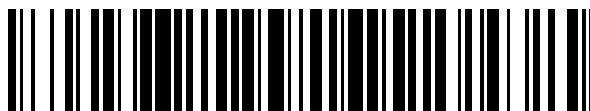


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 170**

51 Int. Cl.:

**B01L 7/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04725021 .2**

96 Fecha de presentación: **01.04.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1613771**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Sistema mejorado de PCR multicolor a tiempo real**

30 Prioridad:  
**04.04.2003 EP 03007458**  
**01.07.2003 EP 03014929**  
**07.08.2003 EP 03017561**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.07.2012**

73 Titular/es:  
**F. Hoffmann-La Roche AG**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**SAGNER, Gregor;**  
**BECHLER, Ingrid;**  
**BOLTE, Joachim;**  
**HEINDL, Dieter;**  
**JOSEL, Hans-Peter;**  
**GUTEKUNST, Martin;**  
**SEIBL, Rudolf y**  
**MUELLER, Christoph**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

ES 2 384 170 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

Sistema mejorado de PCR multicolor a tiempo real

## 5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la PCR a tiempo real. En concreto, la presente invención está dirigida hacia un instrumento para la realización de PCR multiplex a tiempo real.

## 10 Antecedentes de la invención

La amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica fundamental dentro de la biología molecular. El análisis de los ácidos nucleicos mediante la PCR requiere la preparación de la muestra, la amplificación y el análisis del producto. Pese a que la mayoría de las veces estos pasos se realizan secuencialmente, la amplificación y el análisis pueden llevarse a cabo simultáneamente. Antes de la amplificación, se pueden añadir a la mezcla de la PCR colorantes de DNA o sondas fluorescentes para analizar los productos de la PCR durante la amplificación. El análisis de la muestra tiene lugar simultáneamente a la amplificación, en el mismo tubo y dentro del mismo instrumento. Este enfoque combinado disminuye la manipulación de la muestra, ahorra tiempo y reduce en gran medida el riesgo de contaminación del producto para las siguientes reacciones, ya que no es necesario extraer las muestras de sus contenedores dosificados para el análisis posterior. El concepto de la combinación de la amplificación con el análisis del producto se conoce como PCR "a tiempo real". Ver, por ejemplo, la patente U.S. 6.174.670.

25 Inicialmente, la monitorización de la fluorescencia durante cada uno de los ciclos de la PCR implicaba la utilización de bromuro de etidio (Higuchi R, G Dollinger, PS Walsh y R. Griffith, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, Bio/Technology 10 (1992) 413-417; Higuchi R, C Fockler G Dollinger y R Watson, Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions, Bio/Technology 11 (1993) 1026-1030). En ese sistema, la fluorescencia se mide una vez por ciclo como medida relativa de la concentración del producto. El bromuro de etidio detecta DNA bicatenario; si el molde está presente, la intensidad de la fluorescencia se incrementa con el ciclado de la temperatura. Además, el número de ciclo en el que se detecta el primer aumento de intensidad de la fluorescencia incrementa de manera inversamente proporcional al logaritmo de la concentración inicial del molde. Se han desarrollado otros sistemas de fluorescencia que son capaces de proporcionar información adicional en relación a la concentración y a la secuencia del ácido nucleico.

35 En la PCR a tiempo real cinética, la formación de los productos de la PCR se monitoriza en cada ciclo de la PCR. La amplificación se mide habitualmente en termocicladores que contienen aparatos adicionales para la medición de señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación.

## 40 Instrumentación de la PCR a tiempo real

En la materia se conocen varios tipos de termocicladores de detección a tiempo real.

45 Por ejemplo, la patente PE 0 640 828, describe un aparato para la monitorización simultánea de la amplificación múltiple de ácidos nucleicos. Se caracteriza por tener un termociclador en forma de bloque metálico que incluye una porción conductora de calor que tiene múltiples hendiduras para poder acomodar una placa de múltiples pocillos, tal como una placa de microtitulación. La detección se obtiene mediante una cámara CCD configurada para detectar luz emitida (simultáneamente) por todos los pocillos mencionados. De forma alternativa, se sugiere la utilización de la fibra óptica. En relación a los colorantes fluorescentes que se utilizan, y de forma más importante, a la presencia de una rueda de filtros cerca de la cámara CCD, el sistema tiene la capacidad de analizar reacciones de amplificación multiplex, donde en una cámara de reacción se detectan uno o más amplicones diferentes mediante la utilización de 2 o más sondas de hibridación marcadas de forma diferente. Sin embargo, la patente PE 0 640 828 no anticipa ni sugiere qué marcadores o formatos de detección podrían utilizarse en tal enfoque multiplex/multicolor.

55 La patente US 6.015.674 describe un aparato y un sistema para la detección y cuantificación mediante PCR a tiempo real caracterizado por la capacidad de detectar el primer y el segundo indicadores de fluorescencia, que pueden utilizarse como marcadores para diferentes sondas de hibridación con el fin de detectar amplicones diferentes en el mismo recipiente de reacción. Sin embargo, la patente US 6.015.674 no describe un sistema para la realización de experimentos multiplex con un mayor grado de complejidad.

60 Otro ejemplo típico es el LightCycler de Roche Diagnostics (Nº de Cat. 2 0110468). Es un sistema de PCR rápido que permite la cuantificación cinética de la PCR en línea y el posterior análisis de las curvas de fusión de los productos de la PCR. El sistema óptico de la versión actual del LightCycler (1.2) que se encuentra comercialmente disponible contiene una fuente de luz, un diodo emisor de luz azul (LED de 470 nm), y tres canales de detección. Los productos de la amplificación se detectan mediante la utilización de sondas de hibridación marcadas con fluorescencia que sólo emiten señales fluorescentes cuando están unidas al ácido nucleico diana o, en algunos casos, mediante la utilización de colorantes fluorescentes que se unen a DNA bicatenario. Se define un umbral de

5 señal para cada reacción que va a analizarse y se determina el número de ciclos  $C_p$  que se requieren para alcanzar este valor umbral tanto para el ácido nucleico diana como para los ácidos nucleicos de referencia, tales como el gen constitutivo (*housekeeping* en inglés) o estándar. El número absoluto o relativo de copias de la molécula diana puede determinarse en base a los valores  $C_p$  obtenidos para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de referencia.

10 La fluorescencia emitida por la muestra se separa mediante un juego de espejos dicróicos y filtros en diferentes longitudes de onda que pueden registrarse en uno de los tres canales de detección (530 / 640 / 710 nm). Esto permite la detección del colorante SybrGreenI que se une a DNA bicatenario, la detección monocolor del formato de sonda TaqMan y la detección a color dual del formato de sondas de hibridación (HybProbe). Los detalles del sistema Lightcycler se describen en las patentes WO 97/46707, WO 97/46712 y WO 98/46714.

15 Una característica muy importante del instrumento LightCycler es el programa de compensación de color. En principio, este programa permite la cuantificación precisa y el análisis de las curvas de fusión mediante la corrección del solapamiento espectral de la radiación fluorescente monitorizada de manera dependiente de la temperatura. Los detalles técnicos se describen en la patente US 6.197.520.

20 De forma similar al sistema LightCycler, el termociclador de PCR a tiempo real Rotor-Gene de Corbett ([www.corbettresearch.com](http://www.corbettresearch.com)) es un sistema multiplex de 4 canales que incluye 4 LED diferentes como fuentes de excitación y sus fotodiodos correspondientes como unidades de detección de fluorescencia. Así, aunque al menos teóricamente, el hardware de este instrumento tiene la capacidad de llevar a cabo experimentos multiplex con hasta cuatro sondas de hibridación marcadas de forma diferente en un mismo recipiente de reacción, hasta la fecha no se ha publicado el protocolo respectivo para su aplicación exitosa.

25 Otro instrumento de PCR a tiempo real es el sistema de detección de PCR multicolor a tiempo real Biorad iQ (Nº Cat. 170-8740), que permite la excitación de un fluoróforo y la emisión desde los 400 nm a los 700nm. El sistema se basa en un bloque de calentamiento convencional con múltiples pocillos para el termociclado, una lámpara de tungsteno como fuente de excitación, una rueda de filtros para proporcionar longitudes de onda de excitación adecuadas, una segunda rueda de filtros para la selección de las longitudes de onda de emisión adecuadas y una cámara CCD como unidad de detección. El instrumento se ha utilizado con éxito en un ensayo multiplex para la detección de 4 amplicones diferentes generados a partir de dianas con concentraciones aproximadamente equimolares, utilizando cuatro sondas TaqMan marcadas de forma diferente, en el mismo recipiente de reacción (Pedersen, S., *Bioradiations* 107 (2001) 10-11).

35 En un enfoque adicional para aumentar las capacidades de multiplexado, la patente US 6.369.893 describe un instrumento de termociclado para PCR a tiempo real que incluye un primer ensamblaje de la óptica con al menos dos fuentes de luz y un segundo ensamblaje de la óptica que contiene al menos dos detectores para detectar y discriminar luz de diferentes longitudes de onda de emisión. En concreto, se describe una realización específica de 4 LED diferentes como fuentes de luz y 4 fotodiodos diferentes como detectores. De este modo, el instrumento descrito en la patente 6.369.893 puede utilizarse, en principio, para la detección mediante PCR a tiempo real con una amplia selección de colorantes fluorescentes diferentes conocidos en la materia. Sin embargo, la patente US 6.369.893 no anticipa ni sugiere ningún enfoque sobre cómo debe diseñarse un experimento multiplex que contiene múltiples sondas diferentes, cada una de las cuales está marcada con una entidad fluorescente diferente.

#### 45 Formatos de detección mediante PCR a tiempo real

En general, existen diferentes formatos para la detección a tiempo real de DNA amplificado, de entre las cuales las siguientes son las más utilizadas y conocidas en la materia:

##### 50 a) Formato de colorante que se une a DNA

55 Dado que habitualmente la cantidad de producto de amplificación bicatenario excede la cantidad de ácido nucleico originalmente presente en la muestra que se va a analizar, pueden utilizarse colorantes específicos para DNA bicatenario, que sólo muestran fluorescencia potenciada tras la excitación con una longitud de onda adecuada y cuando están unidos a DNA bicatenario. Preferiblemente, sólo se utilizan los colorantes que, como por ejemplo SybrGreenI, no afectan a la eficiencia de la reacción de PCR.

60 El resto de formatos conocidos en la materia requieren el diseño de una sonda de hibridación marcada con fluorescencia que sólo emite fluorescencia cuando se une a su ácido nucleico diana.

##### 60 b) Sondas TaqMan

65 Una sonda de hibridación monocatenaria se marca con dos componentes. Cuando el primer componente se excita con luz de una longitud de onda adecuada, se transfiere la energía absorbida a un segundo componente llamado bloqueador, de acuerdo con el principio de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Durante el

paso de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al DNA diana y se degrada mediante la actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa Taq durante la posterior fase de elongación. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el bloqueador se separan espacialmente el uno del otro y así se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente (US 5.538.848).

5

c) Balizas moleculares

10

Estas sondas de hibridación también están marcadas con un primer componente y con un bloqueador, y los marcadores están localizados preferiblemente en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran en vecindad espacial en solución. Tras la hibridación con los ácidos nucleicos diana, ambos componentes se separan el uno del otro de manera que, tras la excitación con luz a una longitud de onda adecuada, se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente (US 5.118.801).

15

d) Formato de sonda de marcaje único (SLP)

20

Este formato de detección consiste en un único oligonucleótido marcado con un único colorante fluorescente en el extremo 5' o bien en el extremo 3' (WO 02/14555). Pueden utilizarse dos diseños para el marcaje de los oligonucleótidos: sondas G-bloqueantes y sondas desbloqueantes de nitroindol.

25

En la realización de las sondas G-bloqueantes, el colorante fluorescente se adhiere a una C del oligonucleótido en el extremo 5' o 3'. La fluorescencia disminuye significativamente cuando la sonda se hibrida con la diana, siempre que dos G estén localizadas en la cadena diana enfrente de C y en posición uno junto a la sonda de oligonucleótido complementario.

30

En la realización con sondas desatenuantes de nitroindol, el colorante fluorescente se adhiere al nitroindol en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. El nitroindol, de algún modo, disminuye la señalización fluorescente de la sonda libre. La fluorescencia aumenta cuando la sonda se hibrida con el DNA diana gracias al efecto desatenuante.

35

e) Sondas de hibridación FRET

40

El formato de ensayo con sondas de hibridación FRET es especialmente útil para todos los tipos de ensayos de hibridación homogéneos (Matthews, J.A., y Kricka, L.J., *Analytical Biochemistry* 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por un par de sondas de hibridación monocatenarias que se utilizan simultáneamente y que son complementarias a puntos adyacentes de la misma cadena del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas se marcan con componentes fluorescentes diferentes. Cuando se excitan con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente de acuerdo con el principio de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, de tal modo que se puede medir la emisión de fluorescencia del segundo componente cuando ambas sondas de hibridación se unen en posiciones adyacentes de la molécula diana que se va a detectar.

45

Cuando se hibridan en la secuencia diana, las sondas de hibridación deben situarse muy cerca la una de la otra, en una configuración de cabeza a cola. Habitualmente, el espacio entre el extremo 3' marcado de la primera sonda y el extremo 5' marcado de la segunda sonda es tan pequeño como es posible, es decir de 1 a 5 bases. Esto permite una vecindad cercana del componente donador FRET y el componente aceptor FRET, que típicamente es de 10-100 ångströms.

50

De forma alternativa a la monitorización del aumento en la fluorescencia del componente aceptor FRET, también se puede monitorizar la disminución de fluorescencia del componente donador FRET como medida cuantitativa del fenómeno de hibridación.

55

En particular, el formato con sondas de hibridación FRET puede utilizarse en la PCR a tiempo real con el fin de detectar el DNA diana amplificado. De entre todos los formatos de detección conocidos en la materia de la PCR a tiempo real, el formato con sondas de hibridación FRET ha demostrado ser altamente sensible, exacto y fiable (WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714). Sin embargo, el diseño de secuencias de sondas de hibridación FRET puede limitarse, a veces, por las características especiales de la secuencia de ácido nucleico diana que se va a detectar.

60

Como alternativa a la utilización de dos sondas de hibridación FRET, también se puede utilizar un cebador marcado con fluorescencia y sólo una sonda de oligonucleótidos marcada (Bernard, P. S., et al., *Analytical Biochemistry* 255 (1998) 101-107). En este sentido, se puede escoger arbitrariamente si el cebador se marca con un componente donador FRET o con un componente aceptor FRET.

65

Además de en la PCR y en la PCR a tiempo real, las sondas de hibridación FRET se utilizan para el análisis de las curvas de fusión. En tal ensayo, primero se amplifica el ácido nucleico diana en una reacción PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación pueden estar ya presentes durante la reacción de

amplificación o añadirse posteriormente. Tras la finalización de la reacción de PCR, se aumenta constitutivamente la temperatura de la muestra y se detecta la fluorescencia siempre que la sonda de hibridación estuviese unida al DNA diana. A la temperatura de fusión, las sondas de hibridación se separan de sus dianas y la señal fluorescente disminuye inmediatamente hasta el nivel basal. Esta disminución se monitoriza con un gráfico de tiempo de fluorescencia contra temperatura adecuado de manera que se puede calcular un primer valor derivado, en el cual podemos observar la máxima disminución de fluorescencia.

Existen muchos pares de colorantes fluorescentes diferentes conocidos en la materia que, de acuerdo con la invención, son capaces de actuar conjuntamente como un par donador FRET/aceptor FRET. Sin embargo, con anterioridad a la presente invención, no se ha descrito ningún ejemplo funcional caracterizado por utilizar 4 pares FRET diferentes con éxito en un ensayo de detección multiplex. Entre otras razones, esto puede deberse a la falta de instrumentación apropiada y, más aún, al hecho que la funcionalidad del proceso FRET de un par FRET específico se ve interferida por otros compuestos fluorescentes que están presentes en la misma mezcla de la reacción.

Como se expone con anterioridad, existen diferentes instrumentos termocicladores de detección a tiempo real que tienen un máximo de 4 canales detectores para la detección multiplex/multicolor. Sin embargo, hasta la fecha la utilidad de todos esos instrumentos para la detección multiplex ha estado muy limitada debido a que los intentos de establecer ensayos multiplex multicolor con varias (al menos más de dos) sondas marcadas de forma diferente, con una sensibilidad y especificidad suficientes no han tenido éxito.

Consecuentemente, el objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema mejorado que permite un diseño optimizado a la par que flexible de experimentos de detección multiplex/multicolor. En un aspecto, el problema que se ha de resolver se relaciona con las mejoras en el diseño de sondas de hibridación adecuadas. En otro aspecto, el problema que se ha de resolver se relaciona con la mejora de la instrumentación.

Breve descripción de la invención:

La nueva invención está dirigida hacia un instrumento de PCR a tiempo real que incluye

- exactamente una fuente de luz monocromática, donde la fuente de luz monocromática es un LED que emite a 470 nm,
- 6 entidades detectoras de fluorescencia, cada una de las cuales tiene longitudes de onda de detección central a 530, 555, 610, 640, 670 y 710 nm +/- 5 nm,
- múltiples recipientes de reacción para contener la mezcla de la reacción,
- medios de calentamiento y refrigeración,
- un tubo de luz y 6 haces de fibra de vidrio,

que se caracterizan porque dichas entidades detectoras son capaces de

- detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia máxima de al menos 4 pares de sondas de hibridación FRET marcadas de manera diferente,
- detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia máxima de al menos 2 sondas de hibridación TaqMan marcadas de manera diferente, y
- detectar la emisión de fluorescencia máxima de SybrGreenI y

que las unidades de excitación y detección están separadas mecánicamente y conectadas a un haz de fibras de seis haces, donde cada haz único de fibra de vidrio de 50 µm transmite la luz a cada uno de los seis canales de detección.

Se entiende que, aunque el instrumento es capaz de detectar la emisión de fluorescencia de los formatos FRET, TaqMan y SybrGreen, el término "simultáneamente" hace referencia a que dentro del mismo protocolo de termociclado (es decir, en un ciclo del instrumento) se detectan o bien al menos 4 sondas de hibridación FRET marcadas de forma diferente o bien al menos 2 sondas TaqMan diferentes o bien se detecta SybrGreenI.

El instrumento puede incluir al menos 24, más preferiblemente 32, y lo más preferible 48 de dichos recipientes de reacción.

Cada recipiente de reacción puede caracterizarse porque la excitación fluorescente mediante dicha fuente de luz fluorescente y la monitorización de la fluorescencia mediante dichas entidades detectoras de fluorescencia se obtienen a lo largo del mismo eje de dicho recipiente de reacción.

Se ha demostrado que es particularmente ventajoso que la fuente de luz y dichas entidades detectoras estén localizadas en emplazamientos separados.

También se ha demostrado que es particularmente ventajoso que dichos medios de calentamiento y refrigeración sean medios de líquido forzado o gas forzado, preferiblemente medios de aire forzado.

Además, se ha demostrado que es particularmente ventajoso que los recipientes de reacción estén fijados a un carrusel rotatorio.

- 5 Descripción detallada de la invención:
- A) Instrumento
- 10 Se describe un instrumento adecuado para la realización de PCR a tiempo real. De manera opcional, el instrumento también es adecuado para el análisis de las curvas de fusión, es decir, la monitorización de la unión dependiente de temperatura de una entidad que se une a DNA, tal como una sonda de hibridación o un colorante que se une a DNA bicatenario.
- 15 El instrumento consiste básicamente en una parte óptica y un medio para el termociclado que puede someter múltiples soluciones de amplificación en sus respectivos recipientes de reacción a un proceso de termociclado repetido, de tal manera que puede tener lugar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 20 El instrumento de PCR a tiempo real descrito incluye:
- al menos 1 fuente de luz, preferiblemente un diodo emisor de luz
  - al menos 4, y preferiblemente 5-6 entidades detectoras de fluorescencia, cada una de las cuales tiene longitudes de onda de detección central que se diferencian entre sí por al menos 25 y, preferiblemente, al menos 30 nm,
- 25 caracterizado porque dichas entidades detectoras son capaces de
- detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia máxima de al menos 3, preferiblemente 4, y lo más preferible 5 pares de sondas de hibridación FRET marcadas de manera diferente,
  - detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia máxima de al menos 2 sondas de hibridación TaqMan marcadas de manera diferente, y
  - detectar la emisión de fluorescencia máxima de SybrGreenI
  - medios para calentar y enfriar, y
  - múltiples recipientes de reacción para contener una mezcla de reacción.
- 30
- 35 El instrumento de PCR a tiempo real descrito incluye exactamente una fuente de luz.
- Los medios para el termociclado pueden escogerse arbitrariamente. Por ejemplo, pueden utilizarse cicladores en forma de bloque metálico conocidos en la materia. No obstante, es ventajoso que los medios para el termociclado proporcionen medios para el calentamiento activo así como medios independientes para la refrigeración activa.
- 40 Además, se ha demostrado que es particularmente ventajoso que dichos medios de calentamiento y refrigeración sean medios de líquido forzado o gas forzado, tales como el aire forzado.
- Dichos medios para el termociclado son capaces de llevar a cabo un termociclado rápido como en el caso de la tecnología LightCycler (WO 97/46712). Como se puede deducir de la patente WO 97/46712, esta tecnología se basa
- 45 en un calentamiento a base de aire forzado caracterizado porque el aire del ambiente se calienta mediante una resistencia en espiral; y un refrigerado a base de aire forzado caracterizado por proporcionar aire del ambiente.
- La utilización de tubos capilares como recipientes de reacción es una mejora adicional respecto al termociclado rápido debido a su relación superficie/volumen comparativamente superior. Los inventores han demostrado que los tubos capilares con un diámetro externo de menos de 5 mm, preferiblemente de menos de 3,2 mm y lo más preferible de menos de 1,6 mm son especialmente ventajosos, ya que permiten obtener mezclas de reacción que tienen volúmenes totales de entre 10 y 100 µl que además pueden someterse a un protocolo de termociclado rápido con un tiempo de reacción de menos de dos minutos por ciclo. Además, cada recipiente de reacción tiene que fabricarse completamente, o al menos de forma parcial, a partir de un material ópticamente claro tal como el vidrio o
- 50 el plástico.
- El posicionamiento de cada recipiente de reacción (tubo capilar) en una posición de monitorización se caracteriza preferiblemente por que la excitación fluorescente y la monitorización se llevan a cabo a lo largo del mismo eje en dicho recipiente de reacción. Tal principio potencia la señalización a causa del fenómeno de reflectancia interna total.
- 60 Se ha demostrado que es particularmente ventajoso que los recipientes de reacción estén fijados a un carrusel rotatorio con tal de generar perfiles de termociclado uniformes entre los múltiples recipientes de reacción.

Básicamente, la parte óptica del instrumento consiste en una unidad de excitación con una o más fuentes de luz adecuadas con el fin de excitar el(los) componente(s) fluorescentes presentes en las soluciones de reacción; y en una unidad de detección para detectar la emisión fluorescente de dichos recipientes de reacción.

5 De acuerdo con la patente WO 97/46712, es posible construir un sistema óptico en el que las unidades de excitación y detección están colocadas en una localización habitual, siempre y cuando se utilicen un número apropiado de espejos dicróicos. No obstante, resultó ser ventajoso que la unidad de excitación, que incluye las fuentes de luz, y la  
10 unidad de detección, que incluye las entidades detectoras, se localizaran en emplazamientos separados, dando como resultado un instrumento de PCR a tiempo real mejorado que incluye dos unidades ópticas separadas.

10 Para la unidad de excitación se puede utilizar bien la excitación monocromática o la excitación policromática. Para la excitación monocromática se puede utilizar bien un LED (diodo de emisión de luz) monocromático o bien un láser monocromático. También es posible utilizar instrumentos con dos o más LED o láseres monocromáticos siempre  
15 que se utilicen de uno en uno en una medición individual. Para la excitación policromática se puede utilizar un LED blanco, una lámpara halógena o una lámpara de xenón. En este caso es necesaria la instalación en el instrumento de o bien una rueda de filtros o bien otro método para la movilización adecuada de los filtros dentro y fuera del haz de excitación, de tal forma que se puedan proporcionar longitudes de onda de excitación selectiva diferentes.

20 Las características ópticas de la unidad de excitación se seleccionan de acuerdo con diversos parámetros que deben ser considerados:

25 En primer lugar, la longitud de onda de excitación más corta debería de ser mayor a 360 nm, y preferiblemente mayor de 400 nm, ya que la radiación de longitud de onda corta tiene tasas de transmisión comparativamente baja a través del material óptico de utilización convencional que se utiliza en los recipientes de reacción de la PCR a tiempo real, tal como el vidrio o el plástico. Además, la excitación con longitudes de onda mayores, por ejemplo las del rango de los 400-500 nm, evita la interferencia con la fluorescencia intrínseca del material de los recipientes de  
reacción, que podría perturbar la monitorización de la reacción.

30 En una realización preferible de la invención, la unidad de excitación consiste en una única fuente de luz, ya que, de acuerdo con la presente invención, es posible llevar a cabo una detección multiplex en una PCR a tiempo real incluso con una única fuente de luz. Además, es posible llevar a cabo una detección multiplex en una PCR a tiempo real incluso con una única fuente de luz monocromática.

35 En una realización, la unidad de excitación incluye un LED azul que emite a 470 nm. La figura 1 muestra los espectros de excitación de los diferentes colorantes fluorescentes que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención. De entre estos colorantes, la fluoresceína (utilizada frecuentemente como un componente donador FRET o como colorante marcador TaqMan), conocida por los expertos en la materia, puede excitarse con un único diodo emisor de luz que tiene una longitud de onda de excitación de 470 nm, mientras que los colorantes aceptores FRET  
40 frecuentemente utilizados sólo se excitan ligeramente con un LED de 470 nm.

Además, para la excitación de otros componentes donadores FRET que tienen un máximo de excitación más corto en comparación con la fluoresceína se puede utilizar, de manera opcional, un segundo LED-UV que emite entre 400 y 430 nm, preferiblemente a 415 nm.

45 De manera más precisa, el LED azul de 470 nm es capaz de excitar la fluoresceína, que se utiliza en el formato HybProbe como colorante donador en combinación con 4 colorantes marcadores aceptores diferentes. Por otro lado, los colorantes aceptores FRET comunes, tales como LC-Red-640 o Cy5, sólo se excitan ligeramente con el LED de 470 nm. El LED azul también puede excitar los colorantes marcadores FAM y HEX o VIC en los ensayos TaqMan en color dual. Además, la fluoresceína se utiliza como colorante marcador en el formato de sonda de marcaje único (SLP).  
50

Además, el LED azul se utiliza para excitar el SybrGreen1 para la detección de los productos de la amplificación no basada en sondas.

55 El LED-UV opcional puede utilizarse en el formato HybProbe para excitar un colorante donador de longitud de onda corta en combinación con colorantes marcadores adecuados que emiten fluorescencia a longitudes de onda comparativamente cortas. Además, puede incluirse un tercer LED que emite a 580 nm.

60 De acuerdo con la invención, para la unidad de detección pueden utilizarse diferentes métodos de detección conocidos en la materia. Por ejemplo, es habitual en la materia la utilización de varios fotodiodos caracterizados porque cada uno de ellos es capaz de detectar luz fluorescente a una longitud de onda específica. Se describe un sistema de detección que tiene exactamente cinco o seis canales que utilizan fotodiodos como detectores. Como se mostrará más adelante, esto ya permite la detección simultánea de 4 colores mediante sondas de hibridación FRET.

65 Las características ópticas de la unidad de detección se seleccionan de acuerdo con los diferentes parámetros siguientes:

5 En primer lugar, la longitud de onda de emisión más larga que debería detectarse es aproximadamente menor a los 800 nm, y preferiblemente menor de 730 nm, ya que la detección de señales de longitud de onda mayores se ve afectada por una posible radiación de fondo infrarroja que procede presuntamente de la parte de calentamiento del instrumento. Además, los colorantes infrarrojos de longitud de onda larga conocidos en la materia tienen un rendimiento cuántico subóptimo, son menos estables y, por consiguiente, más difíciles de unir a la sonda de hibridación deseada.

10 Como resultado, los diferentes canales de detección deben tener máximos de detección central de entre 500 y 800 nm, y preferiblemente entre 520 y 730 nm. En este contexto, la figura 2 muestra los espectros de emisión para los diferentes colorantes fluorescentes que pueden utilizarse.

15 Dentro del rango de entre 500 y 800 nm, los canales de detección pueden definirse exactamente mediante la selección de filtros apropiados por los que el haz de luz tiene que pasar antes de entrar en el fotodiodo respectivo. Para una selección adecuada, los inventores han identificado que deben considerarse los siguientes parámetros:

20 En primer lugar, el máximo de detección de longitud de onda central de cada canal debería escogerse de manera dependiente a los máximos espectros de emisión de los colorantes fluorescentes que deben detectarse predominantemente. Como norma general, para una sensibilidad de detección adecuada, el máximo de la emisión fluorescente proveniente del colorante a detectar no debería diferir en más de +/-10nm de la longitud de onda detectada centralmente en cada canal.

25 Además, todos los canales de detección deberían ser capaces de detectar emisiones discretas, es decir, el solapamiento del espectro debería minimizarse tanto como fuese posible. En este sentido, es ventajoso que la mitad de los anchos de banda de cada canal sea de 40 nm o menos. Más ventajosamente, la mitad de los anchos de banda de cada canal es de 20 nm o menos.

30 Preferiblemente, la diafonía de los fluoróforos que se detecta en los canales colindantes es menor al 70%, más preferiblemente menor al 50% y lo más preferible menor al 30%. En este sentido, otro criterio importante es el valor de bloqueo, que es indicativo de la intensidad máxima que se detecta fuera del rango de transmisión especificado del canal (filtro). Preferiblemente, este valor es menor a  $10^{-3}$ .

35 Basado en este criterio, se ha demostrado que es ventajoso que las longitudes de onda detectadas centralmente en cada uno de los 5-6 canales estén separadas entre ellas por más de 25 nm, y preferiblemente, incluso por más de 30 nm.

40 Dichas longitudes de onda detectadas centralmente pueden seleccionarse de un grupo de rangos de longitudes de ondas que incluye los rangos 520-540 nm, 545-565 nm, 570-590 nm, 600-620 nm, 630-650 nm, 660-680 nm, y 700-720 nm.

45 Además, en un ejemplo específico que incluye 6 canales de detección, dichos canales tienen longitudes de onda detectadas centralmente a alrededor de los 530, 580, 610, 640, 670, y 710 nm +/- 5 nm o 530, 555, 610, 640, 670, y 710 nm +/- 5 nm o preferiblemente +/-2nm.

50 Si se utilizan 5 canales detectores, dichos canales tienen longitudes de onda detectadas centralmente a alrededor de los 530, 610, 640, 670, y 710 nm +/- 5nm o preferiblemente +/-2nm.

55 Si se utilizan 4 canales detectores, dichos canales tienen longitudes de onda detectadas centralmente a alrededor de los 610, 640, 670, y 710 nm +/- 5 nm o preferiblemente +/-2nm.

60 A modo de ejemplo, la figura 3 muestra los 6 canales de detección de una realización preferible y los espectros de emisión de los diferentes colorantes fluorescentes que pueden utilizarse. En esta realización, los seis canales están separados por una distancia espectral de al menos 25 nm con tal de minimizar la diafonía de cada colorante marcador sobre los canales de detección colindantes. La unidad de detección es capaz de detectar el SybrGreen1 y el colorante marcador de TaqMan, fluoresceína/FAM, en el canal que tiene su máximo de detección de longitud de onda central alrededor de los 530 nm. Además, preferiblemente el sistema es capaz de detectar HEX/VIC en un segundo canal alrededor de los 560 nm. Adicionalmente, los canales de detección de longitud de onda larga son capaces de detectar colorantes aceptores HybProbe y, de forma opcional, colorantes marcadores SLP de longitud de onda larga.

65 Las unidades de excitación y detección están conectadas mediante un haz de fibras múltiple. La luz emitida por los recipientes de reacción (por ejemplo, tubos capilares de vidrio) se distribuye homogéneamente utilizando un cable de fibra óptica y se transmite a seis haces de fibra de vidrio. Estas fibras de vidrio únicas de 50  $\mu$ m transmiten la luz a cada uno de los seis canales de detección.



- Esta configuración, con la unidad de excitación y la unidad de detección colocadas en emplazamientos separados proporciona dos ventajas en comparación a la unidad óptica, tal y como se describe en la patente WO 97/46712: Distribución homogénea de la luz emitida en los seis canales de detección y separación mecánica de las unidades de excitación y detección. Esto permite que se monitorice el posicionamiento altamente preciso de la unidad de excitación respecto a los recipientes de reacción (por ejemplo, la punta de los tubos capilares) sin mover la unidad de detección. Además, se minimiza el número mínimo de espejos dicróicos necesarios. Se muestra un ejemplo de tal configuración en la figura 4. Como puede observarse, las unidades de excitación y detección se localizan en emplazamientos diferentes.
- Además, el sistema incluye una herramienta de compensación del color, tal y como se describe en la patente US 6.197.520. El programa correspondiente permite la medición de la fluorescencia a lo largo de un rango de temperaturas y la corrección del solapamiento espectral dependiente de temperatura de los seis canales detectores descritos con anterioridad.
- En principio esto se logra
- proporcionando soluciones calibradoras para cada entidad fluorescente que se incorpora al experimento multiplex que va a realizarse
  - monitorizando la fluorescencia dependiente de temperatura de cada una de dichas soluciones en cada uno de los canales detectores con el fin de determinar la cantidad de diafonía dependiente de temperatura entre los diferentes canales, y
  - generando un conjunto de datos de la compensación del color que incluye los valores correctores.
- B) Formatos de ensayo y selección de los colorantes
- En el contexto de la presente invención, el término "PCR multiplex" hace referencia a una reacción de PCR caracterizada del tal manera que se generan 2 o más productos de amplificación diferentes mediante la utilización de 2 o más pares de cebadores de amplificación en la misma reacción de PCR.
- También en el contexto de la presente invención, el término "PCR multicolor a tiempo real" se define como un ensayo de PCR a tiempo real caracterizado de tal manera que se detectan 1 o más productos de amplificación diferentes generados o bien en una PCR multiplex o bien en una PCR monoplex (utilizando solamente un par de cebadores de amplificación) mediante la utilización de sondas de hibridación marcadas de forma diferente.
- Un aspecto principal de la presente descripción se basa en la utilización de reactivos de hibridación marcados de forma diferente, donde cada reactivo incluye un par de sondas de hibridación FRET que contienen un par de colorantes fluorescentes que interactúan entre sí bajo el principio de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Los pares de colorantes adecuados se pueden seleccionar para el marcaje de un reactivo de hibridación que puede utilizarse para la detección en, al menos, tres o cuatro, y preferiblemente en tantos canales de detección como sea posible.
- De manera más precisa, tal reactivo de hibridación está compuesto por dos oligonucleótidos adyacentemente hibridantes, marcados adecuadamente de tal manera que conjuntamente pueden actuar de acuerdo con el formato de detección FRET-HybProbe tal y como se describe en las patentes WO 97/46707, WO 97/46712, y WO 97/46714. En muchos casos, es suficiente si los reactivos de hibridación consisten en un único oligonucleótido o, en caso del formato FRET-HybProbe, en un par de oligonucleótidos que actúan conjuntamente como sonda donadora y como sonda aceptora. Sin embargo, en otros casos pueden existir muchas otras variantes de secuencia en las secuencias diana que se deben detectar. Consecuentemente, puede ser imposible detectar las secuencias de todos los miembros mediante la mera utilización de un par de sondas de hibridación de oligonucleótidos FRET.
- Para estos casos, un reactivo de hibridación puede consistir en 1, 2 o más sondas de hibridación, que son similares y que se unen a secuencias homólogas pero que difieren entre sí en 1, 2, 3 o más permutas, deleciones o adiciones de mono-, di- o trinucleótidos. En el caso del reactivo de hibridación que forma parte de un par de sondas de hibridación FRET, dicho reactivo de hibridación puede consistir en 1, 2, 3, o más sondas de oligonucleótidos donadoras FRET y/o 1, 2, 3, o más sondas de oligonucleótidos aceptoras. En este caso, todas las sondas donadoras pueden ser similares pero difieren entre sí en permutas, deleciones o adiciones de mono-, di- o trinucleótidos. Asimismo, todas las sondas aceptoras pueden ser similares pero difieren entre sí en permutas, deleciones o adiciones de mono-, di- o trinucleótidos.
- Además, también se describe la detección multicolor FRET realizada de tal manera que un miembro de dicho par de sondas de hibridación marcadas se reemplaza por un cebador marcado adecuadamente, tal y como se describe en Bernard, P. S., et al., *Analytical Biochemistry* 255 (1998) 101-107. Además, también se describe la realización en la que se monitoriza la disminución en la emisión fluorescente de uno, varios o todos los componentes donadores

FRET como indicador de la presencia del ácido nucleico diana a detectar, en vez de monitorizar el incremento en la emisión fluorescente del componente aceptor.

5 Además de las diversas posibilidades de la realización de la detección multicolor basada en el principio FRET, el sistema también permite la realización de otros formatos de detección tales como la detección del ácido nucleico diana mediante SybrGreenI, la detección multiplex utilizando balizas moleculares marcadas de forma diferente, las sondas de marcaje único o la detección TaqMan a color dual. Como se conoce en la materia, los ensayos TaqMan a color dual pueden basarse en la utilización de Cy5 (Amersham) como compuestos bloqueantes (quenchers) en combinación con FAM como primer colorante marcador estándar, y HEX o, alternativamente, VIC como un segundo componente marcador.

10 En principio, existen múltiples posibilidades en las combinaciones de colorantes fluorescentes que conjuntamente pueden actuar como un par FRET (Revisión: Resonance Energy Transfer Editors: Meer, B Wieb van der et al., VCH Publishers INC., 1994). No obstante, basándose en las precondiciones instrumentales, para un experto en la materia no es un hecho trivial el desarrollo de un ensayo multicolor que combina múltiples reactivos de hibridación FRET que no interfieren entre sí de manera que no se afecta la sensibilidad y/o la especificidad de un experimento respectivo de PCR a tiempo real.

15 Con respecto a la selección de pares adecuados de sondas de hibridación FRET, por ejemplo, los colorantes utilizados para los donadores FRET y los aceptores FRET no pueden escogerse arbitrariamente, sino que tienen que cumplir al menos los siguientes requerimientos:

- 20 • solubilidad y capacidad de acoplarse a un oligonucleótido suficientes
- 25 • estabilidad de los colorantes bajo las condiciones de termociclado de la PCR
- intensidad de emisión y producción cuántica reproducibles y suficientes
- 30 • intensidad de emisión poco dependiente de la temperatura
- esencialmente, ausencia de cambios espectrales bajo condiciones químicas diferentes
- 35 • esencialmente, ausencia de cambios espectrales cuando se unen a secuencias de oligonucleótidos diferentes
- máximos de emisión espectral discretos
- disponibilidad de un colorante asociado adecuado para la realización de un proceso FRET.

40 Como consecuencia, un aspecto importante del sistema aquí descrito se centra en la identificación de múltiples pares de colorantes de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) que pueden utilizarse en el formato HybProbe para tantos canales de detección como sea posible. Los espectros de excitación y emisión de los pares de colorantes FRET que permiten una configuración de detección multicolor 4- o 5-plex se muestran en las figuras 1-3. Las alternativas se consideran más adelante.

45 En este sentido, la siguiente tabla resume varios colorantes aceptores FRET y varios colorantes marcadores TaqMan que, hasta la fecha, se han utilizado con éxito en los canales de detección indicados realizando o bien un ensayo de 4 colores con sondas de hibridación FRET o bien un ensayo TaqMan a color dual:

Tabla 1

Canal	Colorante aceptor FRET	Colorante marcador TaqMan
530 (también detección de SybrGreenI)	-	Fluoresceína (Fam) Cumarina
555	Rh6G Tamra	Hex Vic Tamra
580		Tamra ROX
610	LCRojo610	TexasRed
640	LCRojo640	
670	Cy5 Bodipi 655 Alexa 647	
710	Ja286 Cy5.5 LCRojo705	

50

Sin embargo, para varias de las diferentes entidades marcadoras indicadas arriba se tienen que utilizar diferentes compuestos donadores FRET (Donador) y compuestos bloqueantes TaqMan (Q) respectivamente en relación a la longitud de onda de excitación disponible debido a la presencia de uno, dos o tres LED diferentes. Consecuentemente, se resumen a continuación las diferentes posibilidades de combinaciones adecuadas de TaqMan o de pares FRET en una tabla más comprensible:

5

Tabla2

	LED	530	555	580	610	640	670	710
FRET:								
Donador: Atto 425 WI 343	410	-	Rh6G TAMRA	-	LCRojo610	LCRojo640	Cy5 Bodipi655 Alexa647	JA286 LCRojo705 Cy5.5
Donador: fluoresceína	470	-	-	-	LCRojo610	LCRojo640	Cy5 Bodipi655 Alexa647	JA286 LCRojo705 Cy5.5
Donador: LCRojo640	590	-	-	-	-	-	Cy5 Bodipi655 Alexa647	JA286 LCRojo705 Cy5.5
TaqMan:								
Q: arbitrario	410	Cumarina	-	-	-	-	-	-
Q: Tamra	470	Fam	Hex Vic	-	-	-	-	-
Q: Cy5	470	Fam	Hex Vic TAMRA	TAMRA Rox	TAMRA	-	-	-
Q: BHQ	470	Fam	Hex Vic T TAMRA	TAMRA Rox	TAMRA	-	-	-
Q: Cy5	590	-	-	-	Texas-Red	Texas-	-	-
Q: BHQ	590	-	-	-	Texas-Red	Texas-	-	-

10

Los colorantes mencionados en las tablas de arriba están comercialmente disponibles de la manera siguiente:

LC-Rojo-705 y LC-Rojo-640 se comercializan por Roche Applied Science (Nº de Cat. 2 015 161 y 2 157 594)

15

LC-Rojo-610 se sintetiza de acuerdo con protocolos estándar que utilizan un colorante fluorescente tal y como se describe en la patente US 5.750.409, compuesto II

JA 286 se describe en la patente PE 0 747 447, ejemplo 1. Para este colorante es ventajoso que se conecte el colorante al oligonucleótido de hibridación mediante una entidad espaciadora no hibridante de cinco residuos de nucleótido.

20

Cy-5 NHS-éster está disponible en Amersham, (Nº de Cat. PA 15100) y Cy5.5 fosforamidita también está disponible en Amersham (Nº de Cat. 271799 01).

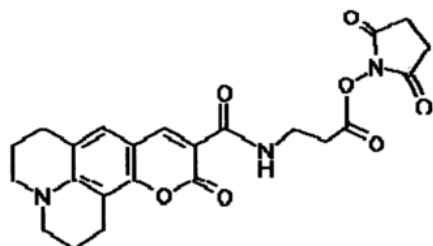
25

Bodipy 650/665 NHS-éster y Alexa 647 NHS-éster está disponible en Molecular Probes (Nº de Cat. D1 000 1 y A 2 000 6).

Atto 425-NHS-éster está disponible en Attotec (Nº de Cat. AD 425-3).

30

WI 343 es un derivado de la Cumarina 343 (Aldrich, Nº de Cat. 55 804 654), que se acopla a un enlazador (beta alanina) y se transforma en succinimidiléster de acuerdo con los métodos estándar:



Wi 343

35

Además, todos los colorantes TaqMan se comercializan por varios de los proveedores conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, Molecular Probes.

El bloqueante BlackHole (BHQ) también está disponible en Biosearch Technologies (Nº de Cat. BHQ 1-3).

El marcaje adecuado de las sondas de oligonucleótidos puede llevarse a cabo mediante los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En particular, el marcaje puede realizarse mediante la utilización o bien de compuestos fluorescentes que contienen un NHS-éster activado o bien de compuestos fluorescentes unidos a una fosforamidita, de manera que el marcaje se puede llevar a cabo durante la misma síntesis *de novo* de los oligonucleótidos. Además, las sondas marcadas con fluoresceína se pueden preparar mediante la utilización como soporte sólido de una partícula de vidrio de poro controlado de fluoresceína (Roche Applied Science Nº de Cat. 3 138 178)

C) Métodos y Kits

Se describe un método para la amplificación y detección de múltiples secuencias de DNA diana que incluye:

- proporcionar una composición o una mezcla de reacción de acuerdo con la invención,
- someter dicha mezcla de reacción a un protocolo de termociclado tal que pueda tener lugar la amplificación de dichas secuencias diana, y
- monitorizar la hibridación de cada uno de los pares de sondas de hibridación FRET, al menos una vez tras varios ciclos de amplificación.

La hibridación puede monitorizarse, al menos una vez, de forma dependiente a la temperatura.

El compuesto o la mezcla de la reacción incluyen predominantemente al menos 3, preferiblemente 4-5, y lo más preferible exactamente 4 pares de sondas de hibridación FRET, donde cada par de sondas de hibridación incluye una sonda FRET donadora que contiene una porción donadora FRET y una sonda aceptora FRET que contiene una porción aceptora FRET que tiene un máximo de emisión entre los 550 y los 710 nm.

Además, tal compuesto o mezcla de reacción puede incluir uno, varios o preferiblemente todos los compuestos y reactivos seleccionados a partir de la siguiente lista:

- Un tampón apropiado para la reacción en cadena de la polimerasa
- Desoxinucleósido trifosfatos
- Una DNA polimerasa dependiente de molde, preferiblemente termoestable
- Al menos un par o varios pares de cebadores de amplificación.

Además, se describe un equipo que incluye, al menos, un primer juego de cebadores de amplificación y, al menos, tres, cuatro o cinco pares de sondas de hibridación FRET.

Adicionalmente, tal equipo puede contener uno o varios de los compuestos y reactivos seleccionados a partir de la lista siguiente:

- Un tampón apropiado para la reacción en cadena de la polimerasa
- Desoxinucleósido trifosfatos
- Una DNA polimerasa dependiente de molde, preferiblemente termoestable
- Al menos un par o varios pares de cebadores de amplificación.

Tal equipo puede incluir también un DNA de control interno, que puede amplificarse y detectarse mediante la utilización de los mismos cebadores y sondas que se utilizan en la detección de cualquier ácido nucleico diana. Cada uno de los componentes descritos con anterioridad puede almacenarse en un único recipiente de almacenaje. Sin embargo, también es posible cualquier combinación de los componentes para el almacenaje en un mismo recipiente.

D) Mejor modalidad del descubrimiento

La mejor modalidad del descubrimiento conocida por los inventores hasta la fecha de la presentación de la solicitud es la siguiente:

El sistema proporciona un fotómetro con una o dos fuentes de excitación y seis canales de detección. Se combinan un diodo emisor de luz azul (470 nm) y un diodo emisor de luz UV opcional con canales de detección que tienen longitudes de onda de detección central a 530, 555, 610, 640, 670 y 710 nm.

5 El fotómetro del instrumento mejorado de PCR a tiempo real incluye dos unidades ópticas separadas. Como se describe en la figura 4, las unidades de excitación y detección se localizan en emplazamientos diferentes.

10 (I) Una unidad de excitación con uno o dos LED: un LED azul que emite a 470 nm y, opcionalmente, un LED violeta que emite a 415 nm. El LED azul es capaz de excitar al SybrGreenI y a la fluoresceína. La fluoresceína se utiliza en el formato HybProbe como colorante donador en combinación con 4 colorantes aceptores diferentes (marcadores): Red 610, Red 640, Cy 5, Red 705. Además, el LED azul excita a los colorantes marcadores FAM y HEX o VIC en ensayos TaqMan a color dual. Adicionalmente, la fluoresceína se utiliza como colorante marcador en el formato de sonda de marcaje único (SLP). El LED violeta opcional puede utilizarse en el formato HybProbe para excitar un colorante donador de longitud de onda corta (Atto 425) en combinación con un colorante marcador a 555 nm (Rh6G).

20 (II) Una unidad de detección con seis canales que utiliza fotodiodos como detectores. Los seis canales están separados por una distancia espectral de al menos 25 nm para minimizar la diafonía de cada colorante marcador sobre los canales de detección colindantes. La unidad de detección es capaz de detectar el SybrGreenI y la fluoresceína/FAM en el canal de 530 nm. Además, el sistema es capaz de detectar el HEX/VIC y el Rh6G en el canal de 555 nm. Los canales de detección de longitud de onda larga (610, 640, 670, 710 nm) son capaces de detectar colorantes aceptores HybProbe y, de manera opcional, colorantes marcadores SLP de longitud de onda larga.

25 Las unidades de excitación y detección están conectadas mediante un haz de seis fibras. La luz emitida por los tubos capilares de vidrio se distribuye homogéneamente mediante la utilización de un tubo de luz y se transmite a los seis haces de fibra de vidrio. Estas fibras de vidrio únicas de 50 µm transmiten la luz a cada uno de los seis canales de detección. Esta configuración proporciona dos ventajas en comparación a la unidad óptica LC 1.2: distribución homogénea de la luz emitida en los seis canales de detección y separación mecánica de las unidades de excitación y detección. Esto permite que se monitorice el posicionamiento altamente preciso de la unidad de excitación respecto a las puntas de los tubos capilares sin mover la unidad de detección. Una función efectiva de compensación del color permite la detección simultánea de múltiples dianas en canales diferentes.

35 En combinación con estas características del *hardware* y del *software*, se han establecido capacidades multicolor en el sistema para llevar a cabo la detección multiplex con sondas de hibridación FRET. Además, el sistema permite llevar a cabo otros formatos de detección diferentes a HybProbe FRET.

40 En base al formato de detección de sondas de hibridación, el sistema permite al menos el multiplexado de 4 colores de la cuantificación a tiempo real y el análisis de las curvas de fusión. Teniendo en cuenta una resolución de la curva de fusión de seis picos de fusión por canal, se pueden discernir hasta 24 productos de PCR diferentes utilizando el fotómetro. Para permitir esto, se han desarrollado nuevos colorantes aceptores FRET (previamente desconocidos) para los canales de detección con longitudes de onda de emisión central de entre 610 y 670 nm. Además, el LED opcional de 410 nm proporciona una opción para la utilización de un colorante donador de longitud de onda corta en combinación con un colorante aceptor que emite a 555 nm, proporcionando así un quinto canal de detección HybProbe. Los espectros de excitación y emisión de los colorantes especialmente útiles se muestran en las figuras 1 y 2.

50 Mediante la utilización de la fluoresceína como colorante donador FRET se podrían identificar dos nuevos colorantes aceptores FRET que pueden detectarse en el canal de 610 nm (Red 610) y en el canal 670 (Cy 5) respectivamente. Ambos colorantes muestran dinámicas de señal altas cuando se utilizan en el formato HybProbe. Además, las propiedades espectrales de los colorantes se adecuan perfectamente al fotómetro descrito con anterioridad, minimizando así la diafonía sobre los canales de detección heterólogos. Se observa que, mediante la utilización de un algoritmo flexible de compensación del color de canal múltiple, es factible la detección específica de los 4 colorantes aceptores FRET (incluyendo los colorantes previamente existentes, LC Red 640 y LC Red 705) a partir de una única reacción bajo un rango de temperatura de entre 40°C y 95°C.

Mientras se intentaba identificar un quinto colorante aceptor FRET para el canal de 555, resultó que las buenas dinámicas de señal FRET se inhibían por dos efectos:

60 (I) El colorante donador de fluoresceína muestra una alta diafonía sobre el canal de 555 nm, enmascarando así el aumento de señal de un colorante aceptor FRET potencial durante el proceso de la PCR.

(II) Un colorante aceptor FRET que emite a 555 nm se excita directamente a sí mismo mediante el LED de 470 nm, aumentando consecuentemente la fluorescencia basal de forma considerable y disminuyendo, por tanto, la sensibilidad de detección.

65

Se encontró una solución a estos inconvenientes mediante la utilización de un LED-UV de 410 nm para la excitación de un colorante donador de longitud de onda corta (Atto 425) en combinación con un colorante aceptor adecuado de 555 nm (Rh6G). En esta combinación, se minimizó la diafonía procedente del donador sobre el canal de detección de 555 nm y la excitación directa del aceptor FRET, y se logró una dinámica de señal suficiente tras la compensación del color.

Además, resultó que el donador de longitud de onda Atto 425 puede utilizarse en combinación con todos los colorantes aceptores de longitud de onda larga. Inesperadamente, las dinámicas de señal FRET de los aceptores de longitud de onda larga en combinación con Atto 425 son comparables con las dinámicas de señal de cuando se utilizan en combinación con la fluoresceína. Esta observación proporciona la opción de extender las características multicolor a un formato de 5 canales utilizando sólo un colorante donador.

Mediante la utilización del formato de detección TaqMan, se pueden llevar a cabo las aplicaciones a color dual basadas en los colorantes marcadores TaqMan FAM (detectados a 530 nm) y HEX o VIC (detectados a 560 nm) sin modificar en gran medida la química TaqMan conocida en la materia. La sensibilidad de detección obtenida es comparable a la del instrumento TaqMan COBAS (Roche Molecular Systems).

Además, el formato de sondas de marcaje único (SLP) para el análisis de las curvas de fusión (WO 02/14555) puede llevarse a cabo en un sistema como el aquí descrito. Este formato se basa en el bloqueo o desbloqueo, respectivamente, de los marcadores de las sondas tras la hibridación de su secuencia diana. El formato requiere sólo una sonda marcada en su extremo terminal con un solo colorante. Consecuentemente y en comparación con los formatos HybProbe o TaqMan, el formato SLP permite una configuración significativamente menos cara de ensayos para el análisis integrado de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP). En una sola reacción, se pueden distinguir con claridad diferentes alelos de un SLP mediante la descripción de las temperaturas de fusión. Las opciones de multiplexado se proporcionan mediante la utilización de diferentes colorantes marcadores.

Las posibilidades para la detección mediante PCR a tiempo real multicolor en el instrumento descrito con anterioridad se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 3

Formato de ensayo	Canales de detección (colorantes marcadores)
SYBR Green I	530 nm (SYBR Green I)
HybProbes	610 nm (LC Red 610) 640 nm (LC Red 640) 670 nm (LC Red 670) 710 nm (LC Red 705)
Sondas de hidrólisis (Sondas TaqMan)	530 nm (FAM) 555 nm (VIC, HEX)
SimpleProbes	530 nm (fluoresceína)

Los ejemplos, referencias, listados de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero ámbito de la cual está definido en la reivindicación anexa.

Descripción de las figuras

Figura 1 Espectros de excitación de los colorantes aceptor y donador FRET de la presente invención

Figura 2 Espectros de emisión de los colorantes aceptor y donador FRET de la presente invención

Figura 3 Espectros de emisión de los colorantes aceptor y donador FRET, y canales de detección de la presente invención

Figura 4 Configuración del fotómetro

Figura 5 Experimento de cuantificación mediante PCR a tiempo real de 4 colores del ejemplo 1

Figura 6 Diseño del cebador/sonda del ejemplo 2

Figura 7 Experimento de curvas de fusión mediante PCR a tiempo real de 4 colores del ejemplo 2

Figura 8 Experimento TaqMan de cuantificación mediante PCR a tiempo real a color dual del ejemplo 3

**Ejemplo 1**

PCR cuantitativa a tiempo real del DNA del Factor V mediante la utilización de diferentes pares de sondas de hibridación FRET marcadas con diferentes componentes fluorescentes

Para la amplificación del fragmento de DNA del Factor V se prepararon 4 mezclas de reacción de PCR a tiempo real de 100 µl diferentes de la siguiente manera:

10<sup>6</sup> copias de un plásmido que contiene el gen del Factor V

3 mM MgCl<sub>2</sub>

500 nM cada uno cebadores

200 nM Sonda de hibridación 3' FRET de acuerdo con la secuencia A

200 nM Sonda de hibridación 5' FRET de acuerdo con las secuencias B1, B2, B3 o B4, respectivamente

Además, se utilizaron componentes de PCR del equipo de HybProbes de DNA LightCycler (Roche Applied Science, Nº de Cat. 2158825).

Los cebadores y las sondas se utilizaron de la siguiente manera:

Cebador del Factor V, sentido:

5'-GAG AGA CAT CGC CTC TGG GCT A-3' (22 nucleótidos) (Id. de Sec. Nº1)

Cebador del Factor V, antisentido:

5'-TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA-3' (20 nucleótidos) (Id. de Sec. Nº 2)

A: Sonda de hibridación 3' marcada con fluoresceína

5'-AAT ACC TGT ATT CCT CGC CTG TC-3' (23 nucleótidos) (Sec. Id. Nº 3)

B1: Sonda de hibridación 5' Red 610

5'-AGG GAT CTG CTC TTA CAG ATT AGA AGT AGT CCT ATT-3' (36 nucleótidos)

B2: Sonda de hibridación 5' Red 640

5'-AGG GAT CTG CTC TTA CAG ATT AGA AGT AGT CCT ATT-3' (36 nucleótidos)

B3: Sonda de hibridación 5' Cy5

5'-AGG GAT CTG CTC TTA CAG ATT AGA AGT AGT CCT ATT-3' (36 nucleótidos)

B4: Sonda de hibridación 5' Red 705

5'-AGG GAT CTG CTC TTA CAG ATT AGA AGT AGT CCT ATT-3' (36 nucleótidos)

(B1-B4: Sec. Id. Nº 4)

La amplificación se llevó a cabo en el instrumento LightCycler descrito con anterioridad como la mejor modalidad de la invención de acuerdo con el siguiente protocolo de termociclado:

	T [°C]	t [s]	Rampa de calentamiento [°C/s]	Adquisición	Ciclos
Desnaturalización	95	30	20,0	Ninguna	1
Amplificación	95	10	20,0	Ninguna	
	55	20	20,0	Única	45
	72	20	20,0	Ninguna	

La monitorización a tiempo real se llevó a cabo con y sin la utilización de un algoritmo de compensación de color, con la utilización del método del umbral de la segunda derivada sobre los 45 ciclos mediante la medición de las señales de fluorescencia en un canal de detección y con la utilización de una corrección aritmética de la fluorescencia basal para la normalización de las intensidades de la fluorescencia basal inicial.

Los resultados se muestran en las figuras 5a-5d. Como se puede observar en las figuras, se pueden obtener las señales de amplificación específicas y cuantitativas de todos los colorantes aceptores FRET utilizados tras la compensación de color en los canales de detección de 610, 640, 670 y 710 nm correspondientes. Además, se muestra que el solapamiento espectral de los diferentes colorantes sobre los canales colindantes no afectó a la señalización cuantitativa y específica cuando se llevó a cabo la compensación del color.

**Ejemplo 2**

Análisis de las curvas de fusión de 4 colores

5 Se amplificó mediante la utilización de cebadores específicos un fragmento de 479 pares de bases de un plásmido específico que contiene un fragmento del gen humano NAT-2 que codifica para la isozima N-Acetiltransferasa y se detectó por fluorescencia, utilizando 4 pares específicos de sondas de hibridación FRET diferentes. Mientras tres de las sondas se marcaron en el extremo 3' con fluoresceína, cuatro sondas de detección se marcaron en el extremo 5' bien con LC Red 610, 640, 705 o bien con Cy5 y se modificaron en el extremo 3' mediante fosforilación. En la figura 6 se muestra una ilustración esquemática de esta configuración experimental. Como puede deducirse de la figura, había cuatro sondas aceptoras FRET marcadas de forma diferente, pero sólo tres puntos de detección. Esto dio como resultado la competencia de hibridación de dos sondas de detección.

10 Las condiciones del ensayo fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 1 con la diferencia de que se utilizaron  $3 \times 10^6$  copias del DNA diana.

Cebador, sentido:

15 5'-TGC CTT GCA TTT TCT GCT T-3' (19 nucleótidos) (Sec. Id. Nº 5)

Cebador, antisentido:

20 5'-GAG TTG GGT GAT ACA TAC A-3' (19 nucleótidos) (Sec. Id. Nº 6)

3'-HybProbe de fluoresceína 1:

5'-GAA ATT CTT TGT TTG TAA TAT ACT GCT CTC TC-Fluos-3' (32 nucleótidos) (Sec. Id. Nº7)

25 5'- HybProbe de Red 610 1a:

5'- Red 610-TGA TTT GGT CCA CGT ACC-3' (18 nucleótidos) (Sec. Id. Nº8)

30 5'- HybProbe de Rojo640 1b:

5'- Red 640-TGA TTT GGT CCA AGT ACC C-3' (19 nucleótidos) (Sec. Id. Nº9)

3'- HybProbe de fluoresceína 2:

35 5'-GTT GGA GAC GTC TGC AGG TAT GTA TTC ATA GAC TCA A-Fluos-3' (37 nucleótidos) (Sec. Id. Nº10)

5'- HybProbe Rojo705 2:

40 5'- Red 705-ATC TTC AAT TGT TCG AGG TT-3' (20 nucleótidos) (Sec. Id. Nº 11)

3'- HybProbe de fluoresceína 3:

5'-ATT TCC TTG GGG AGA AAT CTC GTG CCC A-Fluos-3' (28 nucleótidos) (Sec. Id. Nº 12)

45 5'- HybProbe RojoCy5 3:

5'-Cy5-ACC TGG TGA TGA ATC CCT TAC TAT TTA GAA TAA GGA AC-3' (37 nucleótidos) (Sec. Id. Nº 13)

50 La amplificación y el subsiguiente análisis de las curvas de fusión se llevaron a cabo en el instrumento LightCycler descrito con anterioridad como mejor modalidad de la invención de acuerdo con el siguiente protocolo de termociclado:

	T [°C]	t [s]	Rampa de calentamiento [°C/s]	Adquisición	Ciclos
Desnaturalización	95	600	20,0	Ninguna	1
Amplificación	95	10	20,0	Ninguna	
	55	10	20,0	Única	45
	72	20	3,0	Ninguna	
Curva de fusión	95	60	20,0	Ninguna	
	40	60	20,0	Ninguna	1
	80	0	0,1	Continua	
Refrigeración	40	30	20,0	Ninguna	1

55 Los resultados se muestran en la figura 7. Como se deduce de la figura, se pudo llevar a cabo un análisis de las curvas de fusión de 4 colores mediante la utilización de sondas de hibridación con 4 colorantes aceptores diferentes



utilizando un método de compensación del color adecuado. Entonces, se pudieron detectar los picos de fusión específicos de la sonda de hibridación sin ningún efecto diafónico sustancial.

### Ejemplo 3

- 5 Detección TaqMan a color dual
- 10 Un instrumento LightCycler de acuerdo con la mejor modalidad de la invención proporcionó todos los medios para la detección sensible de los ensayos TaqMan a color dual. Los colorantes TaqMan establecidos FAM y HEX se excitaron correctamente con el LED de 470 nm y, tras la utilización de la función de compensación del color del instrumento, se pudieron identificar diferencialmente en los canales de detección de 530 nm y 560 nm con una alta sensibilidad. La transferencia de los protocolos de los ensayos TaqMan a color dual al instrumento de acuerdo con la invención se llevó a cabo de forma simple suplementando las condiciones del ensayo establecidas con BSA.
- 15 En la figura 8 se muestran diferentes ejemplos de amplificaciones y detecciones a color dual exitosas. La figura 8 muestra que en los experimentos monocolor que utilizan o bien FAM o bien HEX se obtuvo una sensibilidad de detección de aproximadamente 1 copia/μl en los ensayos TaqMan a color dual (sólo los controles negativos no dieron como resultado un incremento significativo de la fluorescencia tras la reacción de PCR). La figura 8 muestra un experimento a color dual en el que siempre se utilizó una sonda TaqMan marcada con Hex para detectar 500 copias de un primer DNA diana, y en la misma reacción, una sonda TaqMan marcada con FAM que se utilizó para detectar las diferentes cantidades ( $10^2$ - $10^6$  copias) de un segundo DNA diana.
- 20 El rango dinámico (que es indicativo de la diferencia relativa en las concentraciones de las dos dianas a detectar) fue de aproximadamente  $10^3$ .
- 25

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Sistema mejorado de PCR a tiempo real multicolor
- <130> 21810 EP
- 10 <150> PE 03007458.7<151> 2003-04-04
- <150> PE 03014929.8<151> 2003-08-07
- 15 <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 20 <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <221> característica miscelánea
- <223> Cebador del Factor V, sentido
- <400> 1
- gagagacatc gcctctgggc ta 22
- 30 <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 35 <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> Cebador del Factor V, antisentido
- <400> 2
- 40 tggtatcaca ctggtgctaa 20
- <210> 3
- <211> 23
- <212> DNA
- 45 <213> Artificial
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 50 <223> Sonda de hibridación 3' marcada con fluoresceína
- <400> 3
- aatacctgta ttctcgct gtc 23
- <210> 4
- 55 <211>36
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 60 <221> característica miscelánea
- <223> Sonda de hibridación 5' Red 610
- <220>
- 65 <221> característica miscelánea
- <223> Sonda de hibridación 5' Cy5

	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<223> Sonda de hibridación 5' Red 640		
5	<220>		
	<221> característica miscelánea		
	<223> Sonda de hibridación 5' Red 705		
10	<400> 4		
	agggatctgc tcttacagat tagaagtagt cctatt		36
	<210> 5		
	<211> 19		
15	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
20	<223> Cebador, sentido		
	<400> 5		
	tgccctgcat ttctgctt		19
	<210> 6		
25	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<221> característica miscelánea		
	<223> Cebador, antisentido		
	<400> 6		
35	gagttgggtg atacatata		19
	<210> 7		
	<211> 32		
40	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<221> característica miscelánea		
45	<223> 3'-HybProbe de fluoresceína 1		
	<400> 7		
	gaaattcttt gtttgaata tactgctctc tc		32
	<210> 8		
50	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
55	<221> característica miscelánea		
	<223> 5'-HybProbe Red 610 la		
	<400> 8		
60	tgatttggtc cacgtacc		18
	<210> 9		
	<211> 19		
	<212> DNA		
65	<213> Artificial		
	<220>		

<221> característica miscelánea  
 <223> 5'-HybProbe Red 640 1b  
 <400> 9  
 5 tgatttggtc caagtaccc 19  
 <210> 10  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> 3'-HybProbe de fluoresceína 2  
 15 <400> 10  
 gttggagacg tctgcaggta tgtattcata gactcaa 37  
 <210> 11  
 20 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <221> característica miscelánea  
 <223> 5'-HybProbe Red705 2  
 <400> 11  
 30 atcttcaatt gtctgaggtt 20  
 <210> 12  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> 3'-HybProbe de fluoresceína 3  
 40 <400> 12  
 atttcctgg ggagaaatct cgtgccca 28  
 <210> 13  
 <211> 38  
 45 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <223> 5'- HybProbe RedCy5 3  
 50 <400> 13  
 acctggtgat gaatcccta ctatttagaa taaggaac 38  
 55

**REIVINDICACIONES**

1. Un instrumento de PCR a tiempo real que incluye

- 5
- exactamente una fuente de luz monocromática, donde la fuente de luz monocromática es un LED que emite a 470 nm,
  - 6 entidades detectoras de fluorescencia, cada una de las cuales tiene longitudes de onda de detección central a 530, 555, 610, 640, 670 y 710 nm +/- 5 nm,
- 10
- múltiples recipientes de reacción para contener la mezcla de reacción,
  - medios de calentamiento y refrigeración,
  - un tubo de luz y 6 haces de fibra de vidrio,

caracterizado porque dichas entidades detectoras son capaces de

- 15
- detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia máxima de al menos 4 pares de sondas de hibridación FRET marcadas de manera diferente,
  - detectar simultáneamente la emisión de fluorescencia máxima de al menos 2 sondas de hibridación TaqMan marcadas de manera diferente, y
- 20
- detectar la emisión de fluorescencia máxima de SybrGreenI y

que las unidades de excitación y detección están separadas mecánicamente y conectadas a un haz de seis fibras, donde cada haz de 50 µm de fibras de vidrio único transmite la luz a cada uno de los seis canales de detección.

Fig. 1

Espectros de excitación

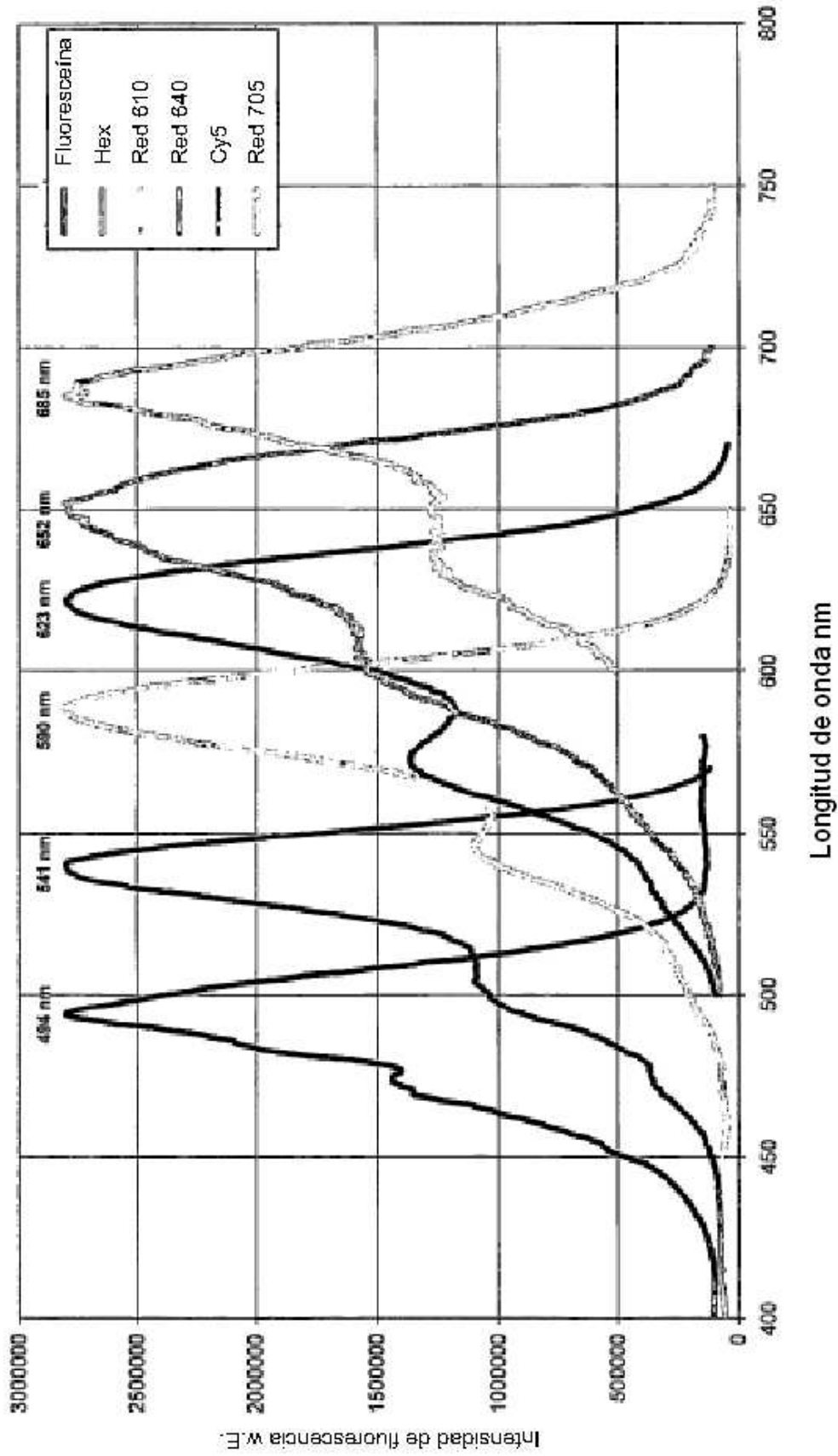


Fig. 2  
Espectros de emisión

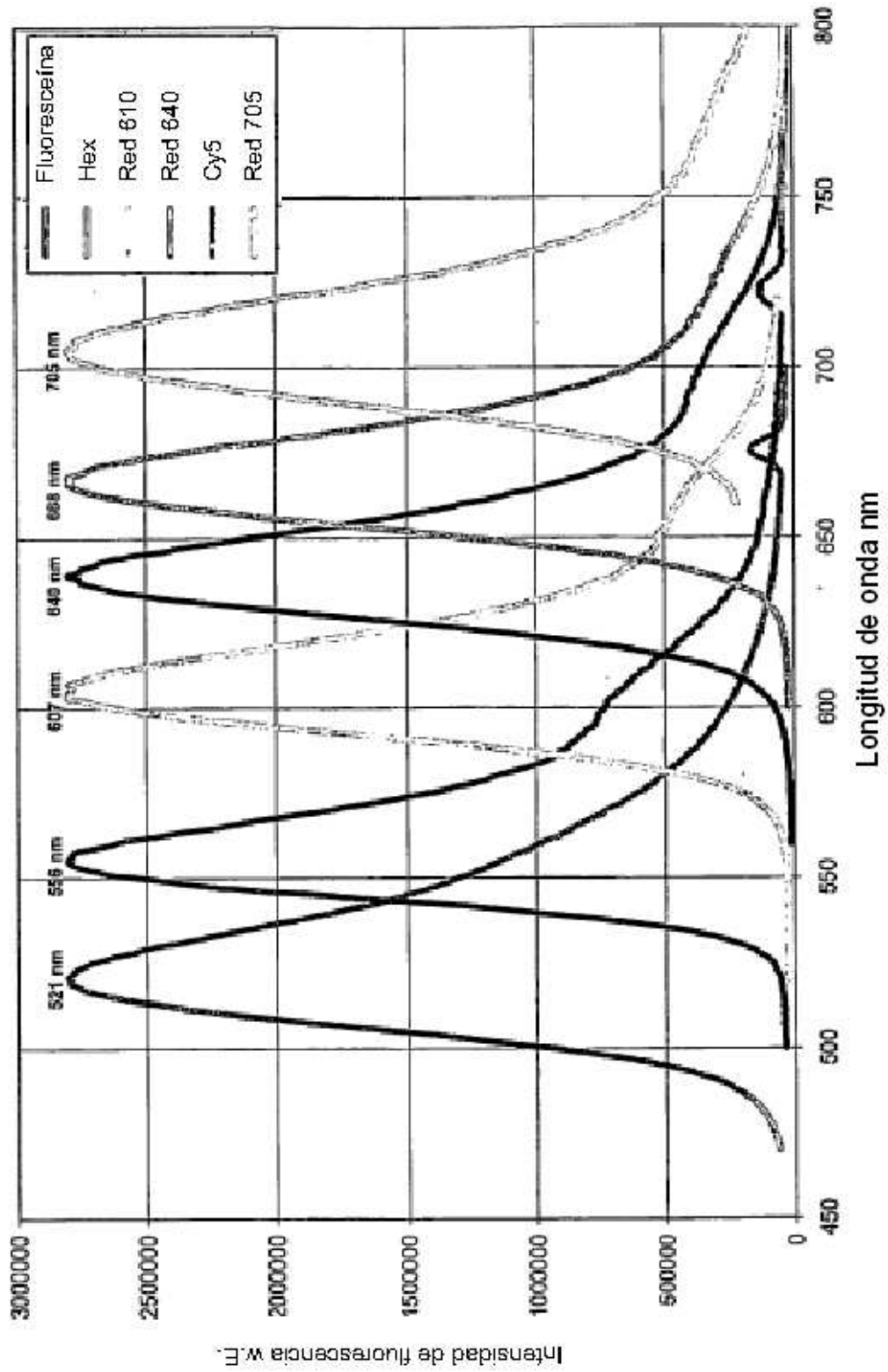


Fig. 3

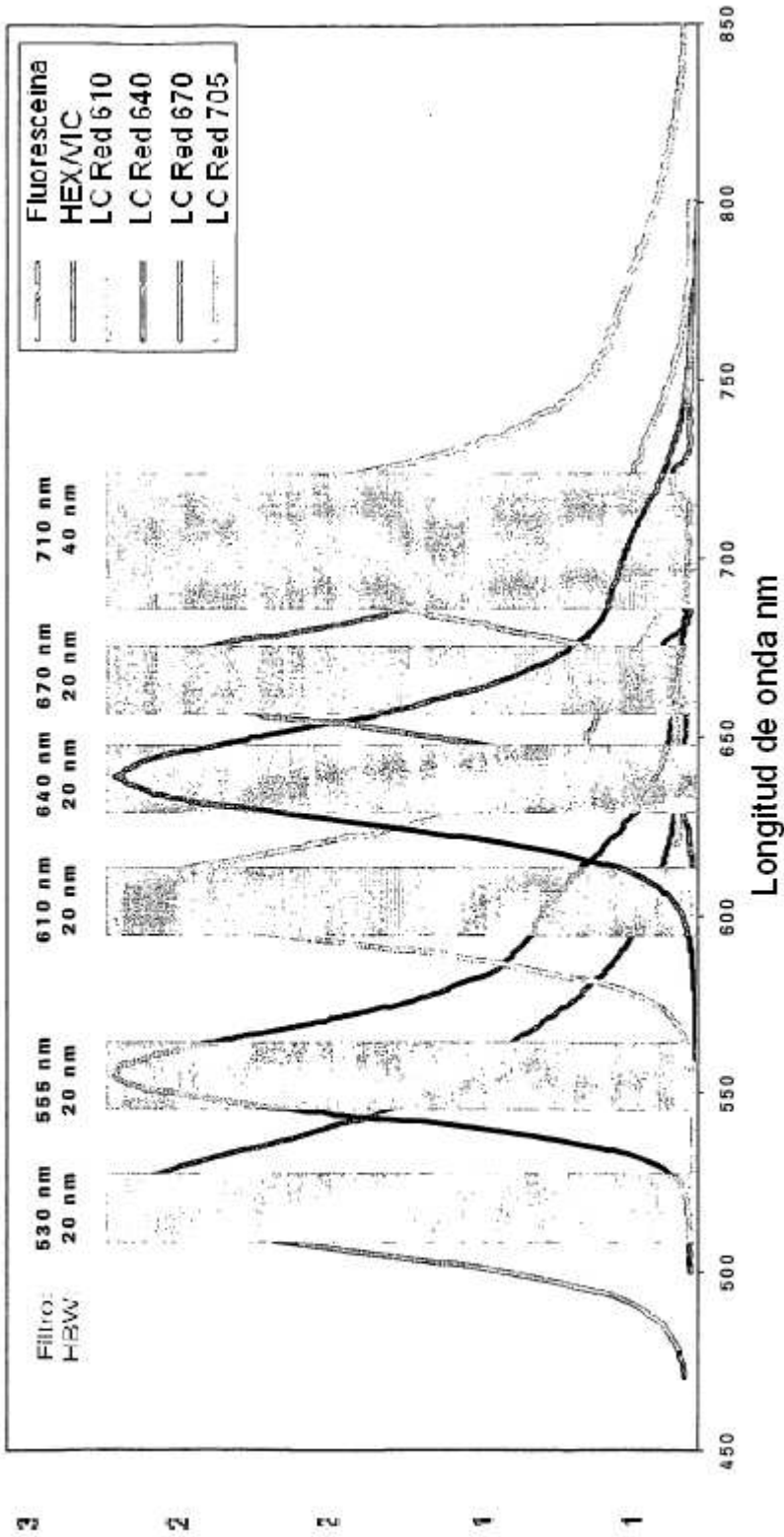




Fig. 4

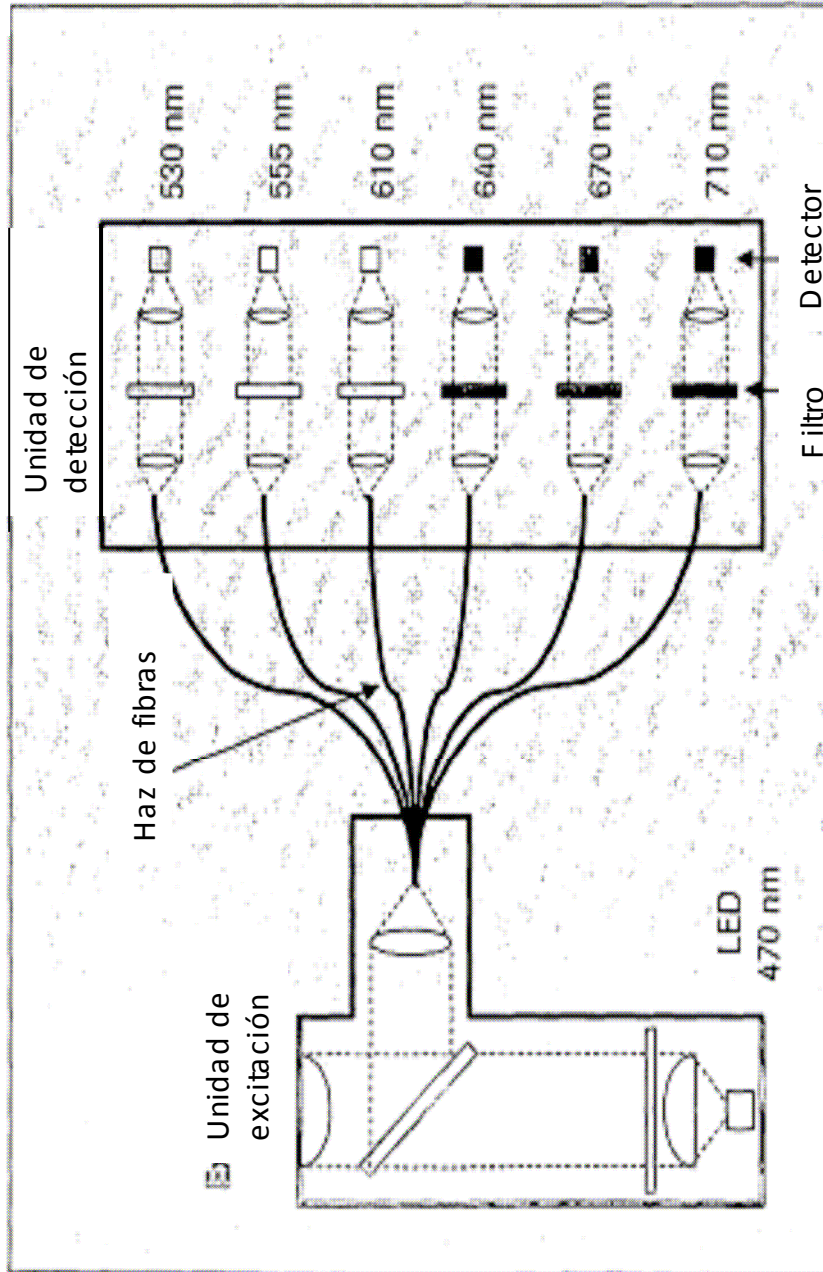
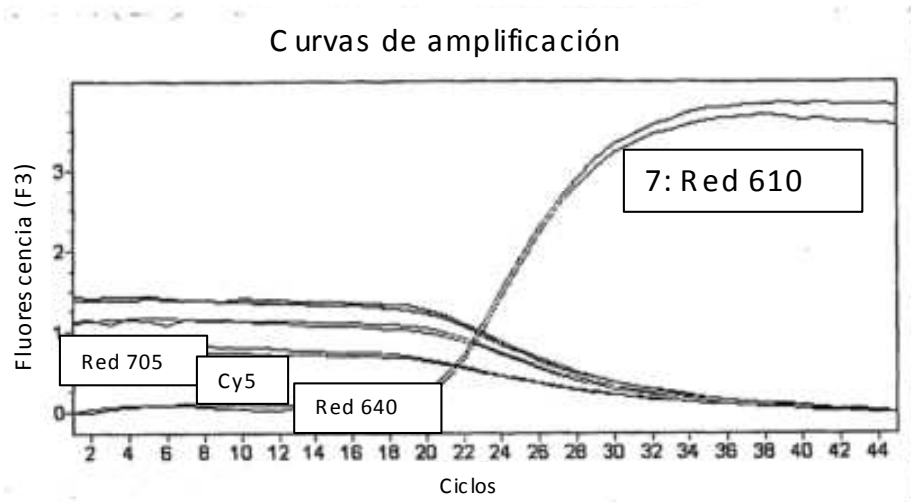


Fig. 5a

F3 = 610 nm

Sin compensación del color



Con compensación del color

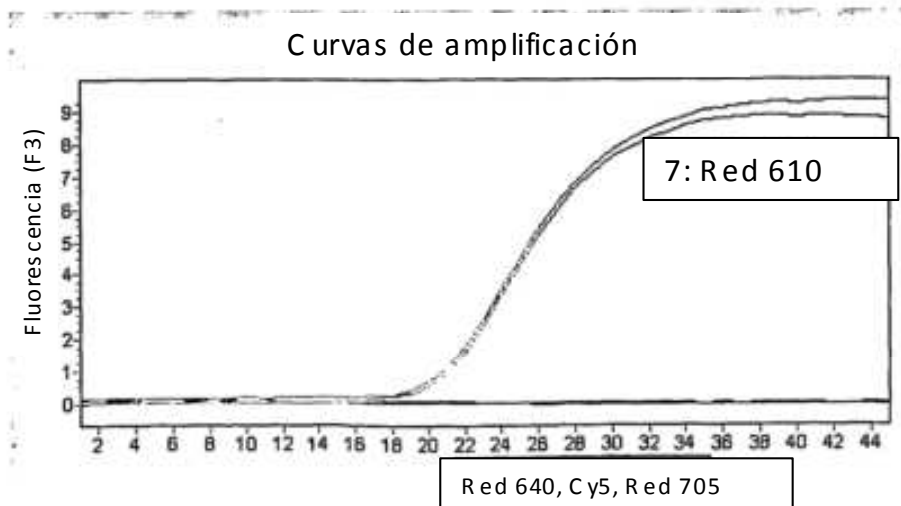
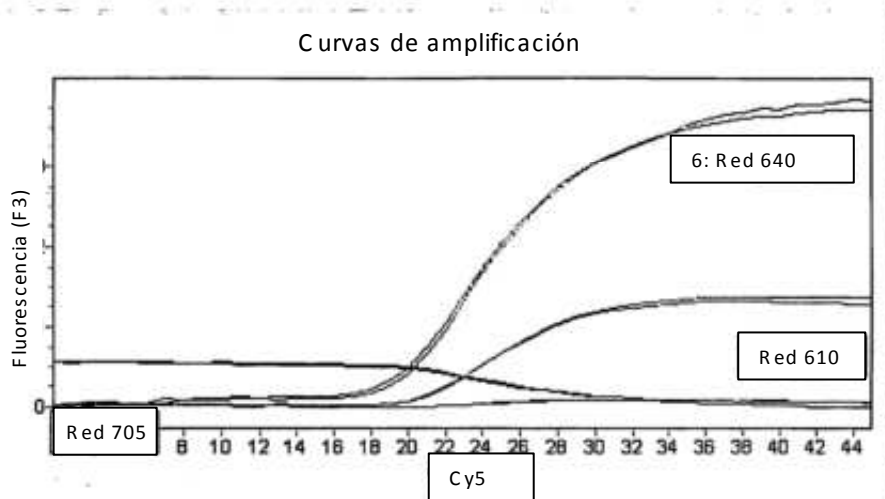


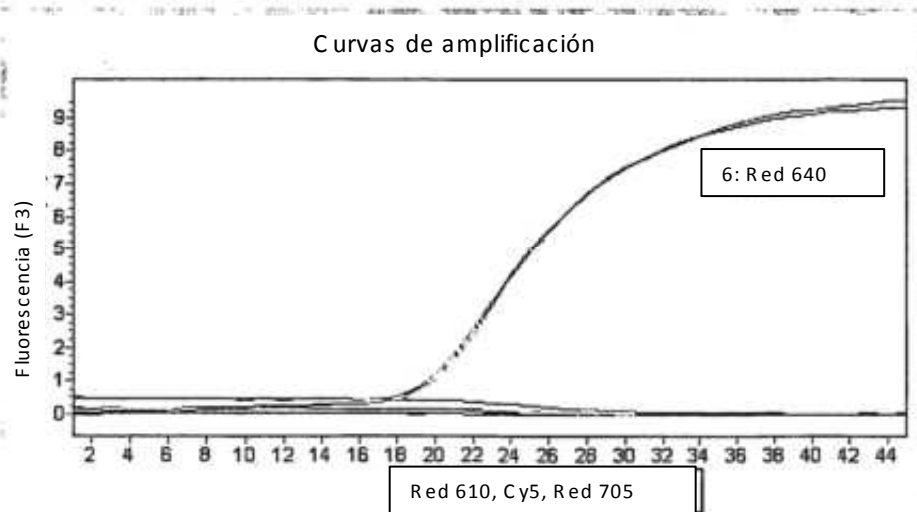
Fig. 5b

F4 = 640 nm

Sin compensación del color



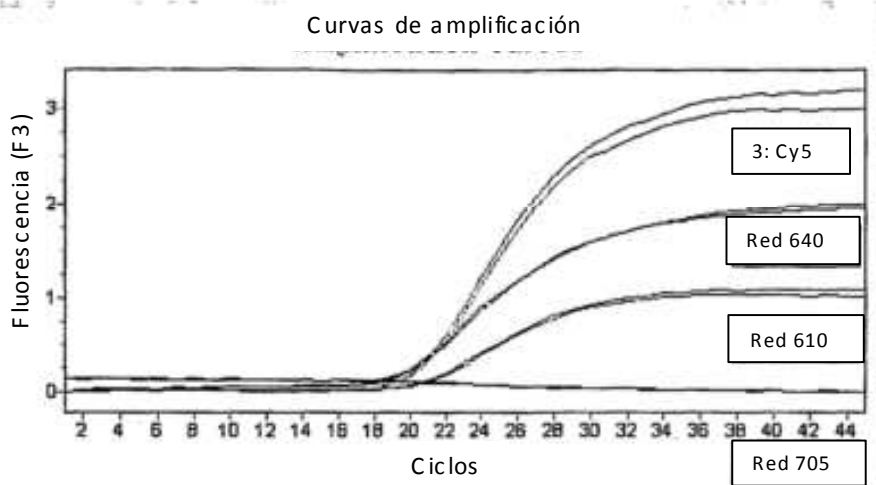
Con compensación del color



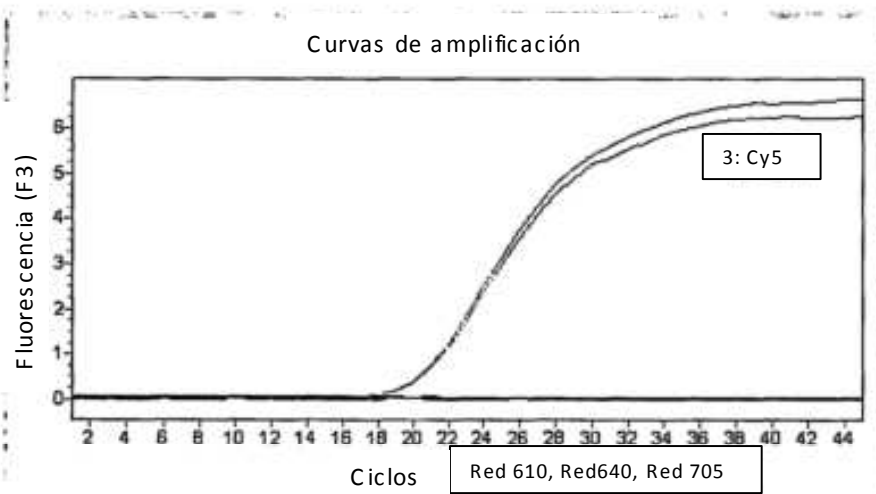
**Fig. 5c**

**F5 = 670 nm**

Sin compensación del color



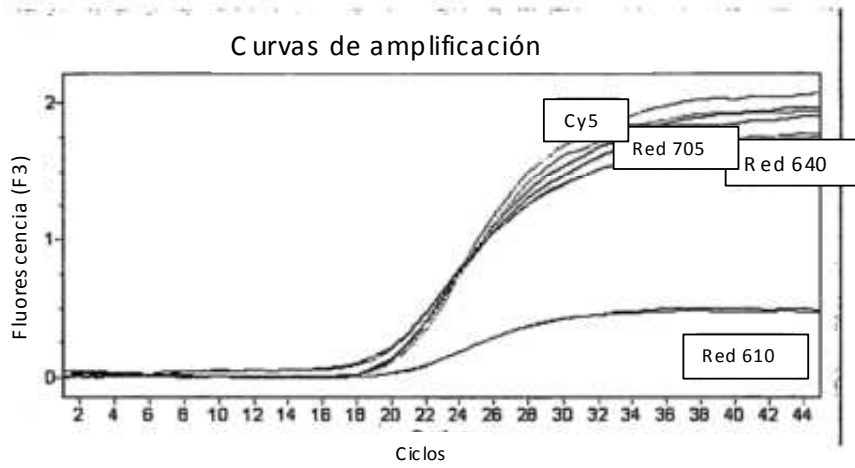
Con compensación del color



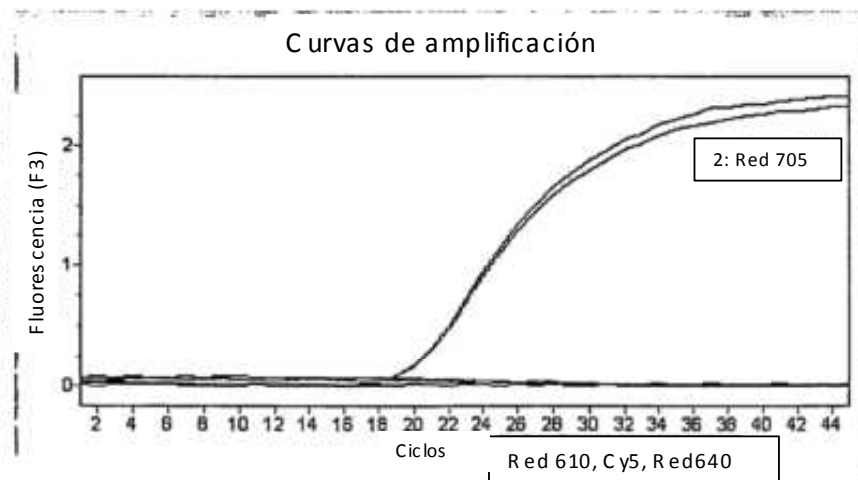
**Fig. 5d**

**F6 = 710 nm**

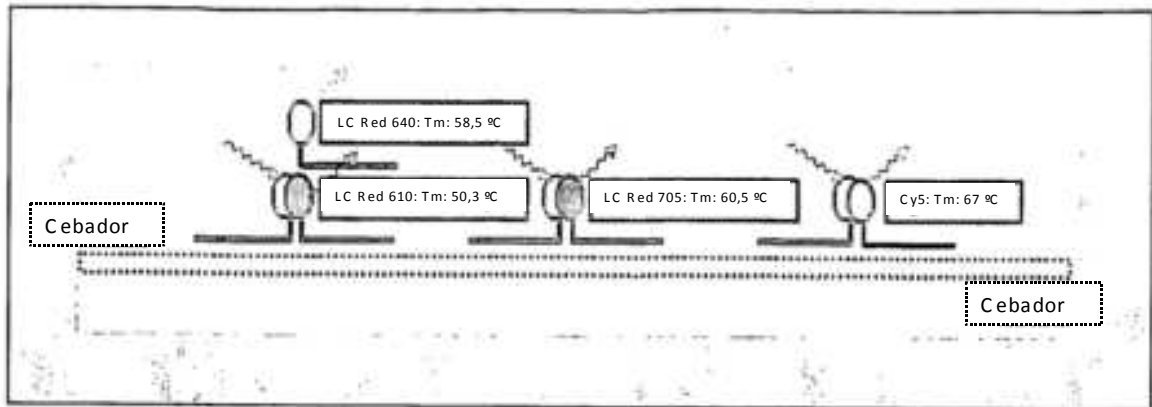
Sin compensación del color



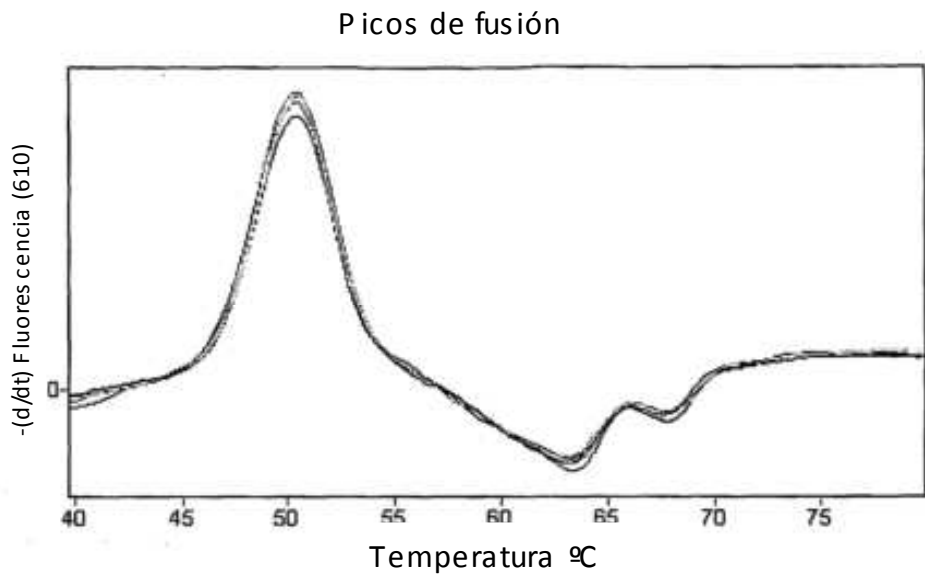
Con compensación del color



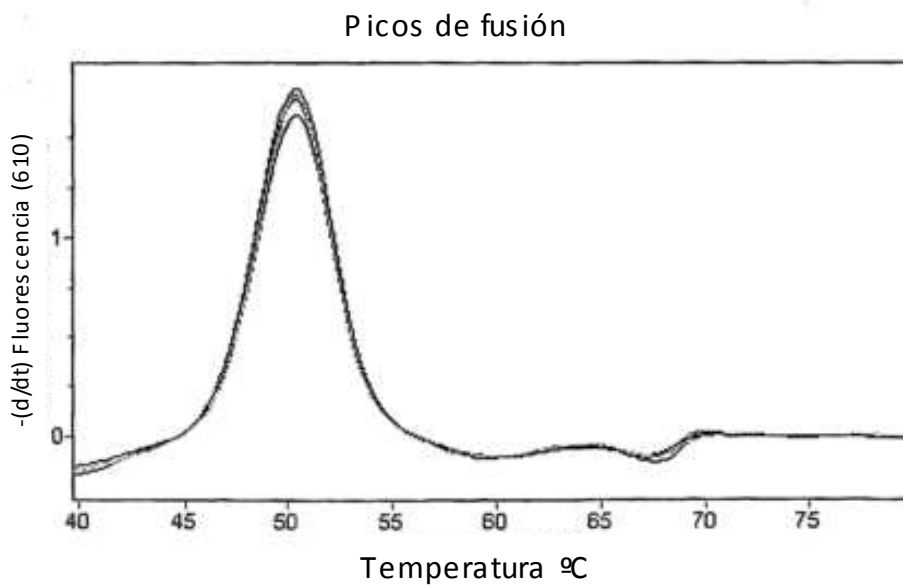
**Fig. 6**



**Fig. 7a**

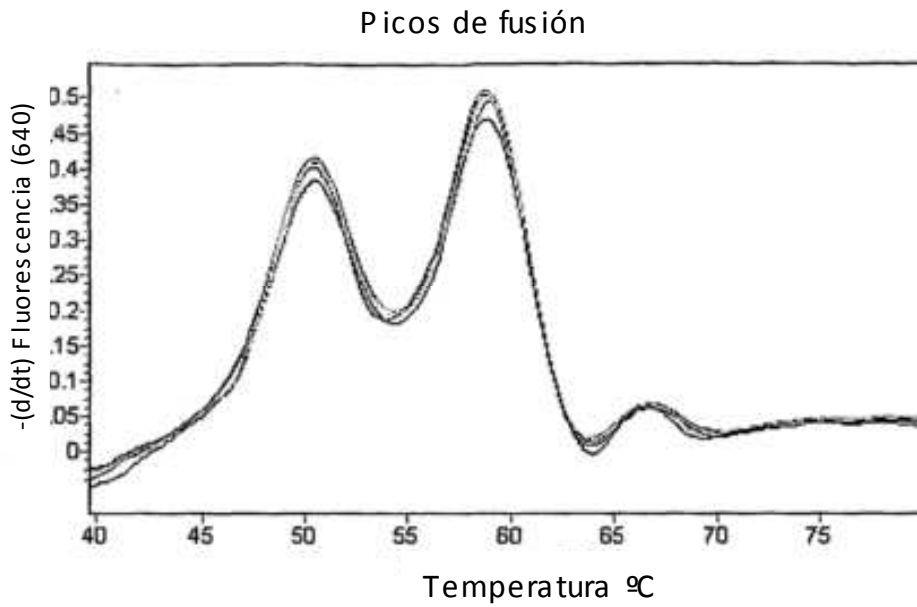


Canal de 610 nm sin compensación de color

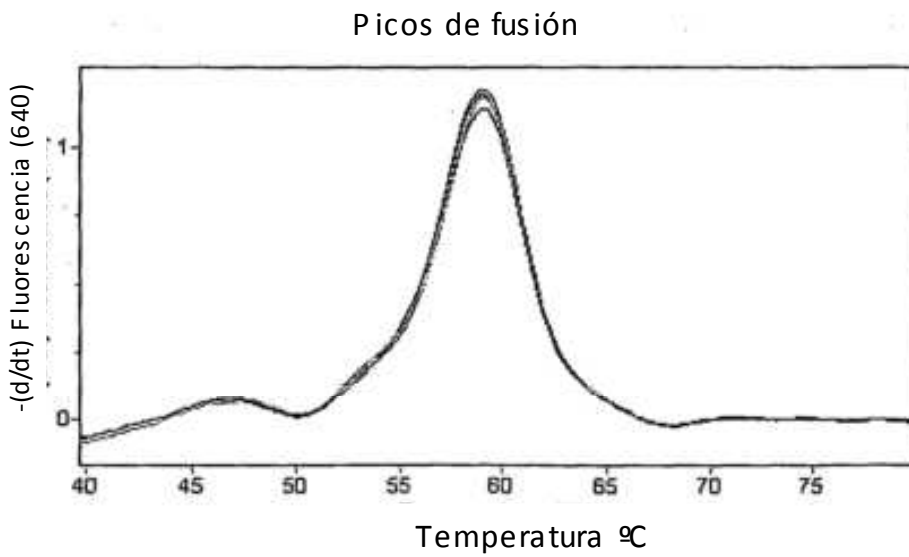


Canal de 610 nm con compensación de color

**Fig. 7b**



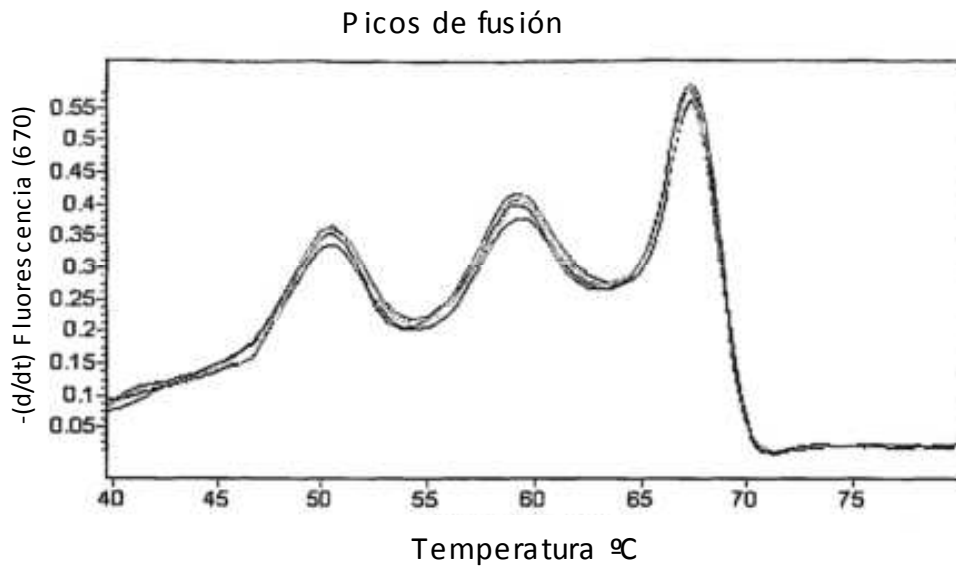
Canal de 640 nm sin compensación de color



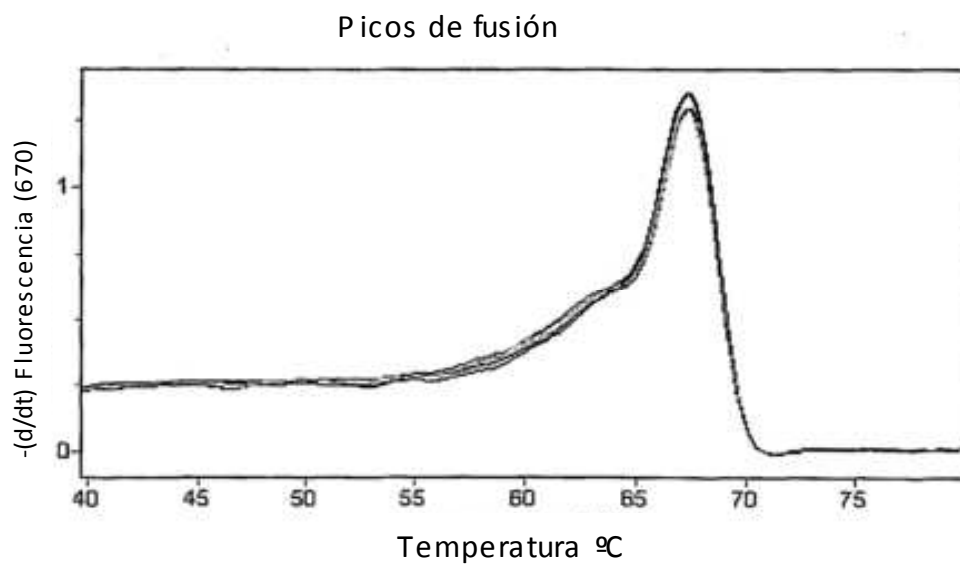
Canal de 640 nm con compensación de color



**Fig. 7c**

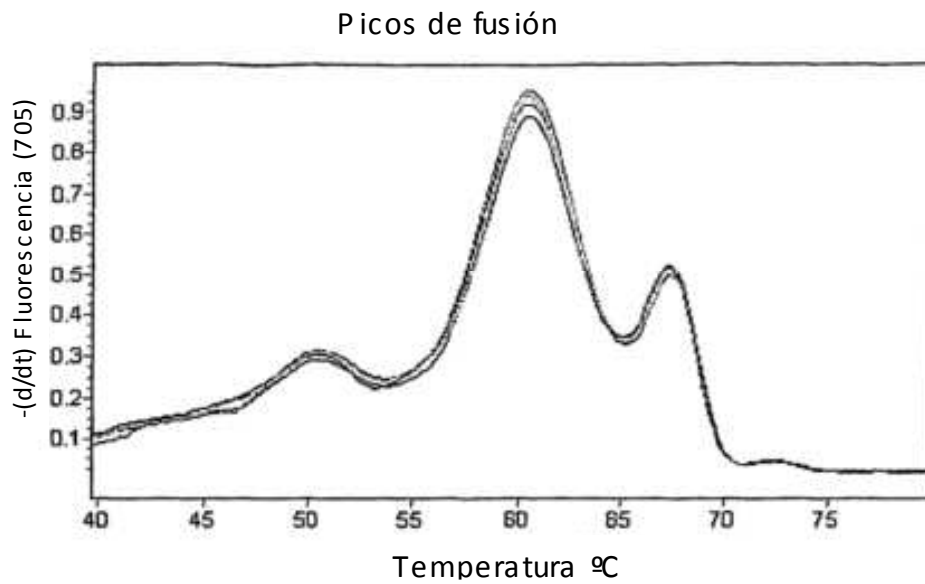


Canal de 670 nm sin compensación de color

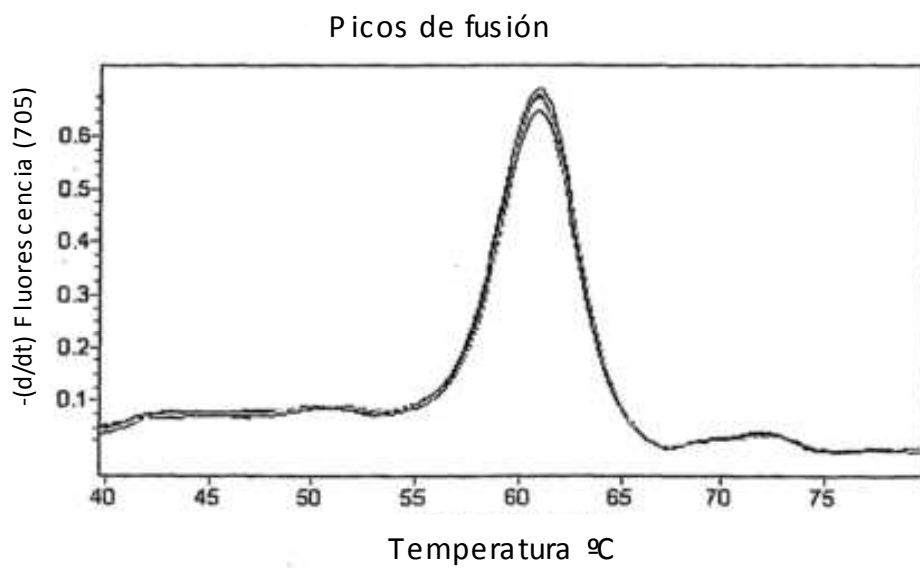


Canal de 670 nm con compensación de color

**Fig. 7d**



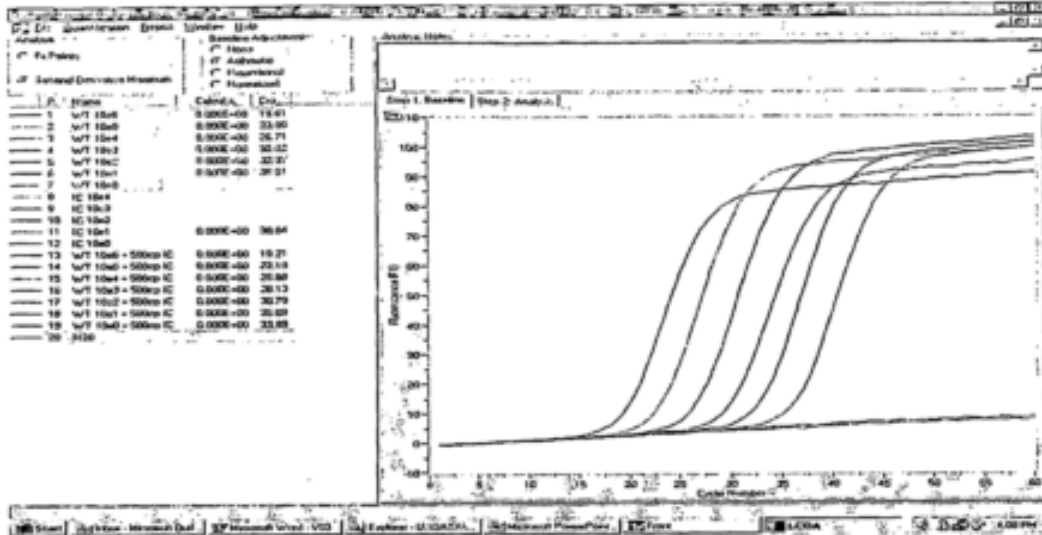
Canal de 705 nm sin compensación de color



Canal de 705 nm con compensación de color

Fig. 8a

F1: 530nm (FAM)



F2: 560 nm (Hex)

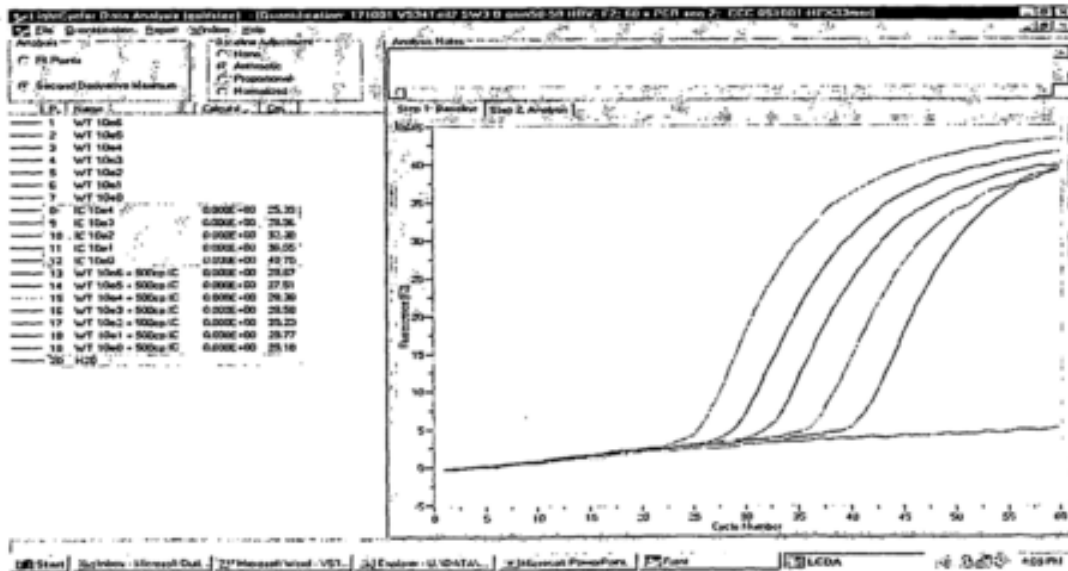
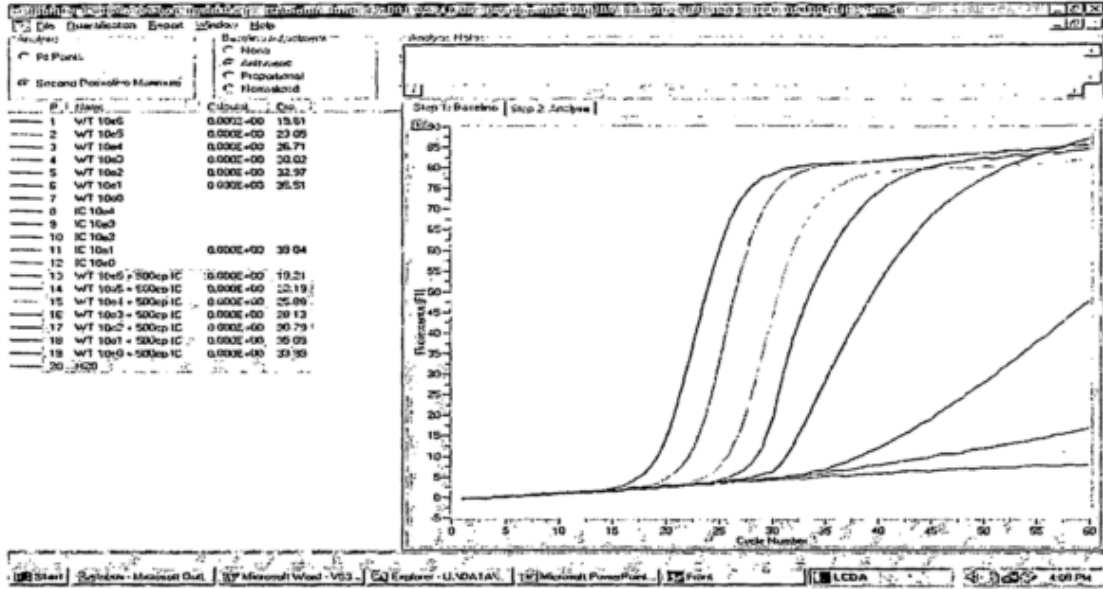


Fig. 8b

F1: 530nm (FAM)



F2: 560 nm (HEX)

