



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 819**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07731073 .8**

96 Fecha de presentación : **02.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1996725**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Método de detección electroquímica de secuencias diana de ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **03.03.2006 FR 06 01936**
10.01.2007 FR 07 00157

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2011

73 Titular/es: **Université Paris Diderot - Paris 7**
5, rue Thomas Mann
75205 Paris Cédex 13, FR
Centre National de la Recherche Scientifique y
Universite de Bourgogne

72 Inventor/es: **Marchal, Damien;**
Limoges, Benoît y
Dequaire, Murielle

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 366 819 T3

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

DESCRIPCION

**MÉTODO DE DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE SECUENCIAS DIANA DE
ÁCIDOS NUCLEICOS**

5

La presente invención se refiere a un método de detección electroquímica de secuencias diana de ácidos nucleicos y a una unidad de detección para la puesta en práctica de dicho método.

10 Son conocidos métodos que, mediante detección electroquímica, permiten identificar la presencia o no de una secuencia diana de un ácido nucleico en una muestra biológica determinada.

Estos métodos permiten en particular detectar en un ácido nucleico una secuencia diana que corresponde por ejemplo a una parte del patrimonio genético de un virus dado.

15 De acuerdo con las técnicas conocidas, una vez identificada esta secuencia de nucleótidos se generan sondas formadas por oligonucleótidos que incorporan dicha secuencia y después estas sondas se fijan sobre un soporte sólido. Las sondas incluyen un número determinado de nucleótidos que presentan una base nucleotídica oxidable. A continuación, la muestra biológica
20 determinada se pone en contacto con el soporte sólido en el que están fijadas dichas sondas, para que, llegado el caso, se produzca la hibridación del ácido nucleico que contiene la secuencia diana con la sonda. Después, el ácido nucleico hibridado se somete a reacción con un complejo de un metal de transición capaz de oxidar las bases de los nucleótidos de la sonda de
25 oligonucleótidos; y se determina la presencia o no de esta hibridación, que se produce si la muestra biológica comprende un ácido nucleico que incluye dicha secuencia diana, aplicando un campo eléctrico variable a la muestra y midiendo paralelamente la corriente eléctrica que circula por la misma. En este contexto, la corriente eléctrica depende del número de bases dadas susceptibles de
30 oxidación. En efecto, cuando se realiza un barrido de potencial y paralelamente se registra la corriente eléctrica que circula por la muestra, la respuesta a la corriente eléctrica es diferente cuando la sonda está hibridada con el ácido nucleico que incluye la secuencia diana a cuando no lo está. En cualquier caso, la corriente eléctrica de oxidación de la base de los nucleótidos de la sonda

hibridada tiene un valor más alto que el asociado a la oxidación de la base de los nucleótidos no hibridados.

Véase en particular el documento US 2002/106.683, que describe un procedimiento de detección de este tipo.

5 Sin embargo, la puesta en práctica de un método de este tipo es relativamente compleja, en particular porque es necesario preparar sondas de oligonucleótidos para fijarlas sobre el soporte sólido, siendo este proceso largo y costoso.

10 Véase también el documento EP-A-1 500 933, que da a conocer la puesta en práctica, en una primera etapa, de un método de amplificación de la secuencia diana eventualmente presente en la muestra biológica y a continuación, en una segunda etapa, un método de detección electroquímica.

15 Por consiguiente, un problema que se plantea y que la presente invención pretende resolver consiste en proporcionar un método que no sólo sea más fácil de poner en práctica, sino que también resulte más económico.

Con el fin de resolver este problema, y según un primer aspecto, la presente invención propone un método de detección electroquímica de secuencias diana de ácido nucleico, siendo dicho método del tipo según el cual: se prepara una muestra biológica que puede incluir al menos un ácido nucleico, 20 pudiendo dicho ácido nucleico contener una secuencia diana determinada, mezclándose dicha muestra biológica con un agente oxidante e incluyendo dicha secuencia diana una base nucleotídica que puede ser oxidada por dicho agente oxidante; se preparan medios complementarios que se pueden acoplar con dicha secuencia diana determinada; se aplica un campo eléctrico a dicha muestra, estando adaptado dicho campo eléctrico para provocar una reacción 25 de dicho agente oxidante con dicha base nucleotídica, y se mide la corriente eléctrica que atraviesa la muestra para determinar la presencia de dicha secuencia diana. De acuerdo con la invención, dichos medios complementarios incluyen medios de amplificación activables adaptados para replicar dicha 30 secuencia diana, comprendiendo los medios de amplificación al menos nucleótidos de un tipo que incluye dicha base nucleotídica, pudiendo los nucleótidos de este tipo ser consumidos durante la replicación para formar ácidos nucleicos replicados; y, si la corriente eléctrica disminuye cuando los medios de amplificación están activados, se determina la presencia de dicha 35 secuencia diana.

Por consiguiente, una característica de la invención consiste en la puesta en práctica de un método de amplificación de un ácido nucleico y la medición simultánea de una corriente eléctrica, demostrando la medida de esta corriente eléctrica si se ha consumido o no uno de los elementos de los medios de amplificación durante la misma, y concretamente uno de los nucleótidos libres. Si la secuencia diana de ácido nucleico se corresponde con los medios de amplificación activables, esta secuencia diana se replicará durante el proceso de amplificación y el número de nucleótidos libres utilizados como sustrato durante esta replicación, y cuya concentración se determina al principio, disminuirá. En consecuencia, si el número de nucleótidos libres disminuye en beneficio del número de nucleótidos incorporados en los ácidos nucleicos sintetizados durante la amplificación, el agente oxidante sólo podrá reaccionar con una cantidad cada vez más limitada de bases nucleotídicas, correspondientes a los nucleótidos libres, y, por consiguiente, se producirán menos transferencias electrónicas y la corriente eléctrica medida en último término disminuirá. En la descripción detallada dada más abajo se explicará no obstante más en detalle que el agente oxidante también puede oxidar las bases de los nucleótidos incorporados en el ácido nucleico inicialmente presente y en los ácidos nucleicos sintetizados por replicación, pero que, en cambio, la corriente eléctrica resultante de ello se reduce en relación con la que resulta de la oxidación de las bases de los nucleótidos libres.

Según una forma de realización particularmente ventajosa de la invención, el ácido nucleico en el que se procura identificar una secuencia diana es una molécula de ADN o de ARN simple o bicatenaria. Además, los medios de amplificación activables comprenden medios adaptados para posterior hibridación aguas arriba de una secuencia diana y medios para proceder a su replicación. El número de ácidos nucleicos resultante de esta replicación crece exponencialmente con el tiempo, de modo que el número de nucleótidos libres que presentan la base nucleotídica oxidable disminuye también exponencialmente con el tiempo y paralelamente la disminución de la corriente que atraviesa la muestra es rápidamente perceptible.

Ventajosamente, la base nitrogenada asociada a los nucleótidos libres es una base nucleotídica de purina, por ejemplo guanina o un análogo químico de la guanina, por ejemplo de tipo mercaptoguanina u oxoguanina, y el agente oxidante utilizado es un complejo de rutenio. Éste presenta una forma reducida y una forma oxidada, catalizando ésta última de forma irreversible la oxidación de la guanina. Cuando se aplica el campo eléctrico a la mezcla, la corriente medida

resultante depende esencialmente de la concentración de nucleótidos libres que presentan el residuo guanina, ya que, aunque el agente oxidante también oxida la guanina de los nucleótidos incorporados en el ácido nucleico replicado, tanto la cinética de oxidación como el coeficiente de difusión de los nucleótidos libres son muy superiores a los de dichos ácidos nucleicos replicados.

Además, dado que el número de ácidos nucleicos resultante de la replicación de dichas secuencias diana depende del tiempo, la disminución de la corriente que atraviesa la muestra también depende del tiempo. Por consiguiente, si la muestra inicial presenta una alta concentración de ácido nucleico y todos estos ácidos nucleicos del mismo tipo presentan la secuencia diana, el consumo de nucleótidos será correspondientemente alto. La medida de la variación de corriente eléctrica también se percibirá correspondientemente con mayor rapidez. En cambio, si la concentración de ácido nucleico es menor, se requerirá más tiempo para observar la variación de la corriente. Por ello, esta invención es aplicable para una determinación cuantitativa de la secuencia diana.

Así, en la práctica se aplicará un campo eléctrico y se medirá la corriente que resulta del mismo, por ejemplo en un tiempo cero y después regularmente, para poder registrar la disminución de la corriente a lo largo del proceso de amplificación. Alternativamente también se podrá registrar la corriente eléctrica después de un tiempo preciso determinado.

En efecto, a priori, la concentración de nucleótidos libres que presentan el residuo guanina es máxima antes del comienzo de la amplificación y, por consiguiente, la corriente eléctrica que puede atravesar la muestra también es máxima. Después, la diferencia se puede apreciar comparando la medida de la corriente durante el transcurso de la amplificación o después de la misma con las mediciones realizadas durante el proceso de amplificación. Si durante estas mediciones se observa una disminución significativa de la corriente eléctrica, esto significa que los nucleótidos libres que presentan el residuo guanina han sido consumidos y que la muestra incluye el ácido nucleico que presenta la secuencia diana. En la descripción detallada se explicarán más en detalle las verificaciones complementarias que se han de realizar antes de llegar a la conclusión de la presencia de la secuencia diana.

Por lo demás, esta corriente eléctrica se mide después de haber aplicado el campo eléctrico durante un tiempo predeterminado relativamente constante

para una misma amplificación. En efecto, entre el instante en el que se aplica el campo eléctrico y el instante en el que la corriente eléctrica que atraviesa la muestra es máxima, se instaura una fase transitoria en la que la movilidad de las especies químicas ionizadas presentes en la muestra crece hasta un valor
5 máximo. Además, para ofrecer un máximo de sensibilidad es preferible medir la corriente eléctrica cuando ésta es máxima, es decir, después de un tiempo predeterminado, tal como se explicará más detalladamente más abajo. En cualquier caso, la medición de la corriente eléctrica se realiza por medio de técnicas electroquímicas conocidas del tipo voltamperometría de barrido de
10 potencial, que puede ser lineal, cíclica, por impulsos, o también del tipo salto de potencial, tal como cronoamperometría.

Además, dicho campo eléctrico se aplica preferentemente entre electrodos aptos para ser sumergidos en dicha muestra. Por ejemplo, se aplica un campo eléctrico entre un electrodo basado en óxidos metálicos o basado en
15 carbono o incluso basado en un metal noble, y un electrodo de referencia, estando ambos sumergidos cuidadosamente en la muestra para que los electrodos presenten una superficie activa constante en cada medición de corriente de una misma amplificación, con el fin de asegurar que la variación de corriente es resultado de la disminución de los portadores de cargas y no de la
20 variación superficial. Por ejemplo, se puede elegir un electrodo de un metal noble tal como oro o platino.

De acuerdo con otra forma de realización de la invención particularmente ventajosa, dicho agente oxidante está situado junto a la superficie de uno de dichos electrodos, bien mediante un gel, una membrana o una película
25 aplicados sobre el electrodo que encierran precisamente el agente oxidante; bien por medio de un polímero sobre el que está acoplado el agente oxidante, estando absorbido o fijado el conjunto sobre la superficie de uno de los electrodos.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención propone una unidad
30 de detección electroquímica de secuencias diana de ácidos nucleicos que comprende: medios para recibir una muestra biológica que puede incluir al menos un ácido nucleico, pudiendo dicho ácido nucleico contener una secuencia diana determinada, estando mezclada dicha muestra biológica con un agente oxidante, incluyendo dicha secuencia diana una base nucleotídica apta para ser
35 oxidada por dicho agente oxidante; medios complementarios que se pueden acoplar con dicha secuencia diana determinada; medios para aplicar un campo

eléctrico a dicha muestra, estando adaptado este campo eléctrico para provocar una reacción del agente oxidante con la base nucleotídica; y medios de medición de una corriente eléctrica que atraviesa dicha muestra para determinar la presencia de dicha secuencia diana; de acuerdo con la invención, los medios
5 complementarios comprenden medios de amplificación activables adaptados para replicar la secuencia diana, comprendiendo dichos medios de amplificación al menos nucleótidos de un tipo que incluye dicha base nucleotídica, siendo los nucleótidos de este tipo aptos para ser consumidos durante la replicación para formar ácidos nucleicos replicados; y proporcionando dichos medios de
10 medición un valor decreciente de corriente eléctrica cuando se activan los medios de amplificación si el ácido nucleico contiene la secuencia diana determinada.

Otras particularidades y ventajas de la invención se desprenderán de la lectura en la siguiente descripción de las formas de realización particulares de la
15 invención, que tienen carácter ilustrativo pero no limitativo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- Figura 1: esquema de reacción que muestra esquemáticamente las reacciones químicas y electroquímicas que intervienen durante la realización del método según la invención;
- 20 Figura 2: vista esquemática que muestra una primera unidad para la realización del método conforme a la invención, según una primera forma de realización;
- Figura 3: vista esquemática que muestra un elemento de un dispositivo para la realización del método conforme a la invención, según una
25 segunda forma de realización;
- Figura 4: gráfico que representa las curvas de evolución de la corriente eléctrica en función del potencial aplicado y que ilustra el método según la invención;
- Figura 5: gráfico que muestra la disminución de una corriente eléctrica en
30 función de un proceso de amplificación;
- Figura 6: vista esquemática de una segunda unidad para la realización del método según la invención;
- Figura 7: gráfico que muestra una curva voltamperométrica.

El método de detección electroquímica de secuencias diana de ácidos nucleicos según la invención prevé la combinación de la realización de un método de amplificación de ácido nucleico y de un método electroquímico para poder seguir la disminución de una especie química particular que refleja la presencia de dicha secuencia diana de ácido nucleico. El método de amplificación descrito más abajo es de tipo "PCR", "Polymerase Chain Reaction" (reacción en cadena de la polimerasa). No obstante, también se podría emplear con la misma eficacia cualquier otro método de amplificación. En particular se mencionarán los métodos de tipo "LCR", "Ligase Chain Reaction" (reacción en cadena de la ligasa); "SDA", "Strand Displacement Amplification" (amplificación por desplazamiento de cadena); "RCA", "Rolling Circle Amplification" (amplificación de círculo); "NASBA", "Nucleic Acid Sequence Based Assay or Amplification" (ensayo o amplificación basada en secuencias de ácido nucleico); o también "HDA", "Helicase-dependent isothermal DNA Amplification" (amplificación de ADN isotérmico dependiente de la helicasa). Todos estos métodos se designan por su acrónimo en inglés.

El principio del método de tipo "PCR" consiste en utilizar de forma repetitiva una de las propiedades de las ADN-polimerasas para sintetizar por replicación, a partir de las dos cadenas complementarias que componen el ADN y de un par de cebadores ("primer" en inglés), dos cadenas nuevas copia de las dos cadenas iniciales, consistiendo los cebadores en pequeñas cadenas de ácido nucleico de aproximadamente 20 bases que se pueden hibridar de forma específica gracias a la complementariedad de las bases de cada una de las dos cadenas de ADN a replicar. Evidentemente, los cebadores se eligen en función de una secuencia diana a revelar en un ácido nucleico.

Además de las ADN-polimerasas, que una vez que el cebador se ha hibridado sobre una cadena permiten sintetizar una cadena complementaria a partir de este cebador, también se proporcionan nucleótidos, y en particular los cuatro nucleótidos dGTP, dATP, dTTP y dCTP que constituyen el ADN (respectivamente desoxiguanina trifosfato, desoxiadenosina trifosfato, desoxitirosina trifosfato y desoxicitosina trifosfato), que la ADN polimerasa reúne para formar una cadena complementaria replicada.

Por otro lado, el medio de reacción en el que se introducen la muestra a analizar, que puede contener la secuencia diana de ácido nucleico, la ADN-polimerasa, los cebadores y los cuatro tipos de nucleótidos, formando una mezcla de reacción, evidentemente es líquido y está tamponado. Además,

dependiendo del método, esta mezcla de reacción se somete alternativamente a variaciones de temperatura correspondientes a diferentes fases de desnaturalización, hibridación y elongación del ácido nucleico durante un mismo ciclo. De forma clásica, la mezcla de reacción se podrá someter a unos treinta
5 ciclos sucesivos.

Además, y esto constituye un objeto de la invención, el método de amplificación cuyo principio se ha descrito más arriba se acopla con medios electroquímicos que permiten revelar, llegado el caso, la desaparición de los nucleótidos de uno de los cuatro tipos con el paso de los ciclos de amplificación,
10 siendo incorporados los nucleótidos de dicho tipo en las cadenas de ADN complementarias por medio de la ADN-polimerasa.

Para ello se utiliza un agente oxidante, en particular un complejo de rutenio, por ejemplo tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II), que en su forma oxidada puede oxidar a su vez la guanina de los nucleótidos que presentan el residuo guanina,
15 dGTP. Evidentemente, también se puede utilizar cualquier otro agente oxidante capaz de oxidar la guanina, por ejemplo IrCl_6^{4-} . Tal como se muestra en la Figura 1, donde se representa un electrodo 10 sumergido en un medio de reacción 12 acuoso, estando incorporado el agente oxidante en la mezcla de reacción arriba mencionada, cuando se aplica un campo eléctrico a esta mezcla
20 el agente oxidante evoluciona primero desde su forma reducida 14 hacia su forma oxidada 16 según la flecha F, cediendo un electrón al electrodo 10. Por otro lado, en su forma oxidada 16, el agente oxidante puede oxidar a su vez una guanina de un nucleótido 18 que presenta precisamente un residuo guanina libre o insertado dentro de un ácido nucleico. Al oxidar esta guanina, el agente
25 oxidante se reduce a la vez según la flecha R, mientras que la guanina definitivamente oxidada ya no interviene más en la reacción. La corriente medida en el electrodo, es decir el flujo de electrones, se debe esencialmente a la corriente de oxidación de los nucleótidos libres que presentan un residuo guanina y en una parte ínfima a los nucleótidos insertados en una cadena de
30 ADN. Una explicación puede consistir en la diferencia del coeficiente de difusión, pero también en la diferencia de la cinética de oxidación de las guaninas entre un nucleótido que presenta un residuo guanina libre y un nucleótido que presenta un residuo guanina incorporado en un ácido nucleico.

Por consiguiente, si los nucleótidos que incluyen la guanina se consumen
35 durante los ciclos de amplificación en el mismo grado que los otros nucleótidos, para sintetizar los ácidos nucleicos replicados que estadísticamente incluyen

casi los mismos nucleótidos de los cuatro tipos arriba mencionados, el flujo de electrones, y con él la corriente medida en el electrodo, también disminuirán en consecuencia.

Más abajo se describe un ejemplo de realización para ilustrar el método
5 conforme a la invención.

La Figura 2 muestra, según una primera forma de realización, un tubo 30 adaptado para ser instalado en un termociclador 32, el cual permite poner el tubo 30 a temperaturas predeterminadas que representan diferentes etapas de la amplificación de acuerdo con el método "PCR". De forma clásica, en una
10 primera etapa de un ciclo, el tubo se calienta durante unos segundos a 94°C para provocar la desnaturalización del ácido nucleico, en este caso ADN. A continuación, en una segunda etapa de aproximadamente un minuto, la temperatura baja rápidamente a 58°C para provocar la hibridación de los cebadores. Después, el tubo se calienta a una temperatura de 72°C también
15 durante un minuto para activar la ADN-polimerasa con el fin de provocar la elongación de las cadenas complementarias. A continuación comienza un nuevo ciclo.

La mezcla de reacción 34 está alojada en el fondo 36 del tubo 30 y dos electrodos 38, 40 introducidos en el tubo 30 están sumergidos en la mezcla de
20 reacción 34. Uno de los electrodos, 38, es por ejemplo un electrodo de carbono, mientras que el otro electrodo, 40, es el electrodo de referencia. Estos electrodos 38, 40 están conectados respectivamente a un potenciómetro 42 que permite variar el potencial eléctrico, según un perfil determinado, entre los dos electrodos y registrar paralelamente la corriente eléctrica que los atraviesa.

De acuerdo con una segunda forma de realización cuyos elementos esenciales están reproducidos en la Figura 3, el método de amplificación es completamente idéntico al método arriba mencionado. Sin embargo, la detección ya no se realiza durante la amplificación sino al final de ésta. En este caso no se introduce ningún electrodo directamente en el tubo 30, sino que la
30 mezcla de reacción 34 se introduce en una o varias microcubetas 44, ilustradas en la Figura 3. Estas microcubetas 44 están selladas de forma estanca sobre una placa de tipo "circuito integrado" 46 en la que se han serigrafiado electrodos 48, 50. Estos electrodos 48, 50 presentan en cada caso un extremo activo 52, 54 situado en el fondo de las microcubetas 44 y se extienden por fuera hacia los
35 extremos de conexión 56, 58, respectivamente. Del mismo modo que en la

primera forma de realización arriba mencionada, los extremos de conexión 56, 58 están adaptados para ser conectados a un potenciómetro con el fin de aplicar un campo eléctrico a la mezcla de reacción en el interior de la microcubeta 44.

Se observará que estas microcubetas 44 están igualmente adaptadas a los métodos de amplificación de tipo “NASBA”, “RCA” o “HDA” arriba mencionados.

Ejemplo de realización 1

A continuación se detalla un ejemplo de realización del citado método para detectar la presencia del citomegalovirus (CMV) en una muestra biológica. El genoma de este virus presenta una secuencia bien identificada de 406 pares de bases y se utilizan dos cebadores comerciales AC1 y AC2 que permiten la amplificación específica de esta secuencia (referencias 60-003 y 60-004 de la sociedad Argene). El volumen total de la mezcla de reacción es 50 μl y ésta contiene los dos cebadores en una concentración de 0,8 $\mu\text{mol/l}$, los nucleótidos de los cuatro tipos en una concentración de 100 $\mu\text{mol/l}$, la polimerasa en una concentración de 0,02 unidades por μl , una concentración de complejo de rutenio de 20 $\mu\text{mol/l}$ y una dilución a la décima parte de tampón 10X. Evidentemente, la mezcla de reacción contiene una muestra biológica, en este caso concreto un extracto celular que incorpora el citomegalovirus.

La medición electroquímica se realiza con ayuda del potenciómetro 42 mediante la aplicación de una técnica voltamperométrica que consiste en aplicar una variación de potencial entre los dos electrodos 38, 40 o 52, 54, empezando por ejemplo con un potencial inicial de 0,5 V con respecto a un electrodo de calomelanos, hasta un potencial final de 1,3 V (con respecto al mismo electrodo de calomelanos), para una velocidad de barrido que puede estar comprendida entre 0,01 y 100 V por segundo. Paralelamente, la corriente eléctrica resultante se registra durante el barrido de potencial.

A continuación se hace referencia a la Figura 4, que muestra dos curvas voltamperométricas registradas a una velocidad de 0,1 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ con el potenciómetro en función de la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos arriba mencionados y representada aquí como densidad de corriente. Una primera curva 60 representa la evolución de la corriente eléctrica medida en el segundo ciclo de amplificación conforme al ensayo arriba mencionado. La muestra biológica contenía inicialmente 100.000 copias de la secuencia diana. Esta curva alcanza un primer pico 62 de aproximadamente 68 μA por cm^2 . Una

segunda curva 64 representa la evolución de la corriente eléctrica medida en el ciclo treinta conforme al ensayo arriba mencionado. Esta curva alcanza un primer pico 66 de aproximadamente $56 \mu\text{A}$ por cm^2 . Este pico 66 está situado aproximadamente $12 \mu\text{A}$ por cm^2 por debajo del primer pico 62.

5 Por otro lado, previamente se ha verificado que las dos etapas del esquema de operación arriba mencionado, aplicado a una muestra biológica que no contiene el citomegalovirus con los medios de amplificación arriba mencionados, conducen a la obtención de dos curvas esencialmente idénticas. Por consiguiente, cuando la muestra biológica no contiene el virus, la
10 amplificación no se produce.

Al comparar las dos curvas 60, 64 se ve claramente que, después de 30 ciclos de amplificación, la intensidad de la corriente eléctrica ha disminuido con respecto a su valor inicial antes de la amplificación. Por consiguiente, parece evidente que la presencia del citomegalovirus en el ácido nucleico de la muestra
15 biológica ha sido reconocida por los cebadores AC1 y AC2 correspondientes, y que se ha producido el alargamiento de las cadenas complementarias consumiendo los nucleótidos y en particular los nucleótidos de tipo dGTP que presentan el residuo guanina, puesto que el agente oxidante, el complejo de rutenio, solo puede oxidar la base de este nucleótido. Ahora bien, la medición de
20 la corriente eléctrica es esencialmente el resultado de la medición del flujo de electrones correspondiente a la reducción del complejo de rutenio y, paralelamente, a la oxidación de los nucleótidos que incluyen la guanina dGTP. Además, cuando estos últimos nucleótidos desaparecen parcialmente porque están integrados en las cadenas de ácido nucleico complementarias, su
25 cantidad en estado libre disminuye y, en consecuencia, la corriente de oxidación resultante también disminuye.

A continuación se hará referencia al gráfico mostrado en la Figura 5 para describir el principio de la cuantificación de una secuencia diana de un ácido nucleico en una muestra dada.

30 El eje de abscisas 80 del gráfico indica el número de ciclos de replicación y el eje de ordenadas 82 indica los valores normalizados de las corrientes elevadas en cada ciclo a un potencial dado de acuerdo con la forma de realización mostrada en la Figura 2. Estos valores normalizados de corriente corresponden a las medidas de corriente divididas entre la medida de la
35 corriente realizada antes del inicio de la amplificación.

Las cinco curvas mostradas 84, 86, 88, 90, 92 representan las curvas trazadas a partir de una muestra biológica que incluía, respectivamente, cero copias de la secuencia diana CMV, 84, 1.000 copias de dicha secuencia diana, 86, 10.000 copias de la secuencia diana, 88, 100.000 copias de la secuencia diana, 90, y 1.000.000 de copias de la secuencia diana, 92.

De este modo se verifica que, cuanto mayor es el número de ácidos nucleicos que incorporan la secuencia diana contenida en la muestra biológica, más rápidamente disminuye la corriente eléctrica que atraviesa la muestra en función del número de ciclos. En efecto, cuanto mayor es el contenido de la muestra en ácidos nucleicos que incorporan la secuencia diana, más nucleótidos de tipo dGTP consume la replicación y, por consiguiente, antes cae la corriente eléctrica en función del número de ciclos. De este modo queda claro que es posible medir la cantidad de ácidos nucleicos que incorporan la secuencia diana determinando el número de ciclos a partir del cual se produce una variación de la cantidad de corriente que atraviesa la muestra. Además, la Figura 5 también demuestra que la presencia de la secuencia diana es detectable incluso cuando la muestra sólo presenta inicialmente 1.000 copias de dicha secuencia diana.

Por consiguiente, el método según la invención aplicado a una muestra biológica que puede contener un virus identificado permite no solo revelar la presencia o ausencia de dicho virus, sino también cuantificar el mismo, gracias a la puesta en práctica de un método de amplificación y de medida electroquímica. En comparación con los métodos aplicados según el estado anterior de la técnica, en los que la preparación del material de identificación es compleja, de acuerdo con la presente invención sólo es necesario aplicar un método de amplificación clásico, someter la muestra biológica a un campo eléctrico durante la amplificación y medir la corriente resultante de ello. En este método se emplea un agente oxidante que no se utiliza en ningún caso en los métodos de amplificación clásicos, para revelar la desaparición de una especie, en este caso un tipo de nucleótido que presenta el residuo guanina o un compuesto que tiene la misma función biológica que la guanina. Además, la selección del agente oxidante dependerá de la naturaleza del tipo de nucleótidos cuya desaparición se desea medir.

El ejemplo de realización descrito más arriba se refiere a un ácido nucleico de cadena doble, es decir una molécula de ADN. No obstante, también se puede aplicar igualmente a un ácido nucleico monocatenario de tipo ARN o

ADN, a través de la utilización de medios de amplificación correspondientemente adaptados. En los dos casos, la amplificación de estos ácidos nucleicos implica el consumo de nucleótidos que incluyen guanina, y por consiguiente la disminución de esta especie en el medio a medida que avanza el
5 proceso de amplificación.

En consecuencia, sea cual sea la forma de realización del método objeto de la invención, bien el primer modo descrito más arriba con ayuda de la Figura 2, bien el segundo modo descrito con referencia a la Figura 3, se evalúa el momento a partir del cual el valor de la corriente eléctrica cae de forma
10 significativa realizando mediciones durante el proceso de amplificación. Esto permite no sólo revelar la presencia de la secuencia diana de ADN, sino también remontarse indirectamente a la concentración inicial del ácido nucleico que incorpora la secuencia diana a detectar. En efecto, cuando mayor es el número de copias iniciales del ácido nucleico que incorpora la secuencia diana, antes
15 disminuye la corriente eléctrica; y a la inversa, cuanto menor es el número de copias, más tarde se observa la caída de corriente.

Por otro lado, de acuerdo con otro aspecto ilustrado en la Figura 6, la presente invención se refiere también a una unidad adaptada especialmente para la detección electroquímica de secuencias diana de ácidos nucleicos. Esta
20 unidad incluye al menos una microcubeta 94 tal como se representa en la Figura 3 para alojar una muestra biológica 95, pero en este caso equipada con aislamiento térmico. Esta microcubeta 94 presenta en el fondo unos electrodos serigrafados 96 que están conectados a un potenciómetro P. Además, la microcubeta 94 está situada entre dos módulos de efecto Peltier 98, 100
25 conectados a través de un generador adaptado para regular la temperatura en el interior de la microcubeta 94. De este modo, la muestra biológica 95 se puede calentar a temperaturas de hasta 94°C realizando amplias variaciones como en el método arriba mencionado y de tipo PCR. A la muestra biológica se le añade además un material de amplificación activable, y en particular nucleótidos que
30 presentan una base nucleotídica oxidable.

La unidad mostrada en la Figura 6, que se puede controlar por ordenador, está adaptada para suministrar automáticamente la información que indica si la muestra introducida en la microcubeta 94 contiene o no la secuencia diana buscada y, en caso afirmativo, la concentración de ácido nucleico que incluye la
35 secuencia diana.

El ordenador tiene cargado un programa capaz de hacer funcionar simultáneamente los medios de replicación, es decir, los módulos de efecto Peltier 98, 100, de acuerdo con ciclos predefinidos, y el potenciómetro entre los ciclos para medir la cantidad de corriente que atraviesa la muestra 95 para valores de potencial dados.

Además, durante la aplicación de los medios de amplificación se modifica el estado de la superficie del mencionado electrodo. Por otro lado, el disolvente de la mezcla de reacción, en este caso agua, se puede evaporar durante los ciclos de amplificación, teniendo en cuenta las temperaturas aplicadas. Toda evaporación del disolvente provoca, por naturaleza, un aumento de la concentración de los solutos.

Por consiguiente, la medida de la corriente, que es proporcional a la concentración de la base nucleotídica consumida, podría no estar del todo en correlación con la cantidad de ácido nucleico amplificado.

Por tanto, se plantea un problema secundario que consiste en poder liberarse a la vez de las perturbaciones del electrodo y de la evaporación del disolvente.

Para resolver este problema, de acuerdo con otra forma de realización de la invención particularmente ventajosa, el método de detección comprende además las siguientes etapas: se prepara un compuesto redox capaz de reaccionar a un valor de campo eléctrico desplazado diferente del valor del campo eléctrico al que reaccionan dicho agente oxidante y dicha base nucleotídica; se mide el valor de la corriente eléctrica redox a dicho valor de campo eléctrico desplazado; y se determina la presencia de dicha secuencia diana determinada cuando la diferencia de corriente eléctrica entre la corriente eléctrica redox y la corriente eléctrica de reacción del agente oxidante y de la base nucleotídica disminuye al activarse los medios de amplificación.

De este modo, al elegir un compuesto redox o patrón interno, por ejemplo un ferroceno, un viologén o un complejo de osmio, cuyo potencial de oxidación está desplazado con respecto al potencial de oxidación del agente oxidante y de la base nucleotídica, por ejemplo 800 mV, la oxidación del compuesto redox no perturba la medida de la corriente de oxidación del agente oxidante y de la base. Por lo demás, este agente oxidante no interfiere en los medios de amplificación activables.

De acuerdo con un primer modo de realización conforme a esta forma de realización, para el que se podrá hacer referencia a la Figura 7, se procede a la normalización de la medición de la corriente eléctrica para una sola muestra durante un mismo ensayo.

5 Por consiguiente, se procede a realizar una muestra en una mezcla de reacción idéntica a la del ejemplo de aplicación arriba mencionado, excepto que también se incorpora ferrocenometanol en una concentración de 50 μM y que se aplica una variación de potencial entre los dos electrodos, comenzando por 50 mV para terminar con 1.300 mV. De este modo, en el primer ciclo de
10 amplificación se obtiene la curva voltamperométrica mostrada en la Figura 7.

Esta curva ya no presenta un único pico, sino dos: un primer pico 210 que está situado hacia 1.100 mV con respecto al electrodo de calomelanos saturado y que corresponde a los picos de las curvas mostradas en la Figura 4, y un
15 segundo pico 220 situado hacia 200 mV, que corresponde a la oxidación del ferrocenometanol. El primer pico resulta de la oxidación del agente oxidante, el complejo de rutenio y la medida de la corriente correspondiente es esencialmente igual a 32 μA , mientras que el segundo, que resulta de la oxidación del compuesto redox, es de aproximadamente 2 μA .

Después del barrido de potencial entre 50 mV y 1.300 mV y el registro
20 simultáneo de las corrientes de intensidad se procede a la normalización de la corriente correspondiente al primer pico 210 dividiendo su valor, en el ejemplo mostrado en la Figura 7: 32 μA , entre el valor de la corriente correspondiente al segundo extremo 220, 2 μA , y se obtiene el valor 16.

A continuación se procede de la misma manera para todos los ciclos de
25 amplificación de dicho ensayo. De este modo, la medida de la variación de la diferencia de los valores de intensidad de los dos picos 210, 220 resulta únicamente de la disminución de la concentración de base nucleotídica, en este caso los dGTP, y permite obviar algunas condiciones del ensayo.

Por tanto, de acuerdo con una segunda forma de realización se procede
30 de forma idéntica para una serie de muestras introducidas respectivamente en una serie de microcubetas del tipo mostrado en la Figura 3 para realizar una serie de ensayos. Estas muestras biológicas proceden ventajosamente de una misma fuente y se trata de confirmar la presencia de la secuencia diana determinada. Además, al normalizar los valores de intensidad correspondientes
35 a la oxidación del agente oxidante respectivamente para cada uno de los

ensayos, éstos son comparables entre sí, ya que son independientes de las variaciones de volumen y del estado de la superficie de los electrodos.

Así, de acuerdo con esta otra forma de realización de la invención se afina la detección del consumo real de nucleótidos, lo que permite determinar la presencia de una secuencia diana después de una cantidad reducida de ciclos de amplificación. En consecuencia, disminuye el tiempo necesario para el establecimiento del diagnóstico.

Además, como demuestra la segunda forma de realización arriba mencionada, las mediciones se pueden comparar entre sí sean cuales sean las condiciones de operación.

Ejemplo de realización 2

Por otro lado, el método de detección según la invención no sólo es aplicable a los virus, sino también a las bacterias. Por ejemplo, se ha empleado para detectar la presencia de bacterias, en particular *Achromobacter xylosoxidans*, cuyos elementos genéticos móviles, y más concretamente los integrones, desempeñan un papel fundamental en la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos.

Así, se han identificado y amplificado tres fragmentos de ADN característicos de esta cepa bacteriana mediante métodos tipo PCR. La aplicación del método según la invención permite detectar la presencia de la bacteria arriba mencionada mediante la identificación de un primer gen "ver-1" que cuenta con aproximadamente 900 pares de bases. Este gen codifica una beta-lactamasa que confiere un alto nivel de resistencia a diversos antibióticos, en particular a amoxicilina y ticarcilina. Los medios de amplificación activables incluyen los cuatro nucleótidos, ADN-polimerasa y un par de cebadores "VER-F" y "VER-R" específicos del gen, y se incorporan a una muestra biológica que contiene dicha bacteria.

Se observa entonces un voltamograma similar al representado en la Figura 4. De acuerdo con las condiciones del ensayo, una primera curva, que corresponde a una medición de la corriente eléctrica antes del comienzo de la amplificación, presenta un pico de aproximadamente 6 μA para un valor de potencial de aproximadamente 1,075 V. Una segunda curva realizada después de la amplificación muestra un pico reducido en aproximadamente 1 μA . En consecuencia, la disminución de la corriente eléctrica se debe al consumo de

nucleótidos durante la amplificación y, por consiguiente, a la presencia efectiva del gen “*veb-1*”.

De este mismo modo se ha identificado y detectado un segundo fragmento de 100 pares de bases del gen “*int I*” característico de la bacteria
5 arriba mencionada.

También se ha podido detectar análogamente un tercer fragmento de 2.500 pares de bases característico de dicha bacteria. La secuencia nucleotídica de este tercer fragmento corresponde a una región variable del integrón que contiene el conjunto de casetes, entre ellos el gen “*veb-1*”.

10 Por consiguiente, el método objeto de la invención se puede aplicar a amplificaciones de fragmentos de material genético de dimensiones diferentes, en protocolos diferentes y con medios de amplificación activable o libre biológica diferentes.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección electroquímica de secuencias diana de ácidos nucleicos, siendo dicho método del tipo según el cual:
 - 5 – se prepara una muestra biológica que puede incluir al menos un ácido nucleico, pudiendo dicho ácido nucleico contener una secuencia diana determinada;
 - se prepara un agente oxidante capaz de oxidar al menos una base nucleotídica de dicha secuencia diana determinada;
 - 10 – se preparan medios complementarios que se pueden acoplar con dicha secuencia diana determinada, incluyendo dichos medios complementarios medios de amplificación activables adaptados para replicar dicha secuencia diana cuando la muestra biológica se mezcla con dichos medios de amplificación activables, comprendiendo los medios de
15 amplificación al menos dos nucleótidos de un tipo que incluye dicha base nucleotídica, siendo aptos los nucleótidos del dicho tipo para ser consumidos durante la replicación para formar ácidos nucleicos replicados;
 - se mezcla el agente oxidante con la muestra biológica;
 - 20 – se aplica un campo eléctrico a dicha muestra, estando adaptado este campo eléctrico para provocar una reacción del agente oxidante con la base nucleotídica; y se mide la corriente eléctrica que atraviesa la muestra para determinar la presencia de dicha secuencia diana cuando la corriente eléctrica disminuye;
 - 25 caracterizado porque comprende, por orden, las siguientes etapas:
 - a) la muestra biológica y el agente oxidante se mezclan con los medios de amplificación activables;
 - b) se activan los medios de amplificación activables; y
 - c) la muestra biológica se somete a un campo eléctrico durante la
30 amplificación para medir la corriente resultante de ello, con el fin de

determinar la presencia de dicha secuencia diana determinada cuando la corriente eléctrica disminuye.

2. Método de detección según la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN.
- 5 3. Método de detección según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque dicha base nucleotídica es una base nitrogenada de purina.
4. Método de detección según la reivindicación 3, caracterizado porque la base nucleotídica consiste en guanina o un análogo químico de la guanina.
- 10 5. Método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el agente oxidante es un complejo de rutenio.
6. Método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque, dado que las secuencias diana se replican con el paso del tiempo, la corriente eléctrica se mide después de haber aplicado el campo eléctrico durante un tiempo determinado.
- 15 7. Método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la secuencia diana se replica de acuerdo con ciclos de amplificación, y porque dicha corriente se mide después de un número determinado de ciclos.
- 20 8. Método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicho campo eléctrico se aplica entre electrodos aptos para ser sumergidos en la muestra.
9. Método de detección según la reivindicación 8, **caracterizado porque** uno de dichos electrodos es un electrodo basado en óxidos metálicos.
- 25 10. Método de detección según la reivindicación 8, caracterizado porque uno de dichos electrodos es un electrodo basado en un metal noble.
11. Método de detección según la reivindicación 8, caracterizado porque uno de dichos electrodos es un electrodo de carbono.

- 12.** Método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque el agente oxidante está situado junto a la superficie de uno de los electrodos.
- 13.** Método de detección según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque incluye además las siguientes etapas:
- se suministra adicionalmente un compuesto redox capaz de reaccionar a un valor de campo eléctrico desplazado diferente del valor de campo eléctrico al que reaccionan dicho agente oxidante y dicha base nucleotídica;
 - se mide el valor de la corriente eléctrica redox en dicho valor de campo eléctrico desplazado; y
 - se determina la presencia de dicha secuencia diana determinada cuando la diferencia de corriente eléctrica entre la corriente eléctrica redox y la corriente eléctrica de reacción del agente oxidante y de la base nucleotídica disminuye al activarse los medios de amplificación.
- 14.** Unidad de detección electroquímica de secuencias diana de ácidos nucleicos, que comprende:
- medios (30, 44, 94) para recibir una muestra biológica (34, 95) que puede incluir al menos un ácido nucleico, pudiendo dicho ácido nucleico contener una secuencia diana determinada, estando mezclada dicha muestra biológica con un agente oxidante, incluyendo dicha secuencia diana al menos una base nucleotídica apta para ser oxidada por dicho agente oxidante;
 - medios complementarios que se pueden acoplar con dicha secuencia diana determinada;
 - medios (38, 42, 52, 54, 96) para aplicar un campo eléctrico a dicha muestra, estando adaptado este campo eléctrico para provocar una reacción del agente oxidante con la base nucleotídica; y medios de medición (42, P) de una corriente eléctrica que atraviesa dicha muestra para determinar la presencia de dicha secuencia diana;
- caracterizada porque los medios complementarios comprenden medios de amplificación activables adaptados para replicar la secuencia diana,

5 comprendiendo dichos medios de amplificación al menos nucleótidos de un tipo que incluye dicha base nucleotídica, siendo los nucleótidos de este tipo aptos para ser consumidos durante la replicación para formar ácidos nucleicos replicados; y porque los medios de medición (42, P) proporcionan un valor decreciente de corriente eléctrica cuando se activan los medios de amplificación en caso de que el ácido nucleico contenga la secuencia diana determinada.

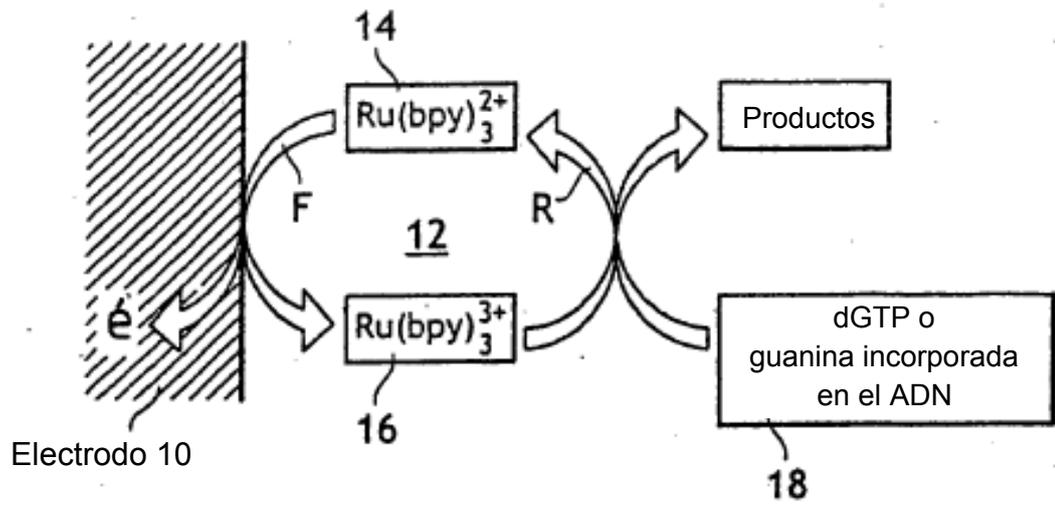


FIG.1

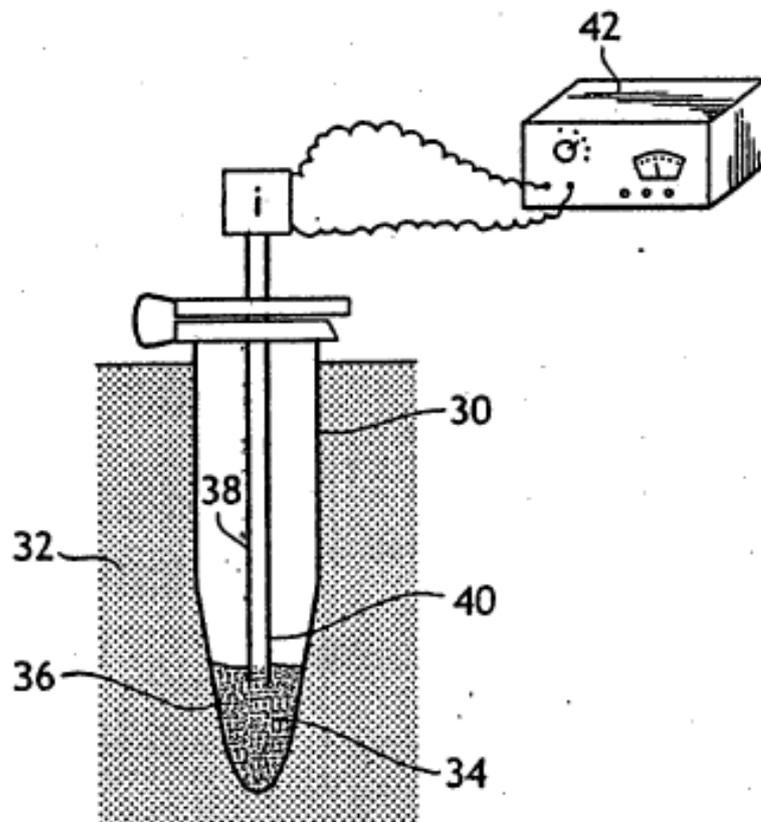


FIG.2

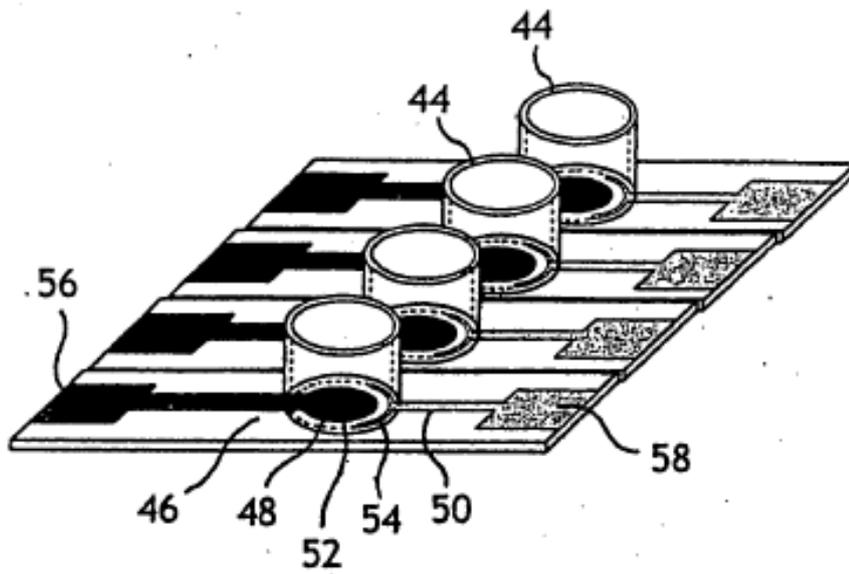


FIG.3

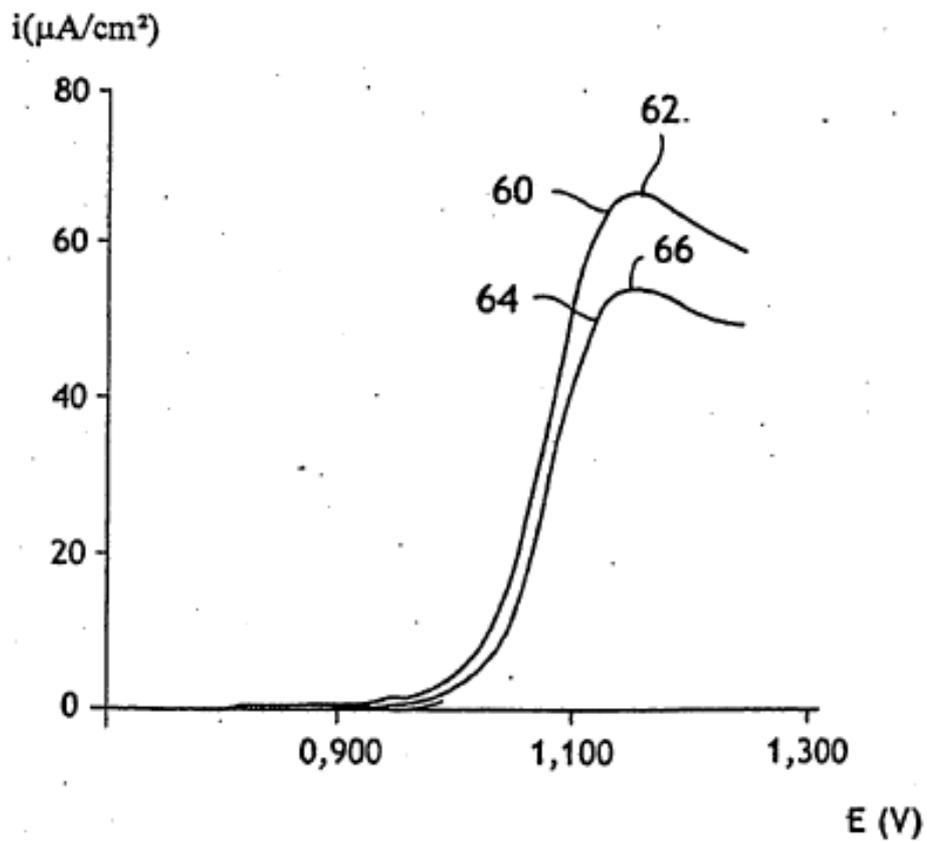


FIG.4

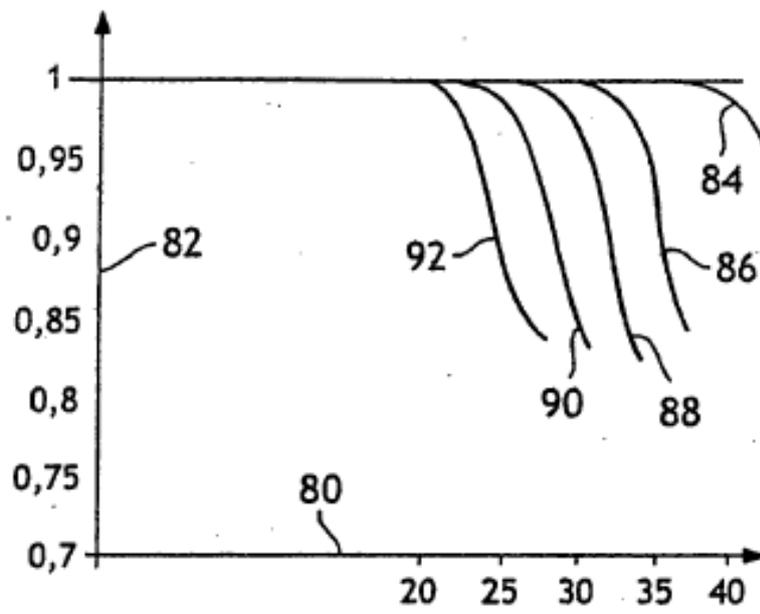


FIG.5

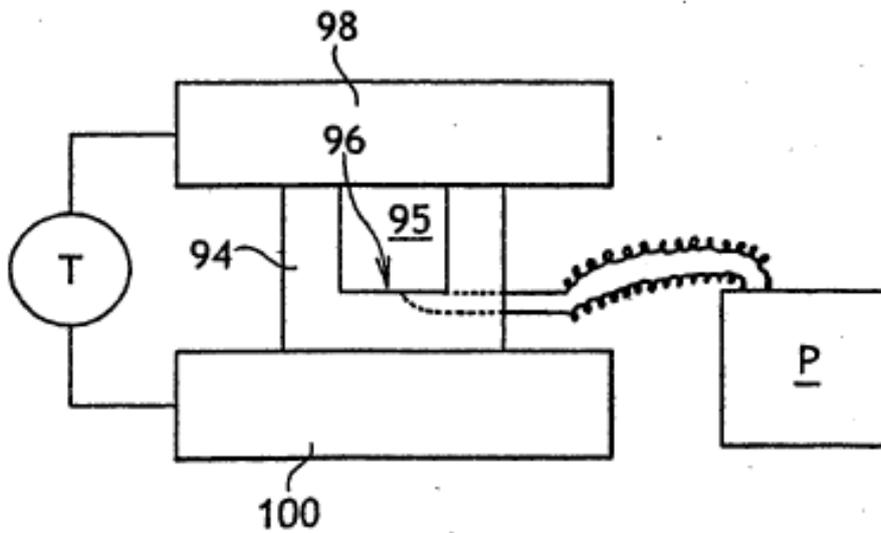


FIG.6

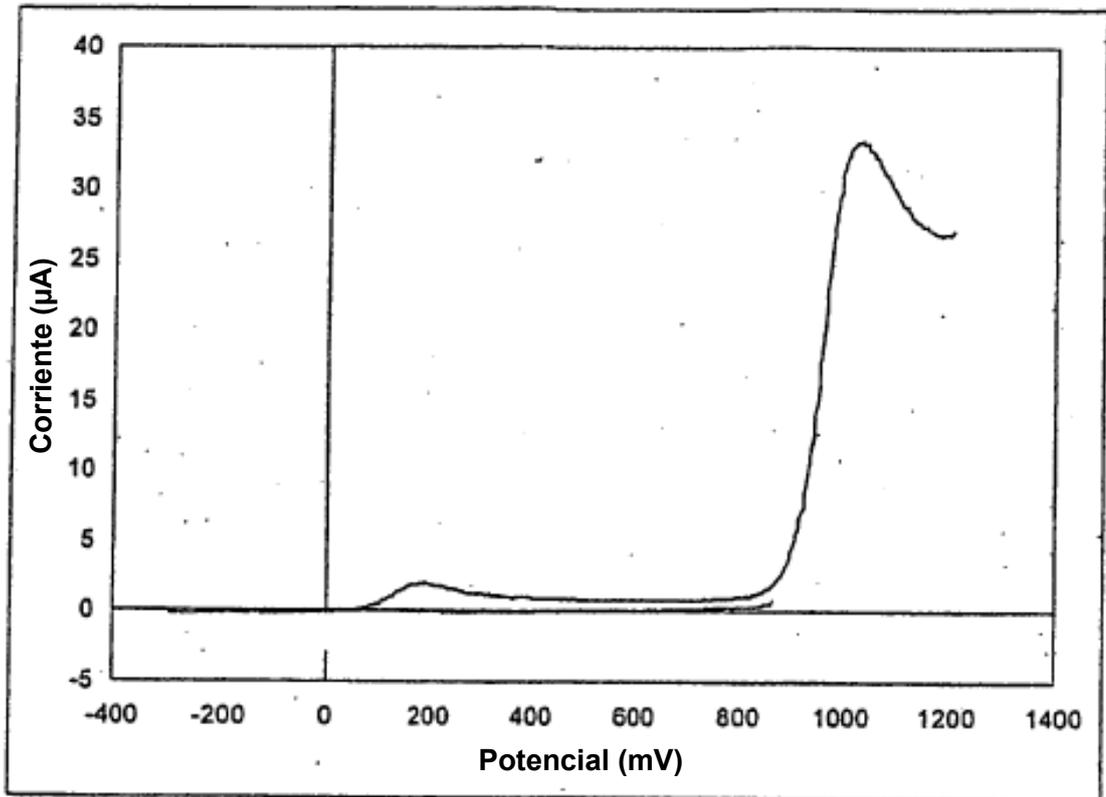


FIG. 7