 59°C/30m

Etapa 3 95°C/2m

Etapa 4 95°C/15s

2 ciclos



58°C/50s

Etapa 5 91°C/15s

60 ciclos



50-58°C/50s

Etapa 6 4°C/inf.

Ejemplo 2

5

Sondas de marcaje único

Desactivación de la fluorescencia

10

El presente Ejemplo y los Ejemplos siguientes ilustran diversas características de rendimiento de ensayos que incluían la utilización de modificadores de la emisión lumínica descritos en la presente invención y una diversidad de sondas de marcaje único. El presente ejemplo ilustra la desactivación de la fluorescencia utilizando diversos modificadores de la emisión lumínica de la invención.

15

La figura 4 es un gráfico (la ordenada representa el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración (µg/ml)) que muestra la desactivación de la fluorescencia de diferentes ácidos nucleicos de marcaje único utilizando diversas concentraciones de azul de metileno nuevo. Tal como se muestra en la leyenda que acompaña al gráfico, los gráficos se refieren a un oligonucleótido monocatenario de marcaje único que presenta una secuencia de 31 nucleótidos (es decir, un 31-mero (GAG108AF; ETCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTATCTTTAP, en donde E=FAM y P=fosfato (SEC ID nº 13)), un 31-mero bicatenario de marcaje único, y un dinucleótido o dímero de marcaje único a las concentraciones indicadas de azul de metileno nuevo. Cada uno de estos ácidos nucleicos incluía un marcaje FAM 5'-terminal.

20

25

La figura 5 es un gráfico (la ordenada representa el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración de modificador de la emisión lumínica (µg/ml)) que muestra la desactivación de la fluorescencia utilizando diversos modificadores de la emisión lumínica llevada a cabo en análisis separados. En estos análisis se

utilizaron 31-meros monocatenarios que comprendían marcajes FAM 5'-terminales (es decir, GAG108AF, anteriormente). Tal como se muestra en la leyenda que acompaña al gráfico, los diferentes modificadores de la emisión lumínica utilizados fueron azul de metileno (azul Me), azul de metileno nuevo (azul N Me), azul B, tionina, azul de dimetil-metileno (azul DM Me) y azul de toluidina (azul T).

La figura 6 es un gráfico (la ordenada representa el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración (µg/ml) de modificador de la emisión lumínica) que muestra la desactivación de la fluorescencia de oligonucleótidos bicatenarios de marcaje único utilizando diversos modificadores de la emisión lumínica. Es decir, los extremo 5' de una cadena de los 31-meros bicatenarios utilizados en estos análisis separados se marcaron con FAM. Tal como se muestra en la leyenda que acompaña al gráfico, los diferentes modificadores de la emisión lumínica utilizados fueron: azul de metileno (azul Me), azul de metileno nuevo (azul N Me), azul B, tionina, azul de dimetil-metileno (azul DM Me) y azul de toluidina (azul T).

La figura 7 es un gráfico (la ordenada representa el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración (µg/ml) de modificador de la emisión lumínica) que muestra la desactivación de la fluorescencia de dinucleótidos marcados (dímeros timidina (TT)) utilizando diversos modificadores de la emisión lumínica. El dinucleótido utilizado en estos análisis se marcó en los extremo 5' con FAM (es decir, 6-carboxi-fluoresceína). Tal como se muestra en la leyenda que acompaña al gráfico, los diferentes modificadores de la emisión lumínica utilizados fueron: azul de metileno (azul Me), azul de metileno nuevo (azul N Me), azul B, tionina, azul de dimetil-metileno (azul DM Me) y azul de toluidina (azul T).

La figura 8 es un gráfico (la ordenada representa el porcentaje de fluorescencia; las abscisas representan la concentración (µg/ml) de modificador de la emisión lumínica) que muestra la desactivación de la fluorescencia de oligonucleótidos monocatenarios marcados con azul de metileno bajo diversas condiciones. En estos análisis se utilizaron 31-meros monocatenarios que comprendían marcajes FAM 5'-terminales. Tal como se muestra en la leyenda que acompaña al gráfico, las mezclas de reacción representadas por una línea incluían poli-rA, mientras que las mezclas de reacción representadas por la otra línea carecían de poli-rA. La poli-rA es homopolímero de adenosina que generalmente se utiliza como componente de un tampón diluyente para muestras. Sirve como ácido nucleico portador, y mejora la sensibilidad de los ensayos al minimizar las pérdidas de ácidos nucleicos diana tras la preparación de la muestra. La poli-rA típicamente se utiliza a una concentración relativamente alta. El análisis que ilustra la figura 8 evalúa si poli-rA interfiere con la efectividad de un desactivador soluble, por ejemplo mediante la unión al mismo, reduciendo su disponibilidad.

Ejemplo 3

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de marcaje único y pigmentos azul

El presente ejemplo ilustra la realización que describe la detección en tiempo real utilizando una sonda de marcaje único y un modificador de la emisión lumínica de la invención.

La figura 9 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y diversas concentraciones de azul B en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en las mezclas de reacción representadas por estos gráficos se marcaron en los extremos 5' con FAM. Las mezclas de reacción también incluían poli-rA. Las etiquetas en cada línea muestran la concentración de azul B utilizada en cada una de dichas mezclas de reacción. La fluorescencia relativa como función de la concentración de modificador de la emisión lumínica para estas reacciones se proporciona en el gráfico de la figura 11. Este gráfico muestra, por ejemplo, que la fluorescencia relativa se incrementa a medida que se incrementa la concentración de modificador de la emisión lumínica.

La figura 10 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y diversas concentraciones de azul B en ensayos de detección de VIH. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en las mezclas de reacción representadas por dichas líneas se marcaron en los extremos 5' con FAM. Las mezclas de reacción también incluían poli-rA. Las etiquetas en las líneas muestran la concentración de azul B utilizada en cada una de dichas mezclas de reacción. Tal como se muestra, al utilizar la sonda de VHC en un sistema de amplificación de VIH, la sonda no resultó cortada y no se observaron curvas de crecimiento. Este análisis demostró que la curva de crecimiento observada era específica de la hidrólisis de la sonda y que no se debía a la introducción del desactivador soluble en el amplicón.

Ejemplo 4

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de marcaje único y azul de metileno nuevo

La figura 12 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasas que incluían sondas nucleasas de marcaje único y azul de metileno nuevo en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA y la temperatura de desnaturalización (T_{den}) utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias de ADNc de VHC. La temperatura de hibridación utilizada en estas reacciones era de 58°C. Las concentraciones de azul de metileno nuevo utilizadas en estas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico. El gráfico de amplificación de la figura 13 muestra la fluorescencia relativa para dichos datos.

Ejemplo 5

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de doble marcaje y azul de 1,9-dimetil-metileno

La figura 14 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa doblemente marcadas y azul de 1,9-dimetil-metileno en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje doble (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron con FAM y BHQTM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. En cada mezcla de reacción se incluían 20.000 copias de ADNc del VHC. La temperatura de hibridación utilizada en estas reacciones era de 58°C. Las concentraciones de azul de metileno nuevo utilizadas en estas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico. El gráfico de amplificación de la figura 15 muestra la fluorescencia relativa para estos datos.

Ejemplo 6

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de marcaje único, azur A y azur C

La figura 16 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y azur A en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias de ADNc de VHC. Las concentraciones de azur A utilizadas en estas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 17 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas nucleasa de marcaje único y azur C en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias de ADNc de VHC. Las concentraciones de azur C en estas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico.

Ejemplo 7

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de marcaje único y tionina

La figura 18 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas nucleasa de marcaje único y tionina en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias de ADNc de VHC. Las concentraciones de tionina utilizadas en estas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico.

Ejemplo 8

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de marcaje único y verde de metileno

La figura 19 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los datos obtenidos en diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y verde de metileno en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremo 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por dichas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias de

ADNc de VHC. Las concentraciones de verde de metileno utilizadas en estas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico.

Ejemplo 9

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de marcaje único y diversos modificadores de la emisión lumínica

La figura 20 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y diferentes pigmentos azur en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA y 200.000 copias de un ácido nucleico diana de VHC. La T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Tal como se muestra en las etiquetas incluidas en el gráfico, los pigmentos utilizados en estos análisis eran azur A, azur B y azur C, cada uno de los cuales se encontraba presente en las mezclas de reacción respectivas a una concentración de 40 µg/ml.

La figura 21 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasas que incluían sondas de 5'-nucleasas de marcaje único y diversos modificadores de la emisión lumínica en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA y 200.000 copias de un ácido nucleico diana de VHC. La T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Tal como se muestra en las etiquetas incluidas en el gráfico, los modificadores de la emisión lumínica utilizados en estos análisis fueron: azur A, azur B, azur C, azul de metileno, azul de toluidina, tionina y verde de metileno, cada uno de los cuales se encontraba presente en las mezclas de reacción respectivas a una concentración de 40 µg/ml.

Ejemplo 10

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando diversas concentraciones de azul de metileno

La figura 22 (paneles A y B) es una fotografía de un análisis en gel de poliacrilamida de reacciones de PCR con ADN de VHC diana, diversas sondas y diversas cantidades de azul de metileno. Los números mostrados en la parte superior de los carriles en el gel indican las concentraciones (µg/ml) de azul de metileno que se incluyeron en las mezclas de reacción particulares. Los carriles señalados con 0(-) son aquellos en los que se corrieron controles negativos. Las mezclas de reacción incluían poli-rA y 20.000 copias del ADN de VHC diana. Además, la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Tal como se muestra, las sondas utilizadas fueron: ST650_5'-FAM y ST2325_5'-HEX, ST650 dual y ST2535 dual, indicados anteriormente. Los paneles A y B representan reacciones por duplicado. Este análisis demostró que la amplificación por PCR resulta relativamente no afectada por la presencia de cantidades crecientes de modificador de emisión lumínica.

La figura 23 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra los datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y azul de metileno en ensayos de detección de QS-VHC. Las sondas ST2535 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 12) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con HEX. Las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias del ADNc de QS VHC. La concentración de azul de metileno utilizada en estas mezclas de reacción era de 40 µg/ml. Las etiquetas incluidas en el gráfico indican la concentración de azul de metileno utilizada en las mezclas de reacción representadas por cada línea. Este análisis demostró, por ejemplo, la capacidad de los pigmentos tiazina de desactivar diferentes fluoróforos (por ejemplo diferentes de FAM).

La figura 24 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían múltiples sondas nucleasas de marcaje único y azul de metileno en ensayos de detección de QS-VHC. Las sondas de marcaje único utilizadas en estos análisis múltiplex fueron oligonucleótidos marcados en el extremo 5' con FAM y HEX. Las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias del ADNc de QS-VHC. Las concentraciones de azul de metileno utilizadas en las mezclas de reacción con estas parejas de sondas se indica en las etiquetas incluidas en el gráfico. Este análisis ilustra la capacidad de los pigmentos tiazina de ser utilizados en la detección múltiplex con sondas de marcaje único.

Ejemplo 11

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando azur B

La figura 25 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en ausencia de azul B en ensayos de detección de VHC. Las mezclas de reacción representadas por estas líneas no presentaban azul B e incluían 20.000 copias de un ácido nucleico diana de VHC. La temperatura de desnaturalización (T_{den}) utilizada en estas reacciones era de 95°C. Tal como se muestra en las etiquetas de líneas incluidas en el gráfico, las mezclas de reacción incluían sondas marcadas en los extremos 5' con FAM (es decir, 5'-FAM) o sondas de marcaje doble (es decir, duales) e incluían o no incluían poli-rA. Tal como se muestra, se produjo una ligera liberación de fluorescencia de la sonda de marcaje único no desactivada. Esto puede haberse debido a cierta desactivación G en la sonda. Sin embargo, este incremento de la señal generalmente es excesivamente reducido para que resulte útil en un ensayo práctico. En contraste, la sonda de marcaje doble generó una buena señal. Además, en presencia del desactivador soluble, la sonda de marcaje único también generó una buena señal (ver, por ejemplo, las figuras 26 y 27, que se describen posteriormente).

Las figuras 26 y 27 son gráficos de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta (fig. 26) o fluorescencia normalizada (fig. 27); las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían azul B en ensayos de detección de VHC. Las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían 30 µg/ml de azul B y 20.000 copias de un ácido nucleico diana de VHC. La T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Tal como se muestra en las etiquetas de las líneas, las mezclas de reacción incluían sondas marcadas en los extremos 5' con FAM (es decir, 5'-FAM) o sondas de marcaje doble (es decir, duales) e incluían o no incluían poli-rA.

Ejemplo 12

Reacciones adicionales de amplificación utilizando azul de metileno

Las figuras 28 y 29 son gráficos de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestran, respectivamente, datos obtenidos de titulaciones de moldes de ADN y de ARN que incluían sondas nucleasa de marcaje único y azul de metileno en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C.

La concentración de azul de metileno utilizada en estas mezclas de reacción era de 40 µg/ml. Los marcajes incluidos en los gráficos indican el número de copias del ADNc diana o ARN de VHC conjuntamente con otras condiciones de reacción para cada línea. Estos análisis ilustran, por ejemplo, que la detección por PCR y RT-PCR cuantitativas y altamente sensibles puede conseguirse utilizando dichos métodos.

La figura 30 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y azul de metileno en ensayos de detección de VIH. Las sondas GAG108 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 9) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. La concentración de azul de metileno utilizada en las mezclas de reacción era de 40 µg/ml. El número de copias de ADNc del VHC presente en cada mezcla de reacción se indica en las etiquetas que acompañan al gráfico. Este análisis ilustra, por ejemplo, que puede conseguirse una detección por PCR cuantitativa y altamente sensible utilizando dicho método.

La figura 31 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra la sensibilidad de detección en ensayos de 5'-nucleasa en los que se variaron los números de copia de ácidos nucleicos diana en presencia de azul de metileno. Los números mostrados en la parte superior de los carriles en el gel indican el número de copia de ácidos nucleicos diana utilizado para el análisis particular. Los carriles señalados con “(-)” o con “sin pigmento(-)” son aquellos en los que se corrieron controles negativos. Las mezclas de reacción incluían poli-rA y la temperatura de desnaturalización (T_{den}) utilizada en estas reacciones era de 95°C. La concentración de azul de metileno en las mezclas de reacción era de 40 µg/ml. El ácido nucleico diana procedía de VHC y la sonda era ST650 (correspondiente a la secuencia SEC ID nº 5) en las reacciones mostradas en el panel A. El ácido nucleico diana era de VIH y la sonda era GAG108 (correspondiente a la secuencia SEC ID nº 9) en las reacciones mostradas en el panel B. Estos ensayos muestran, por ejemplo, que no se produjo ningún efecto deletéreo significativo sobre la eficiencia de la PCR ni sobre la sensibilidad de detección en presencia del desactivador soluble.

Ejemplo 13

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sonda de marcaje único y azul de metileno nuevo

La figura 32 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y azul de metileno nuevo en ensayos de detección de VHC. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se

marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias del ADNc de VHC. La temperatura de hibridación utilizada en estas reacciones era de 40°C. Las concentraciones de azul de metileno nuevo utilizadas en estas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 33 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas nucleasa marcadas con 5'-FAM y azul de metileno nuevo. Este gráfico, conjuntamente con otros a los que se hace referencia en la presente memoria, muestran la modulación con la temperatura de la señal de fluorescencia relativa. Más específicamente, en dichas mezclas de reacción se detectó fluorescencia a una temperatura de hibridación de 40°C. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en estas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por estas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias de ADNc de VHC. Las concentraciones de azul de metileno nuevo utilizadas en dichas mezclas de reacción se indican en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 34 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de diversas reacciones de 5'-nucleasa que incluían sondas 5'-nucleasa de marcaje único y azul de metileno nuevo en las que se utilizaron diferentes temperaturas de hibridación. Las sondas ST650 de marcaje único (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 5) utilizadas en dichas mezclas de reacción se marcaron en los extremos 5' con FAM. Además, las mezclas de reacción representadas por dichas líneas incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Cada mezcla de reacción incluía 20.000 copias de ADNc de VHC. Las concentraciones de azul de metileno nuevo utilizadas en las mezclas de reacción era de 40 µg/ml. La temperatura de hibridación asociada a cada mezcla de reacción se indica en las etiquetas incluida en el gráfico.

Ejemplo 14

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sonda de marcaje múltiple y azul de metileno

El presente ejemplo y otros ejemplos posteriores ilustran la modificación de la fluorescencia en ensayos de 5'-nucleasa que incluían la utilización de sondas de marcaje múltiple. El presente ejemplo muestra la utilización de azul de metileno en reacciones de 5'-nucleasa para modificar la emisión de línea base de luz de sondas 5'-nucleasa.

La figura 35 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa realizadas en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno. Se marcó cada sonda con FAM y un BHQTM. Las concentraciones particulares de azul de metileno se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 36 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo bajo las mismas condiciones utilizadas para las reacciones descritas con respecto a la figura 35, aparte del doblado de las concentraciones de las sondas utilizadas en cada reacción. Las concentraciones particulares de azul de metileno se muestran en el gráfico.

La figura 37 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa que simulan el agrupamiento de sondas. Se muestran en el gráfico la concentración particular de azul de metileno y la concentración relativa de sonda asociadas a cada línea.

La figura 38 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia relativa; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo utilizando una sonda de marcaje doble FAM-BHQ en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno. La concentración particular de azul de metileno asociada a cada línea se muestra en las etiquetas incluidas en el gráfico.

Ejemplo 15

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sondas de marcaje múltiple y azul de 1,9-dimetil-metileno

El presente ejemplo ilustra la utilización de azul de 1,9-dimetil-metileno en reacciones de 5'-nucleasa para modificar la emisión de línea base de luz de sondas 5'-nucleasa.

La figura 39 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de azul de 1,9-dimetil-metileno. Las mezclas de reacción incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Las mezclas de reacción incluían 20.000 copias de un ácido nucleico

diana de VHC. La sonda ST650 (correspondiente a la secuencia SEC ID nº 3) se marcó con FAM y BHQ TM. La temperatura de hibridación utilizada en estas reacciones era de 58°C. Las concentraciones particulares de azul de 1,9-dimetil-metileno se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico. El gráfico de amplificación de la figura 40 muestra la fluorescencia relativa para estos datos.

Ejemplo 16

Reacciones en cadena de polimerasa utilizando sonda de marcaje múltiple y azul de metileno nuevo

El presente ejemplo ilustra la utilización de azul de metileno nuevo en reacciones de 5'-nucleasa para modificar la emisión de línea base de luz de sondas 5'-nucleasa.

La figura 41 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno nuevo. Las mezclas de reacción incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Las mezclas de reacción incluían 20.000 copias de un ácido nucleico diana procedente de VHC. La sonda ST650 (correspondiente a la secuencia SEC ID nº 3) se marcó con FAM y BHQTM. Las concentraciones particulares de azul de metileno nuevo se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico. La temperatura de hibridación utilizada en estas reacciones era de 58°C. El gráfico de amplificación de la figura 42 muestra la fluorescencia relativa para estos datos.

Ejemplo 17

Amplificación y detección de cuantificación estándar utilizando sonda marcada con HEX

El presente ejemplo ilustra la utilización de azul de metileno para modificar la emisión de línea base de luz de una sonda 5'-nucleasa marcada con HEX en ensayos de cuantificación estándar (QS) de amplificación y detección. El ADN de VHC-QS contenía secuencias de unión de cebador de VHC y una región única específica de QS de unión a sonda. Las mezclas de reacción contenían una pareja de cebadores que es específica para ADN de VHC y de VHC-QS, y la detección del ADN amplificado se llevó a cabo mediante la medición de la intensidad de emisión de pigmentos informadores fluorescentes liberados de las sondas de QS específicas de diana durante la amplificación, permitiendo la identificación independiente de VHC y VHC-QS.

Más específicamente, la figura 43 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia de origen; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra datos obtenidos de reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de azul de metileno. Las mezclas de reacción incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Las mezclas de reacción incluían sondas ST2535CY5H14 (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 12) y 20.000 copias de ADN-QS. Las concentraciones particulares de azul de metileno nuevo utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico. El gráfico de amplificación de la figura 44 muestra la fluorescencia relativa para estos datos.

Ejemplo 18

Modificación de la emisión de línea base de luz en la detección de ácidos nucleicos del VHC

El presente ejemplo ilustra la utilización de diversas modificaciones de la emisión lumínica para modificar la emisión de línea base de luz de sondas 5'-nucleasa en ensayos que implicaban la detección de ácidos nucleicos de VHC.

La figura 45 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección de ácidos nucleicos del VHC en reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de verde Janus B. Las mezclas de reacción incluían sondas ST650ACY5F14IN (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 4) y 20.000 copias de ácidos nucleicos diana de VHC. Las concentraciones particulares de verde Janus B utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 46 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección de ácidos nucleicos de VHC en reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de azul de toluidina. Las mezclas de reacción incluían sondas ST65ACY5F14IN (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 4) y 20.000 copias de ácidos nucleicos diana de VHC. Las concentraciones particulares de azul de toluidina utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 47 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección de ácidos nucleicos de VHC en reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de azul puro BO de Victoria. Las concentraciones particulares de azul puro BO de Victoria utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 48 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección de los ácidos nucleicos de VHC en reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de azul A. Las concentraciones particulares de azul A utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 49 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección de ácidos nucleicos de VHC en reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de verde de metileno. Las mezclas de reacción incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Las mezclas de reacción incluían sondas ST650ACY5F14IN (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 4) y 20.000 copias de ácidos nucleicos diana de VHC. Las concentraciones particulares de verde de metileno utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 50 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección de ácidos nucleicos de VHC en reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de tionina. Las mezclas de reacción incluían poli-rA, y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Las mezclas de reacción incluían sondas ST650ACY5F14IN (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 4) y 20.000 copias de ácidos nucleicos diana de VHC. Las concentraciones particulares de tionina utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

La figura 51 es un gráfico de amplificación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta; las abscisas representan el número de ciclos) que muestra la detección de ácidos nucleicos de VHC en reacciones de 5'-nucleasa llevadas a cabo en presencia de diversas concentraciones de azul B. Las mezclas de reacción incluían poli-rA y la T_{den} utilizada en estas reacciones era de 95°C. Las mezclas de reacción incluían sondas ST650ACY5F14IN (correspondientes a la secuencia SEC ID nº 4) y 20.000 copias de ácidos nucleicos diana de VHC. Las concentraciones particulares de azul B utilizadas se muestran en las etiquetas incluidas en el gráfico.

Ejemplo 19

Análisis de la curva de disociación (determinación de la T_m) utilizando una sonda de marcaje único conjuntamente con un modificador soluble de la emisión lumínica en un sistema de modelo de VHC

El presente ejemplo describe un análisis de curva de disociación (es decir, la determinación de la T_m) utilizando una sonda de marcaje único conjuntamente con un modificador soluble de la emisión lumínica (es decir, un desactivador soluble). Se utilizaron una sonda VHC y moldes sintéticos de VHC en el sistema experimental. Se demostró la efectividad de la utilización de la sonda de marcaje único con un desactivador soluble.

Se diseñó y sintetizó una sonda VHC de tipado (SEC ID nº 14) que contenía un único marcaje de fluoresceína (FAM), tal como se muestra en la figura 52A. Esta sonda se hibrida con un dominio dentro de la 5'-UTR heterogénea del genoma de VHC. La sonda se hibridó alternativamente con diferentes moldes monocatenarios sintéticos correspondientes a diversos genotipos de VHC, tal como se indica en la tabla a continuación.

Genotipo de VHC/subtipo	Molde sintético	SEC ID nº:
1a/b	AGGACCCGGTCGTCCTGGCAATTCCGGT GTA	15
2a/c	AGGACCCAGTCTTCCCGGCAATTCCGGTG TA	16
4	AGGACCCGGTCATCCCGGCGATTCCGGT GTA	17
2b	AGGACCCGGTCTTCCGGTAATTCCGGTG TA	18
5	AGGACCCGGTCATCCCGGCAATTCCGGT GTA	19
6	AGGACCCGGTCATCCTGGCAATTCCGGT GTA	20
3a	AGGACCCGGTCACCCAGCGATTCCGGT GTA	21

La sonda se hibridó a cada uno de los moldes sintéticos en reacciones separadas. Para el análisis de disociación, las diversas mezclas de hibridación se calentaron a 95°C durante 2 minutos, y después se enfriaron a 20°C para permitir la hibridación y la formación de complejos de hibridación. Las reacciones que contenían complejos de hibridación seguidamente se calentaron en aproximadamente 76 ciclos, en los que se incrementó la temperatura 1°C durante 30 segundos en cada ciclo. Se midió la fluorescencia durante 50 milisegundos al final de cada ciclo de 30 segundos. Las reacciones de disociación se corrieron en placas de microtitulación de 96 pocillos y se monitorizó la fluorescencia utilizando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® RTM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se midió la fluorescencia en este experimento (y todos los experimentos que utilizaron sondas marcadas con FAM) utilizando un filtro de excitación a 485 nm con una anchura de banda de 20 nm, y un filtro de emisión a 520 nm con una anchura de banda de 10 nm.

Se realizó un seguimiento de la formación/disociación de los complejos de hibridación en la mezcla utilizando un sistema de desactivador soluble. El marcaje FAM unido covalentemente a la sonda proporcionó una emisión adecuada del donante. La acción de desactivación fue proporcionada por el desactivador soluble azul de metileno. El azul de metileno es un miembro de una familia de desactivadores solubles basados en estructuras de pigmento tiazina y diazina. El desactivador azul de metileno presenta una afinidad de unión para el ADN bicatenario, y muestra un efecto de desactivación al encontrarse en estrecha proximidad al marcaje fluorescente en la sonda en el caso de que la sonda se encuentre en una estructura de dúplex con la diana. Sin embargo, el desactivador soluble presenta una afinidad reducida para el ADN monocatenario. De esta manera, al calentar la solución que contiene el complejo de hibridación que comprende la sonda y finalmente disociarse, se reduce la afinidad del desactivador para el ácido nucleico, resultando en un incremento de la fluorescencia.

Los datos de fluorescencia pueden mostrarse gráficamente mostrando un valor de fluorescencia de origen como función de la temperatura. En un experimento de control, se omitió el desactivador soluble azul de metileno de la reacción de disociación. Los resultados de los experimentos independientes (un análisis de disociación utilizando la sonda y cada molde sintético de VHC) se superpusieron en el mismo gráfico y se muestran en la figura 52B. En estos experimentos, los resultados de múltiples experimentos independientes se superponen en el mismo gráfico. Se muestra un conjunto representativo de los datos. Tal como se esperaba, en ausencia del desactivador soluble, no se produjo ningún cambio significativo de fluorescencia de FAM, indicando una transición de dúplex a estado monocatenario en cada uno de los ejemplos, debido a la ausencia de un grupo desactivador, a pesar del programa de ciclado térmico, que resultaría en la hibridación y disociación de los dúplex de ADN.

A continuación, utilizando los mismos reactivos en un nuevo análisis, se añadió azul de metileno a las reacciones de disociación a una concentración de 10 µg/ml. Los resultados de este análisis de disociación se muestran en la figura 53. Tal como puede observarse, cada complejo de sonda/molde proporcionó un perfil de disociación diferente tras el calentamiento, indicando valores de T_m diferentes para los diferentes genotipos.

En el siguiente experimento, se añadió azul de metileno a las reacciones de disociación a una concentración de 20 µg/ml. Los resultados de este análisis de disociación se muestran en la figura 54. Tal como puede observarse, cada complejo de sonda/molde nuevamente proporcionó un perfil de disociación diferente tras el calentamiento, indicando valores de T_m diferentes correspondientes a diferentes genotipos de VHC.

Los datos en la figura 54 pueden interpretarse más fácilmente utilizando un gráfico de primera derivada de los mismos datos. La figura 55 muestra los datos de la figura 54 en forma de gráfico de primera derivada. El pico de cada curva representa la T_m del complejo de hibridación bajo dichas condiciones particulares de hibridación. Tal como puede observarse, la T_m para cada genotipo de VHC puede distinguirse fácilmente en el gráfico. De esta manera, el desactivador soluble pigmento tiazina azul B puede utilizarse con éxito en determinaciones de T_m en una curva de disociación.

Ejemplo 20

Demostración de la estabilización de un dúplex de ácidos nucleicos en presencia de pigmentos tiazina utilizando un sistema de modelo de VHC

El presente ejemplo ilustra las propiedades de estabilización de dúplex de los pigmentos tiazina. En el sistema experimental se utilizó una sonda de VHC y moldes sintéticos de VHC, y se demostró la estabilización de los dúplex mediante medición de las T_m de los diversos complejos de hibridación formados.

Se establecieron reacciones de curva de disociación utilizando la sonda de marcaje único (SEC ID nº 14) y el molde sintético de VHC tipo 1a/b (SEC ID nº 15), tal como se muestra en la fig. 56. Este análisis aplicó los mismos análisis descritos en el Ejemplo anterior. Esta combinación particular de sonda y molde de VHC genotipo 1a/b produjo una alineación perfecta (sin apareamientos incorrectos). Estas reacciones de análisis de disociación contenían, alternativamente, cuatro concentraciones crecientes del pigmento tiazina azul de metileno comprendidas entre 10 y 40 µg/ml. Los datos de disociación se muestran en la figura 56 en forma de un gráfico de primera derivada de fluorescencia frente a la temperatura. Los resultados de los cuatro experimentos independientes se superponen en

el mismo gráfico. Se muestra un conjunto representativo de los datos. Tal como puede observarse en la figura, la concentración creciente de azul de metileno resultó en una estabilidad incrementada de los dúplex de apareamiento perfecto, reflejado en valores de T_m más altos a medida que se incrementaba la concentración de azul de metileno.

- 5 Se realizaron tres experimentos adicionales en los que los dúplex contenían uno, dos o tres apareamientos incorrectos, y se evaluaron los efectos del azul de metileno sobre la estabilidad de los dúplex. En el primero de estos experimentos, se establecieron reacciones de curva de disociación utilizando la misma sonda de genotipado de VHC que la utilizada en la figura 56, y un molde sintético de VHC correspondiente a VHC genotipo 6 (SEC ID nº 20), tal como se muestra en la figura 57. Esta combinación particular de sonda y molde de genotipo 6 produjo un dúplex de
- 10 ácidos nucleicos que contenía una posición incorrectamente apareada. Tal como en el experimento anterior, las reacciones de disociación contenían alternativamente cuatro concentraciones crecientes del pigmento tiazina azul de metileno comprendidas entre 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$. Los datos de disociación se muestran en la figura 57 en forma de gráfico de primera derivada de la fluorescencia frente a la temperatura. Los resultados de los cuatro experimentos independientes se superponen en el mismo gráfico. Se muestra un conjunto representativo de los datos. Tal como
- 15 puede observarse en la figura 57, la concentración creciente de azul de metileno resultó en una estabilidad incrementada de los dúplex que contenían un apareamiento incorrecto, reflejado en valores de T_m más altos a medida que se incrementaba la concentración de azul de metileno.

- 20 De manera similar, también se establecieron reacciones de curva de disociación utilizando la misma sonda de genotipado de VHC y un molde sintético de VHC correspondiente a VHC genotipo 5 (SEC ID nº 19), tal como se muestra en la figura 58. Esta combinación de sonda y molde de genotipo 5 produjo un dúplex de ácidos nucleicos que contenía dos posiciones incorrectamente apareadas. Las reacciones de disociación contenían alternativamente cuatro concentraciones crecientes del pigmento tiazina azul de metileno. Los datos de disociación se muestran en la figura 58 en forma de gráfico de primera derivada de la fluorescencia frente a la temperatura. Los resultados de los
- 25 cuatro experimentos independientes se superponen en el mismo gráfico. Se muestra un conjunto representativo de los datos. Tal como puede observarse en la figura 58, la concentración creciente de azul de metileno resultó en una estabilidad incrementada de los dúplex que contenían dos apareamientos incorrectos, reflejado en los valores de T_m más altos a medida que se incrementaba la concentración de azul de metileno.

- 30 También se establecieron reacciones de curva de disociación con sonda y molde VHC que resultó en dúplex de ácidos nucleicos que contenían tres posiciones apareadas incorrectamente, tal como se muestra en la figura 59. Estas reacciones utilizaron un molde sintético de VHC correspondiente al VHC genotipo 2a/c (SEC ID nº 16). Las reacciones de disociación contenían alternativamente cuatro concentraciones crecientes del pigmento tiazina azul de metileno. Los datos de disociación se muestran en la figura 59 en forma de gráfico de primera derivada de
- 35 fluorescencia frente a la temperatura, en el que los resultados de los cuatro experimentos independientes se superponen en el mismo gráfico. Se muestra un conjunto representativo de los datos. Tal como puede observarse en la figura 59, la concentración creciente de azul de metileno resultó en una estabilidad incrementada de los dúplex que contenían las tres posiciones incorrectamente apareadas, reflejada en los valores de T_m más altos a medida que se incrementaba la concentración de azul de metileno.

- 40 Resulta significativo observar que el grado de estabilización era más pronunciado a mayores concentraciones de azul de metileno, y además, los dúplex que contenían un número creciente de apareamientos incorrectos mostraban un grado mayor de estabilización según las mediciones de T_m . Por ejemplo, sin apareamientos incorrectos en un dúplex (figura 56), la diferencia de valores de T_m al utilizar 10 $\mu\text{g/ml}$ de azul de metileno frente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de azul de metileno era de 2,0°C. Sin embargo, con tres apareamientos incorrectos en el dúplex (figura 59), la diferencia en los
- 45 valores de T_m al utilizar 10 $\mu\text{g/ml}$ de azul de metileno frente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de azul de metileno era mucho más pronunciada, con una disparidad de 12,4°C entre dichas condiciones de reacción. Los dúplex que presentaban uno y dos apareamientos incorrectos (figuras 57 y 58) mostraban grados intermedios de estabilización del dúplex.

50 Ejemplo 21

Estabilización del dúplex de ácidos nucleicos en presencia de pigmentos tiazina utilizando múltiples dianas de molde de VHC

- La propiedad de estabilización de los dúplex de los pigmentos tiazina se ilustra adicionalmente en el gráfico de
- 55 columnas proporcionado en la figura 60. Este gráfico de columnas proporciona un resumen de las determinaciones de T_m realizadas con las sondas de VHC indicadas con los diversos ácidos nucleicos sintéticos que presentan secuencias de nucleótidos correspondientes a los genotipos de VHC mostrados. Este análisis examinó los efectos del azul de metileno, en el que alternativamente se utilizó 0, 10 ó 20 $\mu\text{g/ml}$ de azul de metileno en el análisis de curva de disociación.

- 60 Dichas determinaciones se realizaron utilizando dos metodologías diferentes. En un conjunto de experimentos, las determinaciones de la T_m se realizaron en ausencia de azul de metileno nuevo. En este caso, una sonda FAM de marcaje único resultaría ineficaz para determinar la T_m , debido a que no existe ninguna pareja adecuada de donante/desactivador para realizar un seguimiento de la formación/disociación de dúplex. En este caso, se sintetiza
- 65 una sonda sin marcaje FAM (SEC ID nº 22) y la curva de disociación y la determinación de la T_m se llevan a cabo

incluyendo verde SYBR® en la reacción. La tinción de verde SYBR® es específica para el ADN bicatenario, y por lo tanto es un indicador efectivo de la asociación/disociación de dúplex. Alternativamente, en presencia de azul de metileno en las reacciones de disociación, se utiliza una sonda FAM de marcaje único (SEC ID nº 14), tal como se ha descrito anteriormente. En estos experimentos, las secuencias de nucleótidos de las dos sondas diferentes eran idénticas; la única diferencia entre las dos sondas era la ausencia/presencia del marcaje FAM.

Los dúplex resultantes contenían un número variable de apareamientos incorrectos de nucleótidos, tal como se muestra a continuación:

Molde de genotipo de VHC	Número de apareamientos incorrectos de nucleótidos en un dúplex con la sonda
1a/b	0
2a/c	3
2b	4
3a	5
4	3
5	2
6	1

Los resultados de este tipo de análisis, con siete moldes sintéticos diferentes correspondientes a diversos genotipos/subtipos de VHC, se resumen en la figura 60, y demuestran la naturaleza general del efecto de estabilización de los dúplex. Se muestra un conjunto representativo de los datos. Estos datos también se resumen en la tabla a continuación.

Tratamiento	Genotipo						
	3a	2b	2a/c	4	5	6	1a/b
0 µg/ml de azul de metileno nuevo + sonda no marcada + verde SYBR®	32	36	39	32	48,9	56,8	64,5
10 µg/ml de azul de metileno nuevo + sonda marcada	34,2	40	41,1	45,6	53,7	58	66,9
20 µg/ml de azul de metileno nuevo + sonda marcada	38,2	42,2	47	47,7	54	61,2	68,2

En esta figura pueden observarse dos tendencias claras, ilustrando los efectos estabilizadores de los dúplex del azul de metileno. En primer lugar, en el análisis de cualquier genotipo de VHC, se produce un incremento de la estabilidad de los dúplex al añadir concentraciones crecientes de azul de metileno. Esto es cierto tanto para dúplex perfectamente apareados (genotipo 1a/b) como para dúplex que contenían uno o más apareamientos incorrectos (todos los demás genotipos). En segundo lugar, aquellos dúplex que contienen un número mayor de apareamientos incorrectos generalmente mostraron el mayor grado de estabilización (según las mediciones de cambios de la T_m) con la adición del azul de metileno al análisis de disociación. Por ejemplo, los dúplex que contenían VHC genotipo 1a/b (apareamiento perfecto, sin apareamientos incorrectos) sólo mostraron una ligera elevación del valor de T_m experimentalmente observado al añadir azul de metileno. En contraste, los dúplex que presentaban una o más posiciones nucleótidas incorrectamente apareadas mostraron mayores grados de estabilidad mejorada de los dúplex al añadir azul de metileno nuevo. También se observaron efectos similares al utilizar el pigmento tiazina azul de metileno.

Resulta significativo indicar que, en el caso de los experimentos resumidos en la figura 60, el azul de metileno sirve a dos funciones. En el caso de que se utilice una única sonda marcada con FAM en el análisis de disociación, el azul de metileno nuevo en primer lugar sirve de desactivador soluble con la sonda marcada con FAM para monitorizar la asociación/disociación de dúplex. En segundo lugar, tal como se ilustra en la presente memoria, el azul de metileno nuevo actúa estabilizando los dúplex, y más significativamente, los dúplex que contienen apareamientos incorrectos de nucleótidos. En esta comparación, los datos para los controles sin pigmento (azul de metileno nuevo) se obtuvieron mediante la utilización de sonda no marcada y detección con verde SYBR para la determinación de la T_m.

Ejemplo 22

Demostración de la estabilización del apareamiento incorrecto de un solo nucleótido en presencia de pigmentos tiazina

El presente ejemplo ilustra adicionalmente las propiedades de estabilización del apareamiento incorrecto de un solo nucleótido de los pigmentos tiazina mediante la demostración de la influencia estabilizadora en cada uno de los ocho tipos diferentes de apareamientos incorrectos de nucleótidos. Se utilizó una sonda de VHC y moldes sintéticos en el sistema experimental, y se demostró la estabilización del apareamiento incorrecto de un solo nucleótido mediante la medición de la T_m de los diversos complejos de hibridación formados.

Se establecieron reacciones de curvas de disociación utilizando la sonda FAM de marcaje único mostrada en la figura 52a y moldes sintéticos que se manipularon para que contuviesen diversos apareamientos incorrectos de una sola base al hibridarse con dicha sonda. Se observó que dichos moldes manipulados no se correlacionaban con ningún genotipo particular de VHC y se construyeron únicamente con fines ilustrativos. Se muestran a continuación dichos moldes manipulados. La posición de nucleótido que se encuentra incorrectamente apareada al hibridarse con la sonda se muestra en minúscula. Se diseñó uno de los moldes sin apareamientos incorrectos.

Molde sintético	SEC ID nº
CCGGTCGTCCTGGCAATTCCG	26
CCGGTCGTCCcGGCAATTCCG	27
CCGGTCGTCCgGGCAATTCCG	28
CCGGTCGTCCaGGCAATTCCG	29
CCGGTCGTCCTGGCcATTCCG	30
CCGGTCGTCCTGGCgATTCCG	31
CCGGTCGTCCTGGCtATTCCG	32
CCGGTCGTCCTcGCAATTCCG	33
CCGGTCGTCgTGGCAATTCCG	34

Estas combinaciones de sonda y molde produjeron los apareamientos incorrectos de un solo nucleótido mostrados en la figura 61. Se incluyó un molde de hibridación que no produjo ningún apareamiento incorrecto con la sonda (es decir, un apareamiento A:T perfecto). Cada reacción de análisis de disociación contenía alternativamente 10 µg/ml de azul de metileno ó 40 µg/ml de azul de metileno.

Estos datos de T_m de disociación se resumen en el gráfico de columnas de la figura 61. Se muestra un conjunto representativo de los datos. También se indica en el gráfico la T_m predicha de los complejos de hibridación respectivos (en ausencia de azul de metileno). Estos valores calculados se derivaron de estimaciones de software Visual OMP (DNA Software Inc., Ann Arbor, MI).

Tal como puede observarse en la figura, la adición de azul de metileno a las reacciones de disociación estabilizó significativamente los dúplex incorrectamente apareados, según determinación de sus valores de T_m respectivos en comparación con los valores de T_m predichos en ausencia de azul de metileno. Además, la adición de 40 µg/ml de azul de metileno aparentemente resultaba más efectiva que 10 µg/ml de azul de metileno en la estabilización de los dúplex. Estos efectos de estabilización del azul de metileno también se observaron en el dúplex de apareamiento perfecto. Estos datos demuestran que el efecto de estabilización de dúplex no se encuentra limitado a ningún tipo particular de apareamiento incorrecto y es un fenómeno general. En algunos casos, el grado de estabilización depende del tipo de apareamiento incorrecto.

Ejemplo 23

Demostración de la detección mejorada de subtipos en presencia de pigmentos tiazina utilizando un sistema de modelo de VIH

El presente ejemplo ilustra los beneficios de las propiedades de estabilización de dúplex de los pigmentos tiazina en la amplificación y detección de dianas víricas. Debido a la capacidad de los pigmentos tiazina de estabilizar los dúplex incorrectamente apareados, se demuestra en la presente memoria que la sensibilidad de detección de los subtipos polimórficos puede mejorarse mucho debido a las eficiencias mejoradas de amplificación y/o detección. En contraste con el ejemplo anterior, el presente ejemplo utilizó valores de C_T de diversas reacciones de amplificación TaqMan para demostrar los beneficios de la estabilidad mejorada de los dúplex. Se utilizaron en el sistema de modelo experimental cebadores de amplificación de VIH, una sonda 5'-nucleasa de cuantificación marcada doblemente procedente de VIH y moldes sintéticos de VIH, tal como se proporcionan en la figura 62. En la parte inferior de las secuencias de cebador y de sonda en la figura 62 se proporcionan los dominios homólogos correspondientes de aislados conocidos de VIH, con indicación de las posiciones variables.

Se establecieron utilizando los cebadores de amplificación mostrados a continuación reacciones de amplificación por RT-PCR en tubo único para la cuantificación en tiempo real de productos amplicones.

Cebador de amplificación	Secuencia	SEC ID nº
SK145BU	AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAA-	23

	tBuBndA	
GAG152BU	GGTACTAGTAGTTCTGCTATGTCACTTC-	24
	tBuBndA	
en las que tBuBndA=N6-t-butilbencil-dA		

Las reacciones de amplificación también incluían la sonda 5'-nucleasa doblemente marcada de cuantificación GAG108FBHQ29I que presentaba la secuencia siguiente:

5 FAM-TCTGCAGCT **BHQ2** TCCTCATTGATGGTATCTTTTA-PO₄ (SEC ID nº 25)

en la que FAM es el marcaje fluorescente, PO₄ es un fosfato terminal y BHQ2 es el desactivador Black Hole (BHQTM)-2. Las reacciones de amplificación también incluían moléculas de ARN del VIH producidas sintéticamente mediante la transcripción *in vitro* de material genético de VIH aislado subclonado y purificadas mediante cromatografía de oligo-dT-sefarosa. Se utilizó un millón de copias del transcrito especificado de ARN en cada reacción. La reacción de PCR utilizó el programa de ciclado siguiente:

50°C/5 minutos; 59°C/30 minutos; 95°C/2 minutos; 95°C-->58°C (2 ciclos); 91°C-->58°C (60 ciclos)

15 En un primer experimento, se estableció una amplificación del ARN del VIH (RT-PCR) utilizando los cebadores de amplificación SK145BU y GAG152BU y la sonda de cuantificación 5'-nucleasa GAG108FBHQ29I. Los resultados experimentales se proporcionan en la figura 62. Se utilizaron diversos moldes de ARN de VIH (10⁶ copias de cada uno) en reacciones independientes de amplificación, según se indica. El número de apareamientos incorrectos de nucleótidos en el cebador directo, el cebador inverso y la sonda 5'-nucleasa se muestran para cada subtipo de VIH sometido a ensayo, en la tabla, posteriormente. No se encontraba presente ningún pigmento tiazina en las reacciones. Se muestra un conjunto representativo de los datos. También se indican los valores de C_T obtenidos para cada subtipo de VIH. Tal como puede observarse en la figura 63 y en la tabla, cada genotipo de VIH sometido a ensayo presenta un valor de C_T diferente.

25 El análisis de cuantificación mediante amplificación del ARN de VIH proporcionado en la figura 63 se repitió en el experimento mostrado en la figura 64, con la excepción de que las reacciones se suplementaron con 50 µg/ml de azul de metileno nuevo. Tal como puede observarse, la adición de azul de metileno nuevo resultó en niveles mejorados de detección, en los que los valores de C_T se reducen con la adición del pigmento tiazina. Estos resultados se resumen a continuación:

30

Genotipo del VIH	Nº de apareamientos incorrectos del dúplex en: cebador directo/cebador inv./sonda nucleasa	Valor C _T sin azul de metileno nuevo	Valor C _T con 50 µg/ml de azul de metileno nuevo
101-15	0/0/3	ND	ND
105-1	0/0/1	24,8	24,2
106-1	2/1/2	27,7	25,2
108-3	1/1/3	28,3	27,2
109-1	2/2/2	28,2	27,1
110-5	6/0/1	33,0	23,9

Tal como se muestra en las figuras 63 y 64, y se resume en la tabla anterior, las propiedades de estabilización de dúplex de los pigmentos tiazina quedan demostradas en este sistema modelo, probablemente mediante la estabilización tanto del dúplex de cebador-molde como del dúplex de amplicón-sonda nucleasa. Esta estabilización conduce a una mejor sensibilidad de detección para los subtipos polimórficos.

35

Ejemplo 24

Demostración de la estabilización dependiente de dosis del dúplex de ácidos nucleicos en presencia de concentraciones variables de pigmentos tiazina utilizando un sistema de modelo de VIH

40

El presente ejemplo ilustra las propiedades de estabilización de dúplex de los pigmentos tiazina, en el que el pigmento se utiliza en un intervalo de concentraciones. El presente ejemplo utiliza los mismos sistema de modelo experimental y reactivos de VIH indicados en el Ejemplo 23.

45

Las reacciones de amplificación para la cuantificación en tiempo real de los productos de amplificación de VIH utilizando los cebadores de amplificación de VIH SK145BU (SEC ID nº 23) y GAG152BU (SEC ID nº 24) y la sonda 5'-nucleasa de cuantificación GAG108FBHQ29I (SEC ID nº 25). Las reacciones de amplificación en el presente Ejemplo presentaban como diana el molde de ARN sintético del genotipo 110-5 de VIH (10⁶ copias). Esta combinación particular del genotipo de VIH, los cebadores de amplificación y la sonda nucleasa resulta en seis

apareamientos incorrectos bajo el cebador directo y un apareamiento incorrecto bajo la sonda 5'-nucleasa de cuantificación.

Las reacciones de amplificación y cuantificación se suplementaron alternativamente con diversas concentraciones de azul de metileno nuevo comprendidas entre 10 y 50 µg/ml. También se llevó a cabo una reacción sin azul de metileno nuevo. Los resultados se muestran en forma de curvas de crecimiento de amplicón y valores de C_T . Los resultados se proporcionan en la figura 65. Se muestra un conjunto representativo de los datos. Tal como puede observarse en la figura, la adición de azul de metileno nuevo resulta en una sensibilidad incrementada del ensayo de amplificación y cuantificación, tal como se pone de manifiesto por los valores reducidos de C_T con concentraciones crecientes de pigmento tiazina. Esto probablemente se produce mediante estabilización tanto del dúplex cebador-molde como el dúplex amplicón-sonda nucleasa. Estos datos demuestran claramente el efecto beneficioso del azul de metileno nuevo sobre la sensibilidad de detección de este subtipo de VHC como función de la concentración creciente de pigmento.

Ejemplo 25

Demostración de la estabilización de dúplex de ácidos nucleicos por pigmentos tiazina utilizando la detección de amplicón con verde SYBR®

El presente ejemplo ilustra las propiedades de estabilización de dúplex de los pigmentos tiazina, en los que el sistema modelo utiliza verde SYBR® para realizar el seguimiento de la acumulación de amplicones. Se establecieron las reacciones de amplificación para la cuantificación en tiempo real de productos de amplificación de VIH utilizando los cebadores de amplificación de VIH SK145BU (SEC ID nº 23) y GAG152BU (SEC ID nº 24). Las reacciones de amplificación en el presente Ejemplo presentaron como diana el molde de ARN sintético del genotipo 110-5 de VIH (10⁶ copias). Todas las reacciones se suplementaron con verde SYBR® para realizar el seguimiento de la acumulación de producto amplicón bicatenario. No se utilizó una sonda 5'-nucleasa de cuantificación.

Las reacciones de amplificación se suplementaron alternativamente con 30 µg/ml o con 50 µg/ml de azul de metileno nuevo. También se realizó una reacción en ausencia de azul de metileno nuevo. En el caso de la no utilización de azul de metileno nuevo en la reacción, se utilizó una dilución 1:10.000 (concentración 1X) de verde SYBR®. En el caso de utilización de 30 ó 50 µg/ml de azul de metileno nuevo, se utilizó una dilución 1:2.500 de verde SYBR® (concentración 4X). Se midió la fluorescencia de verde SYBR® a la misma longitud de onda que el marcaje FAM. La adición de azul de metileno nuevo a las reacciones presentó el efecto de reducir la fluorescencia de la emisión del pigmento verde SYBR®. Para compensar lo anterior, las reacciones que contenían azul de metileno nuevo utilizaron la concentración más alta de verde SYBR®. La concentración incrementada de verde SYBR® es conocido que presenta una influencia negativa sobre la eficiencia de amplificación. Sin embargo, a pesar de este efecto perjudicial, se observó claramente un efecto beneficioso del azul de metileno nuevo sobre la estabilización de los dúplex.

Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 66. Los resultados se muestran como curvas de crecimiento de amplicón y valores de C_T . Se muestra un conjunto representativo de los datos. Tal como puede observarse claramente en la figura, la adición de azul de metileno nuevo resulta en una sensibilidad mejorada del ensayo de amplificación y cuantificación, como se pone de manifiesto en los valores reducidos de C_T a concentraciones crecientes de pigmento tiazina. Presumiblemente el pigmento tiazina está estabilizando la interacción de los cebadores de amplificación con el molde diana de VIH. Además, el presente Ejemplo ilustra que puede utilizarse un sistema de detección de verde SYBR® conjuntamente con un pigmento tiazina para la estabilización de los dúplex de ADN.

Aunque la invención anterior ha sido descrita en detalle para mayor claridad, resultará claro para el experto en la materia a partir de la lectura de la presente exposición que pueden realizarse diversos cambios de forma y de detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente pueden utilizarse en diversas combinaciones.

Listado de secuencias

5	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-la Roche AG
	<120> Modificadores de la emisión lumínica y usos de los mismos en la detección, amplificación y análisis de ácidos nucleicos
	<130> 22206 EP-RA
10	<150> US 60/695,991
	<151> 2005-06-30
	<150> US 60/696,293
15	<151> 2005-06-30
	<150> US 60/696,303
	<151> 2005-06-30
20	<150> US 60/696,253
	<151> 2005-06-30
	<160> 70
25	<170> PatentIn versión 3.3
	<210> 1
	<211> 26
30	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
35	<223> Secuencia de VHC
	<220>
	<221> misc_feature
40	<222> (26)..(26)
	<223> x=N6-t-butilbencil-dA
	<400> 1
45	gcagaaagcg tctagccatg gcgttx 26
	<210> 2
	<211> 28
50	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
55	<223> Secuencia de VHC
	<220>
	<221> misc_feature
60	<222> (28)..(28)
	<223> x=N6-t-butilbencil-dA
	<400> 2
65	gcaagcacc taccagcag taccacax 28
	<210> 3
	<211> 34
60	<212> ADN
	<213> Artificial
	<220>
65	<223> Secuencia de VHC
	<220>
	<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> e=AM
 5 <220>
 <221> misc feature
 <222> (16)..(16)
 <223> j=BHQ-2
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> p=fosfato terminal
 15 <400> 3
 ecggtgtact caccgjtcc gcagaccact atgp 34
 <210> 4
 <211> 35
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de VHC
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> e=cy5
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> j=cx-FAM
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> p=fosfato terminal
 40 <400> 4
 ecggtgtact caccgjtcc cgcagaccac tatgp 35
 <210> 5
 <211> 33
 45 <212> ADB
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de VHC
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> e=FAM
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 60 <223> p=fosfato terminal
 <400> 5
 ecggtgtact caccgttccg cagaccacta tgp 33
 65 <210> 6

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia de VIH
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (29)..(29)
 <223> x=N6-t-butilbencil-dA
 <400> 6
 agtgggggga catcaagcag ccatgcaax 29
 15 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de VIH
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> x=N6-t-butilbencil-dA
 <400> 7
 30 ggtactagta gttcctgcta tgcactcx 30
 <210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de VIH
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> p=fosfato terminal
 45 <400> 8
 taaaagatac catcaatgag gaagctgcag ap 32
 <210> 9
 <211> 33
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia de VIH
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 60 <223> e=FAM
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 65 <223> p=fosfato terminal

	<400> 9 etctgcagct tcctcattga tggatcttt tap	33
5	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia de VHC	
15	<220> <221> misc_feature <222> (26)..(26) <223> x=N6-t-butylbencil-dA	
20	<400> 10 gcagaaagcg tctagccatg gcgttx 26	
25	<210> 11 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Secuencia de VHC	
35	<220> <221> misc_feature <222> (28)..(28) <223> x=N6-t-butylbencil-dA	
40	<400> 11 gcaagcaccc tatcaggcag taccacax 28	
45	<210> 12 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Secuencia de VHC	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> e=HEX	
60	<220> <221> mise_feature <222> (34)..(34) <223> p=fosfato terminal	
65	<400> 12 etggactcag tcctctggtc atctcacctt ctp 33	
	<210> 13 <211> 33 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia de VIH	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> e= FAM
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> p= fosfato
 10
 <400> 13
 etctgcagct tcctcattga tggatcttt tap 33
 15
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Sonda de VHC
 <400> 14
 cggaattgcc aggacgaccg g 21
 25
 <210> 15
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda de VIH
 <400> 15
 aggacccggt cgtcctggca attccggtgt a 31
 35
 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda de VHC
 <400> 16
 aggaccagct cttcccgga attccggtgt a 31
 45
 <210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda de VHC
 <400> 17
 aggacccggt catcccgcg attccggtgt a 31
 55
 <210> 18
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Sonda de VHC
 65

<400> 18
 aggacccggt cttccggta attccggtgt a 31

5 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sonda de VHC

 <400> 19
 aggacccggt catcccgga attccggtgt a 31

15 <210> 20
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Sonda de VHC

 <400> 20
 aggacccggt catcctggca attccggtgt a 31

25 <210> 21
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Sonda de VHC

35 <400> 21
 aggacccggt caccagcg attccggtgt a 31

40 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Sonda de VHC

 <400> 22
 cggaattgcc aggacgacga ccgg 24

50 <210> 23
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220><223> Cebador oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es N6-t-butilbencil-dA

60 <400> 23
 agtgggggga catcaagcag ccatgcaan 29

65 <210> 24
 <211> 30

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> n es N6-t-butilbencil-dA

15 <400> 24
 ggtactagta gttcctgcta tgcacttcn 30

<210> 25
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Sonda oligonucleótida sintética

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es dT modificado con FAM

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> BHQ-2 se inserta entre las posiciones nucleótidas 9 y 10

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> n es dA modificado con fosfato terminal

40 <400> 25
 nctgcagctt cctcattgat ggtatctttt n 31

45 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Sonda sintética de VHC

<400> 26
 ccggtcgtcc tggcaattcc g 21

60 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>

	<223> Sonda sintética de VHC	
	<400> 27	
5	ccggtcgtcc cggcaattcc g	21
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de VHC	
	<400> 28	
15	ccggtcgtcc gggcaattcc g	21
	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de VHC	
	<400> 29	
25	ccggtcgtcc aggcaattcc g	21
	<210> 30	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda sintética de VHC	
35	<400> 30	
	ccggtcgtcc aggcaattcc g	21
	<210> 31	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Sonda sintética de VHC	
	<400> 31	
	ccggtcgtcc tggcgattcc g	21
	<210> 32	
50	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Sonda sintética de VHC	
	<400> 32	
60	ccggtcgtcc tggctattcc g	21
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	

	<220>		
	<223> Sonda sintética de VHC		
5	<400> 33 ccggtcgtcc tcgcaattcc g	21	
	<210> 34		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sonda sintética de VHC		
15	<400> 34 ccggtcgtcg tggcaattcc g	21	
	<210> 35		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
25	<400> 35 agtgggggga catcaagcag ccatgcaa	30	
	<210> 36		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> VIH		
	<400> 36 agtgggggga catcaagcag ccatgcaa	30	
	<210> 37		
40	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 37 agtgggggga catcaagcag ccatgcaa	30	
50	<210> 38		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 38 agtgggggga catcaagcag ccatgcaa	30	
60	<210> 39		
	<211> 30		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> VIH		
5	<400> 39 agtggggggg catcaagcag ctatgcaa	30	
	<210> 40		
	<211> 30		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
15	<400> 40 agtgggggga catcaagcag ctatgcaa	30	
	<210> 41		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> VIH		
	<400> 41 agtagaagga caccaggcag caatgcaa	30	
30	<210> 42		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 42 agtagaagga caccaggcag ctatgcag	30	
40	<210> 43		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 43 agtggggggg acaccaggca gctatgcaa	31	
50	<210> 44		
	<211> 30		
	<212> ADN		
55	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
60	<400> 44 agtgggggga caccaggcag ctatgcaa	30	
	<210> 45		
	<211> 30		
65	<212> ADN		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> VIH	
5	<400> 45 agtgggggga caccaggcag caatgcaaat	30
10	<210> 46 <211> 31 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> VIH	
20	<400> 46 cgtggggggg catcaagcag ctcatgcaa t	31
25	<210> 47 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> VIH	
35	<400> 47 ggaagtgaca tagcaggaac tactagtacc	30
40	<210> 48 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> VIH	
50	<400> 48 ggaagtgaca tagcaggaac tactagtacc	30
55	<210> 49 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> VIH	
65	<400> 49 ggaagtgata tagcaggaac tactagtacc	30
	<210> 50 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> VIH	
	<400> 50 ggaagtgata tagcaggaac tactagtacc	30
	<210> 51 <211> 30	

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> VIH	
	<400> 51	
	ggaagtgata tagcaggaac tactagtacc	30
10	<210> 52	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> VIH	
	<400> 52	
20	ggaagtgata tagcaggaac taccagtacc	30
	<210> 53	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> VIH	
	<400> 53	
30	ggaagtgaca tagcaggaac tactagtacc	30
	<210> 54	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> VIH	
40	<400> 54	
	ggaagtgaca tagcaggaac tactagtacc	30
	<210> 55	
	<211> 30	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> VIH	
50	<400> 55	
	ggaagtgata tagcaggaac tactagtacc	30
	<210> 56	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<223> VIH	
	<400> 56	
	ggaggtgaca tagcaggaac cactagtacc	30
65	<210> 57	

	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 57		
10	ggaagtgaca tagcaggaac tactagtagc	30	
	<210> 58		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 58		
20	ggaagtgata tagcaggaac tactagtacc	30	
	<210> 59		
	<211> 31		
	<212> ADN		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
30	<400> 59		
	taaaagatac catcaatgag gaagctgcag a	31	
	<210> 60		
	<211> 31		
35	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
40	<400> 60		
	taaaagatac catcaatgag gaagctgcag a	31	
	<210> 61		
45	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
50	<223> VIH		
	<400> 61		
	taaaagagac catcaatgag gaagctgcag a	31	
55	<210> 62		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
60	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 62		
	taaaggatac tatcaatgag gaagctgcag a	31	
65	<210> 63		

	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 63		
10	taaaggatgc tatcaatgag gaagctgcag a	31	
	<210> 64		
	<211> 31		
	<212> ADN		
15	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 64		
20	taaaggatac tatcaatgag gaagctgcag a	31	
	<210> 65		
	<211> 31		
	<212> ADN		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 65		
30	taaaagaaac catcaatgag gaagctgcag a	31	
	<210> 66		
	<211> 31		
35	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> VIH		
40	<400> 66		
	taaaagatac catcaatgag gaagctgcag a	31	
	<210> 67		
45	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
50	<223> VIH		
	<400> 67		
	taaaagatac catcaatgag gaagctgcag a	31	
55	<210> 68		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
60	<220>		
	<223> VIH		
	<400> 68		
65	taaaagatac catcaatgag gaagctgcag a	31	

5	<210> 69	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> VIH	
	<400> 69	
	taaaggaaac catcaatgaa gaagctgcag a	31
15	<210> 70	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> VIH	
	<400> 70	
	taaaagattc tattaatgaa gaagctgcag a	31

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de la temperatura de fusión (T_m) de un complejo de hibridación, comprendiendo el método:

5 (a) proporcionar:

(i) una sonda que comprende un grupo emisor de luz,

(ii) una diana de hibridación que es complementaria, o parcialmente complementaria, a dicha sonda,

(iii) un modificador soluble de la emisión lumínica que comprende un pigmento tiazina o un pigmento diazina, en el que dicho modificador soluble de la emisión lumínica es capaz de desactivar dicho grupo emisor de luz,

10 (b) hibridar dicha sonda con dicha diana de hibridación bajo condiciones en las que se produce el apareamiento de bases formando un complejo de hibridación diana,

(c) alterar la temperatura de dicho complejo de hibridación diana en presencia de dicho modificador soluble de la emisión lumínica y medir una emisión de dicho grupo emisor de luz,

15 (d) correlacionar dicha emisión medida procedente de dicho grupo emisor de luz con la presencia de dicho complejo de hibridación diana como función de la temperatura, determinando de esta manera la T_m de dicho complejo de hibridación diana basándose en dicha emisión medida.

2. Método según la reivindicación 1, en el que proporcionar una diana de hibridación comprende producir un amplicón correspondiente a un ácido nucleico diana.

20 3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha producción de un amplicón comprende amplificar un ácido nucleico diana mediante una reacción en cadena de polimerasa, preferentemente mediante una reacción en cadena asimétrica de polimerasa.

25 4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho modificador soluble de la emisión lumínica comprende un pigmento seleccionado de entre azul de metileno, verde de metileno, tionina, dimetiltionina-sim, azul de toluidina O, azul de metileno nuevo, violeta de metileno Bernthsen, azur A, azur B, azur C, azul 1,9-dimetilmetileno, un pigmento azocarmin, un pigmento fenacina, un pigmento oxacina y cloruro de dietilsafraninazodimetilanilina.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de medición comprende medir la emisión en un intervalo de temperaturas, preferentemente entre 20°C y 95°C.

6. Método para producir un ácido nucleico dúplex estabilizado, comprendiendo el método:

(a) proporcionar:

30 (i) una muestra que contiene o que se sospecha que contiene una molécula diana de ácidos nucleicos,

(ii) un oligonucleótido complementario, o parcialmente complementario, a dicha molécula diana de ácidos nucleicos, y

(iii) por lo menos un pigmento tiazina soluble presente a una concentración efectiva para estabilizar un dúplex formado entre dicha molécula diana de ácidos nucleicos y dicho oligonucleótido, y

35 (b) uno de entre:

(i) hibridar dicho ácido nucleico diana y dicho oligonucleótido en presencia de dicho pigmento tiazina soluble, o

40 (ii) hibridar dicho ácido nucleico diana y dicho oligonucleótido, seguido de la mezcla con dicho pigmento tiazina soluble, bajo condiciones en las que se produce el apareamiento de bases, produciendo por lo menos un ácido nucleico dúplex estabilizado.

7. Método según la reivindicación 6, en el que la estabilidad de dicho ácido nucleico dúplex de (b) se ha mejorado en comparación con la estabilidad de un ácido nucleico dúplex que comprende dicho ácido nucleico diana y dicho oligonucleótido en ausencia de dicho pigmento tiazina o de una concentración reducida de dicho pigmento tiazina, y en el que dicha estabilidad de dichos ácidos nucleicos dúplex en presencia y en ausencia o con una concentración reducida de dicho pigmento tiazina se mide a partir de: (i) una temperatura de fusión (T_m), (ii) una determinación de la C_T , o (iii) un ensayo de 5'-nucleasa.

8. Método según la reivindicación 7, en el que el oligonucleótido y el pigmento diazina y/o el pigmento tiazina se ponen en contacto en una mezcla de reacción que no presenta sustancialmente bromuro de etidio.

9. Método según la reivindicación 6, en el que dicho ácido nucleico dúplex estabilizado comprende uno o más desapareamientos de nucleobase.
10. Método según la reivindicación 6, en el que proporcionar dicha molécula diana de ácidos nucleicos y dicho oligonucleótido comprende proporcionar por lo menos dos moléculas de ácidos nucleicos, y dicha molécula diana de ácidos nucleicos y dicho oligonucleótido residen en moléculas de ácidos nucleicos diferentes.
11. Método según la reivindicación 6, que comprende además un segundo oligonucleótido complementario, o parcialmente complementario, a dicha molécula diana de ácidos nucleicos, resultando efectivo cada uno de dichos oligonucleótidos para el cebado de una reacción de extensión de ácidos nucleicos en el caso de encontrarse apareado con dicho ácido nucleico diana.
12. Método según la reivindicación 6, en el que dicho pigmento tiazina se selecciona de entre azul de metileno, verde de metileno, tionina, dimetiltionina-sim, azul de toluidina O, azul de metileno nuevo, violeta de metileno Bernthsen, azur A, azur B, azur C y azul 1,9-dimetilmetileno, y en el que dicha hibridación comprende la hibridación en presencia de un pigmento tiazina a una concentración de entre aproximadamente 10 µg/ml y 50 µg/ml, preferentemente de entre aproximadamente 10 µg/ml y 40 µg/ml.
13. Kit para determinar la temperatura de fusión (T_m) de un complejo de hibridación, comprendiendo el kit:
- (a) por lo menos una sonda que comprende un grupo emisor de luz, en el que dicha sonda es complementaria, o parcialmente complementaria, a una diana de hibridación,
 - (b) por lo menos un modificador soluble de la emisión lumínica que comprende un pigmento tiazina soluble o un pigmento diazina, en el que dicho modificador soluble de la emisión lumínica es capaz de desactivar dicho grupo emisor de luz, y
 - (c) uno o más recipientes que comprenden (a), (b), o (a) y (b).
14. Kit según la reivindicación 13, que comprende uno o más componentes adicionales seleccionados de entre una transcriptasa inversa, por lo menos un cebador adecuado para el inicio de la actividad de transcriptasa inversa a partir de un ácido nucleico diana, una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN, desoxirribonucleótidos trifosfato libres, muestras para estandarización, muestras de control positivo, muestras de control negativo, tampones adecuados para reacciones enzimáticas, tubos de recolección de muestras y tubos para reacciones de amplificación.
15. Sistema para determinar una temperatura de fusión (T_m) de un complejo de hibridación, comprendiendo el sistema:
- (a) una muestra que comprende:
 - (i) una sonda de ácidos nucleicos que comprende un grupo emisor de luz que emite una señal,
 - (ii) un ácido nucleico diana que es complementario, o parcialmente complementario, a dicha sonda de ácidos nucleicos, y
 - (iii) un pigmento tiazina soluble o un pigmento diazina soluble,
 - (b) un dispositivo de control térmico para regular la temperatura de la muestra en un intervalo de temperaturas, en el que dicho intervalo incluye:
 - (i) una temperatura a la que esencialmente la totalidad de las moléculas de sonda se hibridan con dicha sonda de hibridación bajo un conjunto determinado de condiciones de hibridación,
 - (ii) una temperatura a la que 50% de dichos complejos diana de hibridación se disocian bajo dichas condiciones de hibridación, y
 - (ii) una temperatura a la que esencialmente ninguna molécula de sonda se hibrida con dicha diana de hibridación y esencialmente no se encuentra presente ningún complejo de hibridación bajo dichas condiciones de hibridación,
 - (c) un detector para medir dicha señal de dicha muestra en dicho intervalo de temperaturas, y
 - (d) un módulo de correlación que se encuentra operablemente acoplado al detector y recibe mediciones de señal en dicho intervalo de temperaturas, en el que el módulo de correlación correlaciona la intensidad de la señal con la presencia de un complejo de hibridación que comprende dicha sonda y dicha diana de hibridación mezclados con dicho pigmento tiazina o pigmento diazina como función de la temperatura, determinando de esta manera la T_m de dicho complejo de hibridación diana.

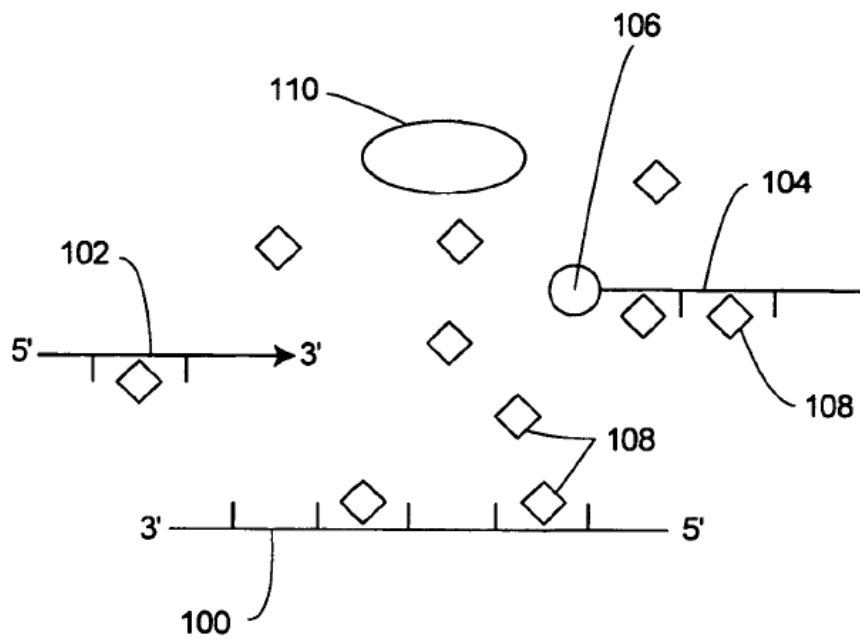


Fig. 1A

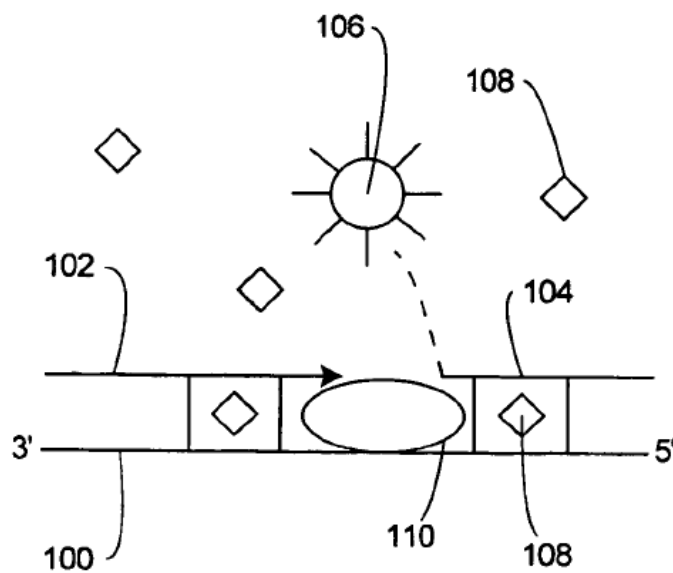


Fig. 1B

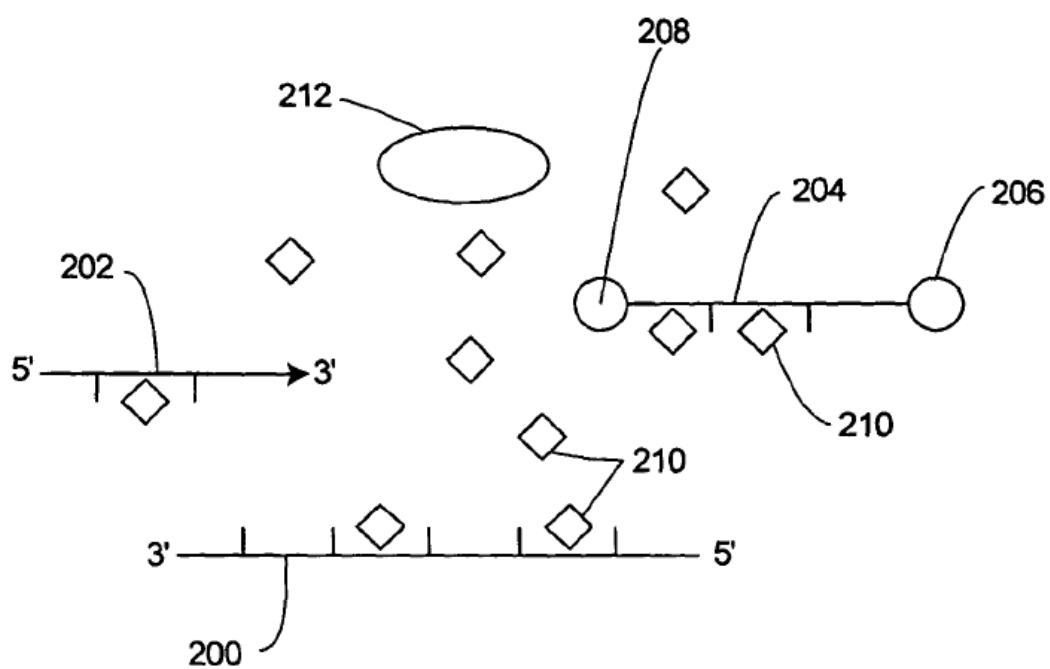


Fig. 2A

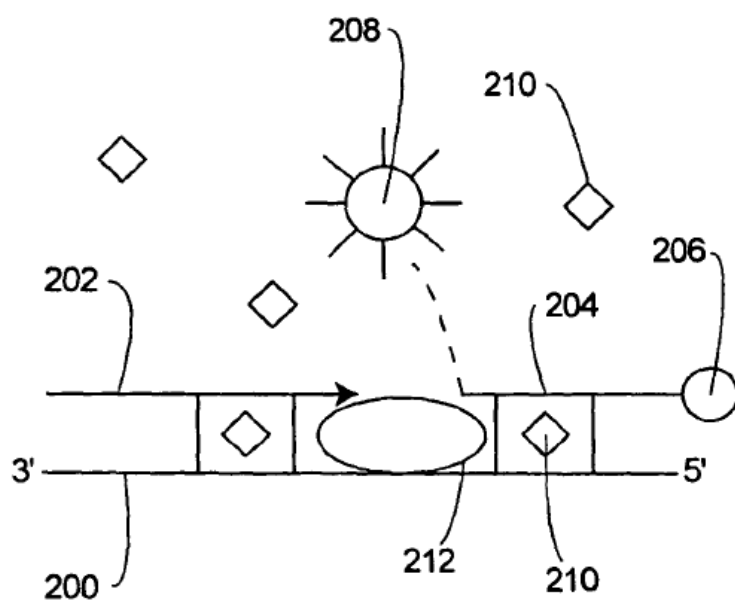


Fig. 2B

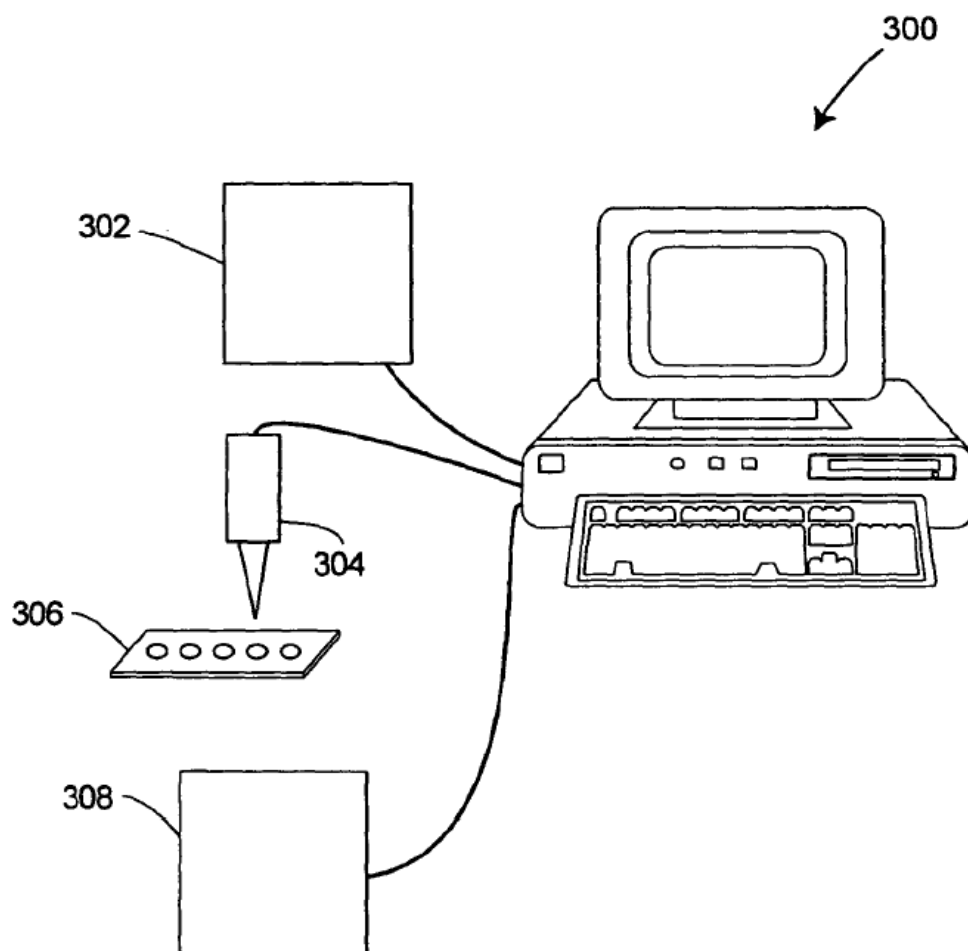


Fig. 3

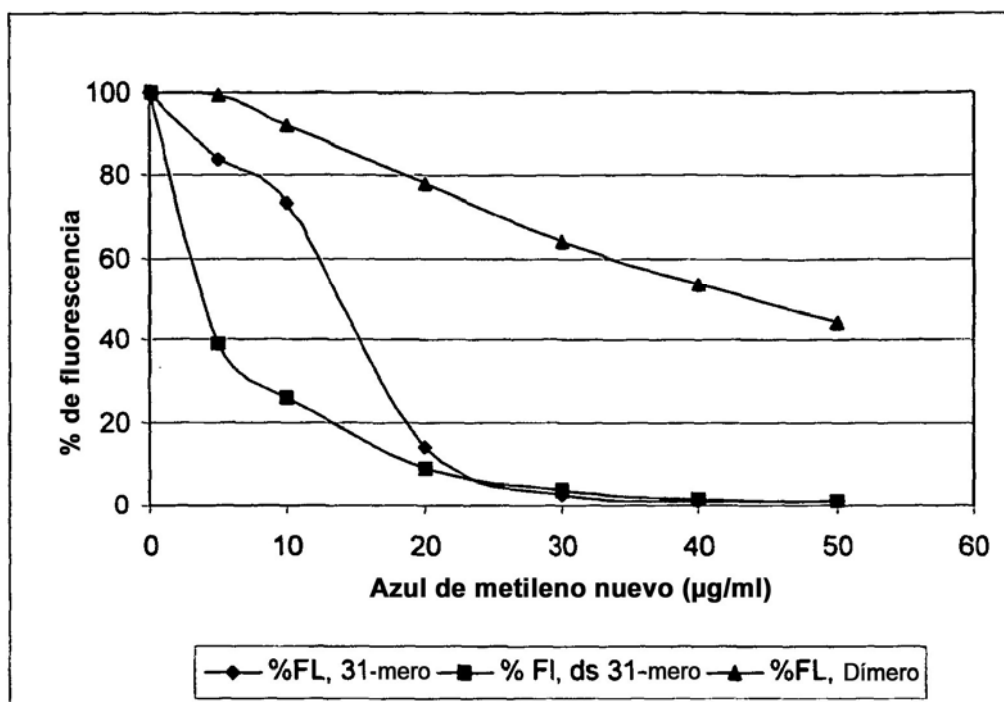


Fig. 4

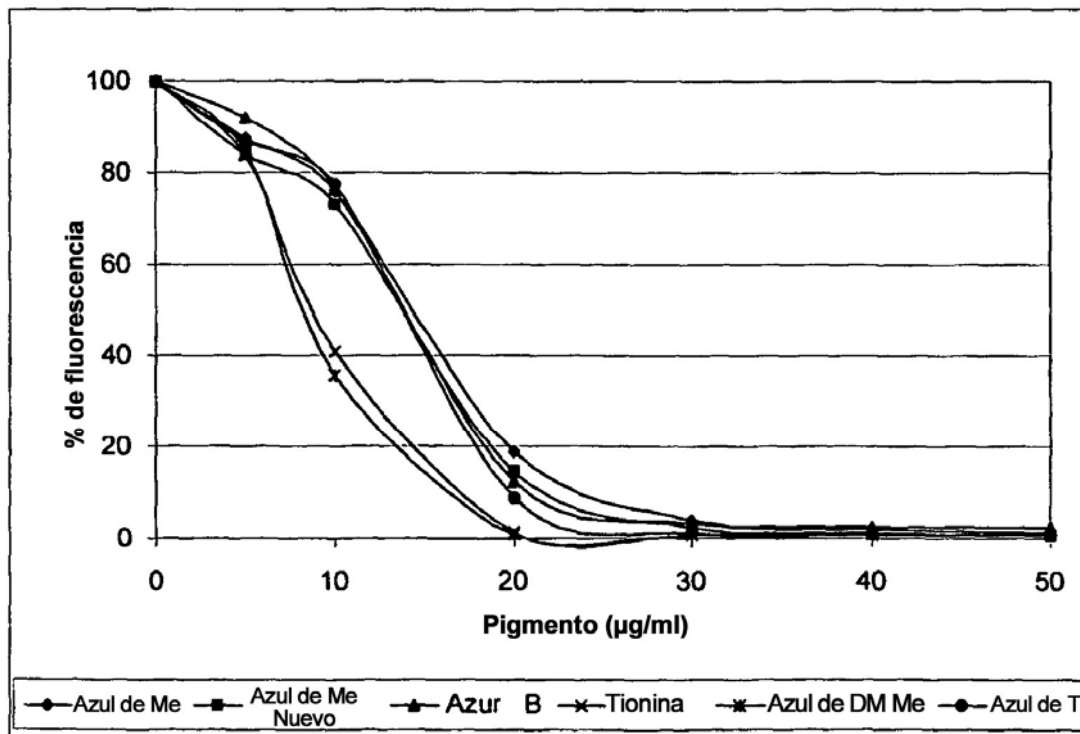


Fig. 5

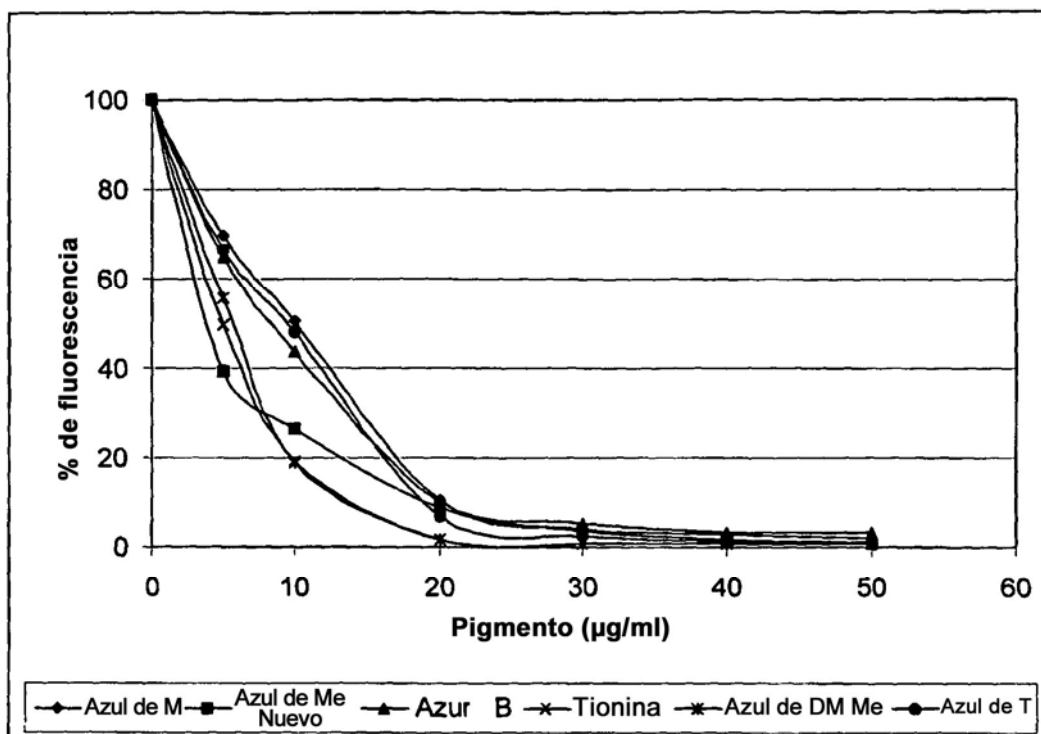


Fig. 6

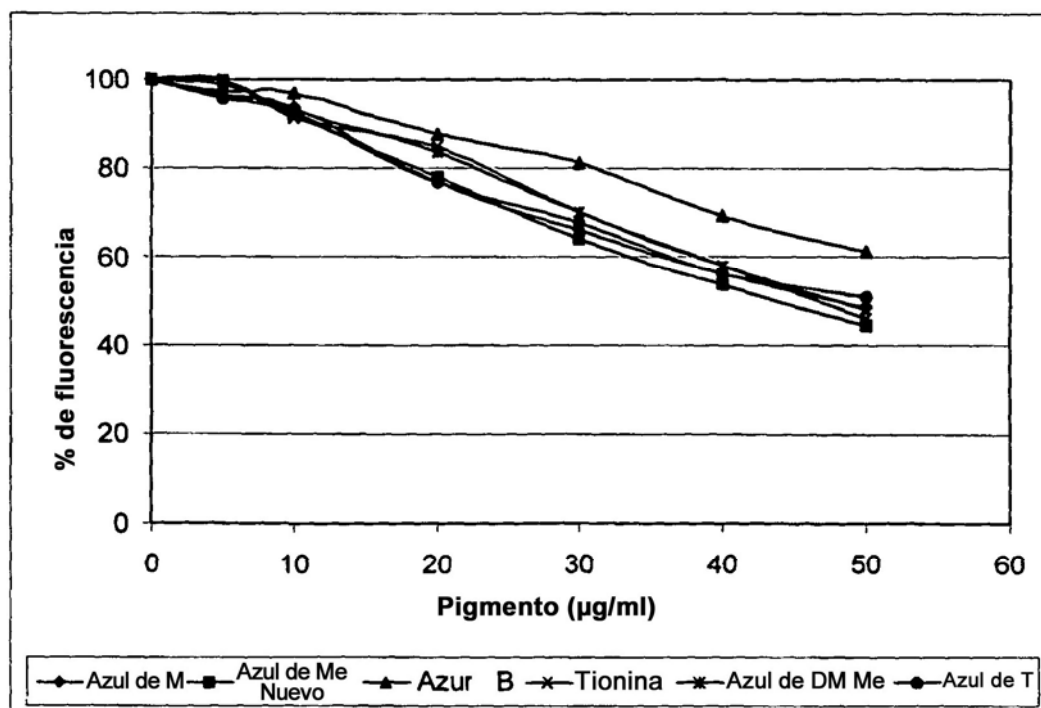


Fig. 7

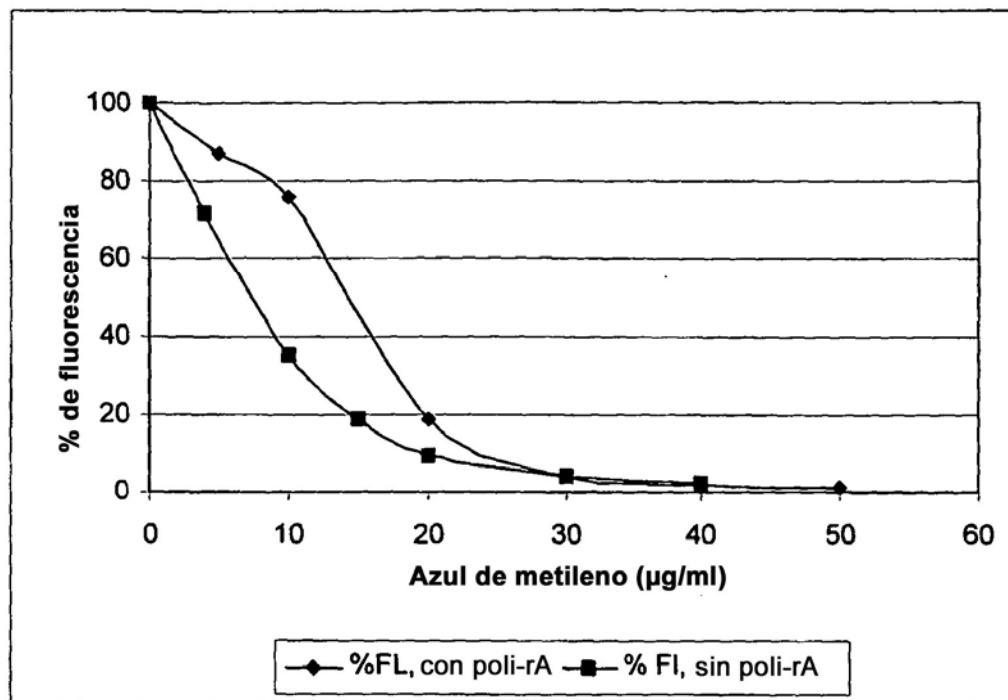


Fig. 8

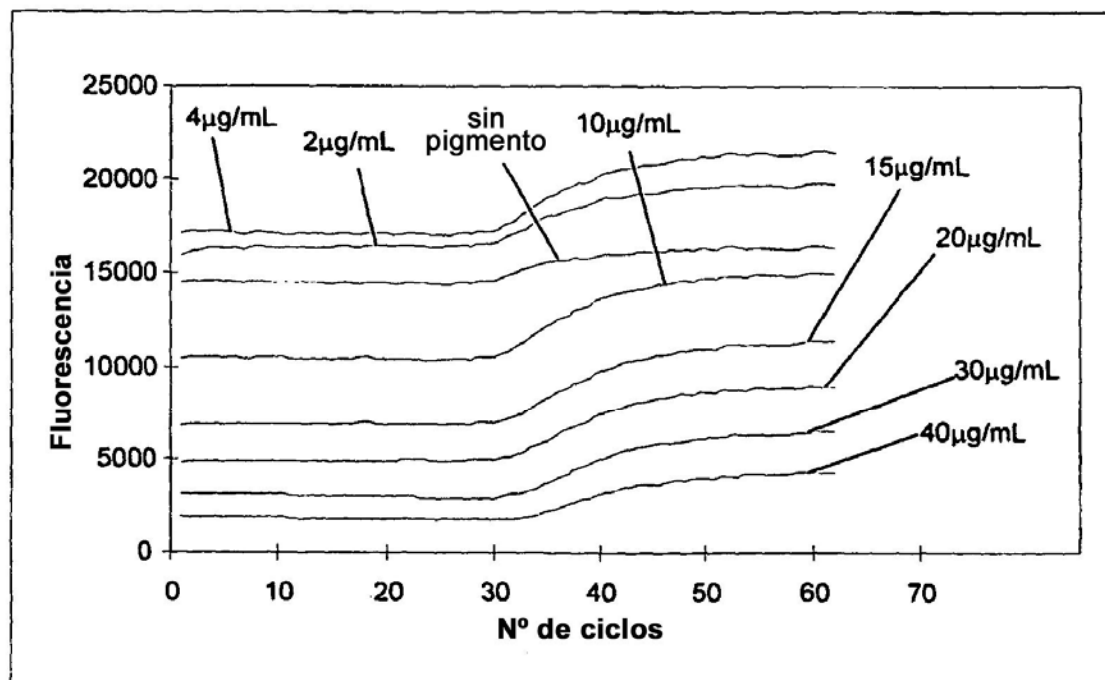


Fig. 9

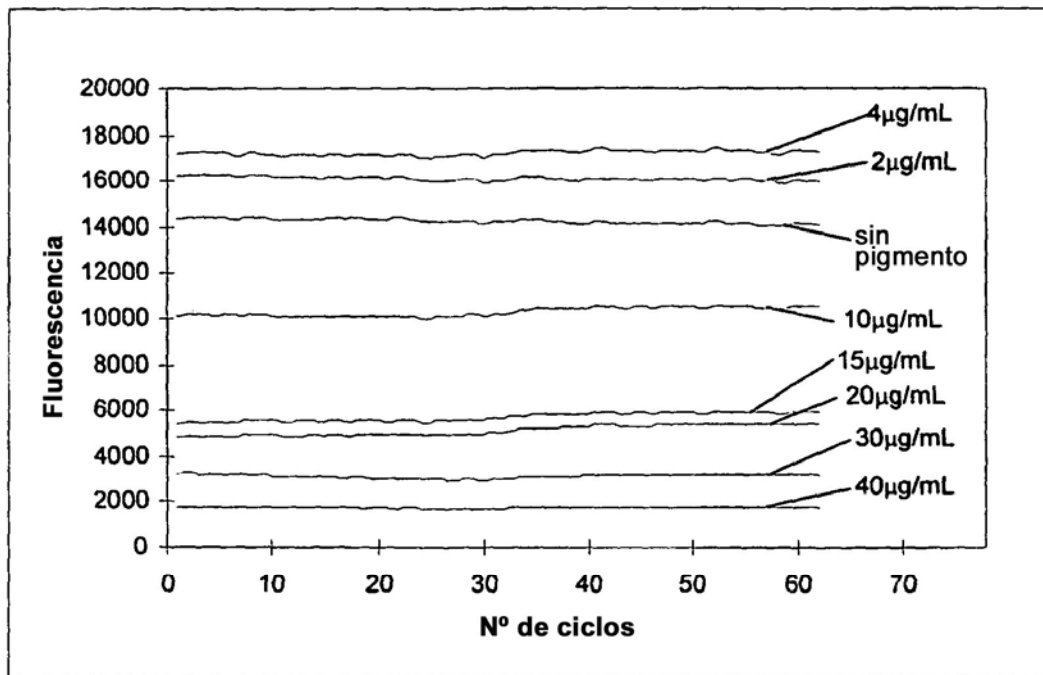


Fig. 10

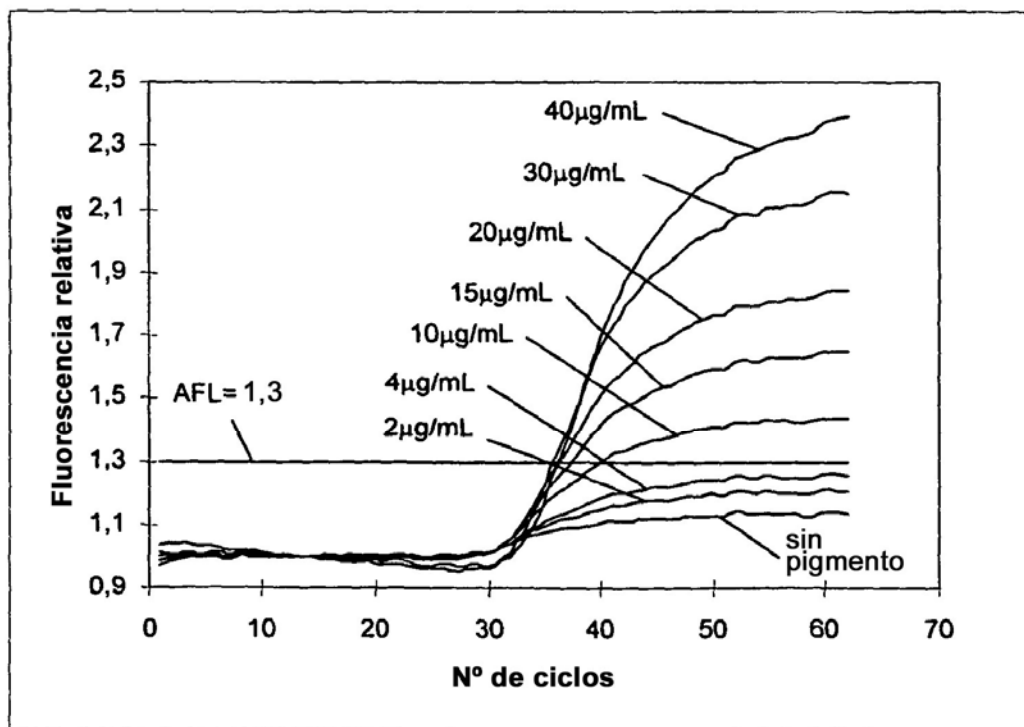


Fig. 11

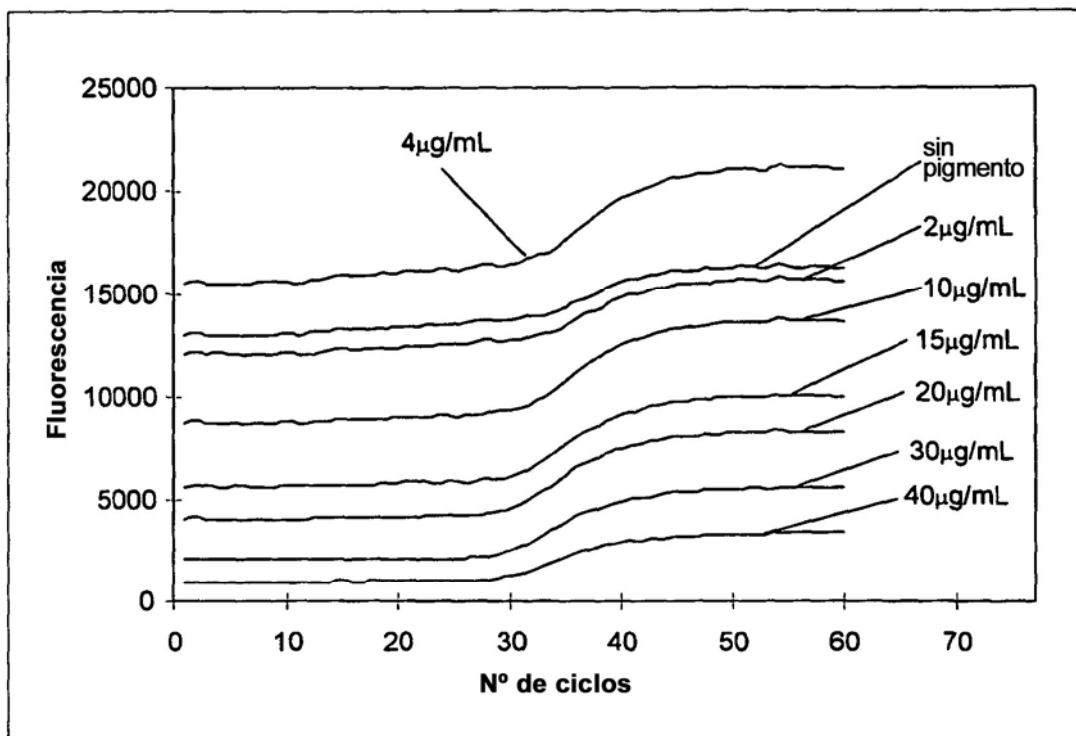


Fig. 12

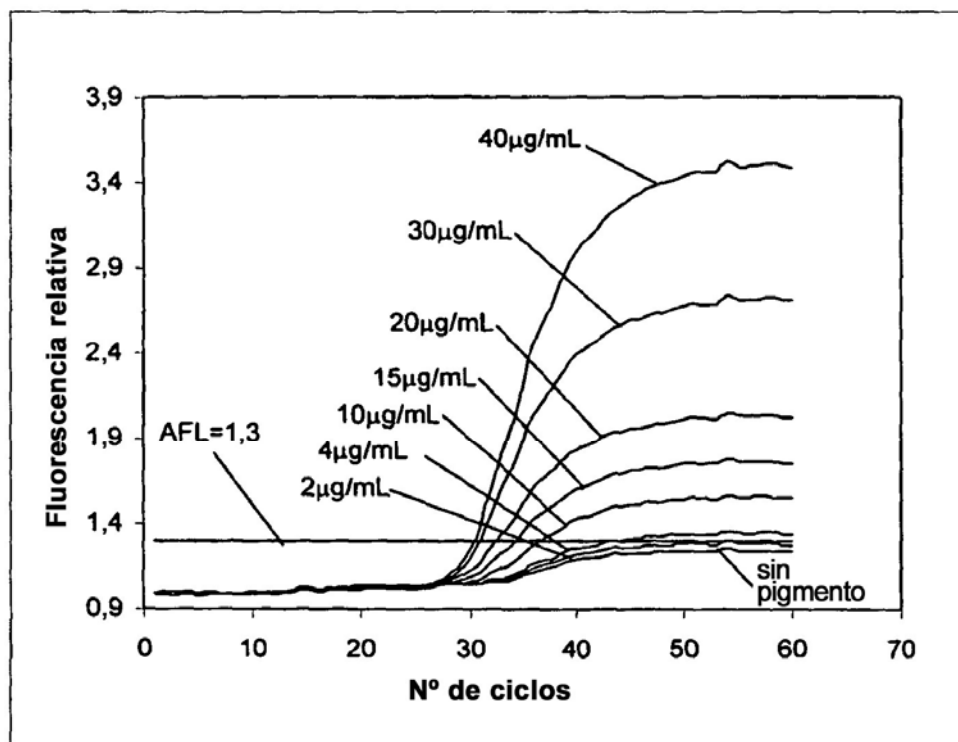


Fig. 13

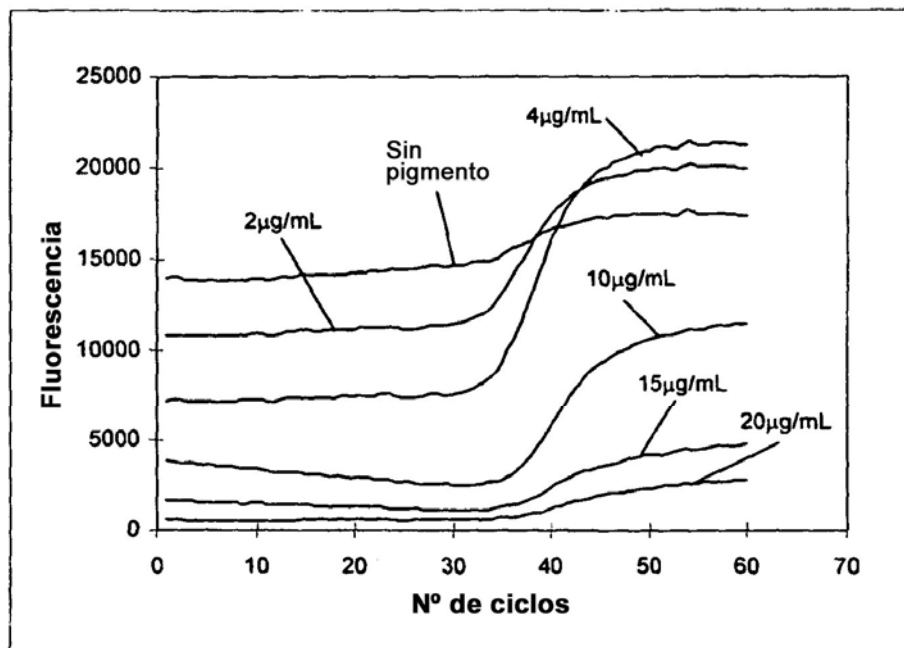


Fig. 14

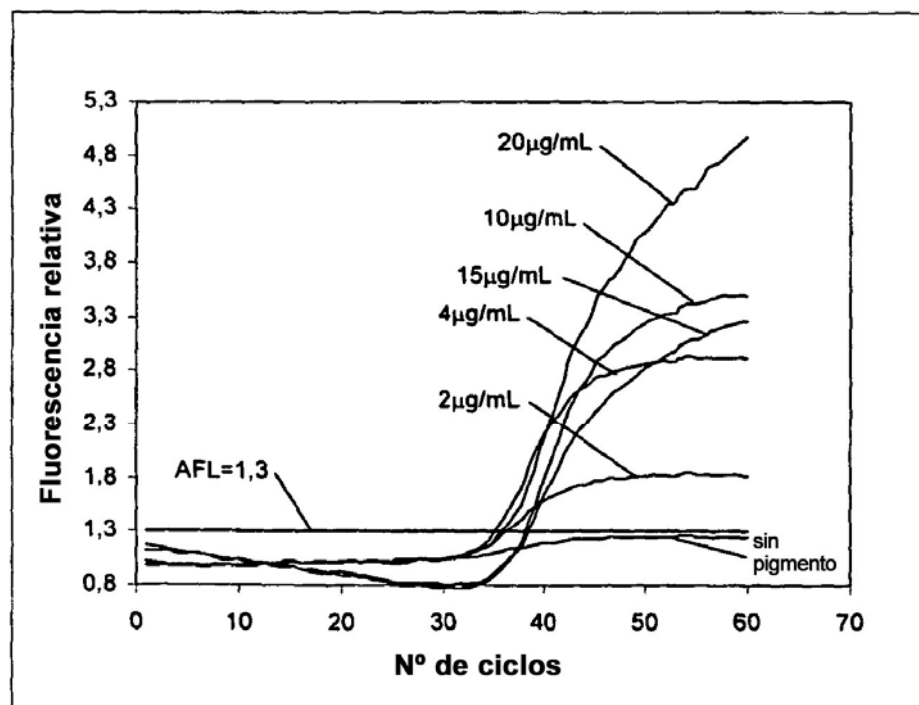


Fig. 15

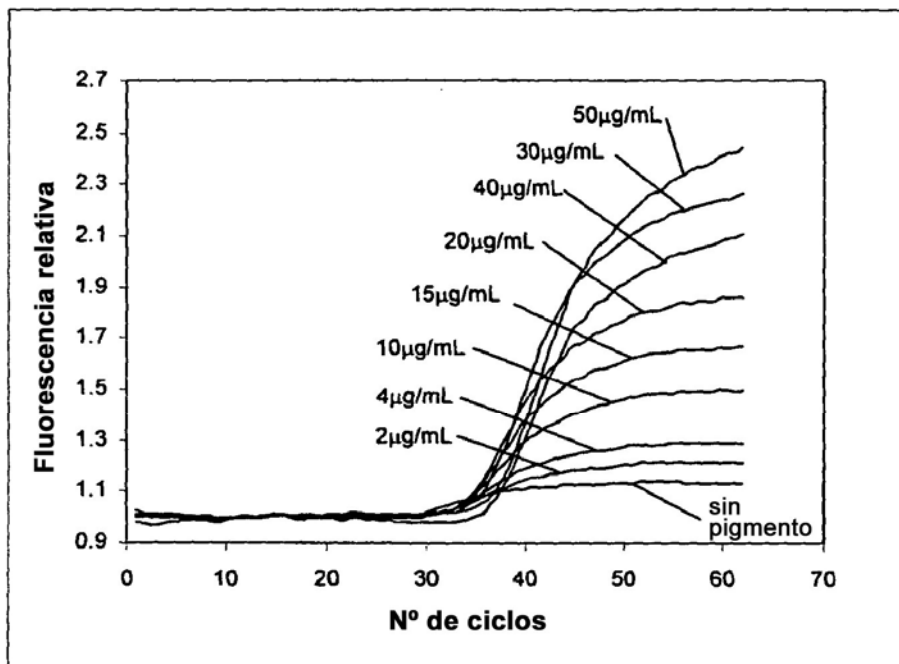


Fig. 16

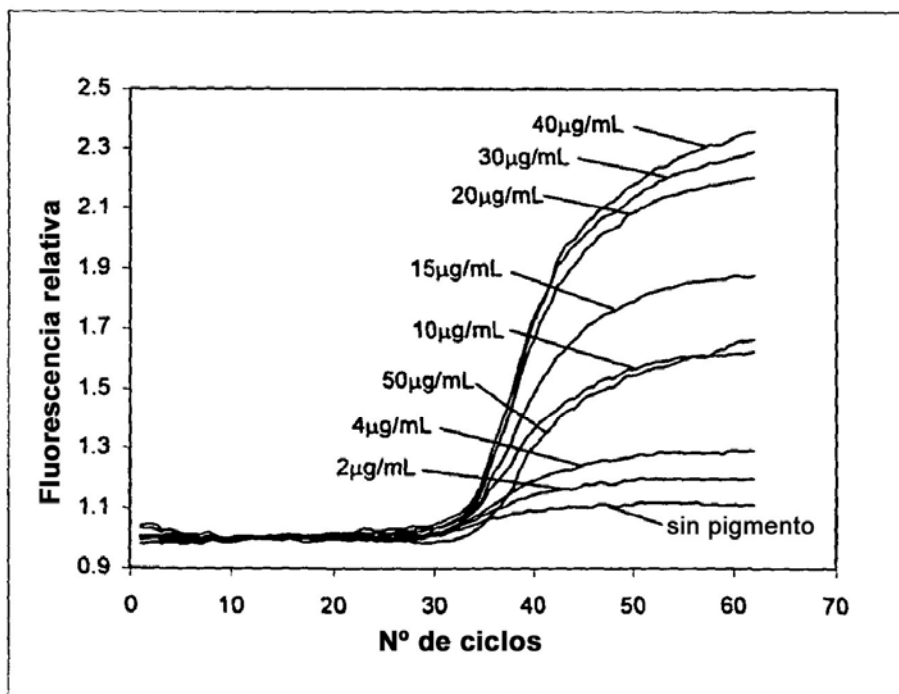


Fig. 17

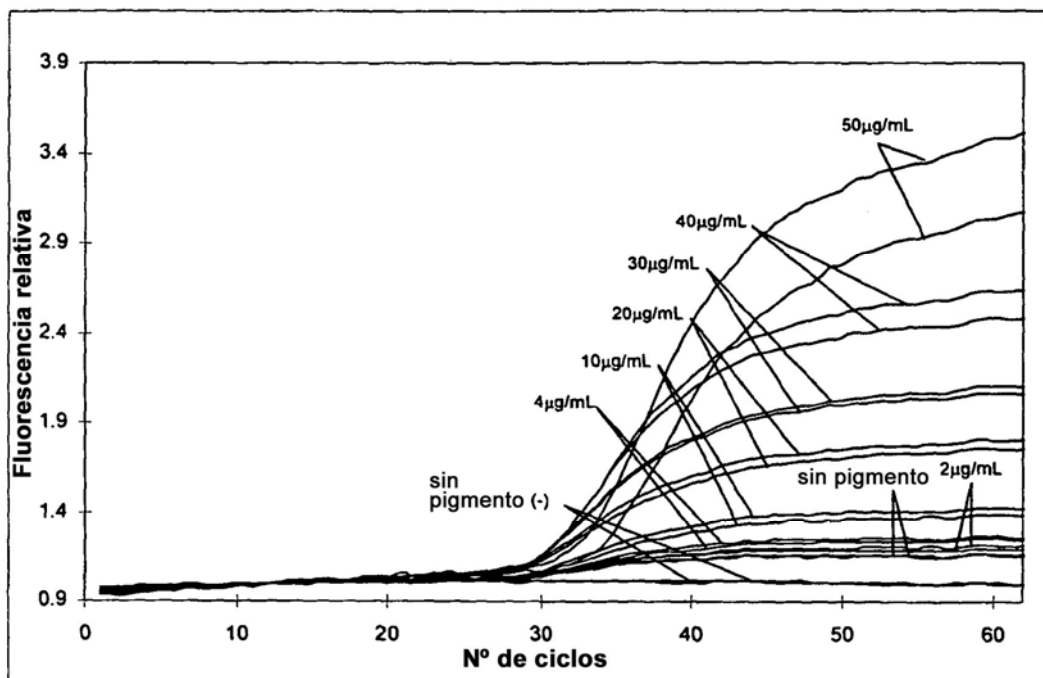


Fig. 18

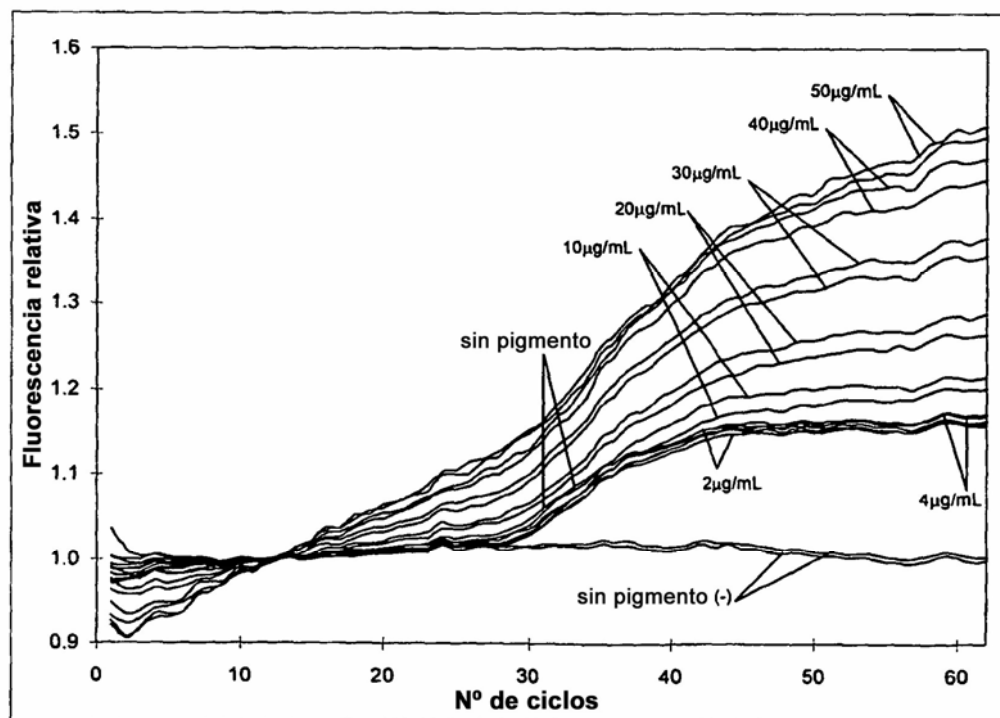


Fig. 19

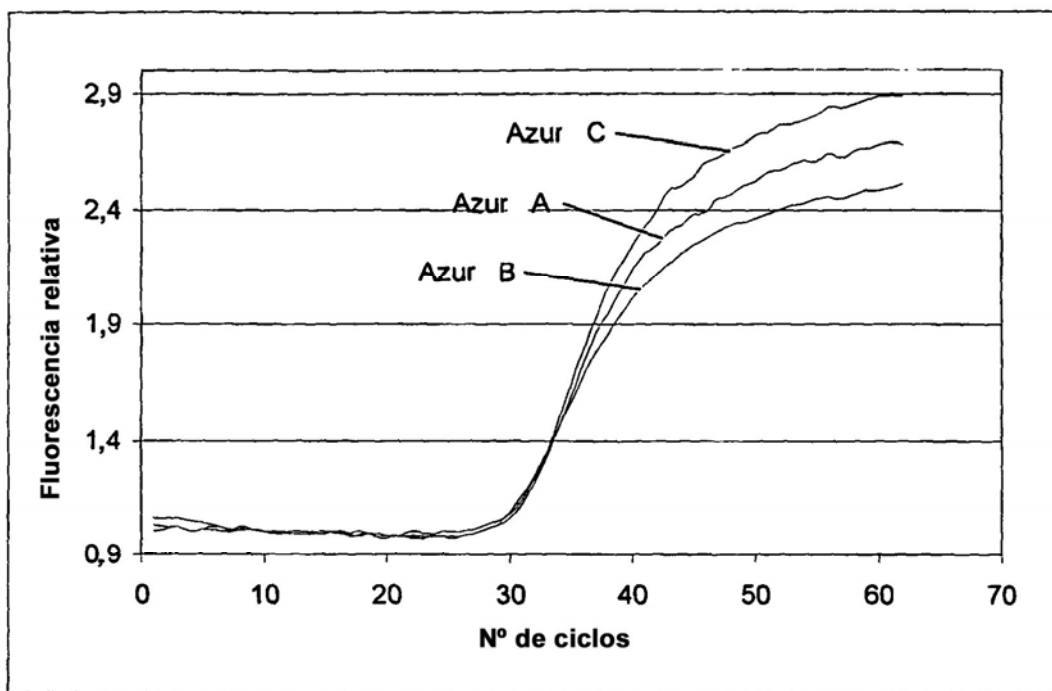


Fig. 20

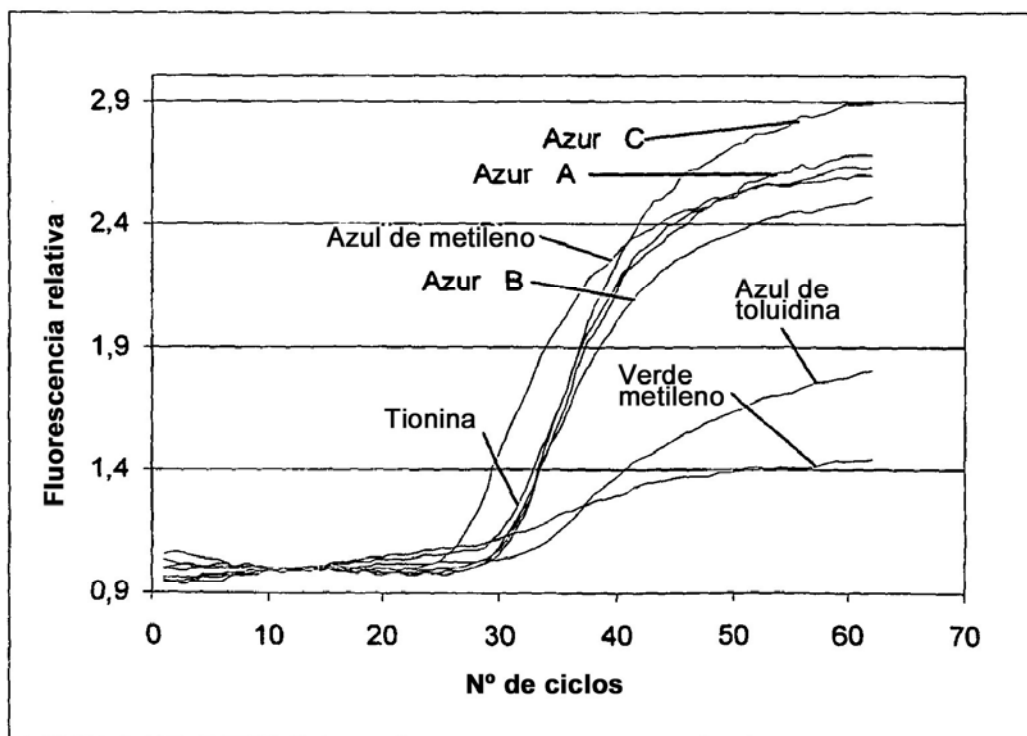


Fig. 21

Fig. 22A

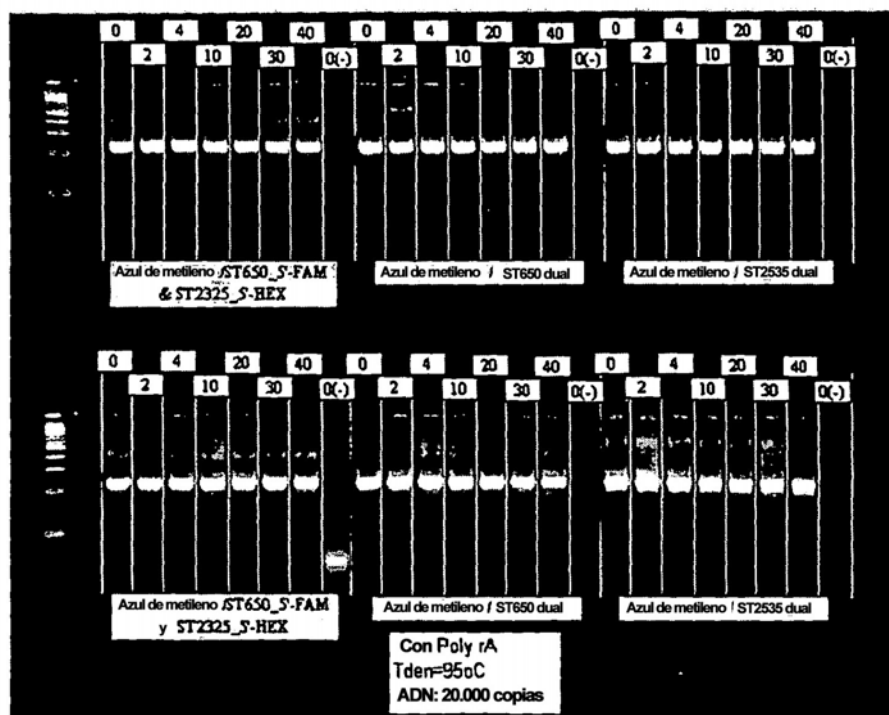


Fig. 22B

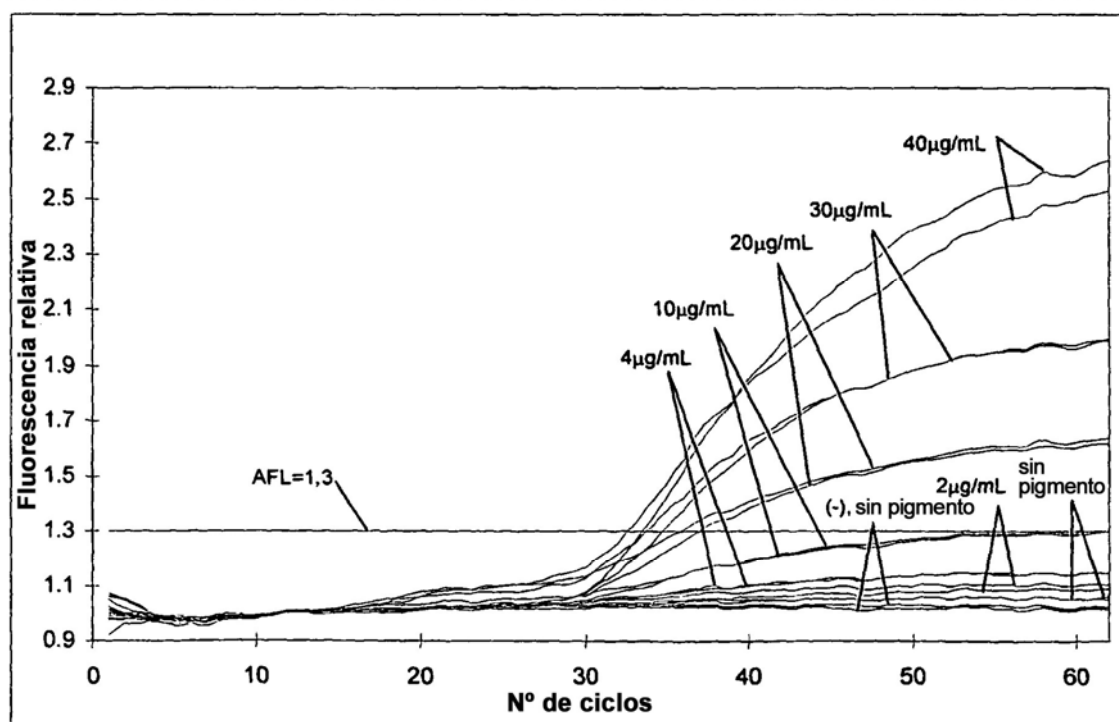


Fig. 23

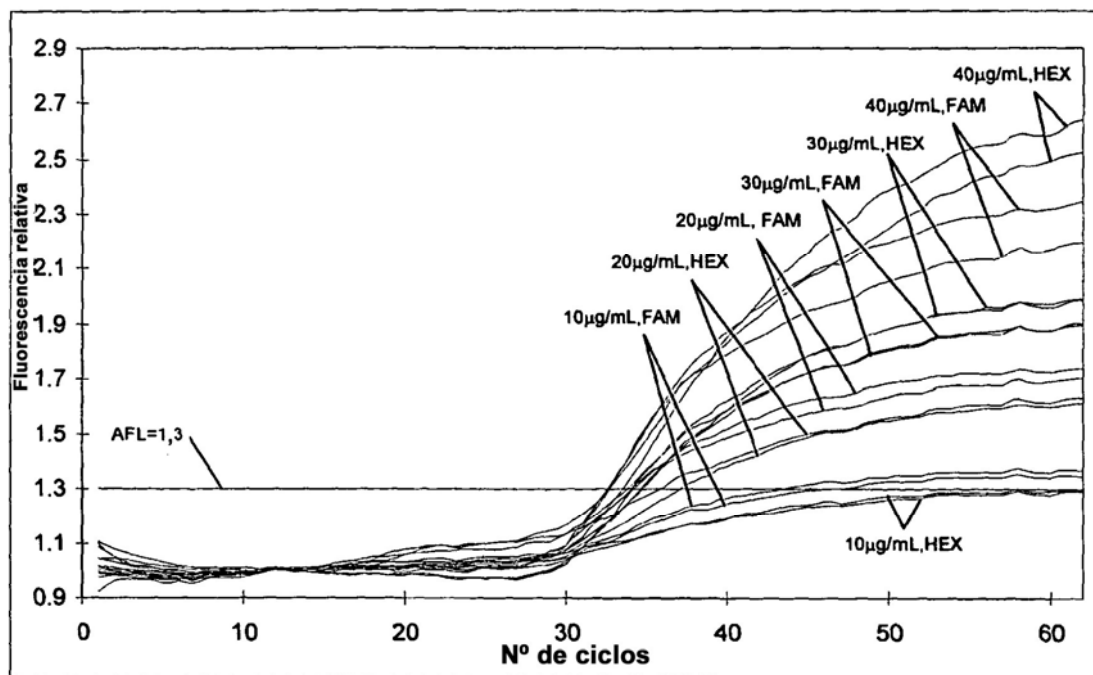


Fig. 24

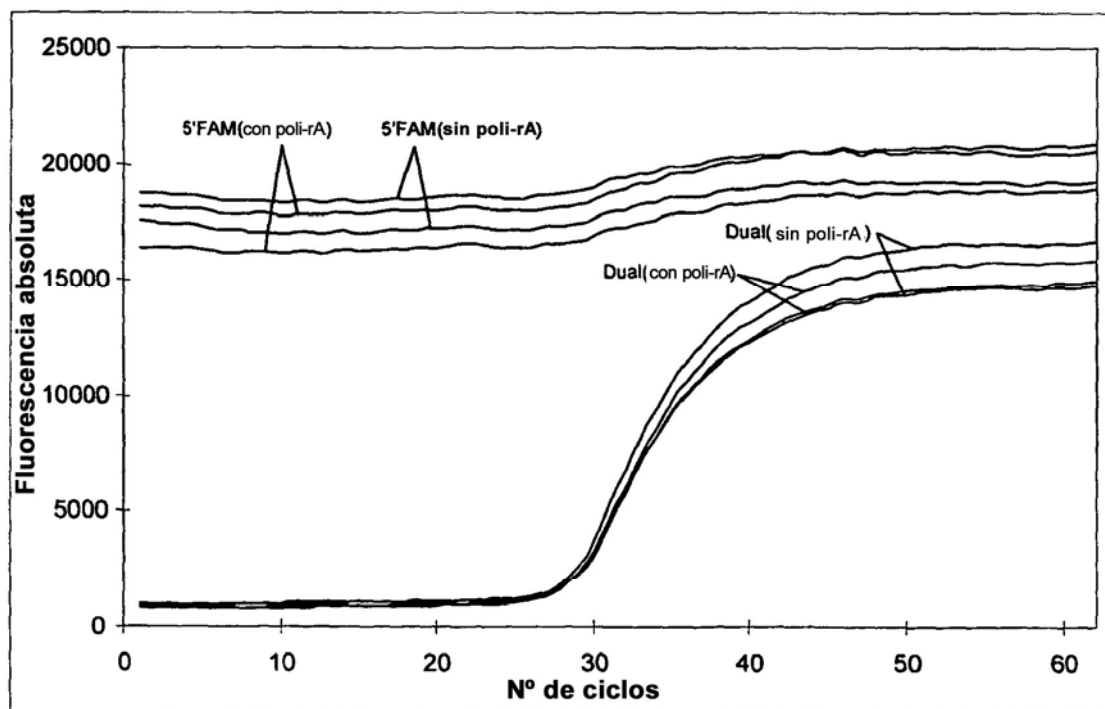


Fig. 25

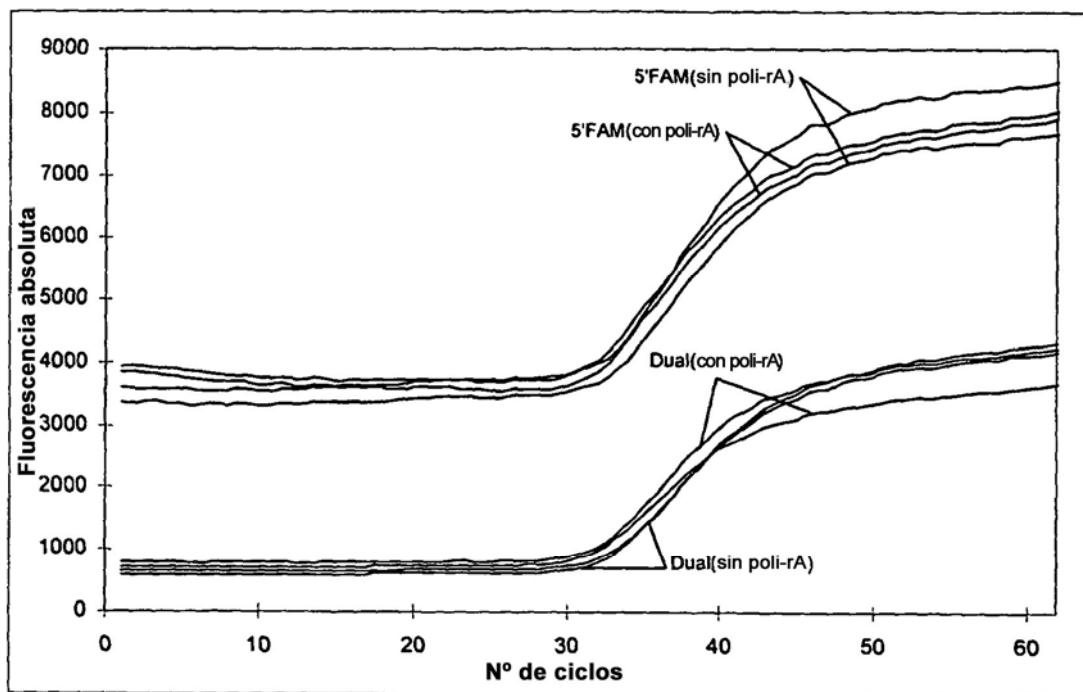


Fig. 26

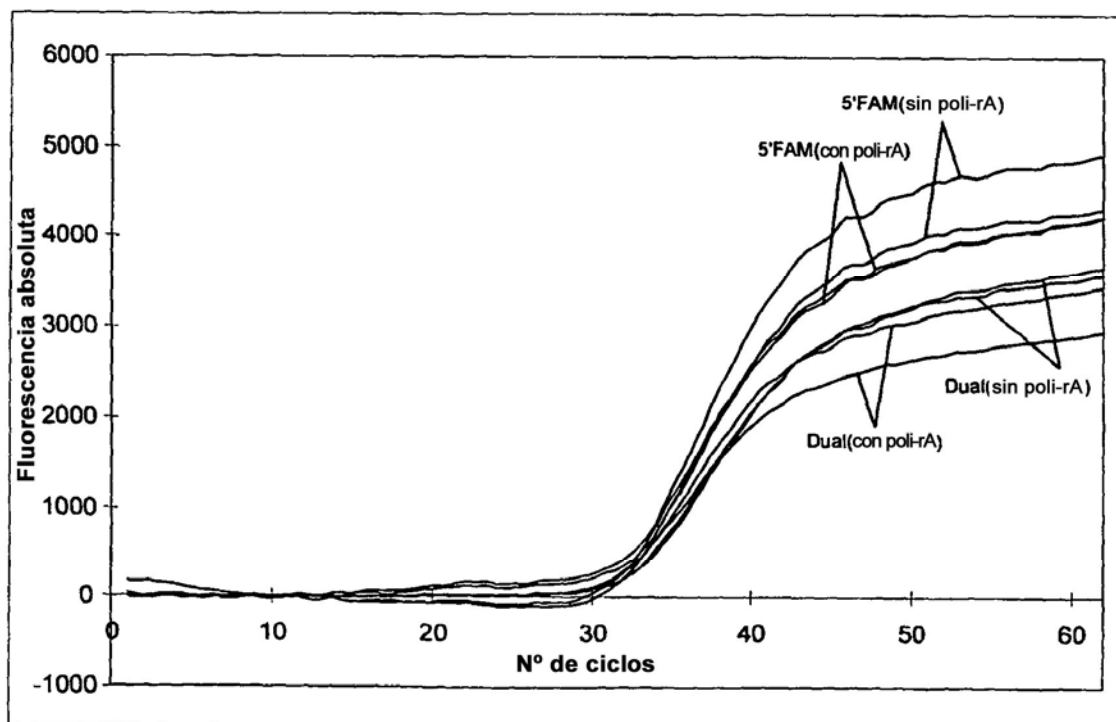


Fig. 27

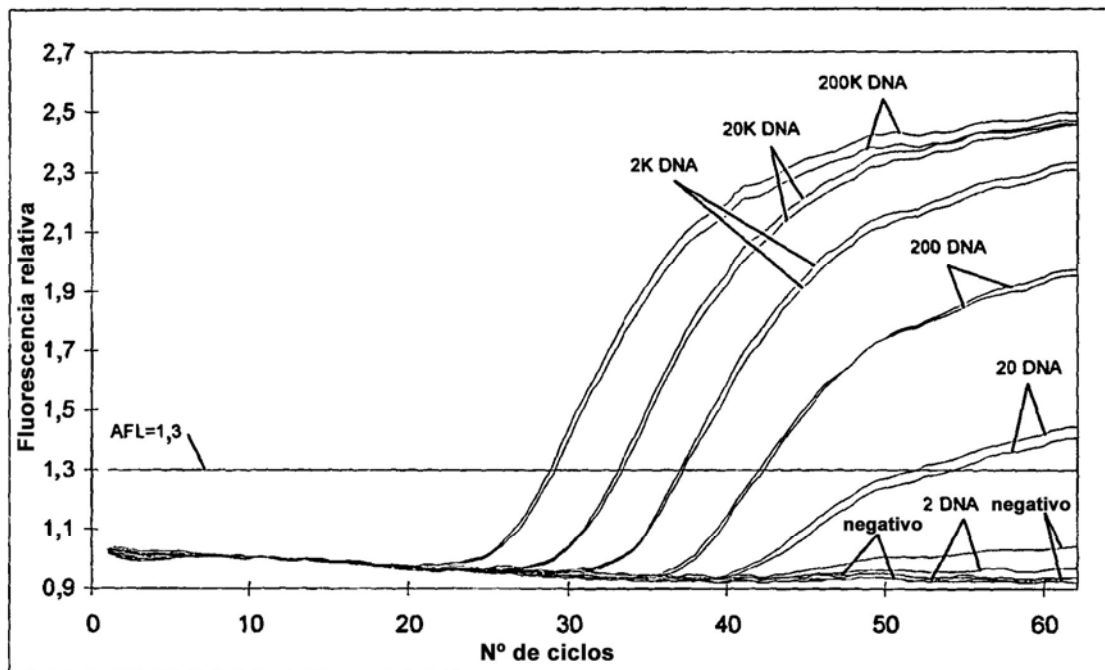


Fig. 28

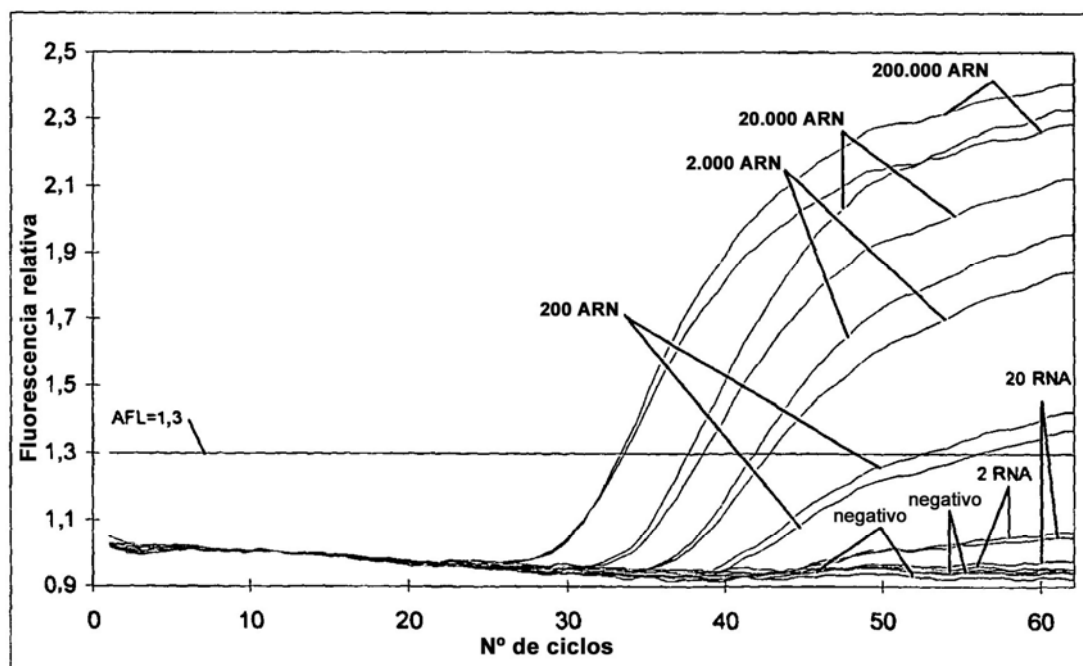


Fig. 29

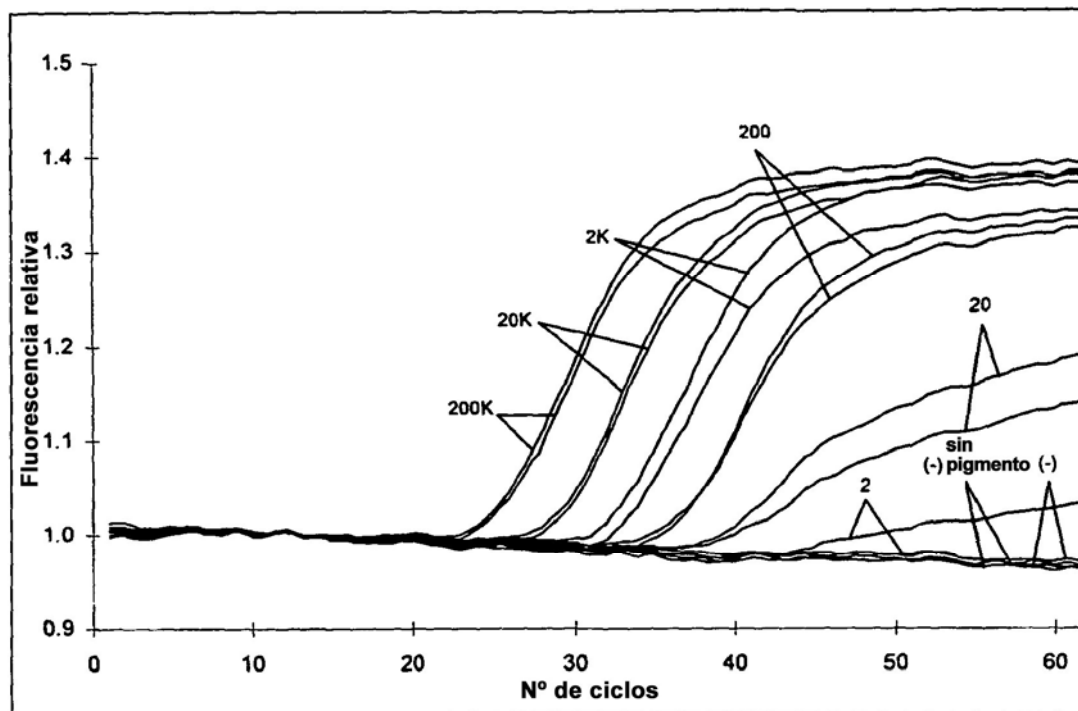


Fig. 30

Fig. 31A

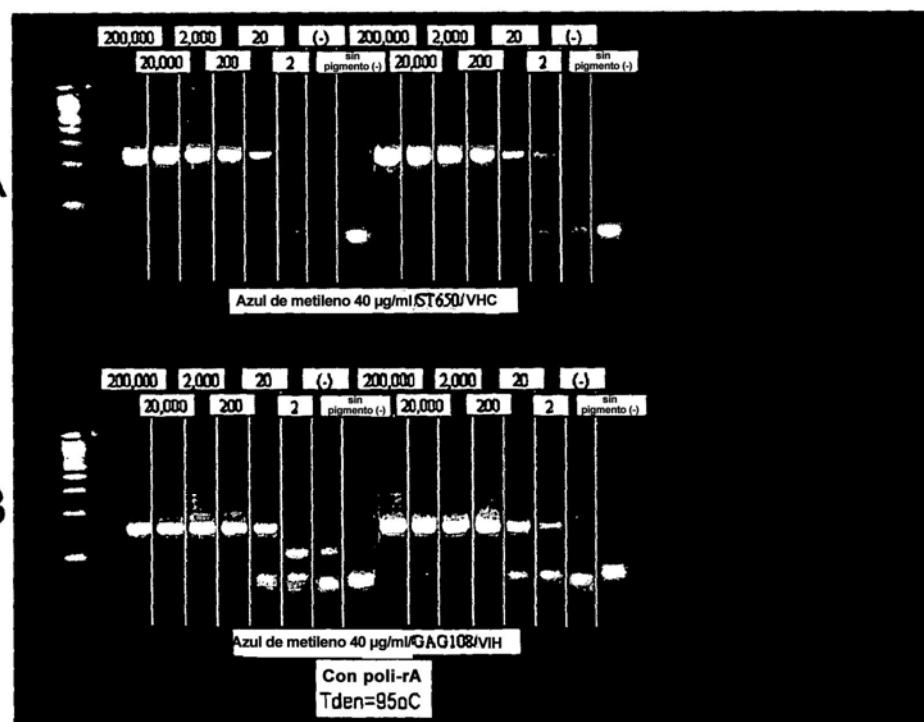
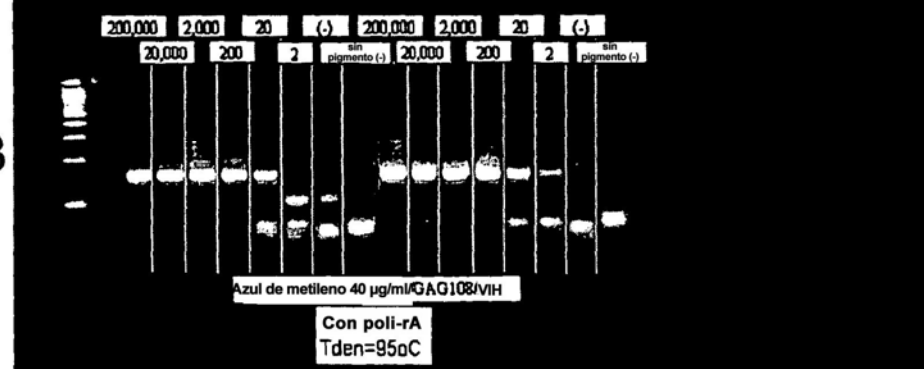


Fig. 31B



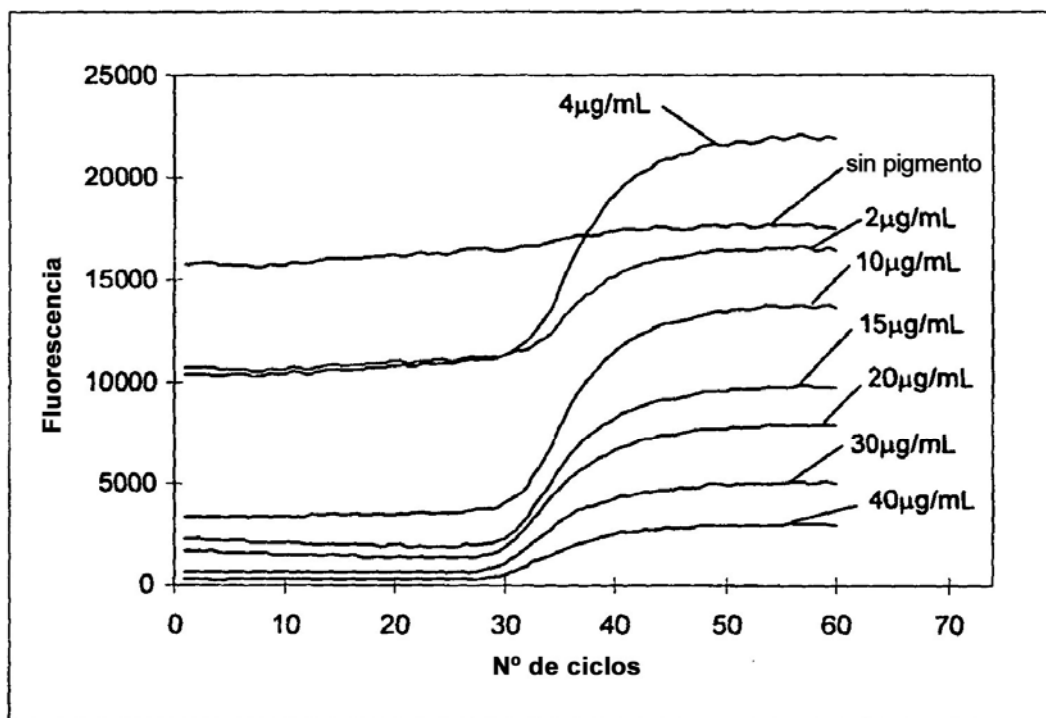


Fig. 32

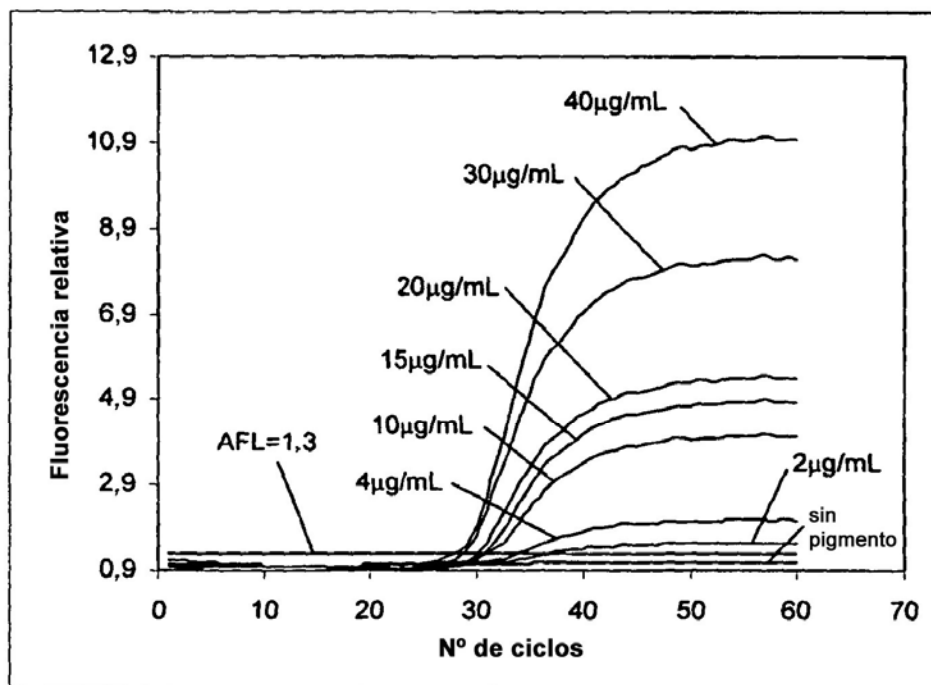


Fig. 33

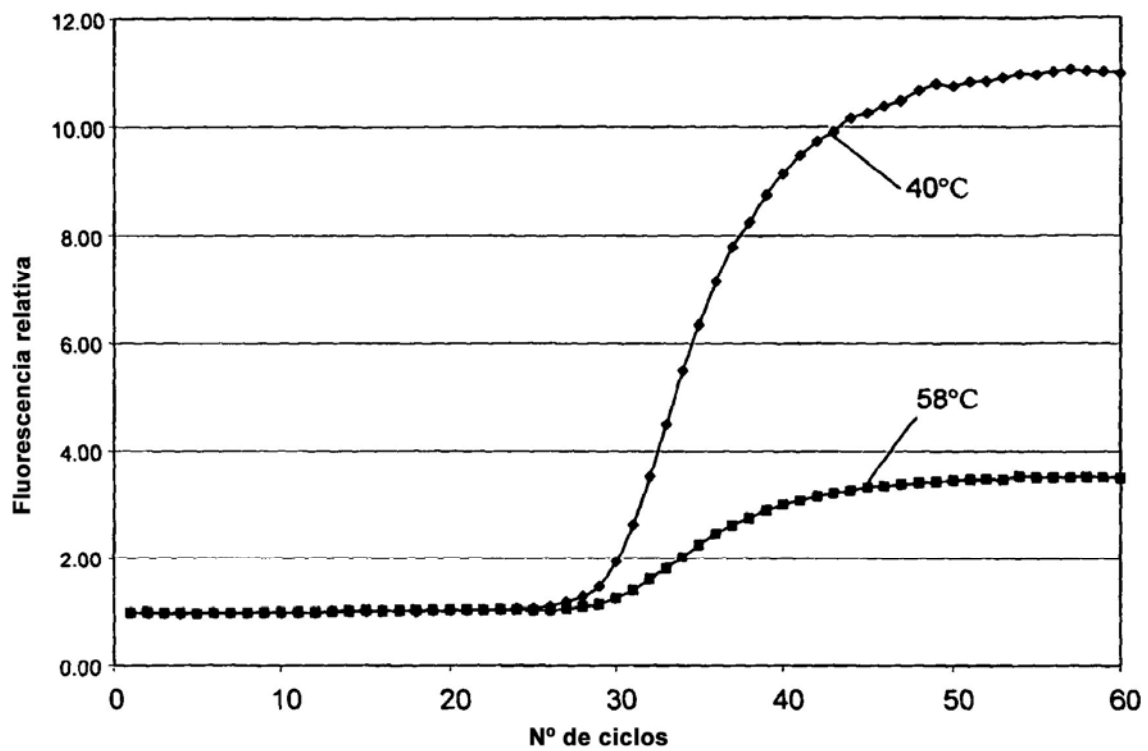


Fig. 34

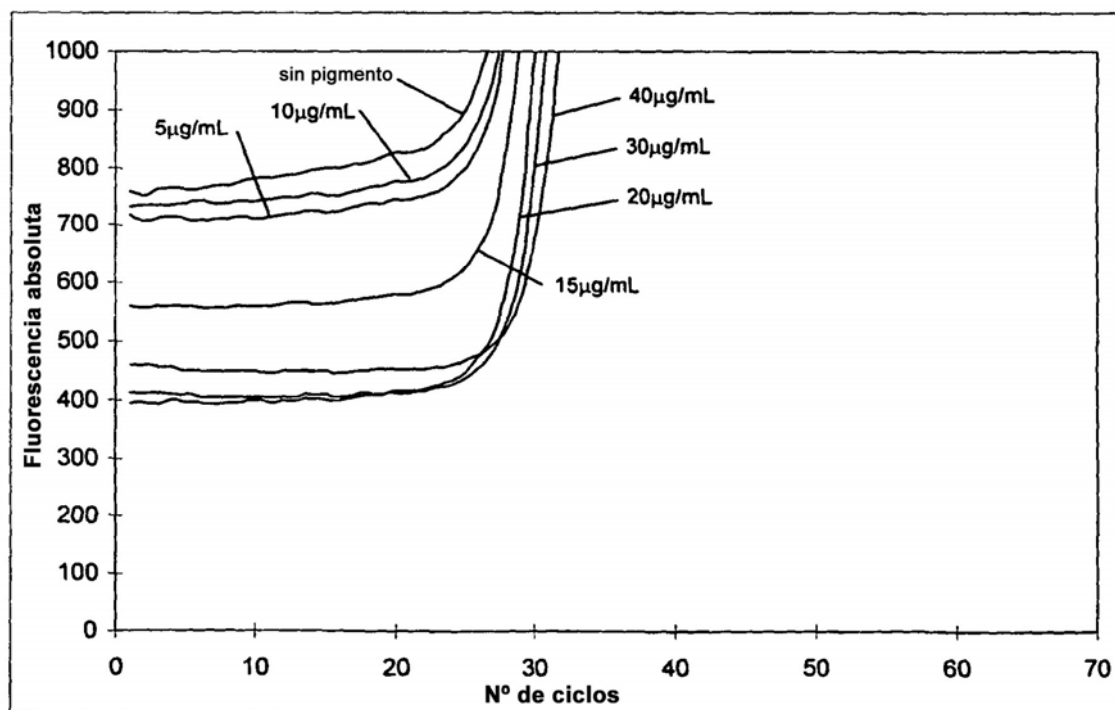


Fig. 35

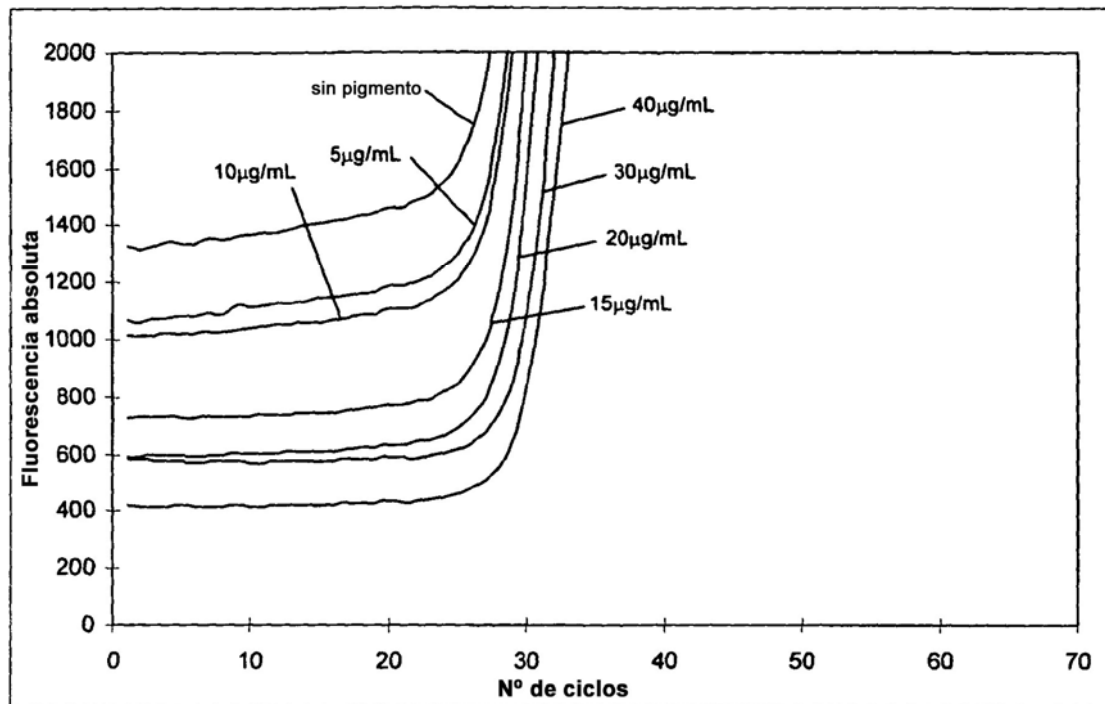


Fig. 36

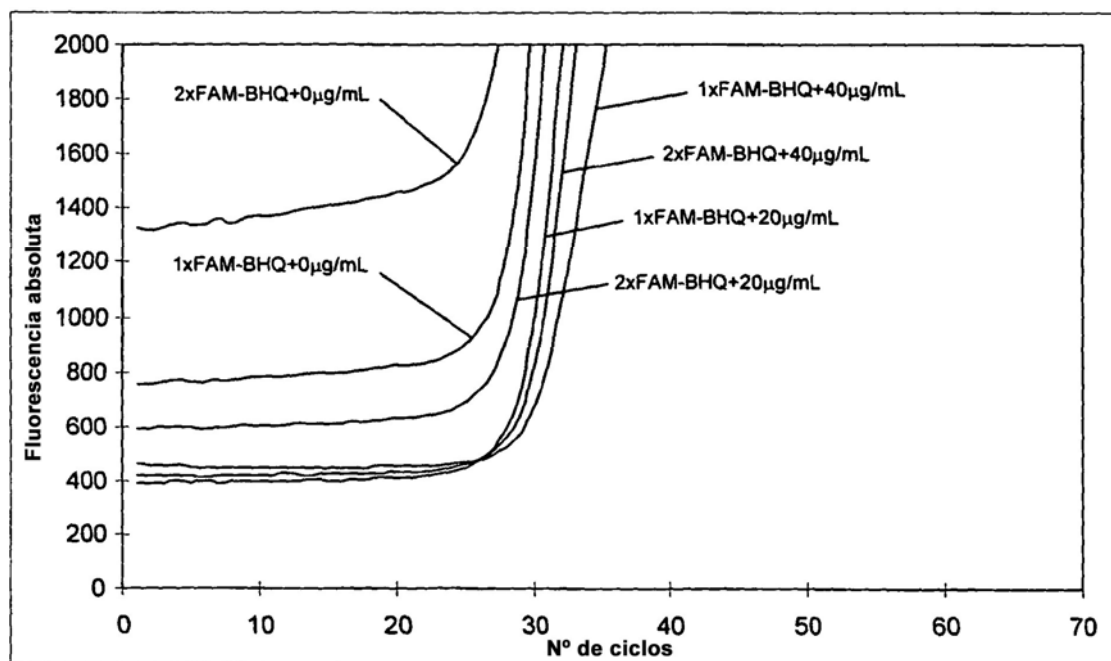


Fig. 37

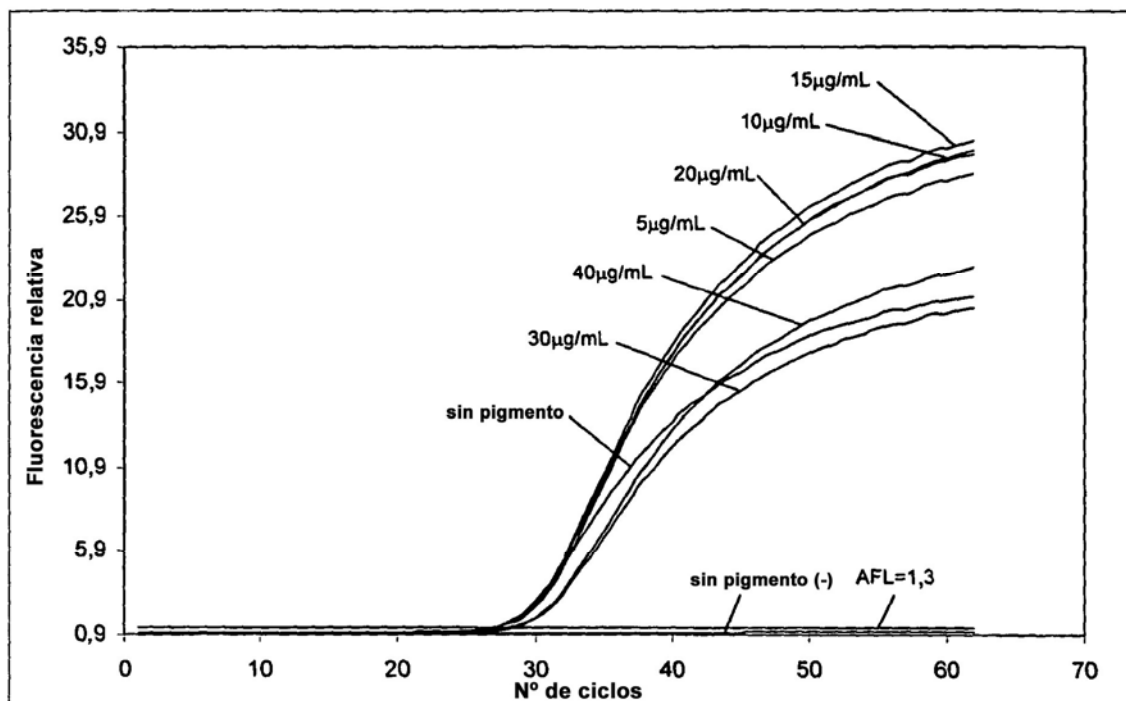


Fig. 38

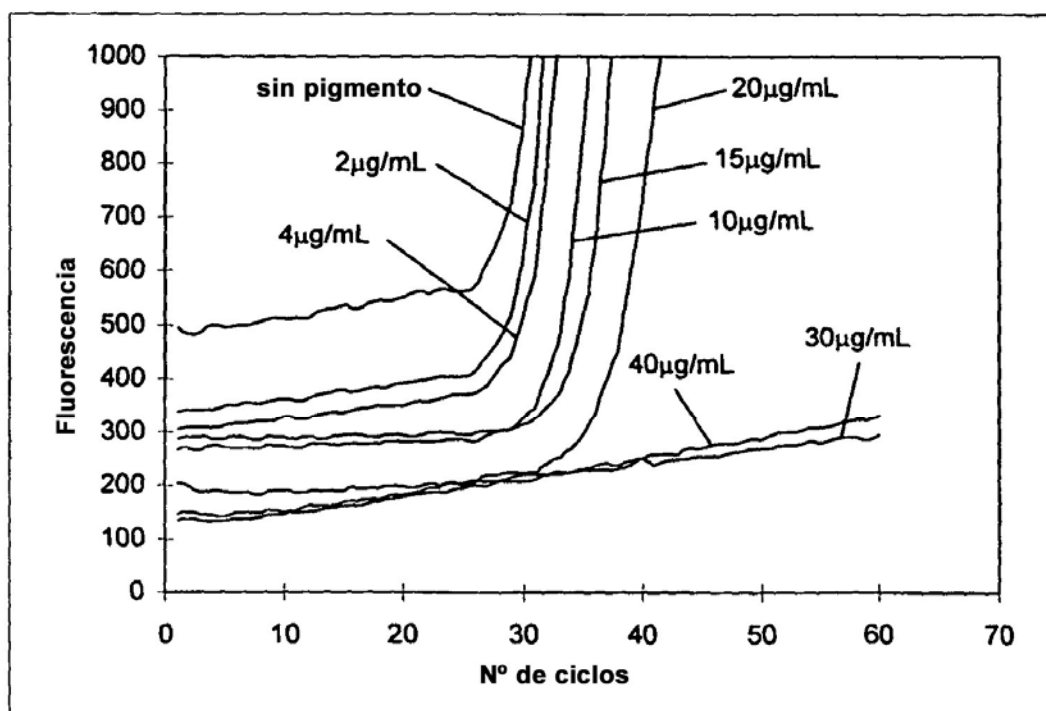


Fig. 39

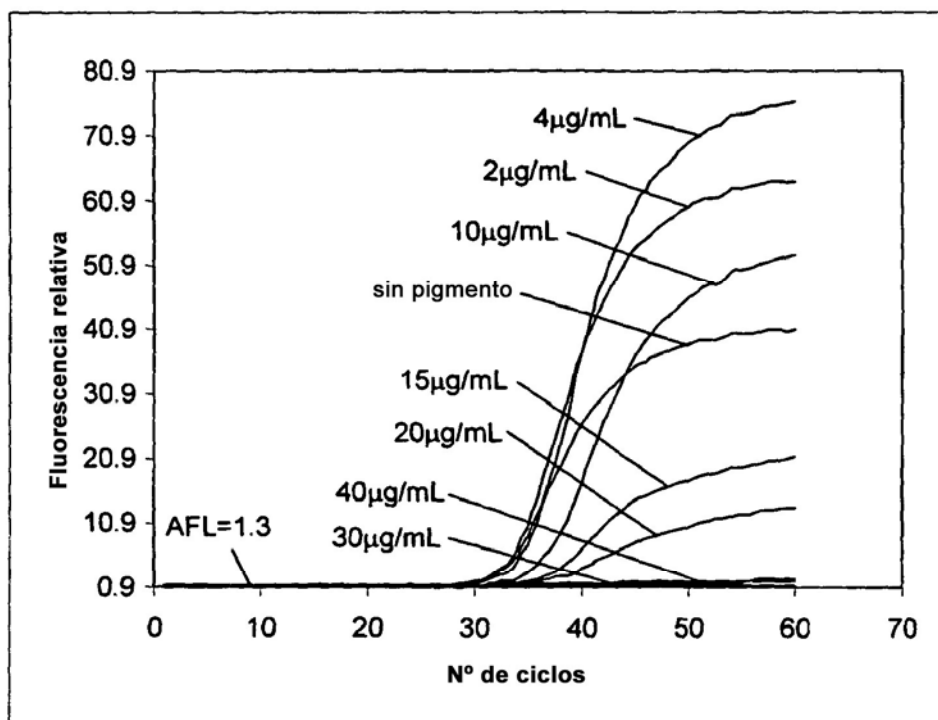


Fig. 40

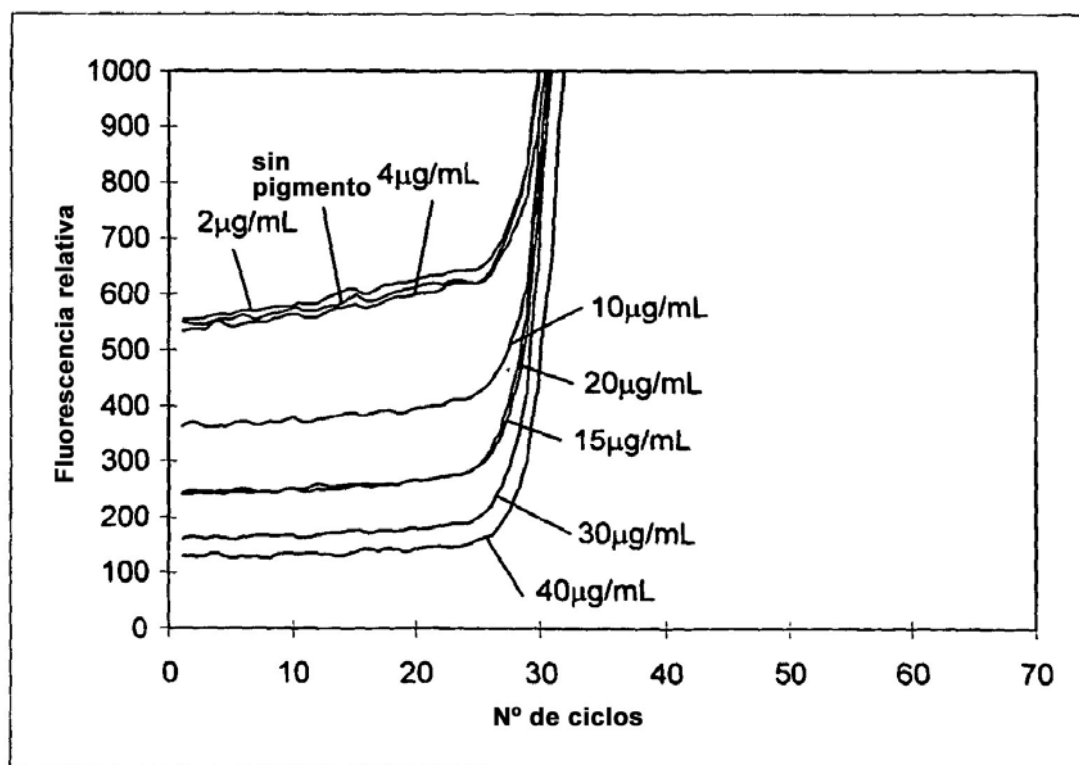


Fig. 41

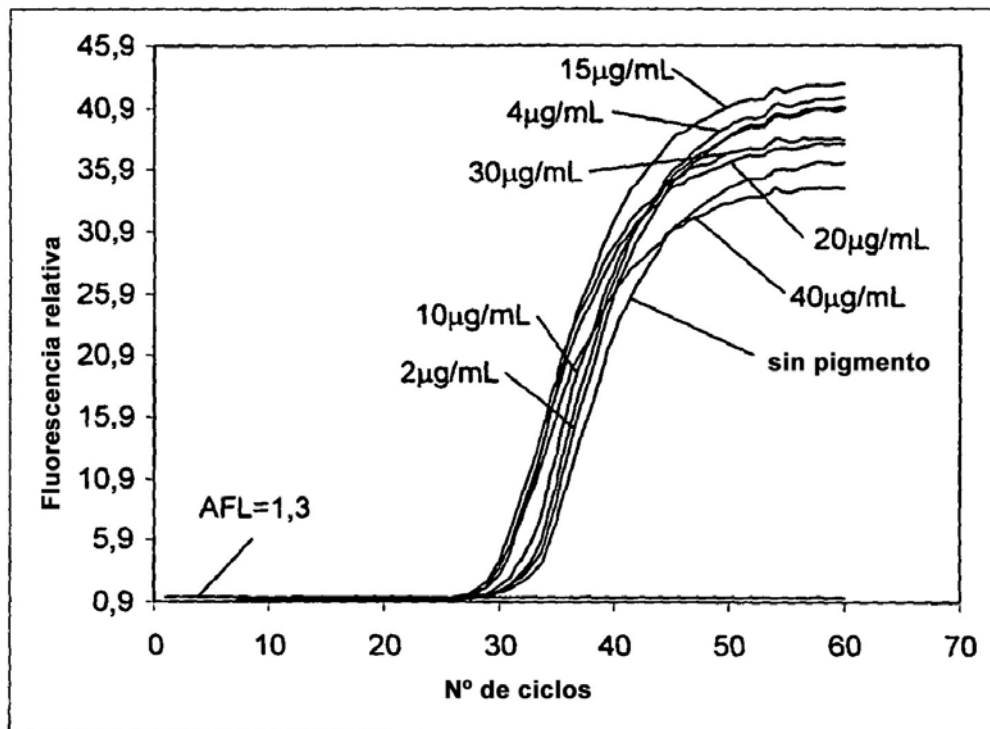


Fig. 42

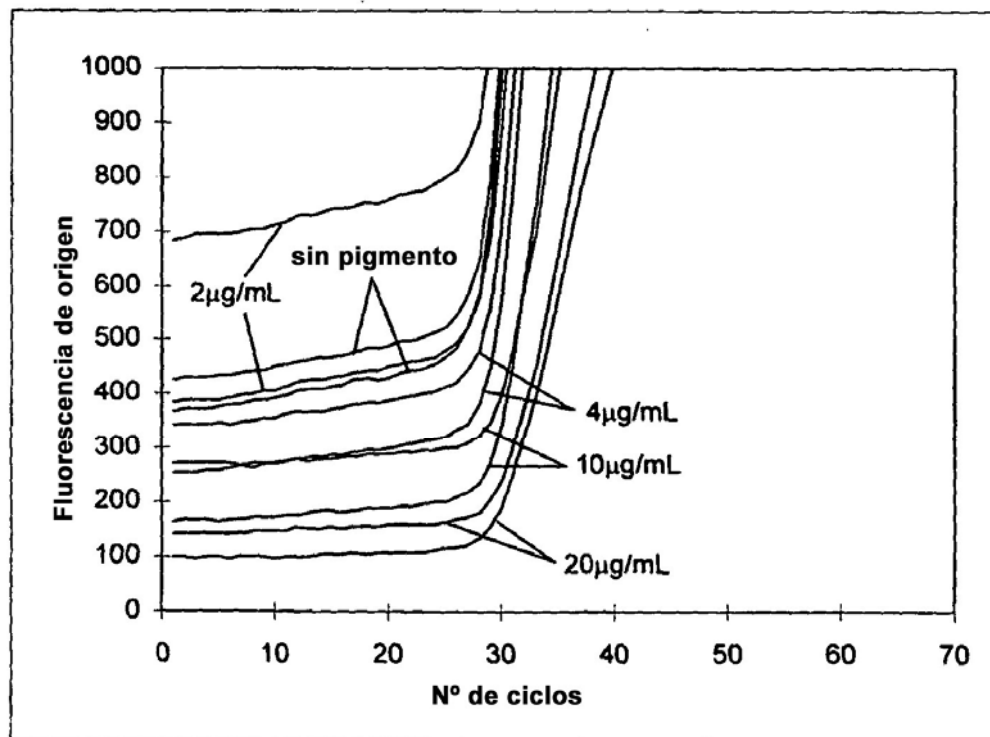


Fig. 43

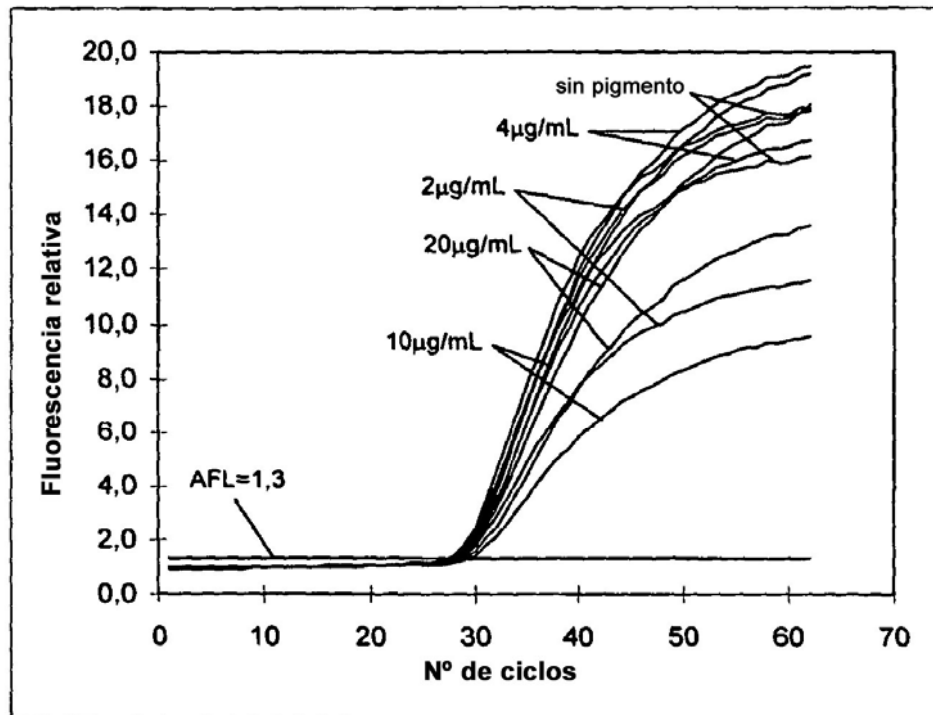


Fig. 44

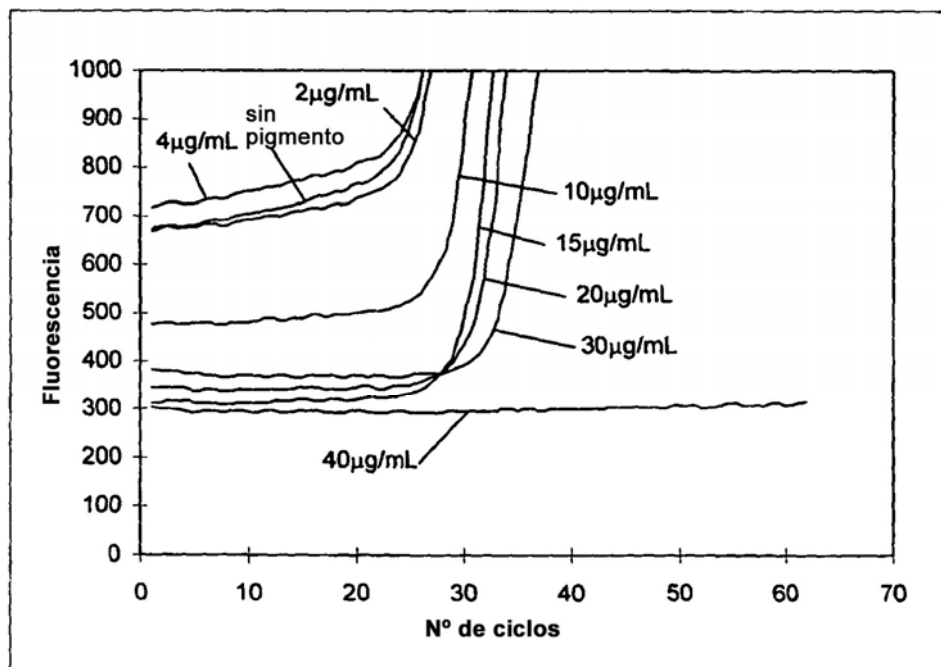


Fig. 45

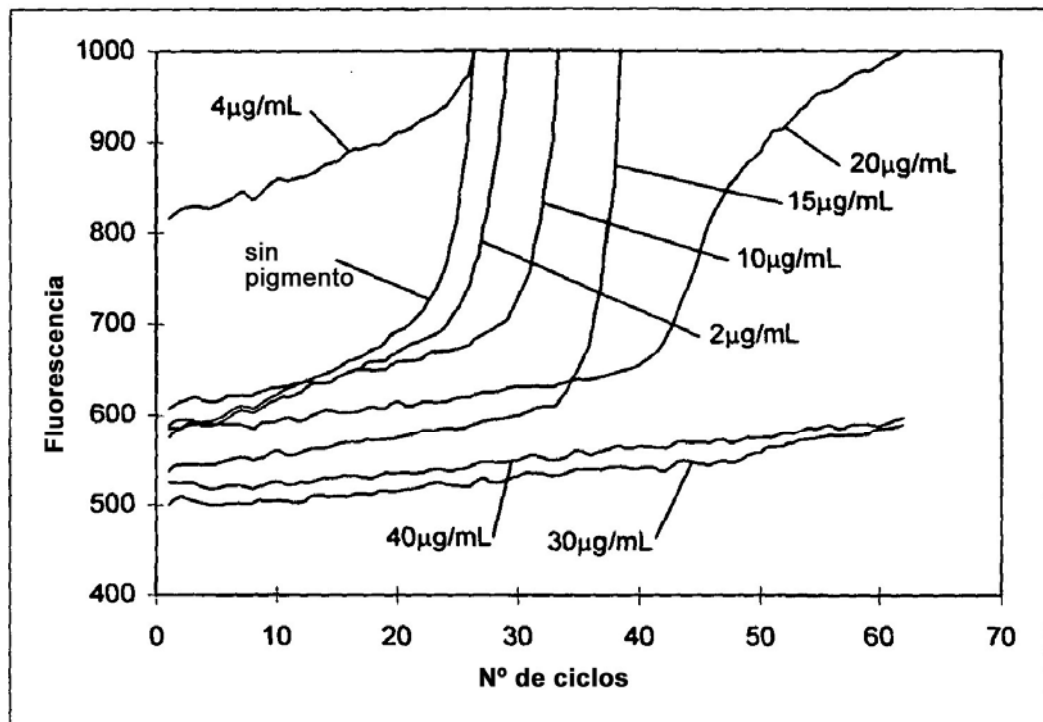


Fig. 46

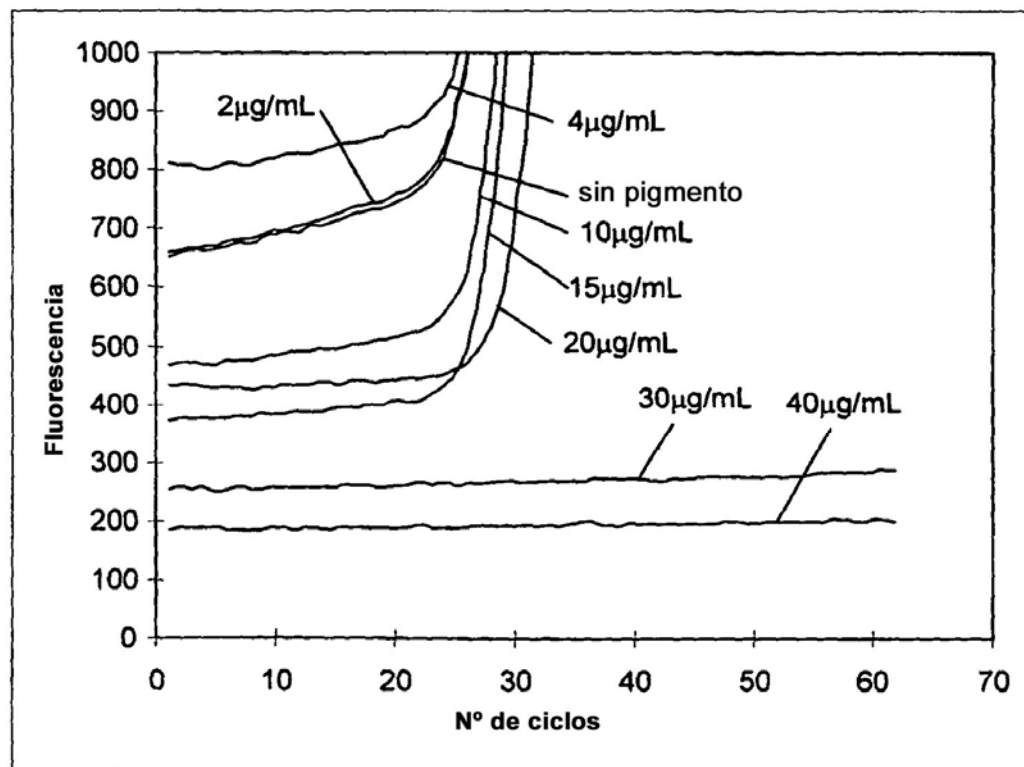


Fig. 47

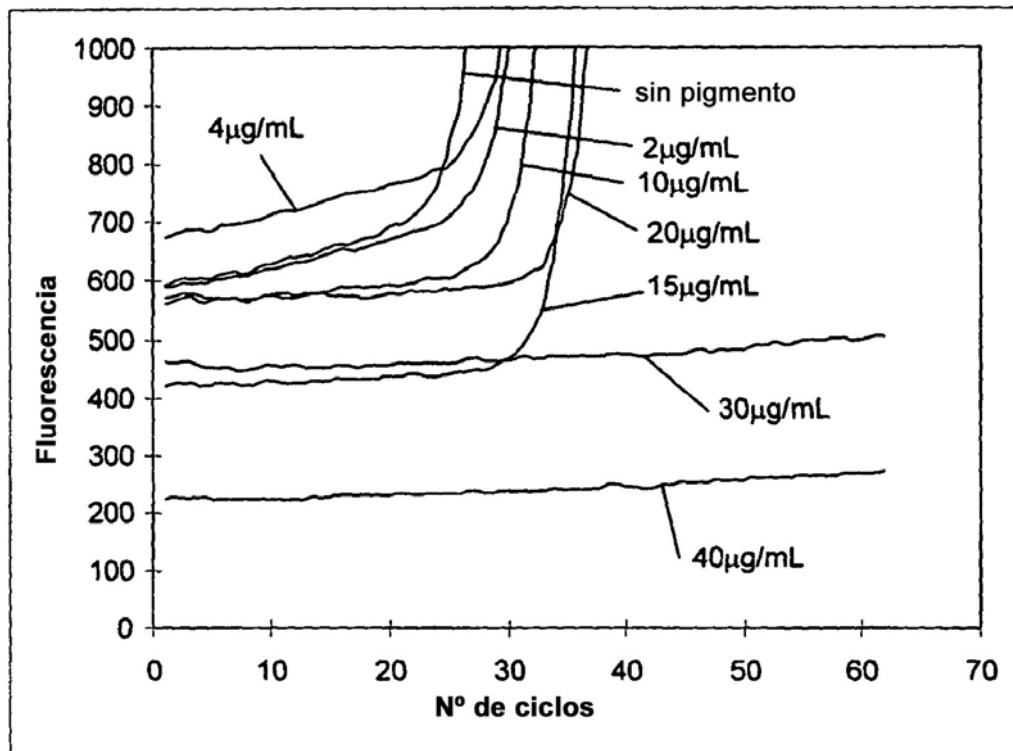


Fig. 48

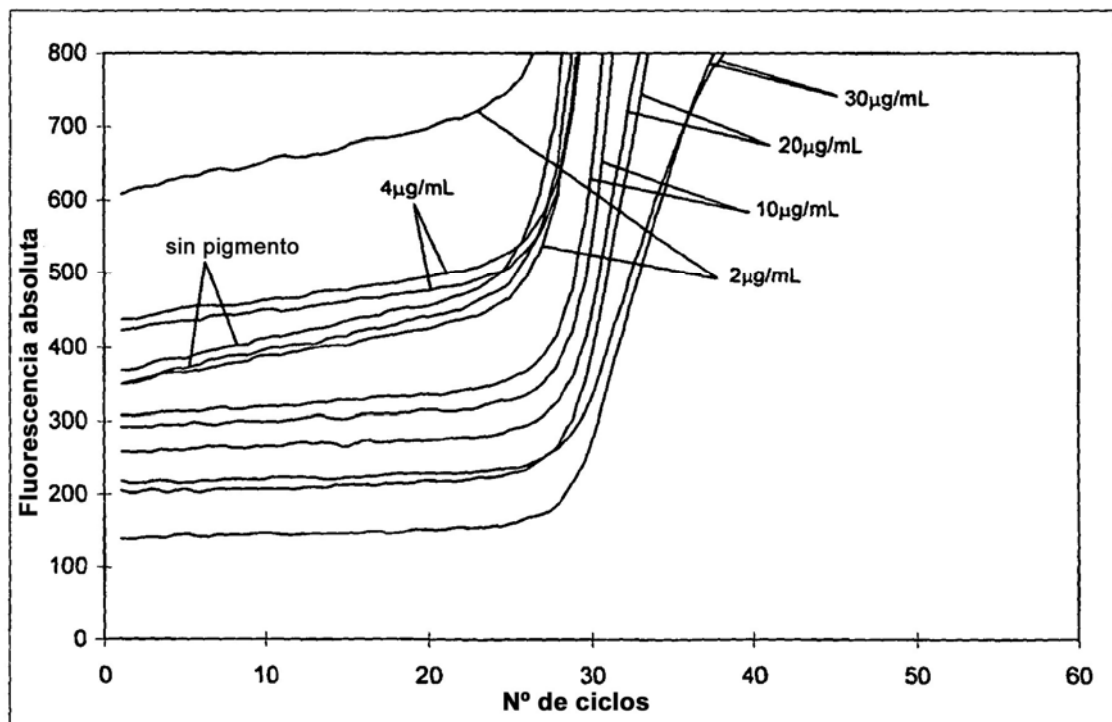


Fig. 49

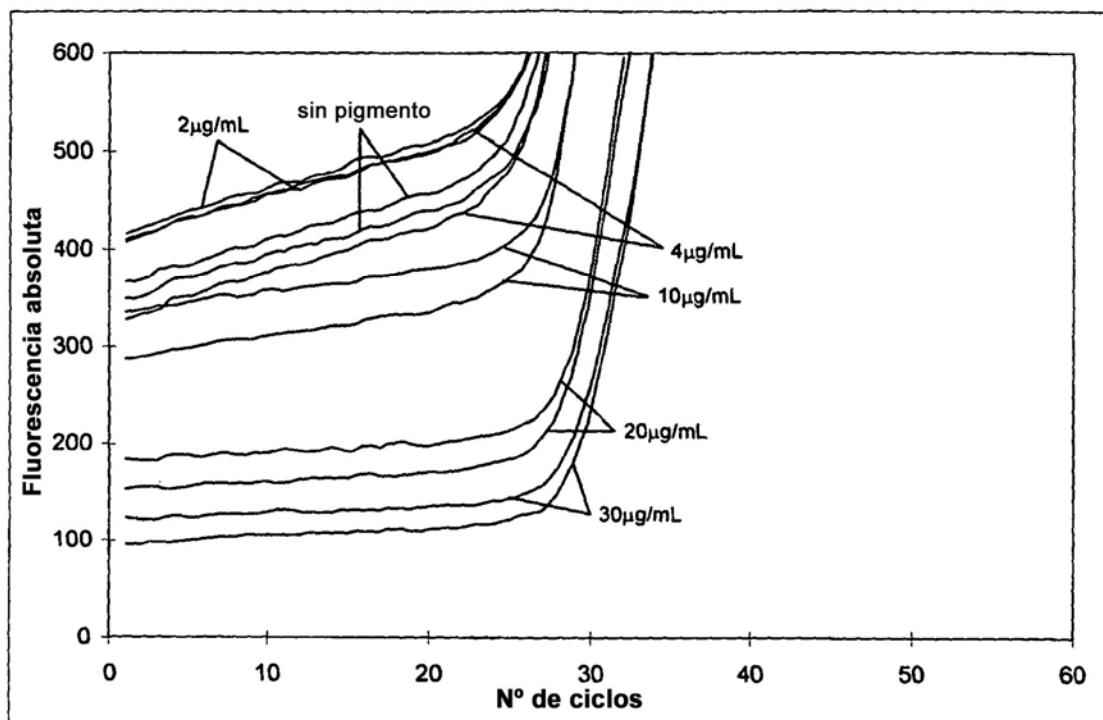


Fig. 50

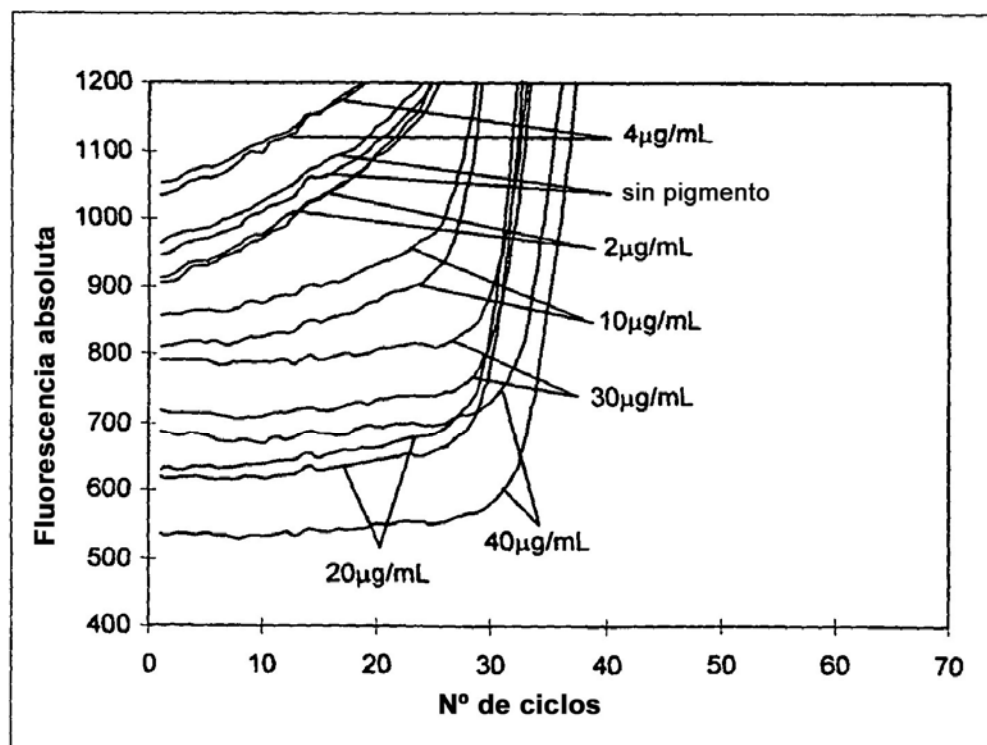


Fig. 51

Sonda : **FAM-CGGAATTGCCAGGACGACCGG** (SEC ID nº 14)

Fig. 52A

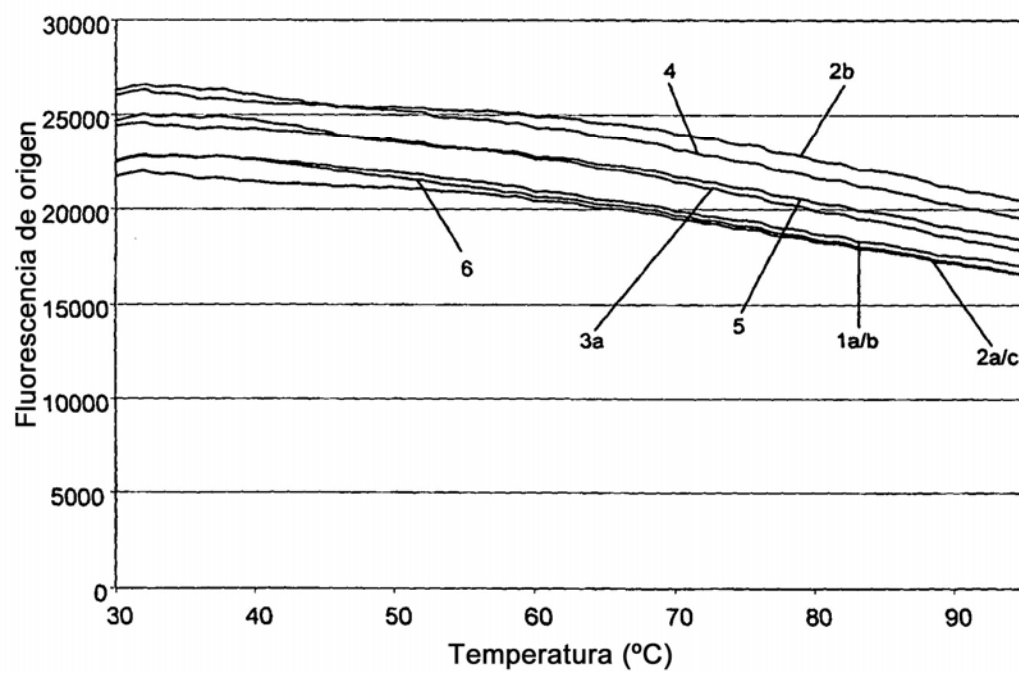


Fig. 52B

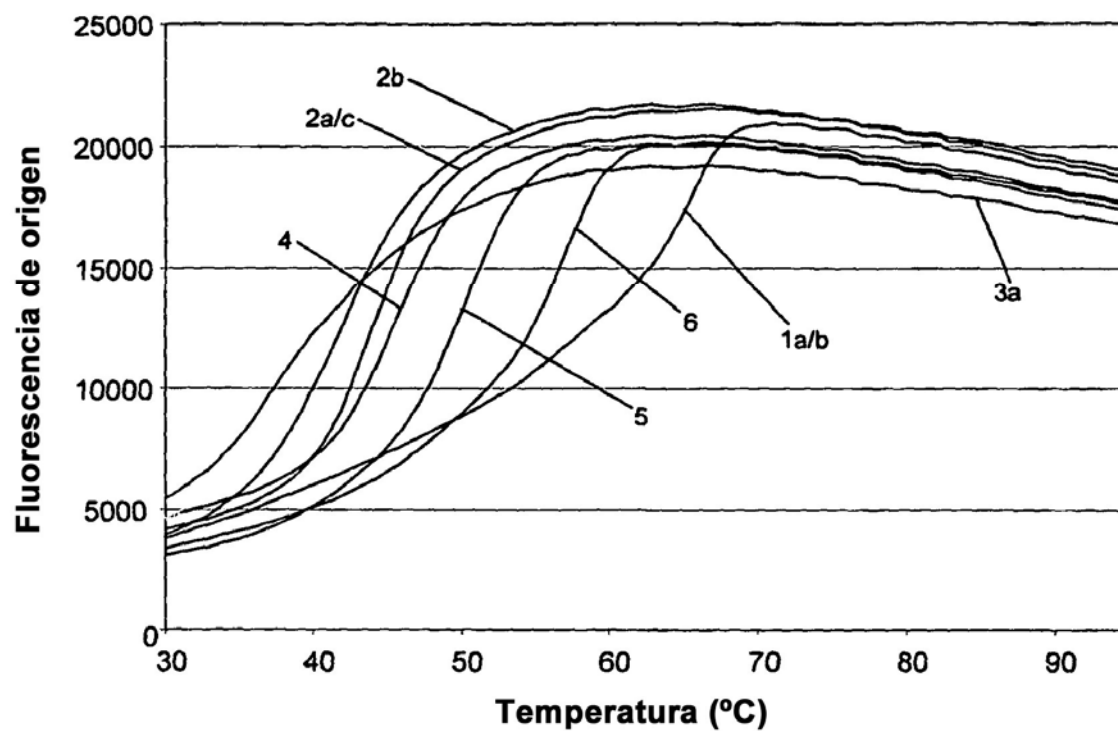


Fig. 53

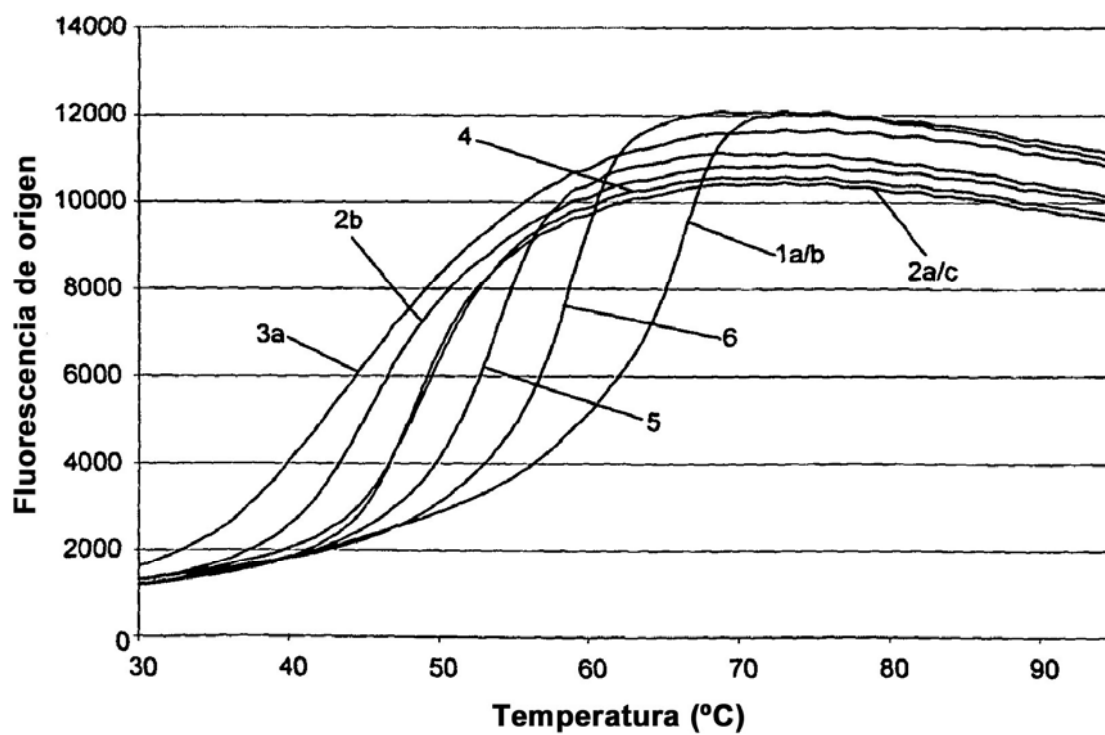


Fig. 54

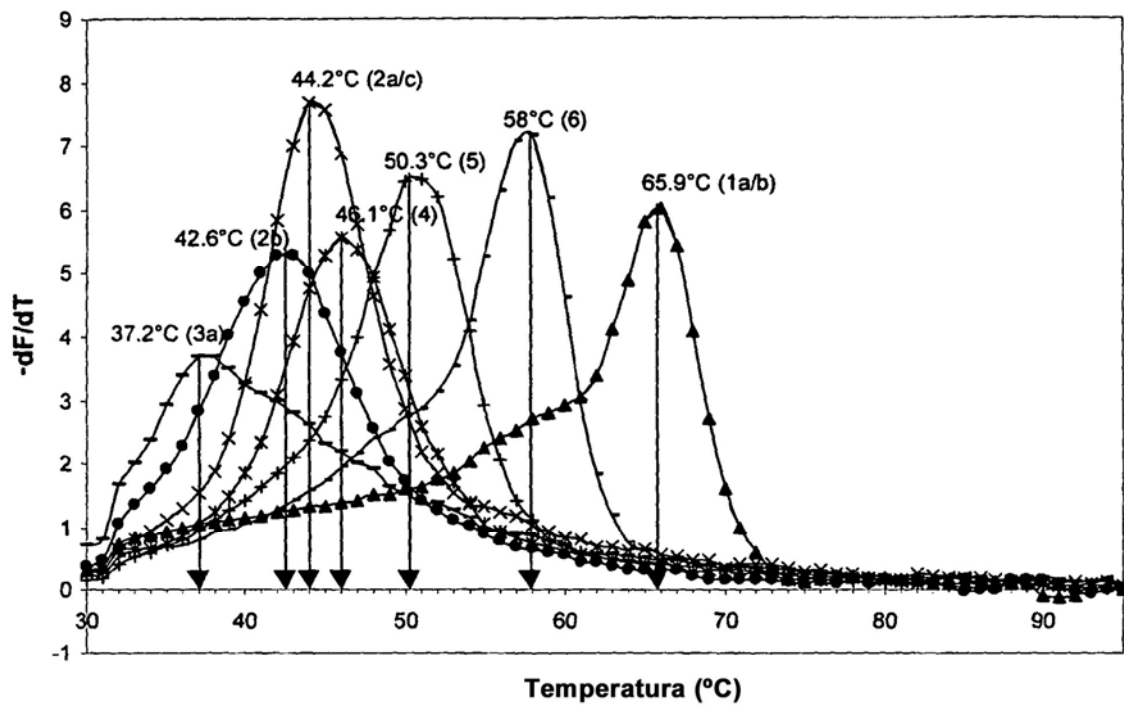


Fig. 55

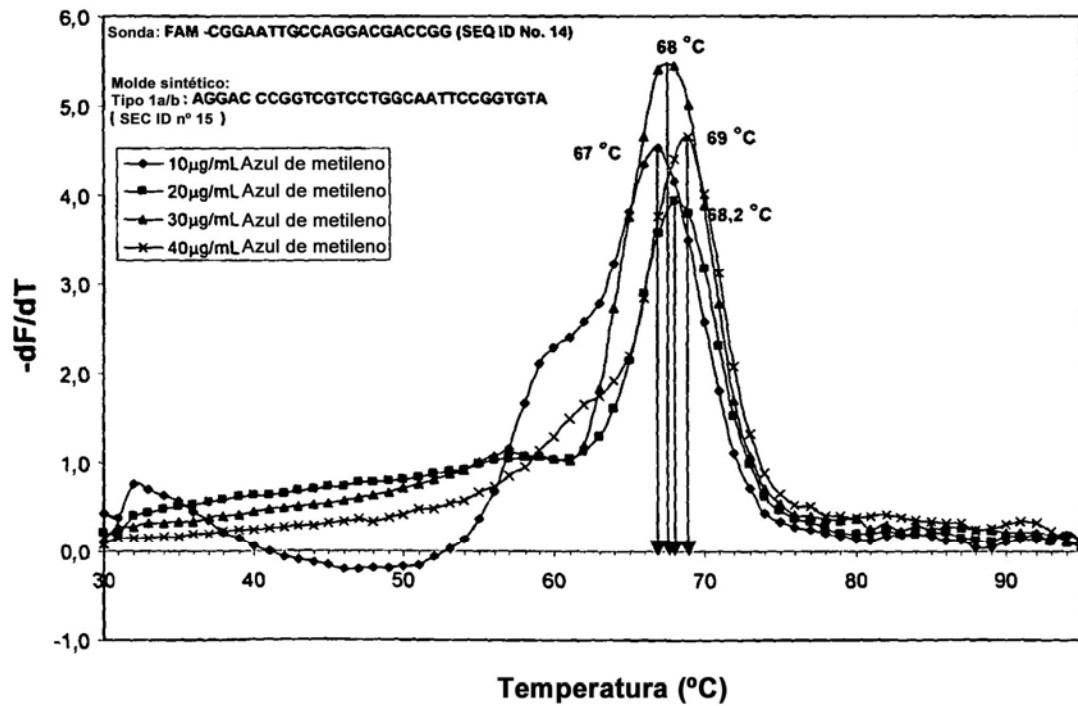


Fig. 56

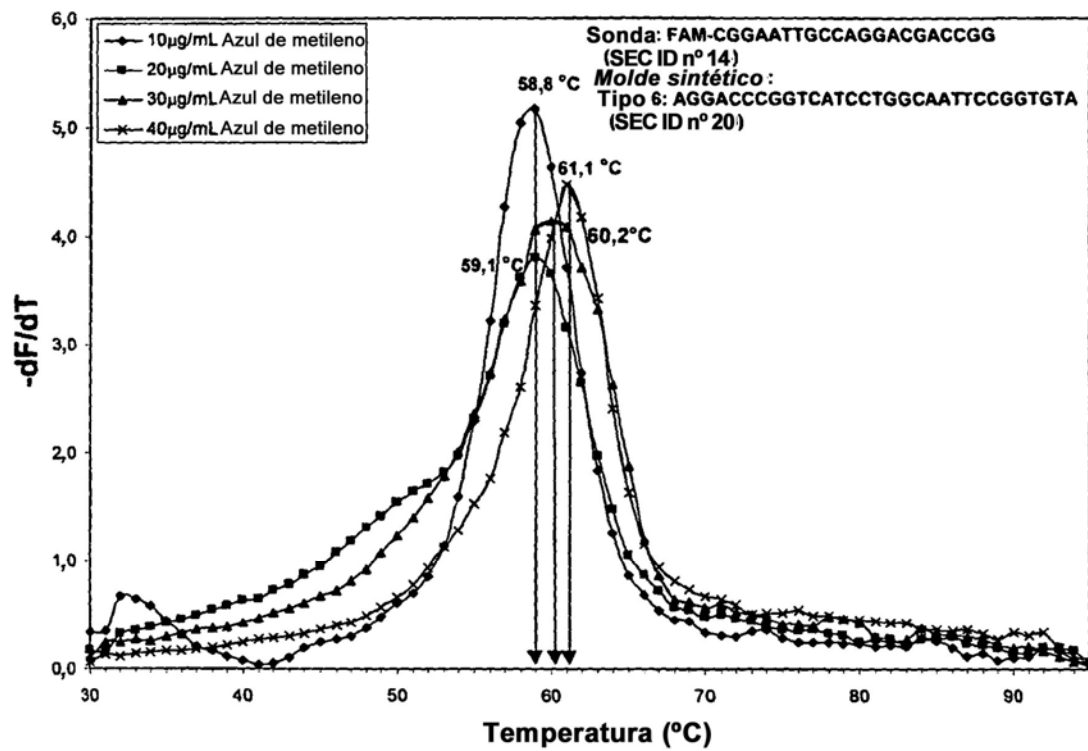


Fig. 57

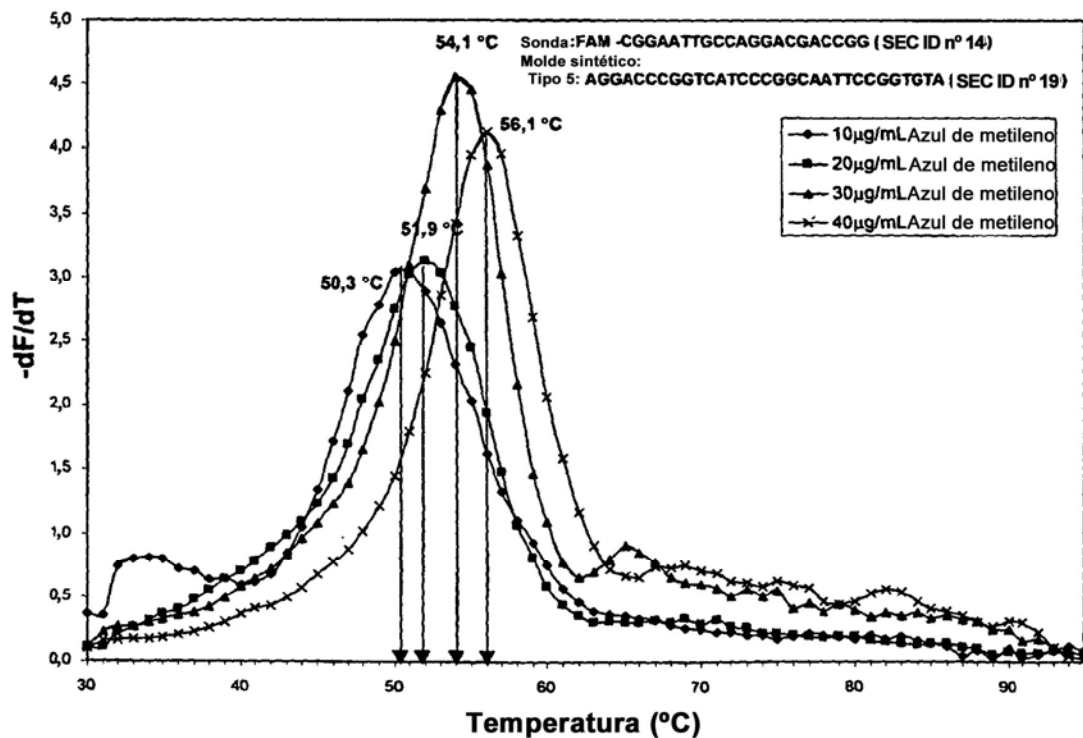


Fig. 58

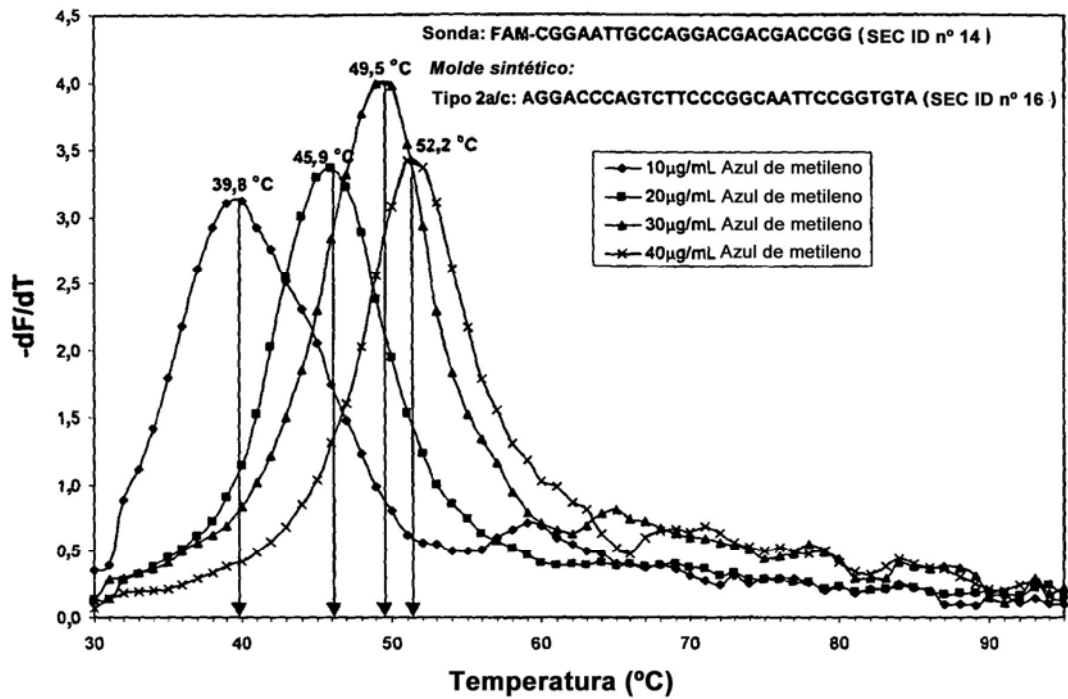


Fig. 59

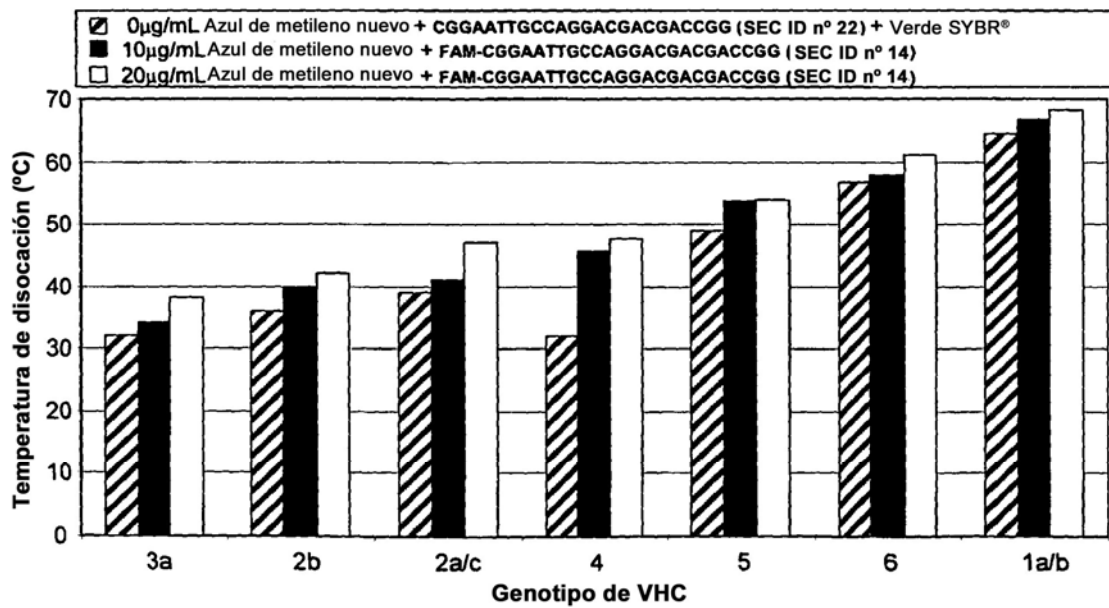


Fig. 60

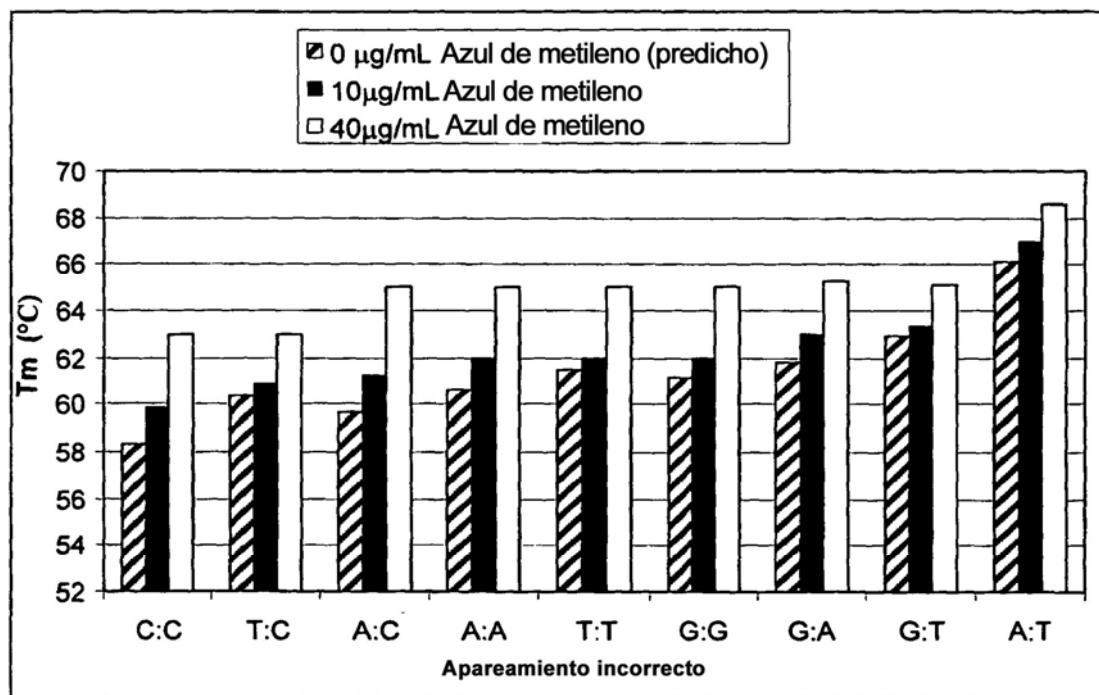


Fig. 61

Región de cebador directo de amplificación

		SK145	AGTGGGGG ACATCAAGCAGCCATGCAAAT (SEC ID nº 35)
HIV	Subtipo	SDL101-15 (SEC ID nº 36)
HIV	Subtipo	SDL105-1 (SEC ID nº 37)
HIV	Subtipo	SDL106-1 G.....T..... (SEC ID nº 38)
HIV	Subtipo	SDL108-3T..... (SEC ID nº 39)
HIV	Subtipo	SDL109-1 G.....T..... (SEC ID nº 40)
HIV	Subtipo	SDL110-5	...A.AA.. ...C..G....A..... (SEC ID nº 41)
HIV	Subtipo	SDL113-1C..G....T....G.. (SEC ID nº 42)
HIV	Subtipo	SDL114-2G...C..G....T..... (SEC ID nº 43)
HIV	Subtipo	SDL115-2C..G....T....G.. (SEC ID nº 44)
HIV	Subtipo	SDL156-1C..G....A..... (SEC ID nº 45)
HIV	Subtipo	G_G3-03	C..... G.....T..... (SEC ID nº 46)

Región de cebador inverso de amplificación (complemento inverso)

		GAG152	GGAAGTGACATAGCAGGAAGTACTAGTACC (SEC ID nº 47)
HIV	Subtipo	SDL101-15 (SEC ID nº 48)
HIV	Subtipo	SDL105-1 (SEC ID nº 49)
HIV	Subtipo	SDL106-1T..... (SEC ID nº 50)
HIV	Subtipo	SDL108-3T..... (SEC ID nº 51)
HIV	Subtipo	SDL109-1T.....C..... (SEC ID nº 52)
HIV	Subtipo	SDL110-5 (SEC ID nº 53)
HIV	Subtipo	SDL113-1 (SEC ID nº 54)
HIV	Subtipo	SDL114-2T..... (SEC ID nº 55)
HIV	Subtipo	sDL115-2	...G.....C..... (SEC ID nº 56)
HIV	Subtipo	SDL156-1G.. (SEC ID nº 57)
HIV	Subtipo	G_G3-03T..... (SEC ID nº 58)

Región de sonda 5'-nucleasa (complemento inverso)

		GAG108	TAAAAGATACCATCAATGAGGAAGCTGCAGA (SEC ID nº 59)
HIV	Subtipo	SDL101-15A.....A..G..... (SEC ID nº 60)
HIV	Subtipo	SDL105-1G..... (SEC ID nº 61)
HIV	Subtipo	SDL106-1G.....T..... (SEC ID nº 62)
HIV	Subtipo	SDL108-3G...G.T..... (SEC ID nº 63)
HIV	Subtipo	SDL109-1G.....T..... (SEC ID nº 64)
HIV	Subtipo	SDL110-5A..... (SEC ID nº 65)
HIV	Subtipo	SDL113-1 (SEC ID nº 66)
HIV	Subtipo	SDL114-2 (SEC ID nº 67)
HIV	Subtipo	sDL115-2 (SEC ID nº 68)
HIV	Subtipo	SDL156-1G..A.....A..... (SEC ID nº 69)
HIV	Subtipo	G_G3-03T.T..T....A..... (SEC ID nº 70)

Fig. 62

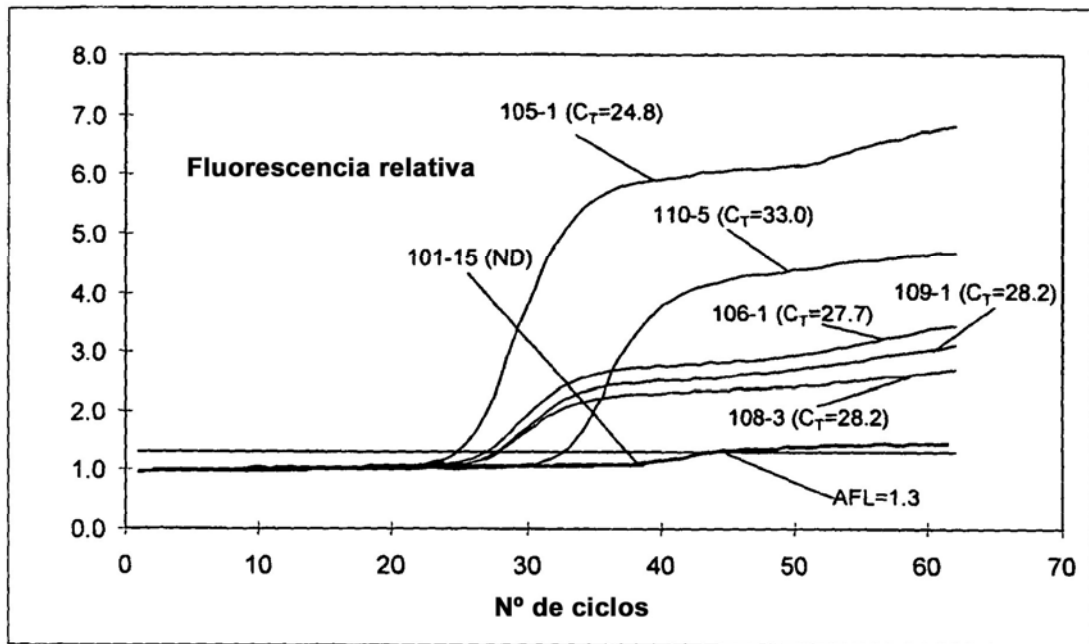


Fig. 63

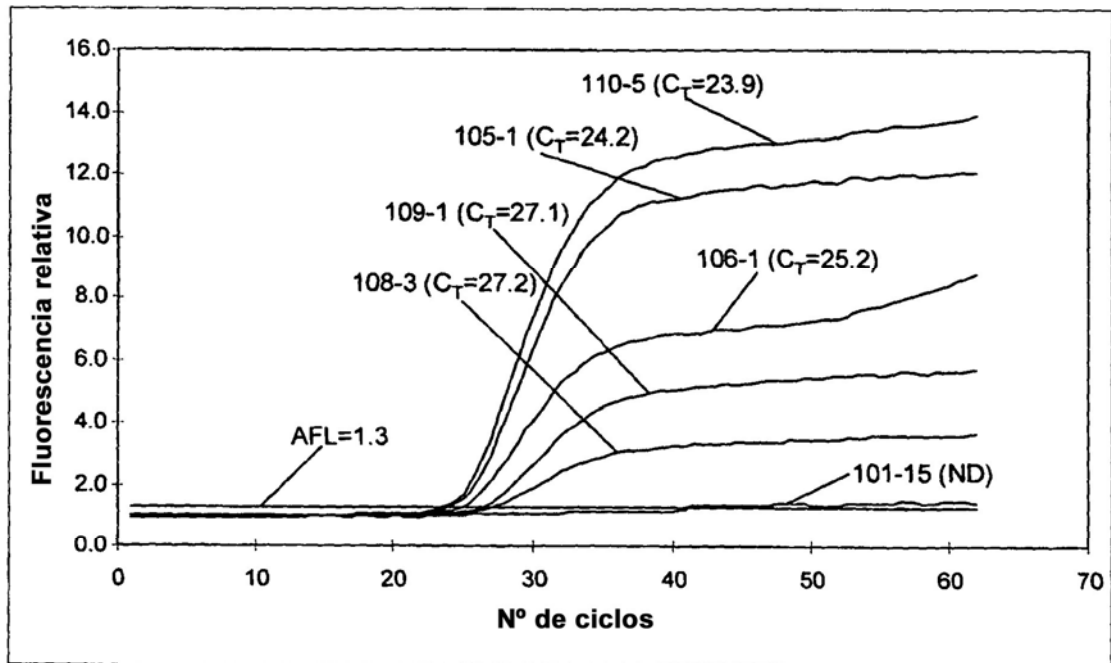


Fig. 64

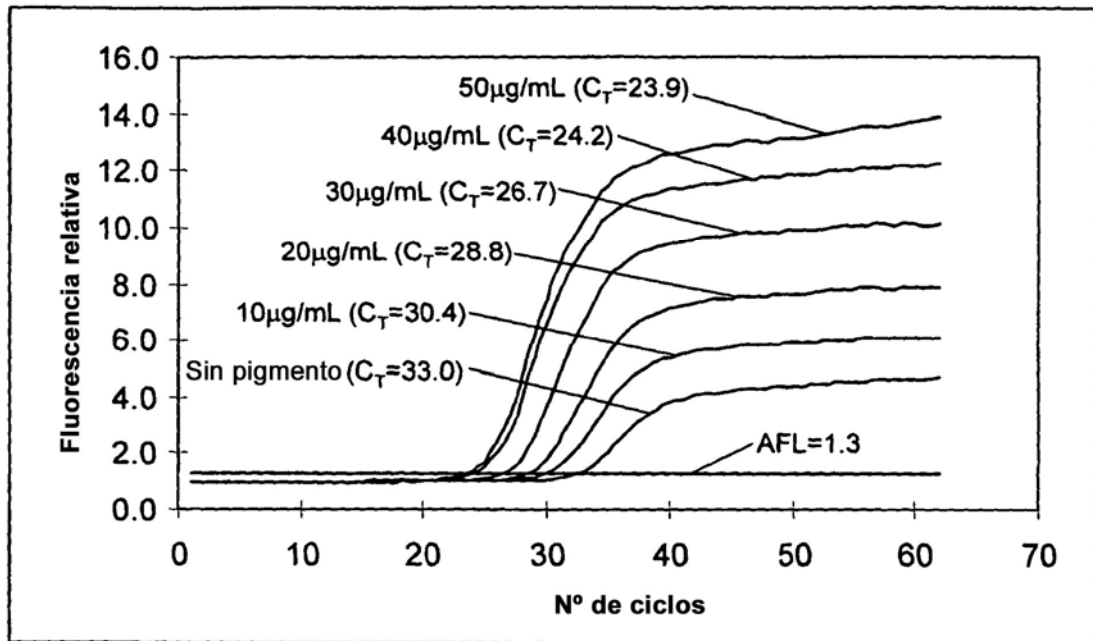


Fig. 65

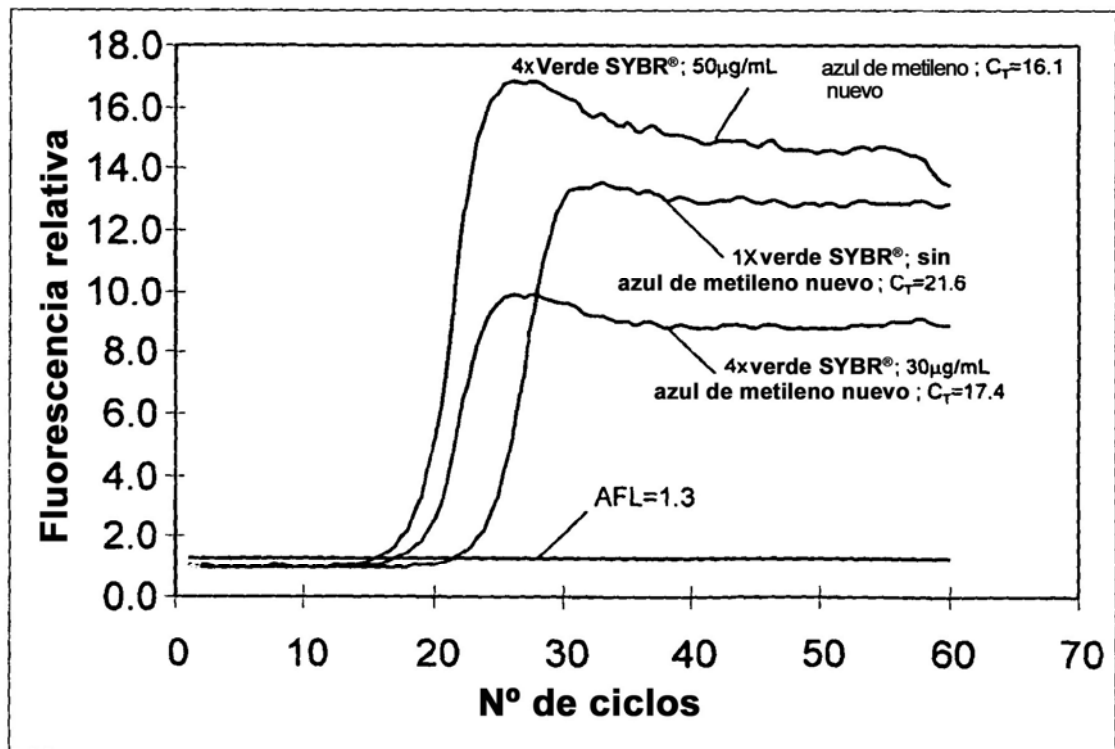


Fig. 66