

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 664**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06784583 .4**

96 Fecha de presentación: **05.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1888788**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **ENSAYO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE PROXIMIDAD DE QUIMIOLUMINISCENCIA.**

30 Prioridad:
03.06.2005 US 687647 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.01.2012

73 Titular/es:
**BEACON BIOTECHNOLOGY LLC
12635 EAST MONTVIEW BLVD.
AURORA, CO 80045, US**

72 Inventor/es:
**WEST, Anthony y
CULL, Millard, Gambrell**

74 Agente: **Jorda Petersen, Santiago**

ES 2 371 664 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de ácidos nucleicos de proximidad de quimioluminiscencia.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos diana en una mezcla heterogénea presente en una muestra y a los procedimientos de aplicación de las mismas. El sistema de detección comprende una molécula quimioluminiscente, un sustrato quimioluminiscente, un colorante que responde a la luz cuando se intercala en un ácido nucleico y una diana de ácido nucleico. El procedimiento requiere la creación de una determinada estructura tridimensional (esto es, un colorante intercalado en el ácido nucleico) a fin de que el colorante acepte energía y requiere que el donante de energía (una molécula quimioluminiscente) está dispuesto próximo a dicha estructura. La presente invención resulta útil en cualquier aplicación en la que sea deseable la detección de una secuencia específica de ácido nucleico o la detección de enzimas que modifican ácidos nucleicos, tal como en la realización de diagnósticos, proyectos de investigación y aplicaciones industriales.

Antecedentes de la invención

Los ácidos nucleicos se miden a fin de identificar moléculas de una secuencia de ácidos nucleicos diana específica en una población de ácidos nucleicos, ADN o ARN heterogéneos, o para medir los productos de las reacciones en las que se modifican ácidos nucleicos, ADN o ARN. Normalmente, dichas mediciones son combinaciones de los procedimientos siguientes:

- a. cuando el ácido nucleico de partida es ARN, la conversión a ADN se lleva a cabo mediante una reacción de transcripción inversa. Los cebadores oligonucleótidos para dicha reacción de transcripción inversa pueden ser específicos para la secuencia diana o pueden ser generales para la conversión de todas las secuencias de ARN en ADN;
- b. amplificación del ácido nucleico diana mediante reacciones específicas de la secuencia diana. Dichas reacciones incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos de secuencia y reacciones de extensión del cebador, de nuevo con un cebador oligonucleótido específico de la secuencia diana. También se ha utilizado la amplificación por círculo rodante de ADN para amplificar las secuencias específicas de ADN;
- c. separación física de los ácidos nucleicos heterogéneos. Dichas separaciones físicas comprenden de manera no limitativa, fraccionamiento por tamaño y separación por afinidad cuando los ácidos nucleicos amplificados se producen con sustratos derivados, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, trifosfatos desoxirribonucleótidos biotinilados;
- d. marcaje del ácido nucleico. Tal como se ha mencionado en el punto c. anterior, los ácidos nucleicos amplificados se pueden marcar utilizando trifosfatos desoxirribonucleótidos derivados o cebadores oligonucleótidos derivados (ARN o ADN); y
- e. detección de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se pueden detectar a través del resto de marcaje o mediante separación física seguida de detección con colorantes específicos de los ácidos nucleicos.

Uno de los procedimientos más comunes para la detección cuantitativa de secuencias diana es la amplificación específica de secuencia de la secuencia o secuencias diana por PCR, ya sea a partir de ADN o ADNc tras una transcripción inversa, separación física mediante electroforesis en gel o capilar y detección por marcaje fluorescente (por ejemplo, de ADN bicatenario mediante bromuro de etidio o mediante la utilización de cebadores marcados con fluorescencia en la amplificación). Otra técnica habitual para la detección cuantitativa de la secuencia o secuencias diana comprende PCR "en tiempo real".

La tecnología PCR es ampliamente utilizada para ayudar en la cuantificación del ADN, dado que la amplificación de la secuencia diana permite una sensibilidad de detección mayor de la que se podría alcanzar de otro modo. El punto en el que se mide la señal fluorescente con el fin de calcular la cantidad inicial de plantilla puede ser al final de la reacción (PCR cuantitativa o QPCR de punto final) o mientras tiene lugar la amplificación (QPCR en tiempo real). El procedimiento más sensible y reproducible de QPCR en tiempo real mide la fluorescencia en cada ciclo a medida que progresa la ampliación.

La molécula indicadora utilizada en las reacciones de QPCR en tiempo real puede ser (1) una sonda específica de secuencia compuesta por un oligonucleótido marcado con un colorante fluorescente más un silenciador o (2) un ADN no específico enlazado a un colorante que emite fluorescencia cuando se une a ADN bicatenario.

Estas dos técnicas, así como otras que no se describen en detalle, requieren instrumentación para la separación física o la detección. Esta necesidad de instrumentación y/o tecnologías de separación con su correspondiente manejo de la muestra limita la utilización de la detección cuantitativa y cualitativa de secuencias diana. En

consecuencia, existe la necesidad de disponer de procedimientos para la detección y medición de ácidos nucleicos que no requieran una instrumentación costosa y delicada para la separación de la muestra o para la detección. Dichas mediciones incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, la identificación de moléculas de una secuencia específica de ácido nucleico, así como la detección de ácidos nucleicos que son el producto de reacciones de modificación de los ácidos nucleicos. Las reacciones de modificación de los ácidos nucleicos comprenden de manera no limitativa, reacciones de polimerización, reacciones de ligadura, reacciones de nucleasa y reacciones de recombinación.

Colorantes fluorescentes de intercalación de ácidos nucleicos

Un procedimiento habitual para la detección de ácidos nucleicos consiste en el marcaje de los mismos con colorantes fluorescentes de intercalación. Dichos colorantes tienen diversas características únicas que los hacen especialmente útiles: 1) Elevada absortividad molar; 2) Fluorescencia intrínseca muy baja; 3) Elevada potenciación de la fluorescencia al unirse a ácidos nucleicos; y 4) Afinidad de moderada a alta por los ácidos nucleicos, con poca o nula tinción de otros biopolímeros. Los colorantes de intercalación de ácidos nucleicos presentan excitaciones y emisiones de fluorescencia que comprenden el espectro de luz visible desde el azul al infrarrojo próximo, con picos de absorción adicionales en el UV, lo que los hace compatibles con muchos tipos diferentes de instrumentación. Estos colorantes se excitan con una fuente de luz extrínseca que presenta un espectro que se superpone con la longitud de onda de excitación máxima del colorante de intercalación. Se pueden utilizar para visualizar ARN y ADN. A continuación se indican algunos colorantes habituales.

Nombre del colorante	Ex/Em *	Aplicación
Bromuro de etidio	300/600	Cuantificación y detección de ADN bicatenario
Bromuro de etidio homodímero-1	510/620	Cuantificación y detección de ADN bicatenario
Reactivo de cuantificación PicoGreen [®]	502/523	ADN bicatenario
Reactivo de cuantificación OliGreen [®]	498/518	Cuantificación y detección de ADN monocatenario y oligonucleótidos
Reactivo de cuantificación RiboGreen [®]	500/520	Cuantificación y detección de ARN
Colorante SYBR Gold [®]	495/537	Cuantificación y detección de ADN o ARN monocatenario o bicatenario tras electroforesis
Colorante SYBR Green I [®]	494/521	Cuantificación y detección de ADN bicatenario y oligonucleótidos tras electroforesis. También es útil en ensayos de PCR en tiempo real
Colorante SYBR Green [®]	492/513	Colorante sensible para ARN y ADN monocatenario tras electroforesis
Colorante SYBR Safe [®]	502/530	Colorante en gel sensible a ADN con mutagenicidad significativamente reducida
Colorante SYBR DX DNA Blot [®]	475/499	Colorante sensible para ADN

* Los máximos de excitación (Ex) y emisión (Em) son respectivamente la longitud de onda en nanómetros (nm) de luz que produce la máxima excitación del colorante intercalado y la longitud de onda de luz a la que se produce la máxima emisión cuando el colorante emite fluorescencia.

Transferencia de energía por resonancia

La energía se puede transmitir al colorante intercalado en el ácido nucleico mediante fotones o mediante transferencia de energía por resonancia. El principio de la transferencia de energía entre dos moléculas se puede aprovechar como medios para obtener información sobre los cambios experimentados en su proximidad y orientación relativas. La transferencia de energía por resonancia (RET por sus siglas en inglés) es la transferencia de energía del estado excitado de una molécula donante a una molécula receptora. La transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) es una interacción dependiente de la distancia entre los estados electrónicos excitados de dos moléculas de colorante en la que la excitación se transfiere de una molécula donante a una molécula receptora sin que se emita ningún fotón. Esto sólo puede ocurrir si el espectro de absorción de la molécula receptora se superpone con el espectro de emisión de la donante. Förster determinó que el grado de transferencia de energía por resonancia entre el donante de energía y el receptor de energía es inversamente proporcional a la distancia entre las dos moléculas elevada a la sexta potencia. En el caso de la FRET, se utiliza una fuente de luz externa con una longitud de onda específica para excitar la molécula donante.

La transferencia de energía de resonancia con bioluminiscencia (BRET) utiliza moléculas biológicas, por ejemplo una luciferasa, como molécula donante. Dependiendo de la especie de origen, las luciferasas que utilizan coelenterazina como sustrato generan luz azul en el intervalo comprendido entre 450 y 500 nm. Cuando se encuentra próximo un receptor adecuado, la energía de la luz azul es capturada por RET. En sentido general, las moléculas receptoras son una clase de proteínas que han desarrollado la capacidad de ser excitadas por la luz azul y que a continuación emiten fluorescencia en longitudes de onda más largas, por lo general con emisiones

espectrales máximas superiores a 500 nm. Tanto en la FRET como en la BRET, las moléculas de interés pueden estar unidas mediante enlace covalente o no covalente, o aproximarse la una a la otra por la modificación de la conformación o por migración espacial o por la modificación de sus orientaciones relativas. Por ejemplo, las dos moléculas se pueden conjugar con dos proteínas de interés independientes. A continuación, se pueden aproximar gracias a su mutua afinidad o a su afinidad por una tercera molécula. También se pueden unir a una proteína de interés y a continuación aproximarse mediante un cambio conformacional en dicha proteína. Habitualmente, las dos moléculas deben encontrarse a una distancia de 100 Å o menos para que tenga lugar la transferencia de energía por resonancia, y se pueden detectar cambios de hasta sólo 1 o 2 Å. Las luciferasas que se han utilizado en la BRET incluyen las de luciérnaga, *Renilla reniformis* y *Gaussia princeps*. Una proteína fluorescente utilizada habitualmente es la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. La BRET se utiliza habitualmente para medir el grado de afinidad o el grado de cambio conformacional entre dos dominios proteínicos unidos mediante enlace covalente o no covalente.

En Photochemistry And Photobiology 1999, vol. 69, nº 4, páginas 405-409, Alba F.J. y Daban J.-R. describen la inhibición de la quimioluminiscencia de los perioxalatos por la intercalación de receptores de fluorescencia entre las bases de ADN.

En Luminescence 2001, vol. 16, nº 3, páginas 247-249, Alba F.J. *et al* dan a conocer el hecho de que un ADN bicatenario marcado con el colorante fluorescente rojo de Texas se puede detectar por quimioluminiscencia no enzimática de perioxalato.

Sumario de la invención

La presente invención consiste en aproximar una molécula quimioluminiscente a los ácidos nucleicos diana marcados con colorante o a los productos de las reacciones de modificación de ácidos nucleicos. La capacidad del colorante para recibir energía está condicionada. Es necesario que dicho colorante se intercale en el ácido nucleico y que el donante de energía esté muy próximo al mismo. El procedimiento requiere la creación de una estructura tridimensional específica (es decir, de colorante intercalado en el ácido nucleico que se pone en contacto con una molécula quimioluminiscente) para que la energía sea absorbida por el colorante y también que el donante de energía se encuentre próximo a dicha estructura.

Las ventajas específicas de la presente invención comprenden las siguientes. La presente invención es rápida y no requiere ninguna etapa de lavado, lo cual resulta significativo, tal como sabe cualquier experto en la materia. Tampoco requiere el uso de radiactividad ni de ningún láser para activar fluoróforos conjugados con los ácidos nucleicos. La señal de la luz emitida en las reacciones se puede integrar a lo largo de minutos en lugar de milisegundos, tal como ocurre con los fluoróforos activados mediante láser.

Un aspecto único del presente procedimiento es el de la proximidad. El contacto directo de la molécula quimioluminiscente con el ácido nucleico permite la detección sensible de un cambio en la masa del ácido nucleico marcapable (ejemplo 3). La cantidad de fluorescencia del ácido nucleico que se ha marcado con un colorante de intercalación es directamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico presente. Cualquier circunstancia en la que la masa total de ácido nucleico que se une a la molécula quimioluminiscente aumenta o disminuye se traduce en un aumento o disminución de la fluorescencia por parte de un colorante de intercalación activado.

La molécula quimioluminiscente no actúa simplemente como indicador de la presencia del contacto de una sonda con un fluoróforo, sino que indica la presencia de ácido nucleico bicatenario en virtud de su iluminación del colorante enlazado que sólo puede actuar como receptor de energía cuando está unido a una doble cadena. En la detección de ácidos nucleicos de secuencia específica, añade un nivel de rigor. Una señal positiva requiere que la molécula indicadora (es decir, la molécula quimioluminiscente) esté asociada a la secuencia diana y también que estén presentes ácidos nucleicos. Dicho de otro modo, una señal positiva exige que se cree una estructura tridimensional específica para que la energía sea absorbida por el colorante y exige asimismo que el donante de energía forme parte de dicha estructura y, por lo tanto, esté próximo a la misma. Esto reducirá significativamente el ruido de fondo en el sistema al que se aplica.

La presencia del ácido nucleico diana se transmite cuando la molécula quimioluminiscente emisora de luz se acerca a un colorante intercalado fluorescente. La luz emitida por el colorante intercalado es proporcional a la cantidad de ácido nucleico marcapable que se encuentra próximo a la molécula quimioluminiscente.

La presente invención se refiere a un sistema general de detección de ácidos nucleicos y a procedimientos de utilización del mismo. El sistema preferente comprende cuatro reactivos: 1) una molécula quimioluminiscente, 2) un sustrato quimioluminiscente, 3) un colorante de intercalación y 4) ácido nucleico. Estos reactivos se ponen en contacto con una muestra y pueden detectar un cambio en la masa del ácido nucleico marcapable causado por la hibridación a ácidos nucleicos complementarios o por reacciones de modificación de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos presentes en una muestra pueden no haberse amplificado o ser el resultado de reacciones de amplificación.

Se puede preparar una sonda quimioluminiscente uniendo la molécula quimioluminiscente mediante un enlace covalente o no covalente con una sonda de ácido nucleico monocatenario capaz de hibridarse con el ácido nucleico monocatenario complementario presente en la muestra. El ácido nucleico diana que se quiere detectar en la muestra puede estar en fase de solución, añadiéndose la sonda quimioluminiscente igualmente en fase de solución. El ácido nucleico diana que se quiere detectar en la muestra puede estar inmovilizado sobre un soporte sólido, añadiéndose la sonda quimioluminiscente en fase de solución. La sonda quimioluminiscente puede estar inmovilizada sobre un soporte sólido, añadiéndose el ácido nucleico diana que se quiere detectar en la muestra en fase de solución. La sonda quimioluminiscente y el ácido nucleico que se quiere detectar en la muestra pueden estar inmovilizados.

El colorante de intercalación se agrega a la muestra que contiene ácido nucleico bicatenario y una molécula quimioluminiscente o sonda, y se intercala en las regiones de ácido nucleico bicatenario de la muestra. A dicha muestra se le agrega el sustrato quimioluminiscente y se activa mediante la molécula quimioluminiscente. La interacción de la molécula quimioluminiscente y el sustrato quimioluminiscente produce una energía que, a su vez, excita el colorante de intercalación a la longitud de onda de excitación de dicho colorante, y éste emite luz a su longitud de onda de emisión. Se mide la luz emitida a la longitud de onda de emisión del colorante de intercalación (con o sin filtros de emisión apropiados) y de este modo es posible determinar la presencia y la cantidad de ácido nucleico diana presente en la muestra. Mediante la utilización de un filtro se puede distinguir la luz de longitud de onda más larga emitida por el colorante intercalado fluorescente de la luz de longitud de onda más corta emitida por la molécula quimioluminiscente. Esta discriminación también se puede lograr mediante la incorporación en la reacción quimioluminiscente de colorantes no de intercalación y no fluorescentes que absorben la luz emitida a las longitudes de onda producidas por la molécula quimioluminiscente, pero no la que emite el colorante intercalado fluorescente. Este procedimiento general se ilustra en la figura 1.

En una forma de realización no limitativa, la muestra contiene ADN genómico monocatenario del que se sospecha que contiene integrada la secuencia proviral del VIH. La molécula quimioluminiscente es luciferasa de *Gaussia princeps* (gluc), que se une covalentemente a una sonda de ADN monocatenario complementario a una región del gen de la envoltura del VIH. El colorante de intercalación es PicoGreen® y el sustrato quimioluminiscente es coelenterazina. El ADN de la muestra se desnaturaliza para generar cadenas simples y a continuación la sonda enlazada covalentemente a luciferasa de *Gaussia* se agrega a la muestra y se hibrida con su complemento. Se añade el PicoGreen® a la muestra y el mismo se intercala en la región de ADN bicatenario resultante de la hibridación de la sonda. Se añade la coelenterazina a la muestra, provocando que la luciferasa de *Gaussia* emita luz azul con un pico espectral en 480 nm. La luz azul emitida hace que se excite todo el PicoGreen® intercalado que se encuentra próximo, ya que su longitud de onda de excitación máxima es de 502 nm. A continuación, el PicoGreen® emite un espectro de luz de color verde brillante con un pico en 523 nm que se puede medir fácilmente mediante una cámara con dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) provista de un filtro que elimina significativamente las longitudes de onda menores de 500 nm.

En una descripción adicional no limitativa de la presente invención, se puede disponer un ensayo de proximidad disponiendo una molécula quimioluminiscente en estrecha proximidad con polímeros de ácidos nucleicos que llevan incorporados nucleótidos marcados con fluorescencia, o análogos de nucleótidos que presentan fluorescencia, en lugar de los colorantes de intercalación de la presente invención. Las patentes US nº 6.451.536 y nº 6.960.436 describen la utilización de nucleótidos fluorescentes para detectar y medir muestras de ADN sin el componente de proximidad que incorpora la presente invención.

La presente invención resulta útil en cualquier aplicación en la que se desee llevar a cabo la detección de la presencia o ausencia de ADN, tal como diagnósticos, procesos de investigación y aplicaciones industriales. El procedimiento es especialmente adecuado para la detección de ADN en muestras que se encuentran en solución o en formato de micromatrices. Asimismo, el presente procedimiento resulta muy adecuado para la detección de productos de actividades enzimáticas que crean o modifican las muestras de ácidos nucleicos, como las polimerasas, las nucleasas, las recombinasas y las ligasas, así como para la detección de inhibidores de estas mismas actividades. La presente invención también comprende procedimientos de utilización del sistema descrito anteriormente.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una forma de realización con la sonda directamente unida a una molécula quimioluminiscente y con la muestra, en la que ninguna de las dos está unida a ningún soporte sólido.

La figura 2 representa una forma de realización con la sonda directamente unida a la molécula quimioluminiscente y con la muestra inmovilizada sobre un soporte sólido.

La figura 3 representa una forma de realización con la sonda indirectamente unida a una molécula quimioluminiscente y con la muestra, en la que ninguna de las dos está unida a ningún soporte sólido.

La figura 4 representa una forma de realización con la sonda indirectamente unida a una molécula quimioluminiscente y con la muestra inmovilizada sobre un soporte sólido.

La figura 5A muestra las imágenes de la cámara CCD para las reacciones que se describen en el ejemplo 1 cuando el colorante de intercalación es SYBR Green I[®]. En este experimento, las concentraciones de luciferasa y SYBR Green I[®] se mantienen constantes mientras se varía la concentración de ADN.

5 La figura 5B muestra los datos obtenidos en el ejemplo 1 representados como intensidad relativa para cada punto

La figura 6A muestra las imágenes de la cámara CCD para las reacciones que se describen en el ejemplo 2 cuando el colorante de intercalación es SYBR Green I[®]. En este experimento, las concentraciones de luciferasa y ADN se

10 mantienen constantes mientras se varía la concentración de SYBR Green I[®].

La figura 6B muestra los datos obtenidos en el ejemplo 1 representados como intensidad relativa para cada punto cuando el colorante de intercalación es SYBR Green I[®].

15 La figura 7A muestra un diagrama esquemático del experimento descrito en el ejemplo 3, en el que la gluc biotinilada se dispone en estrecha proximidad con respecto a la doble cadena de ADN biotinilado mediante un producto intermedio de estreptavidina en presencia de SYBR Green I[®].

20 La figura 7B muestra los datos obtenidos en el ejemplo 3, en el que la gluc biotinilada se dispone en estrecha proximidad con respecto a la doble cadena de ADN biotinilado mediante un producto intermedio de estreptavidina en presencia de SYBR Green I[®].

La figura 7B muestra los datos obtenidos en el ejemplo 3 representados como intensidad relativa para cada punto cuando el colorante de intercalación es SYBR Green I[®].

25 La figura 8 muestra los datos predichos para un ensayo hipotético en el que se utilizaría luciferasa de *Gaussia princeps* conjugada con una sonda de oligómeros de ADN para cuantificar el ADN de una única secuencia en una muestra mixta.

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer un procedimiento general para detectar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos en una muestra. El sistema según la presente invención comprende cuatro reactivos: 1) una molécula quimioluminiscente, 2) un sustrato quimioluminiscente, 3) un colorante de intercalación y 4) ácidos nucleicos. Los

35 siguientes términos pretenden tener los siguientes significados generales tal como se utilizan en la presente memoria, como resultará evidente para el experto en la materia.

A. Definiciones

40 "Molécula bioluminiscente" se refiere a cualquier molécula biológica que participa en una reacción de quimioluminiscencia. La reacción puede ser catalítica o estequiométrica.

45 "Espectro de emisión quimioluminiscente" se refiere al intervalo de longitudes de onda fotónicas emitidas por la molécula quimioluminiscente. A menudo, dicho espectro viene definido por la longitud de onda de mayor intensidad procedente de una reacción de quimioluminiscencia.

50 "Sonda quimioluminiscente" se refiere a una molécula de sonda oligonucleótida o polinucleótida con una molécula quimioluminiscente acoplada. Dicha molécula quimioluminiscente puede estar acoplada covalentemente o a través de una interacción no covalente, ya sea antes o después de la modificación de la sonda por parte del ácido nucleico diana.

"Sustrato quimioluminiscente" se refiere a un reactivo que interactúa con la molécula quimioluminiscente y produce un fotón/luz.

55 "Molécula quimioluminiscente" se refiere a cualquier molécula que participa en cualquier reacción de quimioluminiscencia; entre las mismas se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, las moléculas bioluminiscentes.

60 Las moléculas quimioluminiscentes según la presente invención y sus respectivos sustratos quimioluminiscentes comprenden:

i) Luciferasas que utilizan coelenterazina como sustrato, incluidas las luciferasas procedentes de los organismos *Gaussia princeps*, *Periphylla periphylla*, *Renilla mulleri* y *Aequorea victoria*.

65 ii) Luciferasa de luciérnaga que utiliza luciferina de luciérnaga como sustrato.

iii) Fosfatasa alcalina que utiliza el sustrato quimioluminiscente/fluorescente DuoLuX[®] para fosfatasa.

iv) Peroxidasa de rábano picante que utiliza el sustrato quimioluminiscente/fluorescente DuoLuX[®] para peroxidasa.

5 "Reacción de quimioluminiscencia" se refiere a cualquier reacción química que produce un fotón sin que exista ningún fotón de entrada. Los reactivos pueden actuar catalítica o estequiométricamente. En una reacción catalítica, el catalizador convierte un sustrato o sustratos en un producto o productos, teniendo lugar la liberación concomitante de un fotón. En una reacción estequiométrica, dos o más reactivos se convierten en un producto o productos y un fotón.

10 "Pares de bases complementarias" se refiere a las bases purínicas y pirimidínicas que se aparean formando enlaces de hidrógeno estables entre dos moléculas de ácido nucleico monocatenario. Los pares de bases habituales son adenina y timidina, guanina y citosina, y adenina y uracilo. Otros pares de bases incluyen variantes derivadas de estas bases, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, bases metiladas y otras purinas y pirimidinas, incluida, aunque sin limitarse a la misma, la inosina.

15 "Ácido nucleico bicatenario" se refiere a dos moléculas de ácido nucleico monocatenario unidas mediante enlaces no covalentes por puentes de hidrógeno entre las bases complementarias de las dos moléculas.

20 "Excitación" se refiere a la transferencia de energía de una molécula quimioluminiscente al colorante de intercalación. La transferencia de energía de una molécula luminiscente al colorante de intercalación puede tener lugar a través de la donación de fotones o mediante transferencia de energía por resonancia (RET).

25 "Hibridación" se refiere a la reacción de asociación entre dos moléculas de ácido nucleico a través de pares de bases complementarias para formar un ácido nucleico bicatenario.

30 "Colorante de intercalación" se refiere a una molécula que se une a ácidos nucleicos bicatenarios o monocatenarios entre pares de bases adyacentes. Además, tras la intercalación, el colorante experimenta un cambio en su configuración electrónica, de tal manera que su espectro de absorción y/o emisión cambia. El colorante tiene una fluorescencia intrínseca muy baja cuando no está enlazado a ácidos nucleicos. En cambio, experimenta un aumento muy grande de fluorescencia al unirse a ácidos nucleicos, aumentando el rendimiento cuántico hasta 0,9. Dicho colorante tiene una afinidad muy alta por los ácidos nucleicos y da lugar a una tinción baja o nula de otros biopolímeros.

35 "Espectro de excitación del colorante de intercalación" se refiere al intervalo de longitudes de onda de energía que provoca la excitación de un colorante intercalado complejado con un ácido nucleico bicatenario o monocatenario, generando un fotón en su espectro de emisión. El espectro de excitación del colorante de intercalación se superpone con el espectro de emisión de la molécula quimioluminiscente.

40 "Espectro de emisión del colorante de intercalación" se refiere a las longitudes de onda de los fotones emitidos por el colorante intercalado complejado con un ácido nucleico bicatenario o monocatenario cuando es excitado por una fuente de luz con un espectro que se superpone con su longitud de onda de excitación máxima.

45 "Ácido nucleico" se refiere a un oligómero o polímero de ADN, ARN o una quimera de ambos. En dicho concepto se incluyen oligómeros o polímeros de ADN, ARN o quimeras de ambos en los que se han incorporado análogos de nucleótidos. También se incluyen oligómeros y polímeros de análogos de nucleótidos, tal como será evidente para los expertos en la materia. Entre los ejemplos de análogos de nucleótidos se incluyen nucleótidos tales como un ácido nucleico cerrado (LNA) o un ácido nucleico peptídico (PNA), u otros análogos de nucleótidos capaces de experimentar apareamiento de bases complementarias con ADN o ARN; o análogos de nucleótidos que pueden ser incorporados por enzimas que modifican el ADN, tales como las telomerasas, las ADN-polimerasas, las enzimas de reparación del ADN, las transcriptasas inversas o las ligasas de ADN y ARN, u otras enzimas codificadoras de ADN conocidas por los expertos en la materia.

50 "Sonda" se refiere a cualquier ácido nucleico monocatenario con una secuencia definida de bases purina y pirimidina, incluyendo las modificaciones, como resultará evidente para los expertos en la materia.

55 "Proximidad" se refiere a la situación en la que diferentes moléculas se encuentran cercanas en virtud de su asociación en un complejo molecular estable, tal como será evidente para el experto en la materia. Las moléculas pueden estar asociadas a través de interacciones covalentes o no covalentes. Se prevé que el tamaño de dichos complejos sea parecido al observado en muchos complejos proteína/proteína, proteína/ácido nucleico y ácido nucleico/ácido nucleico. La proximidad de la molécula quimioluminiscente con respecto al ácido nucleico es preferentemente inferior a 500 Å. La proximidad de la molécula quimioluminiscente con respecto al ácido nucleico es más preferentemente menor de 250 Å. Todavía más preferentemente, la proximidad de la molécula quimioluminiscente con respecto al ácido nucleico es menor de 100 Å. El ácido nucleico puede tener una longitud mucho mayor de 500 Å.

"Muestra" se refiere a cualquier mezcla de moléculas recogida de un sólido, una solución o un gas que puede contener ácidos nucleicos o actividad capaz de modificar ácidos nucleicos o inhibidores de dicha actividad.

"Ácido nucleico monocatenario" se refiere a un oligómero o polímero de unidades repetitivas de fosfato y ribosa o desoxirribosa unidas en las posiciones 3' y 5' de los anillos sacáridos junto con las bases purínicas o pirimidínicas unidas en la posición del anillo de ribosa o desoxirribosa.

"Soporte sólido" incluye cualquier soporte adecuado para una reacción de unión y/o cualquier superficie en la que las moléculas se pueden fijar a través de enlaces covalentes o no covalentes. Dichos soportes comprenden de manera no limitativa, membranas, plásticos, bolas paramagnéticas, papel cargado, nailon, películas de Langmuir-Blodgett, vidrio funcionalizado, germanio, silicio, PTFE, poliestireno, arseniuro de galio, oro y plata. También se incluye cualquier otro material conocido en la técnica que sea capaz de presentar grupos funcionales tales como amino, carboxilo, tiol o hidroxilo incorporados en su superficie. Esto incluye superficies con cualquier topología, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, superficies planas, superficies esféricas, superficies acanaladas y superficies cilíndricas, por ejemplo columnas. Las sondas se pueden fijar en ubicaciones específicas de la superficie de un soporte sólido en un formato direccionable para formar una matriz, también conocida como "micromatriz" o "biochip".

B. Procedimiento general (las formas de realización ilustrativas no son limitativas de las formas de realización dadas a conocer en la presente invención)

La presente invención comprende cuatro moléculas: la primera es una molécula quimioluminiscente, la segunda es un sustrato quimioluminiscente, la tercera es un colorante de intercalación y la cuarta es un ácido nucleico. El espectro de absorción del colorante de intercalación se superpone con el espectro de emisión de la molécula quimioluminiscente.

En una forma de realización, la molécula quimioluminiscente está unida mediante un enlace covalente o no covalente a un ácido nucleico monocatenario complementario con respecto a la secuencia diana; a esto es a lo que se denomina "sonda". Cuando el ácido nucleico de "muestra" se desnaturaliza y se deja que se hibride en presencia de la "sonda", la "sonda" y las secuencias diana de la muestra forman un ADN bicatenario. Este ADN bicatenario se asocia a su vez con el colorante de intercalación. La intercalación del colorante en el ADN bicatenario desplaza el espectro de absorción del colorante de intercalación hasta que se superpone con el espectro de emisión de la molécula quimioluminiscente.

Finalmente, cuando se proporciona un sustrato quimioluminiscente a la molécula quimioluminiscente, la misma genera la energía necesaria para excitar las moléculas de colorante intercalado y hacer que las mismas emitan fotones en sus longitudes de onda de emisión. Estos fotones se pueden detectar/contar. Un procedimiento para cuantificar la luz emitida por el colorante consiste en aplicar un filtro que puede distinguir entre la luz emitida a una longitud de onda menor y la luz emitida por el colorante intercalado. La eficiencia con la que la energía producida por la molécula quimioluminiscente es absorbida por las moléculas intercaladas de colorante de intercalación depende de la distancia que las separa. La luz emitida por el colorante de intercalación es una función de la distancia entre la fuente de luz (molécula quimioluminiscente) y el colorante de intercalación. Si la excitación por parte de la molécula quimioluminiscente tiene lugar mediante transferencia de energía por resonancia, se aplica la ecuación de Förster. La ecuación de Förster establece que la transferencia de energía de excitación entre el donante (una molécula quimioluminiscente como la luciferasa) y el receptor (un colorante de intercalación como PicoGreen[®]) es inversamente proporcional a la 6^a potencia de la distancia que los separa.

Una ventaja de la presente invención es que no se necesita ninguna otra fuente de luz que no sea la molécula quimioluminiscente. Además, la asociación de la sonda quimioluminiscente con el ADN bicatenario se puede medir sin que exista separación física entre la diana y otros ácidos nucleicos bicatenarios, ya que únicamente el ADN bicatenario que presenta el colorante de intercalación intercalado con una asociación física estrecha con la sonda quimioluminiscente produce señal por encima del ruido de fondo. Este aspecto de la presente invención evita la necesidad de llevar a cabo lavados, una ventaja significativa, como reconocerá el experto en la materia. Cualquier detector que pueda distinguir entre las longitudes de onda de espectros más cortos y más largos se puede utilizar en este sistema de ensayo. Dichos detectores comprenden de manera no limitativa, luminómetros, fluorímetros y cámaras CCD equipadas con un filtro para eliminar las longitudes de onda más cortas en el intervalo emitido por la molécula quimioluminiscente.

C. Forma de realización que presenta la sonda directamente marcada con la molécula quimioluminiscente y la muestra en solución

La figura 1 es una representación esquemática de una sonda quimioluminiscente que se utiliza para cuantificar ácidos nucleicos de secuencia específica en fase de solución. En este caso, la molécula quimioluminiscente es una luciferasa. La luciferasa está unida covalentemente a una sonda de ADN monocatenario. Esta sonda bioluminiscente se añade a una muestra que contiene ácido nucleico de secuencia diana en la solución y un colorante de ácido nucleico. A continuación, se añade coelenterazina para activar la luciferasa. La luciferasa excita el colorante intercalado en el ácido nucleico que, a su vez, emite un espectro de luz con una longitud de onda máxima de 520

nm. La luz con una longitud de onda inferior a 500 nm se elimina por filtración. La luz con una longitud de onda superior a 500 nm se deja pasar a un detector.

D. Forma de realización que presenta la sonda directamente marcada con la molécula quimioluminiscente y la muestra inmovilizada sobre un soporte sólido

La figura 2 es una representación esquemática de una sonda quimioluminiscente que se utiliza para cuantificar ácidos nucleicos de secuencia específica inmovilizados sobre un soporte sólido. En este caso, la molécula quimioluminiscente es una luciferasa. La luciferasa está unida covalentemente a una sonda de ADN monocatenario. A continuación, esta sonda bioluminiscente se añade a la muestra con el ácido nucleico diana inmovilizado sobre el soporte sólido. El colorante del ácido nucleico está presente en solución en la muestra. A continuación se añade coelenterazina para activar la luciferasa. La luciferasa excita el colorante intercalado en el ácido nucleico que, a su vez, emite un espectro de luz con una longitud de onda máxima de 520 nm. La luz con una longitud de onda inferior a 500 nm se elimina por filtración. La luz con una longitud de onda superior a 500 nm se deja pasar a un detector.

E. Forma de realización que presenta la sonda indirectamente marcada con la molécula quimioluminiscente y la muestra en solución

La figura 3 es una representación esquemática de una sonda quimioluminiscente que se utiliza para cuantificar ácidos nucleicos de secuencia específica en fase de solución. En este caso, la molécula quimioluminiscente es una luciferasa. La luciferasa está conjugada no covalentemente con una sonda de ADN monocatenario biotinilado mediante un producto intermedio de estreptavidina. Dado que una molécula de estreptavidina puede enlazarse a cuatro moléculas de biotina, el ADN de sonda biotinilado, la luciferasa biotinilada y la estreptavidina se pueden mezclar en las proporciones adecuadas para generar una sonda bioluminiscente. La sonda bioluminiscente se añade a una muestra que contiene el ácido nucleico de secuencia diana y un colorante de ácido nucleico. Se agrega coelenterazina para activar la luciferasa. A continuación, la luciferasa excita el colorante intercalado en el ácido nucleico que, a su vez, emite un espectro de luz con una longitud de onda máxima de 520 nm. La luz con una longitud de onda inferior a 500 nm se elimina por filtración. La luz con una longitud de onda superior a 500 nm se deja pasar a un detector.

F. Forma de realización que presenta la sonda indirectamente marcada con la molécula quimioluminiscente y la muestra inmovilizada sobre el soporte sólido

La figura 4 es una representación esquemática de una sonda quimioluminiscente que se utiliza para cuantificar ácidos nucleicos de secuencia específica inmovilizados sobre un soporte sólido. En este caso, la molécula quimioluminiscente es una luciferasa. La luciferasa está conjugada no covalentemente con una sonda de ADN monocatenario biotinilado mediante un producto intermedio de la estreptavidina. Dado que una sola molécula de estreptavidina puede enlazarse a cuatro moléculas de biotina, el ADN de sonda biotinilado, la luciferasa biotinilada y la estreptavidina se pueden mezclar en las proporciones adecuadas para generar una sonda bioluminiscente. A continuación, esta sonda bioluminiscente se añade a la muestra con el ácido nucleico diana inmovilizado sobre el soporte sólido. El colorante del ácido nucleico está presente en solución en la muestra. A continuación se añade coelenterazina para activar la luciferasa. La luciferasa excita el colorante intercalado en el ácido nucleico que, a su vez, emite un espectro de luz con una longitud de onda máxima de 520 nm. La luz con una longitud de onda inferior a 500 nm se elimina por filtración. La luz con una longitud de onda superior a 500 nm se deja pasar a un detector.

G. Forma de realización que presenta la sonda directamente marcada con la molécula quimioluminiscente, la sonda inmovilizada sobre un soporte sólido y la muestra en solución

H. Aplicaciones de la invención

La presente invención consiste en un procedimiento general para detectar y cuantificar secuencias diana de ácido nucleico en una mezcla heterogénea de ácidos nucleicos. La detección de ácidos nucleicos es importante en muchas aplicaciones, incluidas (aunque sin limitarse a las mismas) las mediciones de ácidos nucleicos en tejidos y fluidos corporales con propósitos diagnósticos, como será evidente para el experto en la materia.

El presente procedimiento sirve para controlar el aumento o disminución de los ácidos nucleicos marcables que se ponen en contacto con una molécula quimioluminiscente. Un ácido nucleico marcapable es cualquier polímero de ácido nucleico en el que se pueden incorporar colorantes de intercalación, a diferencia de otras moléculas biológicas. Tras enlazarse, dichos colorantes de intercalación experimentan un cambio en su configuración electrónica que hace que emitan fluorescencia en presencia de la longitud de onda de excitación adecuada.

Esto ocurre cuando cambia la masa de ácido nucleico marcapable que está en contacto con la molécula quimioluminiscente. Comprende de manera no limitativa lo expuesto a continuación:

- a. El procedimiento mide la actividad enzimática que polimeriza la extensión de una cadena naciente mediante la incorporación de nucleótidos o análogos de nucleótidos, de ácido nucleico cuando la cadena extendida, o su

complemento en el caso de los ácidos nucleicos bicatenarios, se pone en contacto con una molécula quimioluminiscente y está presente un colorante de intercalación sensible a la luz. Dicha actividad comprende de manera no limitativa las ARN-polimerasas, las ADN-polimerasas y las telomerasas. La presente invención detecta asimismo los inhibidores de la actividad de las mismas;

b. El procedimiento mide la actividad enzimática que degrada el ácido nucleico cuando el mismo se pone en contacto con una molécula quimioluminiscente y está presente un colorante de intercalación sensible a la luz. Dicha actividad comprende de manera no limitativa las ARN-exonucleasas, las ARN-endonucleasas, las ADN-exonucleasas y las ADN-endonucleasas. La presente invención detecta asimismo los inhibidores de la actividad de las mismas;

c. El procedimiento mide la actividad enzimática que facilita la unión o enlace de moléculas separadas de ácido nucleico cuando una de las moléculas de ácido nucleico se pone en contacto con una molécula quimioluminiscente y está presente un colorante de intercalación sensible a la luz. Dicha actividad incluye, aunque sin limitarse a las mismas, las ADN-ligasas. La presente invención detecta asimismo los inhibidores de la actividad de las mismas;

d. El procedimiento mide la actividad enzimática que facilita la recombinación de moléculas bicatenarias de ácido nucleico cuando una de las moléculas bicatenarias de ácido nucleico se pone en contacto con la molécula quimioluminiscente, esta presente un colorante de intercalación sensible a la luz y la masa de la doble cadena de ácido nucleico del producto recombinado es diferente de la masa de la doble cadena de ácido nucleico de la molécula sin recombinar. Dicha actividad incluye, aunque sin limitarse a las mismas, las recombinasas y las integrasas. La presente invención detecta asimismo los inhibidores de la actividad de las mismas;

e. El procedimiento mide la actividad enzimática que facilita la unión o enlace de moléculas bicatenarias de ácido nucleico a moléculas proteínicas cuando las moléculas proteínicas se ponen en contacto con una molécula quimioluminiscente, o son moléculas quimioluminiscentes, y está presente un colorante de intercalación sensible a la luz. La presente invención detecta asimismo los inhibidores de la actividad de las mismas.

Los ejemplos siguientes son proporcionados a título ilustrativo de varias formas de realización y aspectos preferidos de la presente invención, y no limitativo del alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

La activación por luciferasa del colorante intercalado en ADN es proporcional al ADN presente. Objetivo:

El objetivo de este experimento era determinar si la enzima luciferasa de *Gaussia princeps* (gluc) es suficiente como fuente de excitación para un fluoróforo encargado del marcaje de un ADN bicatenario. En concreto, el experimento tiene por objeto determinar si la gluc que emite luz en un pico de 480 nm puede excitar un colorante de ácido nucleico intercalado en un ADN bicatenario con un máximo de excitación en el intervalo comprendido entre 495 nm y 500 nm y un máximo de emisión de aproximadamente 520 nm. Esto se lleva a cabo mediante la detección de la luz de una mezcla de gluc, colorante fluorescente de ácido nucleico/ADN bicatenario en el que se filtran las longitudes de onda inferiores a 500 nm.

Materiales y procedimientos:

La luciferasa de *Gaussia princeps* se obtuvo a través de Avidity LLC (Denver, CO). El colorante de ácido nucleico SYBR Green I y la escala de ADN bicatenario linealizada se obtuvieron a través de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Las reacciones para la detección del ADN bicatenario fueron las siguientes. Se prepararon diluciones de ADN bicatenario, SYBR Green I y gluc con Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), NaCl 600 mM, EDTA 1 mM y BPER II al 20% (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se diluyó coelenterazina (Nanolight International, Pinetop, CA) en PBS, EDTA 1 mM. La concentración final de coelenterazina en la reacción fue de 50 μ M.

Se preincubaron diversas cantidades de ADN bicatenario con 0,78 μ l de SYBR Green I concentrado a 200x en un volumen de 50 μ l. Una concentración de 1x es relativa y corresponde a la definida por el fabricante como la cantidad estándar de ensayo para la detección de ADN. Se añadió gluc (50 ng) en 5 μ l al ADN bicatenario premarcado. La reacción de la luciferasa se inició mediante la adición de 100 μ l de coelenterazina. Las reacciones se llevaron a cabo en los pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno blanco (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA). La luz emitida por la reacción se detectó con una cámara CCD (Raytest, Straubenhardt, Alemania). El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas con la cámara se llevó a cabo con el paquete de software AIDA (Raytest), que se incluía con la cámara. La captura de luz de la reacción por parte de la cámara comenzó 10 segundos después de que se iniciara la reacción. La luz se tomó en 1 en incrementos de 15 minutos (figura 5). La discriminación entre la luz emitida por la gluc y la emitida por el colorante de ácido nucleico excitado/ADN bicatenario se llevó a cabo mediante

la inserción de un filtro entre la reacción que produce luz y la abertura de la cámara CCD. El ajuste de la abertura de la cámara fue de 0,95 o 11. Se demostró que el filtro (Clare Chemical Research, Dolores, Colorado, EE.UU.) capta eficazmente los colorantes de ácido nucleico fluorescentes que son excitados por una luz con longitudes de onda comprendidas entre 400 nm y 500 nm y emiten en longitudes de onda superiores a 500 nm cuando están complejados con ADN de doble cadena. Esto lo hace eliminando significativamente las longitudes de onda menores de 500 nm.

Resultados:

Se determinó que, en las condiciones aplicadas, 50 ng de gluc generaban niveles de luz que se encontraban dentro del intervalo dinámico de detección de la cámara CCD con y sin el filtro. También se determinó que la luz generada por esta cantidad de enzima era la esperada, la cual se reducía significativamente cuando se utilizaba el filtro. A continuación, este nivel de enzima se analizó en presencia de diferentes cantidades de ADN de doble cadena (figura 5). La figura 5 representa la reacción generadora de luz llevada a cabo con 50 ng de gluc y coelenterazina en presencia de SYBR Green I y 0 µg, 0,063 µg, 0,125 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg y 2 µg de ADN bicatenario linearizado (puntos 1-7 respectivamente). La parte A representa las imágenes de la cámara CCD para las reacciones con filtro. La parte B representa los mismos datos como intensidad relativa para cada punto.

En este experimento se puso claramente de manifiesto que, cuando se mantenía constante la cantidad de enzima luciferasa y marcador de ácido nucleico mientras se aumentaba la cantidad de ADN de doble cadena, la luz emitida a longitudes de onda más largas aumentaba proporcionalmente. Este hecho demuestra la capacidad de la gluc para actuar como fuente de luz intrínseca para activar los colorantes intercalados en ácidos nucleicos.

Ejemplo 2

La activación por luciferasa de un colorante intercalado en ADN es proporcional a la cantidad de colorante presente.

Objetivo:

El objetivo de este experimento consiste en determinar si la enzima luciferasa de *Gaussia princeps* (gluc) es suficiente como fuente de excitación para un fluoróforo encargado del marcaje de un ADN bicatenario. En concreto, el experimento tiene por objeto determinar si la gluc que emite luz en un pico de 480 nm puede excitar un colorante de ácido nucleico intercalado en un ADN bicatenario con un máximo de excitación en el intervalo comprendido entre 495 nm y 500 nm y un máximo de emisión de aproximadamente 520 nm. Esto se lleva a cabo mediante la detección de la luz de una mezcla de gluc, colorante fluorescente de ácido nucleico/ADN bicatenario en el que se filtran las longitudes de onda menores de 500 nm.

Materiales y procedimientos:

Las reacciones se llevaron a cabo con los mismos reactivos y en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. Sin embargo, en este experimento las concentraciones de ADN de doble cadena y gluc se mantienen constantes mientras se varía la concentración de SYBR Green I (figura 6).

Se preincubó ADN de doble cadena (2 µg) con SYBR Green I en un volumen de 50 µl hasta una concentración final de 0x, 0,16x, 0,3x, 0,63x, 1,3x, 2,5x, 5x y 10x. Se añadió gluc (50 ng) en 5 µl al ADN bicatenario premarcado. La reacción de la luciferasa se inició mediante la adición de 100 µl de coelenterazina.

La cantidad de luz emitida superior a 500 nm en cada reacción se determinó tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Las mismas reacciones se llevaron a cabo en ausencia de ADN de doble cadena (-dsDNA).

Resultados:

Se determinó que, en las condiciones aplicadas, 50 ng de gluc generaban niveles de luz que se encontraban dentro del intervalo dinámico de detección de la cámara CCD con y sin el filtro. También se determinó que la luz generada por esta cantidad de enzima era la esperada, la cual se reducía significativamente cuando se utilizaba el filtro. A continuación, este nivel de enzima se analizó en presencia de diferentes cantidades de SYBR Green I (figura 6). La figura 6 muestra la reacción generadora de luz llevada a cabo con 50 ng de gluc y coelenterazina en presencia (+dsDNA) o ausencia (-dsDNA) de ADN de doble cadena linearizado y SYBR Green I en concentraciones finales de 0x, 0,16x, 0,3x, 0,63x, 1,3x, 2,5x, 5x y 10x (puntos 1-8 respectivamente). La parte A muestra las imágenes de la cámara CCD para las reacciones con filtro. La parte B muestra los mismos datos como intensidad relativa para cada punto.

En este experimento se puso claramente de manifiesto que, cuando se mantenía constante la cantidad de enzima luciferasa y de ADN bicatenario mientras se aumentaba la cantidad de SYBR Green I, la luz emitida a longitudes de onda más largas aumentaba proporcionalmente. Este hecho demuestra la capacidad de la gluc para actuar como

fuentes de luz intrínseca para activar los colorantes fluorescentes intercalados en la doble cadena de ADN bicatenario.

Ejemplo 3

5 Activación dependiente de la proximidad de un colorante intercalado en ADN de doble cadena.

Objetivo

10 El objetivo de este experimento consistía en demostrar la dependencia que la activación del colorante intercalado en ácido nucleico tiene con respecto a la proximidad entre la molécula quimioluminiscente y dicho colorante. En este experimento, se mezcla ADN bicatenario diana biotinilado con gluc biotinilada. En dicha mezcla no existe ninguna asociación de las dos especies de moléculas entre sí. Tras la adición de cantidades crecientes de estreptavidina, el ADN bicatenario y la gluc se asocian entre sí con la estreptavidina como producto intermedio (figura 7A). Esto es debido al estrecho enlazamiento no covalente de los restos de biotina del ADN de doble cadena y de la gluc a los cuatro sitios de enlace de biotina disponibles de la estreptavidina. A medida que aumenta la cantidad de estreptavidina, mayor es el número de moléculas de ADN de doble cadena que se sitúan muy cerca de las moléculas de gluc. Si la activación del colorante intercalado depende de la proximidad entre la gluc y el colorante, la cantidad de fluorescencia a longitudes de onda más largas debería aumentar a medida que aumenta la cantidad de estreptavidina.

Materiales y procedimientos

25 Las reacciones se llevaron a cabo con los mismos reactivos y en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. Sin embargo, en este experimento el ADN de doble cadena utilizado se preparó por hibridación de dos oligonucleótidos sintéticos complementarios (Sigma-Genosys, The Woodlands, TX) de ADN de 85 y 95 nucleótidos de longitud. Uno de los oligómeros (de 95 nucleótidos) se biotiniló en el extremo 5'. La estreptavidina se obtuvo a través de Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

30 Se preincubó ADN de doble cadena (2,5 pmol de extremo 5' biotinilado por reacción) con 0,78 µl de SYBR Green I 200x en un volumen de 50 µl. Se añadió gluc (50 ng) en 5 µl al ADN bicatenario premarcado. A esta mezcla se le añadió estreptavidina en diferentes cantidades en 5 µl de ddH₂O. La mezcla se incubó 15 min con agitación suave a temperatura ambiente. La reacción de la luciferasa se inició mediante la adición de 100 µl de coelenterazina. La cantidad de luz emitida a más de 500 nm en cada reacción se determinó tal como se ha descrito en el ejemplo 1 (figura 7B, figura 7C).

Resultados

40 La figura 7 representa la reacción generadora de luz llevada a cabo con 50 ng de gluc biotinilada y coelenterazina en presencia de colorante PicoGreen. El ADN diana para cada reacción se encontraba en una concentración de 2,5 pmol por extremo biotinilado por reacción. La estreptavidina estaba presente a razón de 0,013 pmol, 0,026 pmol, 0,05 pmol, 0,1 pmol, 0,2 pmol, 0,42 pmol y 0,84 pmol (puntos 1-8 respectivamente). La parte A muestra un diagrama esquemático del diseño experimental. La parte B muestra las imágenes de la cámara CCD para las reacciones con filtro. La parte C muestra las imágenes de la cámara CCD para cada reacción como intensidad relativa para cada punto.

50 En este experimento se puso de manifiesto que la cantidad de luz que puede pasar a través del filtro hacia la cámara CCD es directamente proporcional a la cantidad de estreptavidina que se añade. Todos los demás componentes (luciferasa, colorante de intercalación, ADN de doble cadena y coelenterazina) son los mismos en cada reacción. La estreptavidina sirve para juntar la molécula quimioluminiscente (gluc) y el ácido nucleico marcado en un único complejo y en estrecha proximidad entre sí. A medida que se añade más estreptavidina, se crea más complejo. El aumento del complejo es directamente proporcional a la cantidad de luz de longitud de onda más larga.

Ejemplo 4

55 La figura 8 representa un experimento hipotético que representa otra aplicación del procedimiento. Cada punto del gráfico representa la intensidad de una reacción emisora de luz a medida que aumenta (de izquierda a derecha) la cantidad de ADN diana monocatenario en cada reacción. La sonda de gluc/ADN, el PicoGreen[®] y la coelenterazina se mantienen constantes. Las reacciones tienen lugar con a) una sonda con una secuencia complementaria al ADN diana, o b) una sonda con una secuencia no complementaria al ADN diana.

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento que comprende:
- 5 a) proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene un ácido nucleico de interés;
- b) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico complementaria del ácido nucleico de interés para formar una doble cadena de ácido nucleico;
- 10 c) poner en contacto la muestra con un colorante de intercalación para generar una doble cadena de ácido nucleico unida a colorante, y con una molécula quimioluminiscente, en el que dicha molécula quimioluminiscente es seleccionada de entre el grupo constituido por la luciferasa, la luciferasa de luciérnaga, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante;
- 15 d) activar dicha molécula quimioluminiscente mediante la adición de un sustrato quimioluminiscente para producir luz, en el que la luz excita el colorante de intercalación en la doble cadena unida a colorante, y
- e) detectar la luz emitida por el colorante de intercalación, detectándose así un ácido nucleico de interés.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico de interés está asociado a dicha molécula quimioluminiscente.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico complementario del ácido nucleico de interés está asociado a dicha molécula quimioluminiscente.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico de interés se selecciona de entre el grupo constituido por ADN, ARN y sus derivados.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico complementario del ácido nucleico de interés se selecciona de entre el grupo constituido por ADN, ARN y sus derivados.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha molécula quimioluminiscente se activa mediante una luciferina.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha luciferina se selecciona de entre el grupo constituido por luciferina de luciérnaga, coelenterazina, luciferina bacteriana, luciferina de dinoflagelados, vargulina, y sus análogos sintéticos que se oxidan en presencia de una luciferasa en una reacción que produce bioluminiscencia.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que por lo menos uno de entre los ácidos nucleicos de interés y el ácido nucleico complementario está unido a un soporte sólido.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el colorante de intercalación se selecciona de entre el grupo constituido por PicoGREEN[®] y SYBR GREEN I[®].
- 45 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de la luz es cualitativa.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de la luz es cuantitativa.
- 50 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha molécula quimioluminiscente es una luciferasa.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la luciferasa es una luciferasa de un sistema seleccionado de entre el grupo constituido por los sistemas: *Renilla*, *Gaussia*, *Pleuromamma*, *Aequorea*, *Obelia*, *Porichthys*, *Aristostomias*, *Odontosyllis*, *Oplophorus*, luciérnaga, bacterias, *Cavarnularia*, *Ptilosarcus*, *Stylatula*, *Acanthoptilum*, *Parazoanthus*, *Chiroteuthis*, *Eucleoteuthis*, *Onychoteuthis*, *Watasenia*; sepia, *Sepiolina*, *Sergestes*, *Gnathophausia*, *Argyropelecus*, *Yarella*, *Diaphus* y *Neoscopelus*.
- 55 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la luciferasa es la luciferasa de *Gaussia princeps*.
15. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha molécula quimioluminiscente está asociada a dicha molécula de ácido nucleico complementaria mediante unos medios seleccionados de entre el grupo constituido por interacciones covalentes y no covalentes.
- 60 16. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho compuesto quimioluminiscente está asociado a dicho ácido nucleico de interés mediante unos medios seleccionados de entre el grupo constituido por interacciones covalentes y no covalentes.
- 65

17. Procedimiento que comprende:

- a) proporcionar una muestra de la que se sospecha que contiene un ácido nucleico de interés;
- 5 b) poner en contacto la muestra con una molécula de ácido nucleico complementaria al ácido nucleico de interés para formar una doble cadena de ácido nucleico, en el que el ácido nucleico incorpora los nucleótidos marcados con fluorescencia o los análogos de nucleótidos que presentan fluorescencia;
- 10 c) poner en contacto la muestra con una molécula quimioluminiscente, en el que dicha molécula quimioluminiscente es seleccionada de entre el grupo constituido por la luciferasa, la luciferasa de luciérnaga, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante;
- 15 d) activar la molécula quimioluminiscente mediante la adición de un sustrato quimioluminiscente para producir luz, en el que la luz excita los nucleótidos marcados con fluorescencia o los análogos de nucleótidos que presentan fluorescencia; y
- e) detectar la luz emitida por los nucleótidos marcados con fluorescencia o los análogos de nucleótidos que presentan fluorescencia, detectándose así un ácido nucleico de interés.

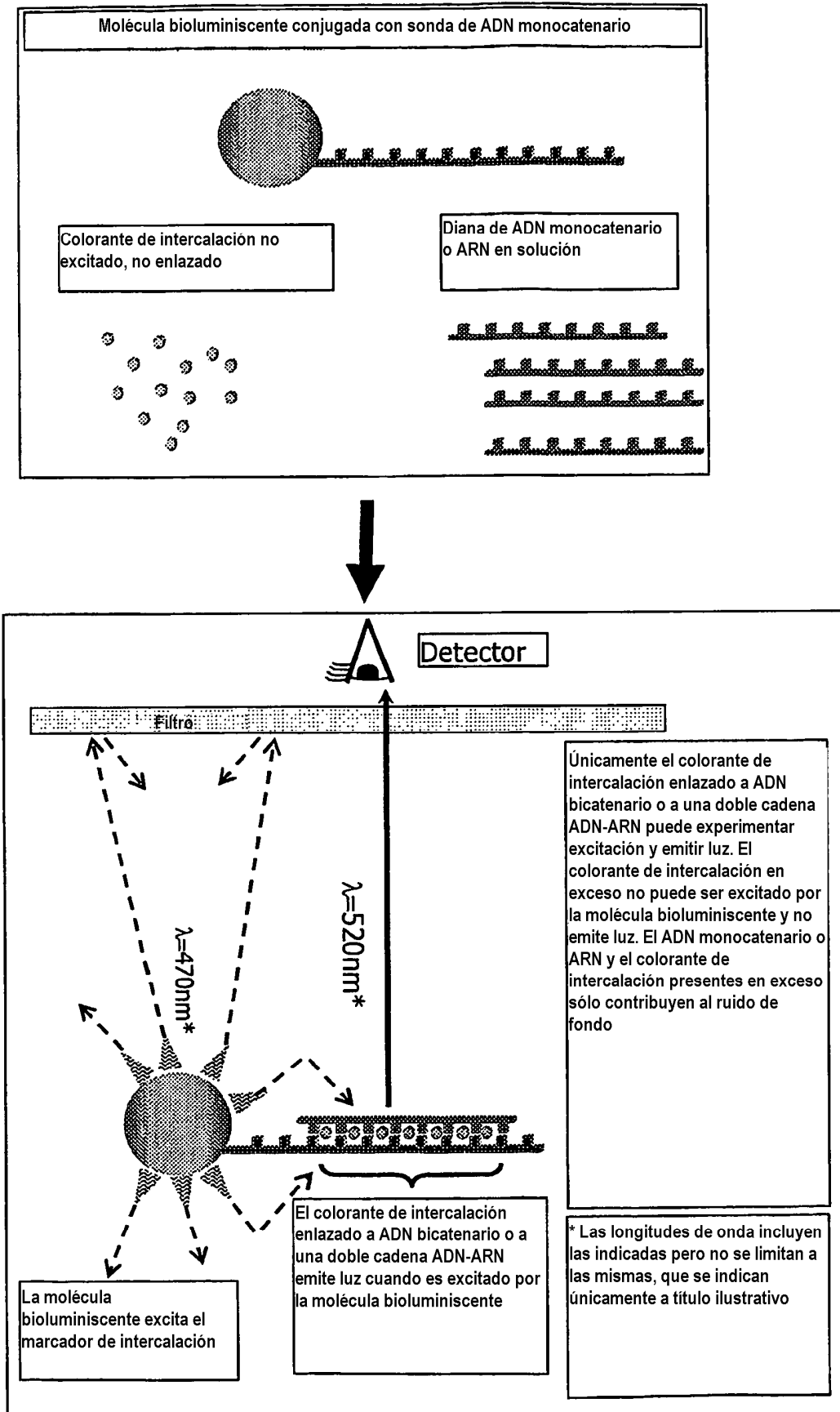


Figura 1 de 8

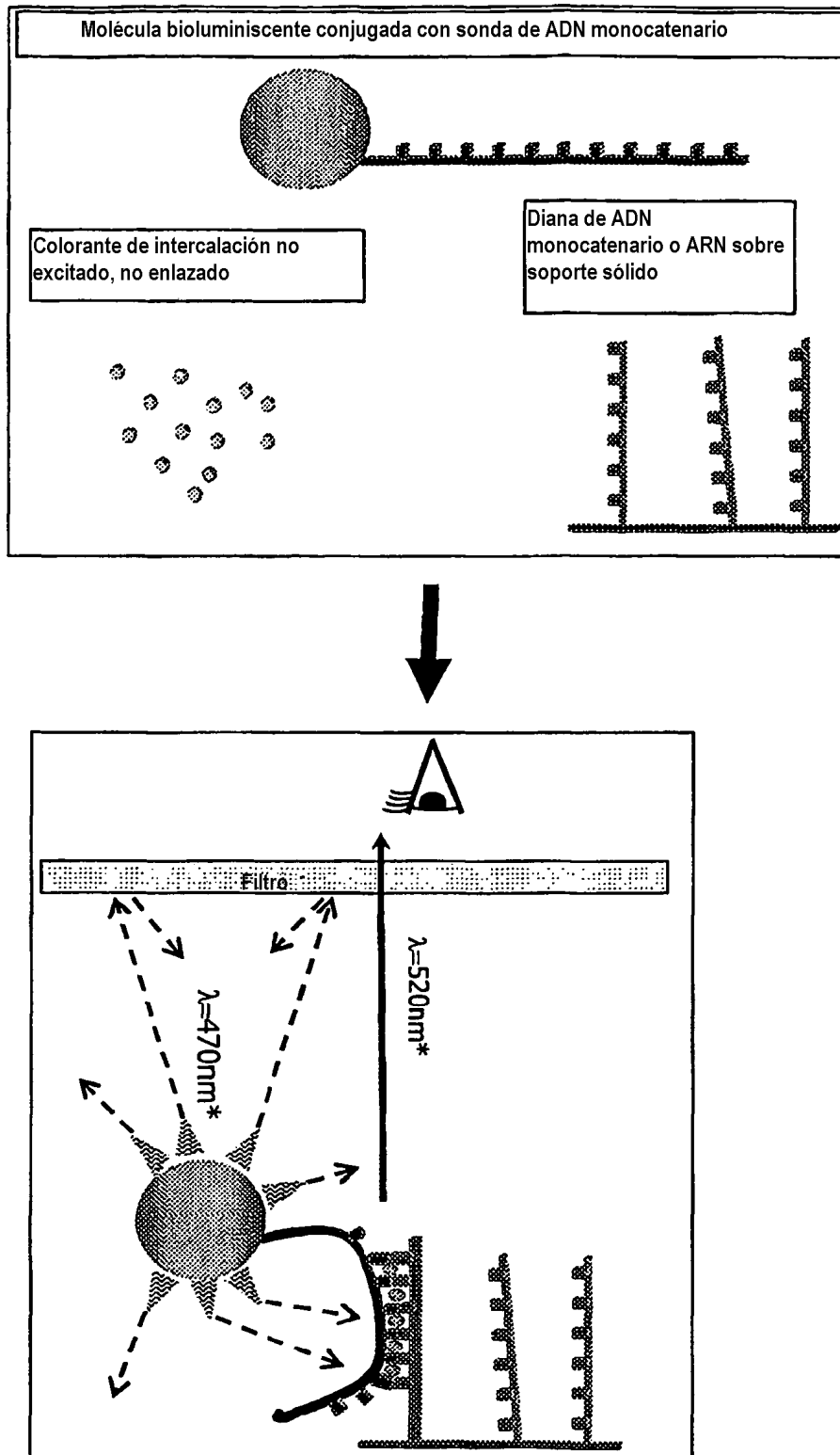


Figura 2 de 8

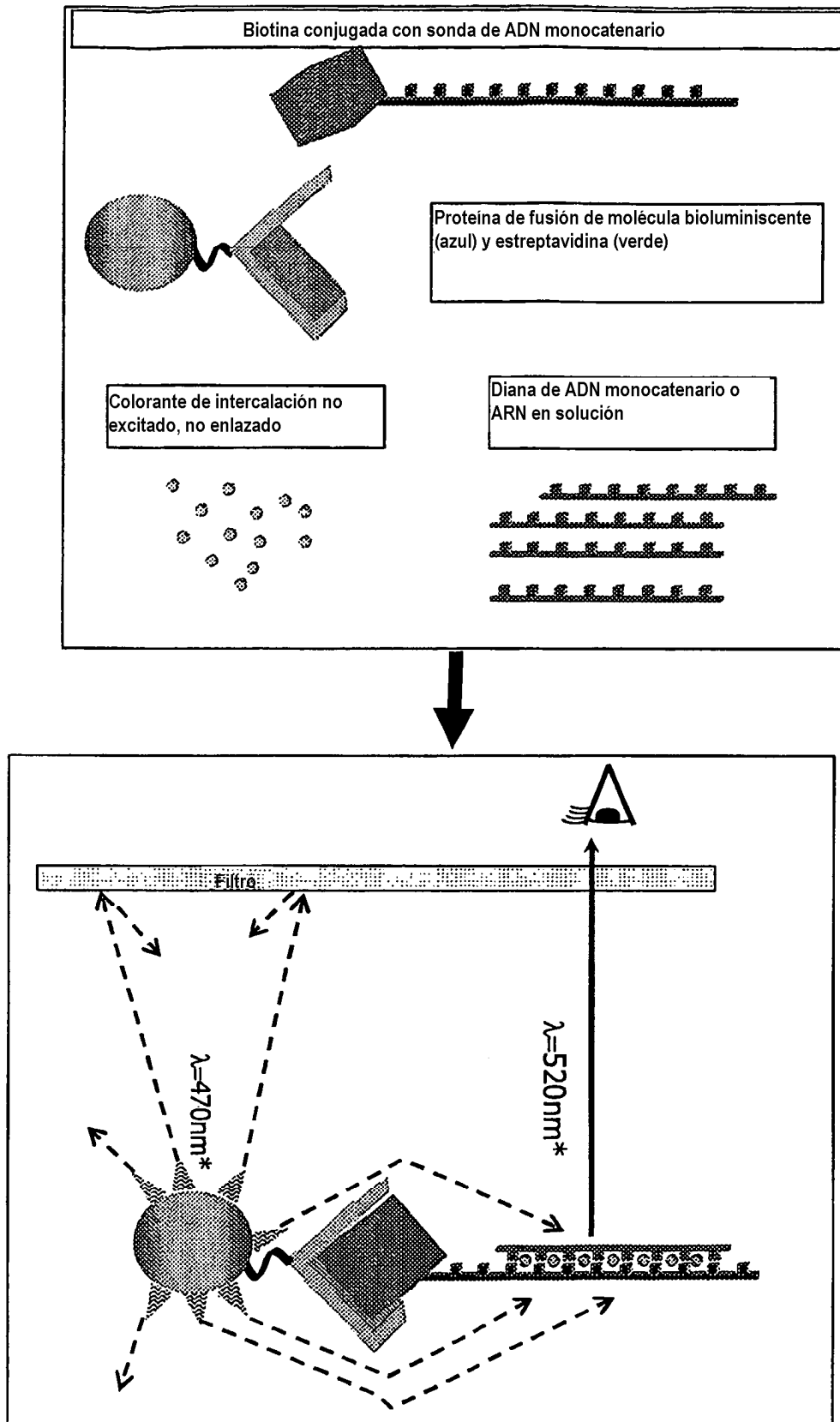


Figura 3 de 8

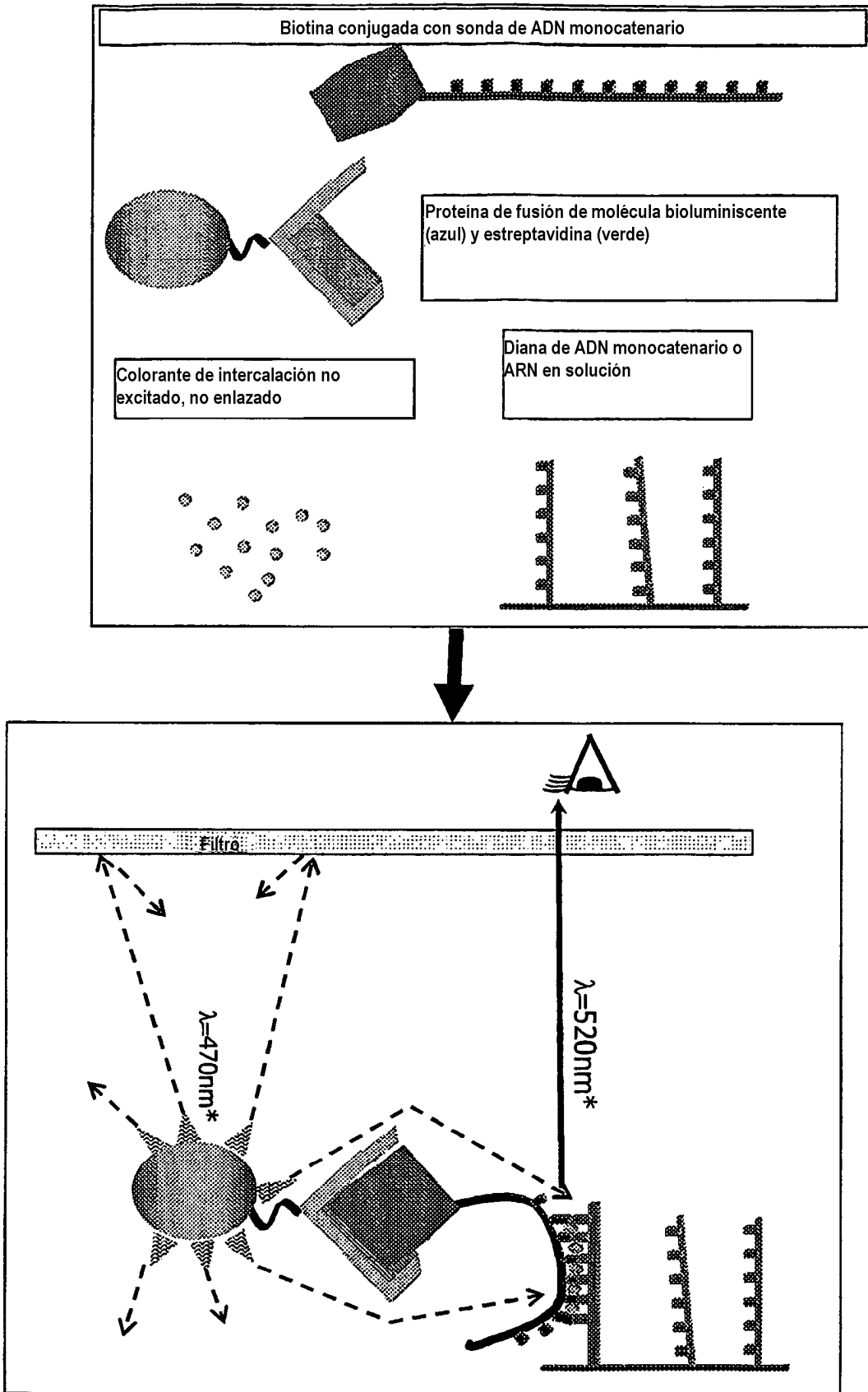
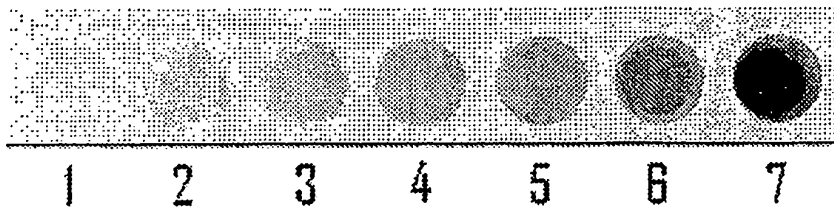


Figura 4 de 8

A.



B.

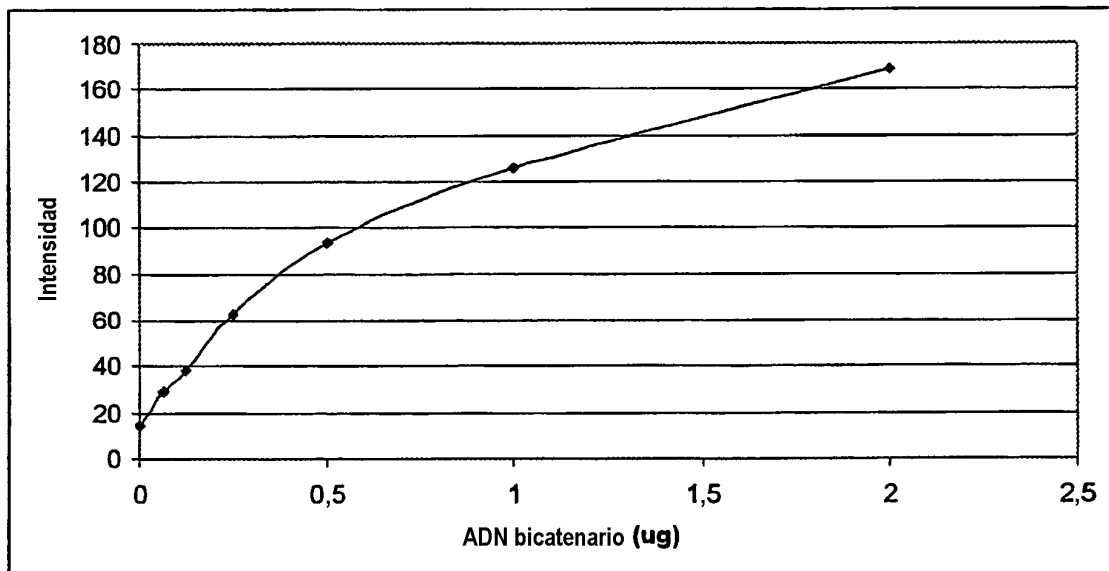
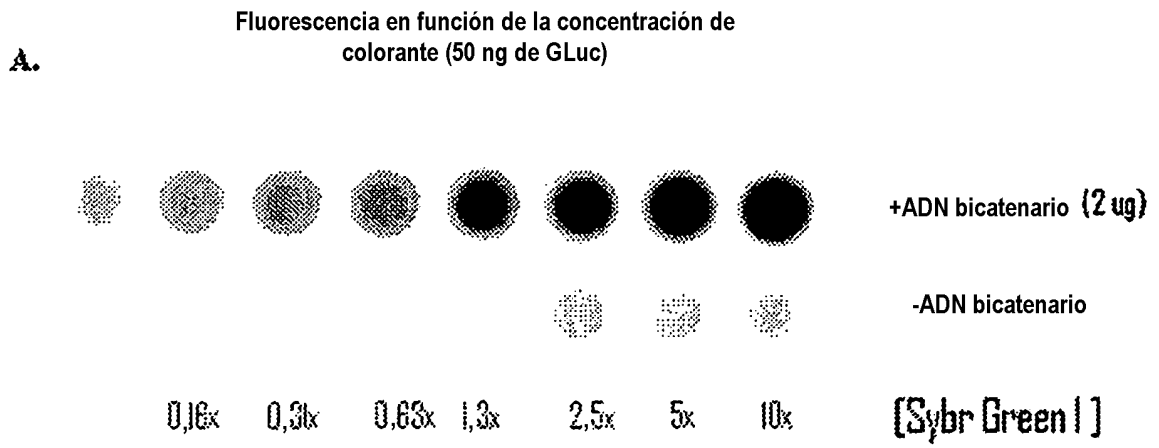


Figura 5 de 8



B.

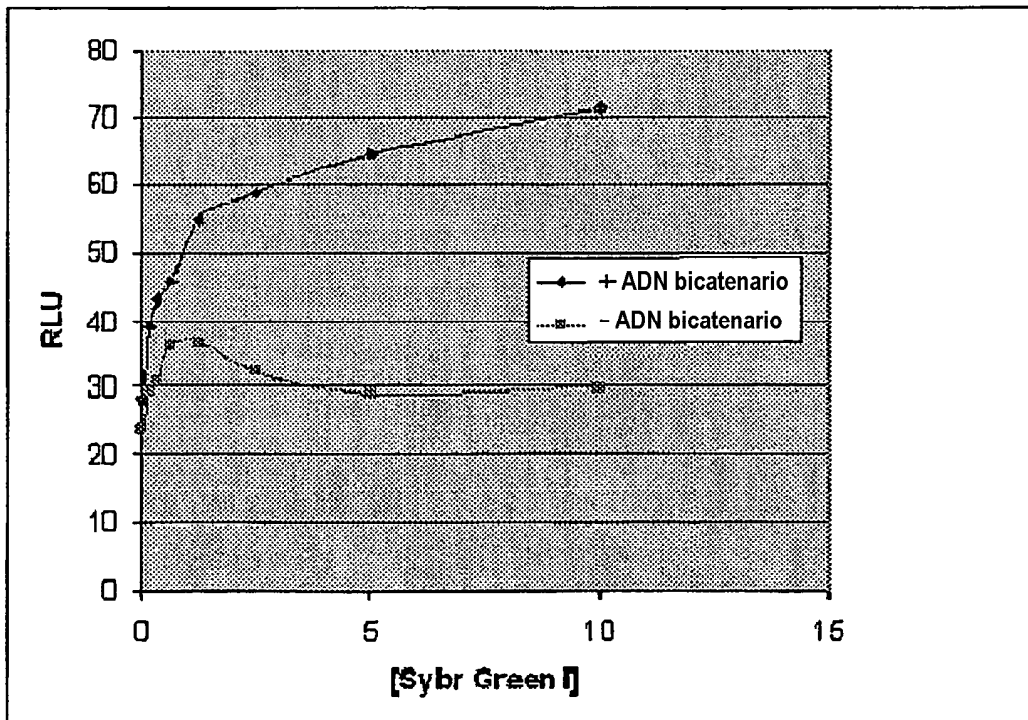
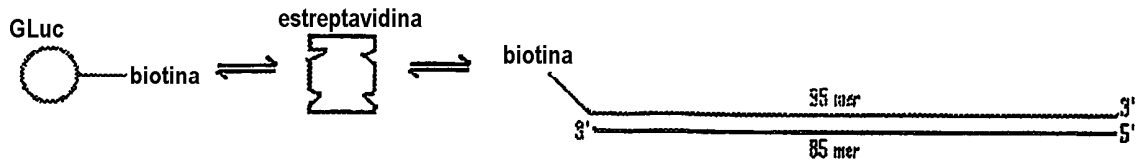


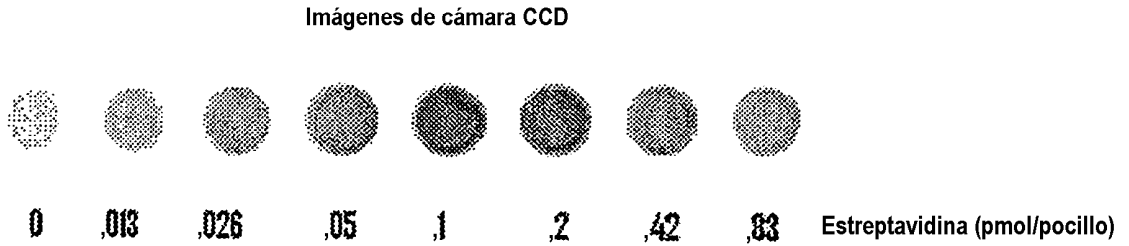
Figura 6 de 8

Figura 7 de 8

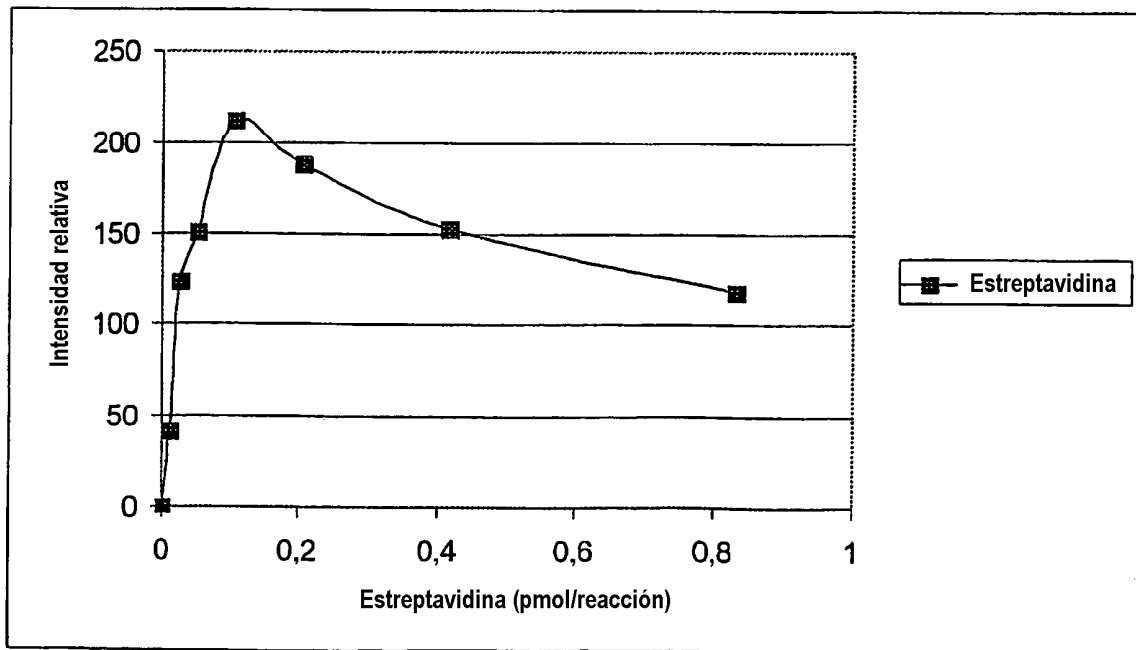
A.



B.



C.



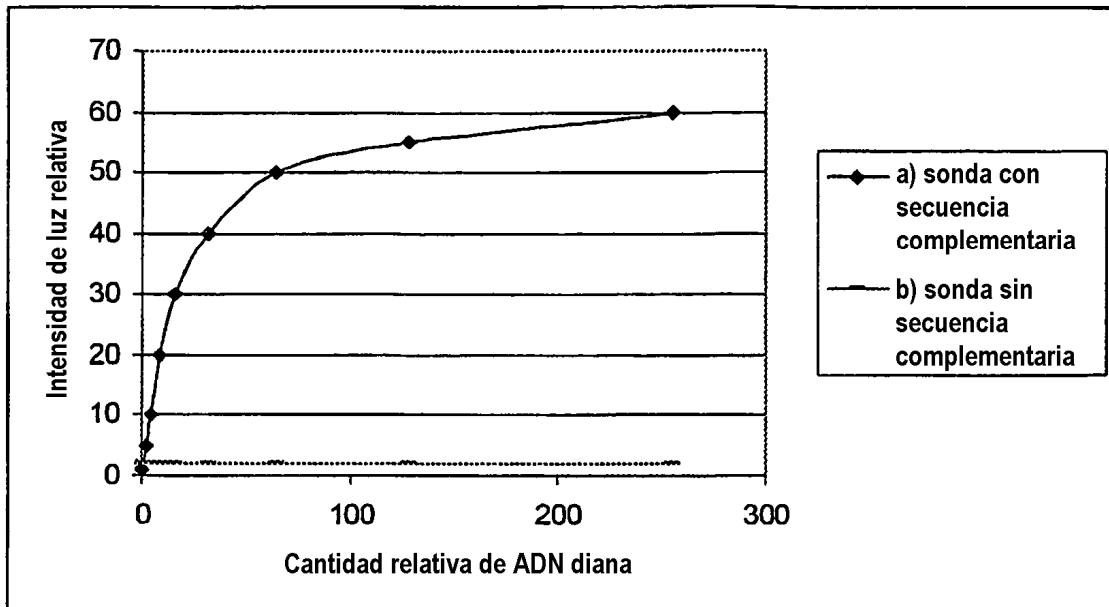


Figura 8 de 8