

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 341**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 27/30** (2006.01)

**G01N 27/403** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05856910 .4**

96 Fecha de presentación: **05.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1784512**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2007**

54 Título: **Detección de hibridación de ácidos nucleicos electrocatalítica**

30 Prioridad:  
**06.08.2004 US 913925**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.07.2012**

73 Titular/es:  
**THE TRUSTEES OF BOSTON COLLEGE  
LOWER CAMPUS OFFICE BUILDING, ROOM 550,  
140 COMMONWEALTH AVENUE  
CHESTNUT HILL, MA 02467-3807, US**

72 Inventor/es:  
**KELLEY, Shana;  
GASPARAC, Rahela;  
LAPIERRE-DEVLIN, Melissa y  
TAFT, Bradford**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

**ES 2 385 341 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

Detección de hibridación de ácidos nucleicos electrocatalítica

**Antecedentes**

5 La aplicación de la información genética disponible recientemente a los avances en la medicina preventiva y en el tratamiento de enfermedades requiere tecnologías de detección de ADN eficientes y exactas.<sup>1,2</sup> Uno de los objetivos de los desarrollos tecnológicos recientes es el de sistemas que exploten la hibridación de ADN diferencial en superficies sólidas.<sup>3-6</sup> En teoría, la hibridación de secuencias diana que representan fragmentos genómicos microbianos o genes relacionados con enfermedades humanas para inmovilizar secuencias de sondas permitiría una detección de ADN de alta sensibilidad y de alto rendimiento. Además, si se pudieran discriminar secuencias estrechamente relacionadas, se podrían detectar e identificar patógenos microbianos.

10 Se puede usar una variedad de técnicas espectroscópicas y analíticas para detectar la hibridación de ADN en superficies.<sup>7-22</sup> Se pueden usar nanopartículas de oro modificadas con ADN para detectar secuencias de ADN usando espectroscopía óptica y de fluorescencia.<sup>12,18</sup> La resonancia de plasmón superficial también proporciona un medio para monitorizar la hibridación de secuencias diana con sustratos de oro modificados con ADN en tiempo real.<sup>3,4,19,20,22</sup>  
 15 Los resultados obtenidos con estos procedimientos indican que se puede lograr la detección de ADN con alta sensibilidad cuando se usan oligonucleótidos movilizados para capturar secuencias de una solución.

Otros procedimientos de detección de genes (por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.972.692, y la patente de los EE. UU. N.º 5.312.527) no usan un ensayo electrocatalítico para la detección de hibridación de ADN.

20 La detección de secuencias de ADN usando una lectura electroquímica es particularmente atractiva para el desarrollo de diagnósticos clínicos.<sup>2,6,23,24</sup> Se pueden realizar medidas electroquímicas cuantitativas de este tipo usando instrumentación compacta y económica, y normalmente es innecesario usar muestras de ADN marcadas covalentemente con grupos indicadores, simplificando los procedimientos de preparación de muestras. De hecho, se ha informado de varios procedimientos para la detección electroquímica de ADN, la mayoría de los cuales se basan en la señal producida por un grupo indicador activo redox unido no covalentemente que se incrementa cuando se hibrida el ADN a una superficie modificada con una secuencia de sonda.<sup>7-11,13,15,21</sup> Además, se pueden detectar electroquímicamente sustituciones de bases sueltas que producen emparejamientos inadecuados de bases dentro de dúplex de ADN inmovilizados sobre superficies de oro usando sondas intercalantes.<sup>14,16</sup> La interrupción del apilamiento de bases provocada por el emparejamiento inadecuado atenúa el flujo de corriente al indicador interfiriendo el acoplamiento electrónico mediado por ADN. Este efecto permitiría potencialmente la detección electroquímica de mutaciones puntuales relacionadas con enfermedad.

25 Los procedimientos electrocatalíticos que amplifican las señales obtenidas en las superficies de electrodos modificados con ADN proporcionan un medio poderoso para incrementar la sensibilidad y precisión de un ensayo de detección. El  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  generado electroquímicamente reacciona con guaninas contenidas dentro de una diana hibridada en un procedimiento catalítico que genera señales grandes que se pueden usar para detectar la hibridación de ADN, aunque con limitaciones debido a la dependencia de la secuencia.<sup>13,15,21,24</sup> Además, se ha usado una reacción electrocatalítica entre una sonda intercalante, azul de metileno y  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  transmitido en solución para amplificar los cambios de señal que informan de la presencia de mutaciones puntuales que producen emparejamiento inadecuado.<sup>16</sup> Sin embargo, ninguno de los sistemas es ideal para una detección basada en hibridación de secuencias estrechamente relacionadas.

40 Lapierre *et al.*<sup>4</sup> da a conocer una detección electroquímica (esquema 1, fig. 1) de un ácido nucleico diana usando un compuesto activo redox de rubidio que se une a ADN de forma no específica a través de interacciones electrostáticas con el esqueleto de fosfato lo que proporciona una señal que informa del incremento de grupos cargados negativamente en la superficie del electrodo después de la hibridación de una secuencia diana. La señal se amplifica por un oxidante de Fe(III), lo que permite que se genere Ru(III) para múltiples ciclos redox.

45 Keohne *et al.* (Nanotechnology 14 (2003) 1239-1245) da a conocer una detección de ácidos nucleicos usando nanohilos integrados en una matriz de sílice. Ferain *et al.* (Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section - B-beam interactions with materials and atoms, Elsevier NL, vol. 208, 1 de agosto de 2003) da a conocer el desarrollo de plantillas basadas en policarbonato nanoporoso.

**Sumario de la invención**

50 La invención proporciona un procedimiento para la detección electroquímica de un ácido nucleico diana en una muestra de acuerdo con la reivindicación 1.

La invención también proporciona procedimientos para la detección electroquímica de hibridación de ácidos nucleicos en de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 5.

Las características adicionales de la invención se establecen en las reivindicaciones dependientes 6 a 17.

**Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es una ilustración de una detección electrocatalítica de hibridación de ADN de una secuencia de *H. pylori*.

La FIG. 2A y 2B muestra una detección de hibridación electrocatalítica de la secuencia Hpn a partir de *H. pylori*. FIG. 2A: sin diana. A FIG. 2B: con diana.

- 5 La FIG. 3 es un histograma que muestra la reproducibilidad de la detección de hibridación electrocatalítica. Las pruebas descritas a continuación y mostradas en la FIG. 2 se realizaron en cuatro días diferentes.

La FIG. 4 es una ilustración de una detección electrocatalítica de hibridación de ADN.

- 10 Las FIG. 5A, 5B y 5C son un par de voltamogramas y un gráfico de barras. La FIG. 5A es un voltamograma cíclico que ilustra la potenciación de la señal electrocatalítica después de la hibridación de la secuencia diana. La señal inicial se muestra como un trazo de puntos, y la señal obtenida después de la introducción de la diana se muestra como una línea continua. La FIG. 5B es un voltamograma obtenido con los mismos electrodos pero sólo en presencia de Ru(III), que presenta un incremento de señal muy pequeño después de la introducción de la diana. La FIG. 5C muestra la detección de secuencias relacionadas con *H. pylori* monitorizando la carga integrada. Los datos presentados corresponden a un cambio en la carga después de 30 minutos de hibridación.

- 15 La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra la dependencia con el tiempo de la hibridación para las secuencias de WT y A2143C correspondientes a un fragmento del ARNr 23S de *H. pylori*.

La FIG. 7 es un gráfico de barras que muestra la dependencia con el tiempo de la hibridación para una sonda de HP2a (sonda de Hpn complementaria) y una sonda de HP2b (sonda de Hpn no complementaria).

- 20 La FIG. 8 es una electrocatalisis de Ru(III)/Fe(III) como indicador de ADN inmovilizado en superficie. (A) Dependencia de electrocatalisis sobre cobertura de superficie de ADN. Se prepararon películas de ADN con densidades variables variando la concentración de MgCl<sub>2</sub> durante la exposición de sustratos de oro a soluciones de la sonda. Se muestran voltamogramas cíclicos obtenidos en electrodos modificados en presencia de MgCl<sub>2</sub> 10 (línea de puntos), 30 (línea de guiones) y 100 (línea continua) mM. (B) Voltamogramas cíclicos que ilustran la potenciación de la señal electrocatalítica después de la hibridación de T2a (la línea de puntos corresponde al VC obtenido prehibridación, la línea continua corresponde al VC obtenido después de la hibridación). Se prepararon películas de ADN en presencia de MgCl<sub>2</sub> 50 mM. Se indujo la hibridación con T2a introduciendo una solución que contiene ADN 20 µM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM y MgCl<sub>2</sub> 100 mM durante 30 minutos. Se calentó la solución de la diana hasta 40 °C, se depositó sobre un electrodo invertido y se incubó durante 30 minutos. No se obtuvo ningún cambio en la señal cuando se introdujo un tampón o una secuencia no complementaria (T-NC). Para la comparación, se muestran voltamogramas de una solución de Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> 27 µM obtenida antes (línea de puntos) y después de la hibridación (línea continua).
- 25
- 30

- La FIG. 9 muestra una detección de secuencias relacionadas con *H. pylori* a través de cambios en la carga integrada obtenida usando electrocatalisis. Se usó voltametría cíclica para cuantificar la carga en los electrodos expuestos a diferentes pares de secuencias diana/sonda. Se prepararon películas de secuencias de sondas de ADN (HP2b y HP1a) como se describe en la FIG. 8 con la excepción de que se depositó la secuencia de la sonda de 30 nucleótidos (HP1a) durante aproximadamente 1,5 horas. La carga integrada promedio medida en electrodos modificados por sonda antes de la hibridación se muestra como una línea de puntos. Se dejó que la hibridación de todas las secuencias diana procediera durante aproximadamente 30 minutos y se realizó de otro modo como se describe en la FIG. 8, con la excepción de la inclusión de MgCl<sub>2</sub> 200 mM en la solución de hibridación para la diana *hpn* (T1).
- 35

- 40 La FIG. 10 muestra la dependencia de la eficacia de la hibridación sobre la cobertura de superficie. Se usaron sondas de tiolato modificadas con fluoresceína y secuencias diana para cuantificar las coberturas de superficie absoluta, y se usó voltametría cíclica para cuantificar los cambios en la carga después de la hibridación. Las secuencias de sonda (HP2a) y diana (T2a) y las condiciones experimentales son idénticas a la FIG. 8A.

- 45 La FIG. 11 muestra la dependencia con el tiempo de la hibridación para las secuencias de WT y A2143C correspondientes a un fragmento del ARNr 23S de *H. pylori*. Se depositaron películas de ADN de sonda (HP2a) desde soluciones que contienen MCH 1 µM, ADNss 5µM y fosfato de sodio 0,8 M (pH 7) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó la hibridación con la sonda 1 µM en fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM y MgCl<sub>2</sub> 100 mM durante el tiempo designado. Se incubaron los electrodos a 40 °C durante la hibridación.

- 50 La FIG. 12 muestra la detección electrocatalítica de dianas de ADN y ARN extendidas. Se depositaron soluciones de sonda de ADN (HP1b y HP1c) durante 1,5 horas. Se expusieron la solución de diana que contenía diana 500 nM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7), y NaCl 25 mM y se expusieron a películas de ADN durante 1 hora a 45 °C. Se realizó la hibridación de diana de ARN bajo las mismas condiciones excepto porque se usó ARN 1µM.

La FIG. 13A muestra ilustraciones esquemáticas de conjuntos de nanoelectrodos 2D y 3D.

La FIG. 13B muestra nanohilos con sondas de ácidos nucleicos unidas a los mismos.

La FIG. 14 muestra voltamogramas cíclicos para la electrocatálisis de Ru(III)/Fe(III) en macroelectrodos de (A) 2D NEE, (B) 2D NEE y (C) Au en ausencia (-) y en presencia de (+) un oligonucleótido de ADN complementario de la sonda inmovilizada. Los datos mostrados se obtuvieron a una velocidad de exploración de 100 mV/s.

- 5 La FIG. 15 muestra la evaluación del límite de detección de ADN en un 3D NEE usando voltametría cíclica. Los datos mostrados corresponden a ADN diana 0, 1 pM, 1 nM, 1 μM y 20 μM.

### Descripción detallada

Definiciones:

- 10 "Soporte sólido", como se usa en el presente documento, se refiere al material al que se unen la sonda de ácido nucleico. Los soportes sólidos adecuados están comercialmente disponibles, y serán evidentes para el experto. Los soportes se pueden fabricar a partir de materiales tales como vidrio, cerámica, sílice y silicio, y pueden incorporar materiales conductores para servir como electrodo. También se pueden usar soportes conductores con una superficie de oro. Los soportes comprenden normalmente una superficie plana (plana), o al menos una estructura en la que los polinucleótidos que se van a examinar están aproximadamente en el mismo plano. El soporte puede ser un electrodo, 15 o puede estar unido a un electrodo.

- "Emparejamiento inadecuado", como se usa en el presente documento, se refiere a un dúplex en el que menos de todos los nucleótidos en una cadena están perfectamente emparejados con la hebra (por ejemplo, cuando se produce el apareamiento de nucleótidos diferentes de adenosina-timina o guanina-citosina, por ejemplo, se produce el apareamiento de nucleótidos tales como adenosina-citosina, adenosina-guanina, adenosina-adenosina, 20 timina-citosina, timina-guanina, timina-timina, guanina-guanina o citosina-citosina), donde se produce una delección o inserción de uno o más nucleótidos de ADN en una cadena en comparación con la otra cadena complementaria (por ejemplo, se produce una delección de 1, 2, 5, 10, 15 o más nucleótidos o una inserción de 1, 2, 5, 10, 15 o más nucleótidos), o se producen otros emparejamientos inadecuados ente las dos cadenas del dúplex. Los emparejamientos inadecuados de ADN pueden surgir de errores de errores de replicación del ácido nucleico, 25 mutagénesis, desaminación de 5-metilcitosina, formación de dímeros de timidina, recombinación de ácido nucleico, etc.

- Por "sonda" se quiere decir un oligonucleótido monocatenario que puede unirse a al menos una porción del ácido nucleico diana buscada para que sea detectada. En general, la sonda tendrá una secuencia parcial o completamente complementaria con una secuencia del ácido nucleico diana buscada para que sea detectada, para que se hibride de 30 forma estable a la misma bajo condiciones de hibridación restrictivas. En el caso de una sonda específica de grupo o especie, la sonda tiene la capacidad de hibridarse de forma estable a un ácido nucleico diana y no a los ácidos nucleicos no diana, tales como los de organismos ajenos al grupo o especie filogenética bajo condiciones de hibridación restrictivas. Las sondas pueden tener, aunque no sea necesario, regiones que no son complementarias a una secuencia diana, siempre que estas secuencias no alteren sustancialmente la especificidad deseada de la sonda 35 bajo condiciones de hibridación restrictivas.

- Como se usa en el presente documento, el término "una sonda de ácido nucleico" también se refiere a un ácido nucleico que se puede unir a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente a través de un apareamiento de bases complementarias, normalmente a través de la 40 formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en el presente documento, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc) o un resto de azúcar. Además, las bases en una sonda se pueden unir por un engarce distinto de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Por tanto, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes se unen por enlaces peptídicos, en lugar de engarces fosfodiéster. Se entenderá por un experto en la técnica que las sondas se pueden unir a secuencias diana carentes de complementariedad completa con la secuencia 45 de sonda dependiendo de la restricción de las condiciones de hibridación. Mediante el ensayo para determinar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

- Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También se debe entender que el 50 término incluye, como equivalentes, análogos de ARN o ADN fabricados a partir de análogos de nucleótidos, y, como aplicables a la realización descrita, polinucleótidos mono (sentido o antisentido) y bicatenarios. EST, cromosomas, ADNc, ARNm, y ARNr son ejemplos representativos de moléculas que se pueden denominar ácidos nucleicos.

Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se refiere a cualquier proceso por que el una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de apareamiento de bases.

- 55 Como se usa en el presente documento, el término "condiciones de hibridación" se refiere a las condiciones estándar bajas las que se usan las moléculas de ácido nucleico para identificar moléculas de ácido nucleico similares. Estas condiciones estándar se dan a conocer, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Sambrook *et al.*, *ibid.* (véanse específicamente, las páginas 9.31-9.62). Además, las fórmulas para calcular las condiciones de hibridación y lavado apropiadas para lograr una hibridación que permita grados variables de emparejamiento inadecuado se dan a conocer, por ejemplo, en Meinkoth *et al.*, 1984. *Anal. Biochem.* 138, 267-284; Meinkoth *et al.*, *ibid.* Los ejemplos no limitantes de condiciones de hibridación incluyen condiciones de hibridación restrictivas bajas, condiciones de hibridación restrictivas moderadas y condiciones de hibridación restrictivas rigurosas.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se usa en su sentido más amplio, se refiere a cualquier material vegetal, animal o vírico que contenga ADN o ARN, tal como, por ejemplo, tejido o fluido aislado a partir de un individuo (incluyendo sin limitación, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, linfa, lágrimas, saliva y secciones de tejido) o de constituyentes de cultivo celular *in vitro*, así como muestras del entorno. La muestra de ácidos nucleicos se puede extraer de cualquier fuente y puede ser natural o sintética. La muestra de ácidos nucleicos puede contener ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN) o copolímeros de ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos, o combinaciones de los mismos. De forma alternativa, la muestra se ha podido someter a purificación (por ejemplo, extracción) u otro tratamiento. El término "muestra" también se puede referir a "una muestra biológica".

Como se usa en el presente documento, el término "una muestra biológica" se refiere a un organismo completo o a un subconjunto de sus tejidos, células o partes de componentes (por ejemplo, fluidos corporales, incluyendo pero sin limitarse a sangre, moco, fluido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, sangre del cordón umbilical amniótico, orina, fluido vaginal y semen). "Una muestra biológica" se refiere además a un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir de un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes de componentes, o una fracción o porción del mismo, incluyendo pero sin limitarse a, por ejemplo, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, fluido linfático, secciones externas de la piel, tubo respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, órganos. Más a menudo, la muestra se ha extraído de un animal, pero el término "muestra biológica" también se puede referir a células o tejido analizados *in vivo*, es decir, sin extraerse del animal. Típicamente, una "muestra biológica" contendrá células del animal, pero el término también se puede referir a material biológico no celular, tal como fracciones no celulares de sangre, saliva u orina, que se puede usar para medir los niveles de polinucleótidos o polipéptidos asociados a cáncer. "Una muestra biológica" se refiere además a un medio, tal como un caldo o gel de nutrientes en el que se ha propagado un organismo, que contiene los componentes celulares, tales como proteínas o moléculas de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término "un incremento de la señal" significa que la señal generada a partir de la hibridación entre dos ácidos nucleicos es mayor que la generada a partir de uno de dichos dos ácidos nucleicos solo en forma no hibridada. Preferentemente, la hibridación es entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico diana. También preferentemente, la hibridación es entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico. Preferentemente, el incremento es al menos de aproximadamente un 10 %, preferentemente al menos aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente más de un 100 %, aproximadamente dos veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente cincuenta veces, o mayor.

Como se usa en el presente documento, el término "disminución de la señal" significa que la señal generada a partir de la hibridación entre dos ácidos nucleicos que son complementarios salvo por un emparejamiento inadecuado, es menor que la generada a partir de la hibridación entre dos ácidos nucleicos completamente complementarios. Preferentemente, la disminución es al menos de aproximadamente un 10 %, preferentemente al menos aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente más de un 100 %, aproximadamente dos veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente cincuenta veces, o mayor.

Como se usa en el presente documento, el término "un metal de transición" se refiere a cualquiera de los elementos presentes entre los elementos del grupo IIA y los elementos del grupo IIB en la tabla periódica. Los metales de transición que se van a usar en un complejo de metal de transición de la presente invención incluyen los del cuarto, quinto y sexto periodos de la tabla periódica de los elementos. Preferentemente, los metales de transición usados en la presente invención incluyen hierro, rutenio, cobalto, molibdeno osmio y renio.

Como se usa en el presente documento, el término "complejo de metal de transición" se refiere a una estructura compuesta por un átomo o ión de metal de transición, en general, un catión, rodeado de una serie de ligandos cargados negativamente o neutros que poseen pares de electrones solitarios que se pueden ceder al metal central. El metal de transición se define anteriormente en el presente documento. Los ligandos se unen al metal de transición central usando enlaces dativos. Hay una serie de diferentes tipos de ligandos que se pueden aplicar a la presente invención. Los ejemplos no limitantes incluyen pero no se limitan a, ligandos monodentados, ligandos bidentados, ligandos tridentados, ligandos tetradentados y ligandos hexadentados, etc. Preferentemente, los ligandos pueden ser basados en piridina, basado en fenatrolina, heterocíclico, acuo, aromático, cloruro (Cl<sup>-</sup>), o amoníaco (NH<sub>3</sub>) o cianuro (CN<sup>-</sup>).

Como se usa en el presente documento, las formas del singular "un", "una" y "el/la" usadas en la memoria descriptiva

y las reivindicaciones incluyen referentes tanto en singular como en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

#### I Ensayo de detección electrocatalítica para la detección de hibridación de ácido nucleico

5 En el presente documento se describe un ensayo de detección electrocatalítica que informa de la hibridación entre ácidos nucleicos o entre ácidos nucleicos y proteínas. En un aspecto, se puede usar el ensayo para detectar la hibridación entre una sonda de ácido nucleico y una diana de ADN o ARN. El presente ensayo es suficientemente sensible como para resolver los cambios de bases individuales en la secuencia diana. El procedimiento se beneficia de una reacción entre un par redox que comprende un compuesto de unión a ácido nucleico y una sonda activa redox.

10 El compuesto de unión a ácido nucleico puede ser un complejo de metal de transición. Preferentemente, el metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. También preferentemente, el complejo de metal de transición es un complejo de amonio del metal de transición. Más preferentemente, el complejo de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

15 La sonda activa redox también puede ser un complejo de metal de transición. Preferentemente, el metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, molibdeno, iridio, osmio, hierro y renio. También preferentemente, el complejo de metal de transición es un complejo de cinato o cloruro del metal de transición. Más preferentemente, el complejo de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ . Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{-2}$  o  $\text{IrCl}_6^{-3}$ .

20 De forma alternativa, la sonda activa redox también puede ser una molécula orgánica, tal como ácido ascórbico o tripopilamina.

25 El compuesto de unión a ácido nucleico se une al ácido nucleico principalmente a través de interacciones electrostáticas con el esqueleto de fosfato, y por lo tanto su reducción electroquímica proporciona una señal que informa sobre el incremento de grupos cargados negativamente en la superficie del electrodo después de la hibridación de un ácido nucleico diana. La señal se amplifica por el metal de transición u oxidante orgánico de la sonda activa redox lo que permite que el metal de transición se regenere para múltiples ciclos. La inmovilización de la sonda de ácido nucleico sobre superficies altamente conductoras, por ejemplo, oro, amplifica los efectos cinéticos de los emparejamientos inadecuados de bases sobre la hibridación de ácido nucleico, permitiendo que se resuelvan los cambios de bases individuales.

30 Una ventaja del ensayo es el uso del compuesto unido al ácido nucleico para informar del acontecimiento de hibridación y el acoplamiento de esta señal a otro procedimiento electrocatalítico. El diseño también proporciona una sensibilidad superior, por ejemplo, la detección de un emparejamiento inadecuado de una base individual.

35 La invención descrita en el presente documento es útil para la detección de agentes bacterianos y víricos infecciosos. La invención también es útil en la detección de genes y proteínas, por ejemplo, los cambios en genes y proteínas, por ejemplo, los cambios en oncogenes. Por lo tanto, es útil en un ámbito de diagnóstico clínico, y para la detección de agentes patógenos en ámbitos no clínicos, por ejemplo, la detección de agentes de bioterrorismo.

40 En otro aspecto, el procedimiento descrito en el presente documento se puede usar para determinar la presencia de un ácido nucleico diana de acuerdo con el siguiente protocolo. Una muestra biológica sospechosa de contener el ácido nucleico diana se puede tratar opcionalmente para liberar cualquier ácido nucleico contenido dentro de la muestra. Por ejemplo, la muestra puede ser suero, sangre, otros fluidos corporales, tejido, etc. La muestra también puede ser de un ser humano, un animal, una planta, etc. La muestra también puede ser ácido nucleico lavado de un hisopo o de algún otro tipo de material usado para limpiar las superficies para detectar contaminantes. La muestra también puede ser ácido nucleico extraído o lavado de un filtro a través del que se pasa aire, por ejemplo, un filtro de un sistema de filtración de aire, en el caso de detección de agentes de bioterrorismo transportados por el aire. Se puede tratar un artículo de este tipo para extraer el ácido nucleico por procedimientos que son conocidos en la técnica, por ejemplo, 45 detección forense y de contaminación. El ácido nucleico extraído del artículo se puede someter a prueba directamente por los procedimientos descritos en el presente documento, o se puede amplificar para potenciar la detección.

50 En una realización, la invención proporciona un procedimiento de detección de hibridación de ácido nucleico entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el procedimiento incluye las etapas de: (a) proporcionar una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un sustrato sólido; (b) poner en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y la sonda inmovilizada con una solución que contiene la muestra y un par redox, en el que el par redox comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición; y (c) medir la señal electrocatalítica generada por la hibridación de la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana; donde un incremento de la señal detectada en la etapa (c) con relación a la de una muestra de control que no contiene ácido nucleico, indica que se ha producido la hibridación de ácido nucleico. El procedimiento también 55 puede incluir una etapa adicional de prueba de un control, poniendo en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y la sonda de ácido nucleico inmovilizada con una solución que no contiene muestra, y un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición.

Preferentemente, el metal de transición del primer complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del primer complejo de metal de transición es rutenio. También preferentemente, el primer complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición. Más preferentemente, el primer complejo de de amonio de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Lo más preferentemente, el complejo de amonio de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

Preferentemente, el metal de transición del segundo complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del segundo de complejo de metal de transición es hierro o iridio. También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cinato de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Lo más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ . También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cloruro de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cloruro de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{2-}$  o  $\text{IrCl}_6^{3-}$ .

En otra realización, la invención también proporciona un procedimiento de detección de hibridación de ácido nucleico entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico, en el que el procedimiento incluye las etapas de: (a) proporcionar el primer ácido nucleico inmovilizado sobre un soporte sólido; (b) poner en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y el primer ácido nucleico inmovilizado con una solución sospechosa de contener el segundo ácido nucleico y un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición; y (c) medir la señal electrocatalítica generada por la hibridación del primer y segundo ácidos nucleicos; en el que un incremento de la señal detectada en la etapa (c) con relación a la de un primer ácido nucleico no hibridado, indica que se ha producido la hibridación de ácido nucleico. El procedimiento también puede incluir una etapa adicional de prueba de un control, poniendo en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y el primer ácido nucleico inmovilizado con una solución que no contiene muestra, y un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición.

Preferentemente, el metal de transición del primer complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del primer complejo de metal de transición es rutenio. También preferentemente, el primer complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición. Más preferentemente, el primer complejo de de amonio de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Lo más preferentemente, el complejo de amonio de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

Preferentemente, el metal de transición del segundo complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del segundo de complejo de metal de transición es hierro o iridio. También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cinato de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Lo más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ . También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cloruro de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cloruro de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{2-}$  o  $\text{IrCl}_6^{3-}$ .

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de detección de un emparejamiento inadecuado entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico, que comprende: (a) proporcionar una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido; (b) poner en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y la sonda inmovilizada con una solución que contiene la muestra que contiene un ácido nucleico diana y un par redox, en el que el par redox comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición; y (c) medir la señal electrocatalítica generada por la hibridación de la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana; en el que un incremento de la señal detectada en la etapa (c) con relación a la de una complementariedad perfecta entre la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana, indica que hay un emparejamiento inadecuado entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico. El procedimiento también puede incluir una etapa adicional de prueba de un control, poniendo en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y la sonda de ácido nucleico inmovilizada con una solución que no contiene muestra, y un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición.

Preferentemente, el metal de transición del primer complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del primer

complejo de metal de transición es rutenio. También preferentemente, el primer complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición. Más preferentemente, el primer complejo de de amonio de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Lo más preferentemente, el complejo de amonio de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

- 5 Preferentemente, el metal de transición del segundo complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del segundo de complejo de metal de transición es hierro o iridio. También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cinato de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Lo más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ . También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cloruro de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cloruro de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{-2}$  o  $\text{IrCl}_6^{-3}$ .

La invención proporciona además un procedimiento de detección de un emparejamiento inadecuado entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico, en el que el procedimiento incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar el primer ácido nucleico inmovilizado sobre un soporte sólido; (b) poner en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y el primer ácido nucleico inmovilizado con una solución que contiene el segundo ácido nucleico y un par redox, en el que el par redox comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición; y (c) medir la señal electrocatalítica generada por la hibridación del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico; en el que una disminución de la señal detectada en la etapa (c) con relación a la de una complementariedad perfecta entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico, indica que hay un emparejamiento inadecuado entre el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico. El procedimiento también puede incluir una etapa adicional de prueba de un control, poniendo en contacto, bajo condiciones de hibridación, el soporte sólido y la sonda de ácido nucleico inmovilizada con una solución que no contiene muestra, y un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición.

Preferentemente, el metal de transición del primer complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio.

Más preferentemente, el metal de transición del primer complejo de metal de transición es rutenio. También preferentemente, el primer complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición. Más preferentemente, el primer complejo de de amonio de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Lo más preferentemente, el complejo de amonio de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

Preferentemente, el metal de transición del segundo complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del segundo de complejo de metal de transición es hierro o iridio. También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cinato de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Lo más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ . También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cloruro de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cloruro de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{-2}$  o  $\text{IrCl}_6^{-3}$ .

En otra realización, la invención también proporciona un procedimiento de detección de hibridación de ácido nucleico entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico diana, en el que el procedimiento incluye las etapas de: (a) proporcionar una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido; (b) poner en contacto la sonda inmovilizada con una solución que contiene: (i) un complejo de metal de transición; (c) medir la señal electrocatalítica generada; (d) poner en contacto la sonda inmovilizada con una solución que contiene: (i) una muestra pensada para incluir el ácido nucleico diana, y (ii) un complejo de metal de transición; (e) medir la señal electrocatalítica generada; en el que un incremento de la señal detectada en la etapa (e) sobre la señal generada en la etapa (c) indica que se ha producido la hibridación entre la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana. Preferentemente, el metal de transición del complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del complejo de metal de transición es rutenio. También preferentemente, el complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición. Más preferentemente, el primer complejo de de amonio de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Lo más preferentemente, el complejo de amonio de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

Las soluciones también pueden incluir un segundo complejo de metal de transición para potenciar la señal electrocatalítica generada. Preferentemente, el metal de transición del segundo complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del segundo de complejo de metal de transición es hierro o iridio. También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cinato de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Lo más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ . También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cloruro de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cloruro de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{-2}$  o  $\text{IrCl}_6^{-3}$ .

De forma alternativa, las soluciones también pueden incluir una molécula orgánica como una sonda redox para potenciar la señal electrocatalítica generada. Preferentemente, la molécula orgánica puede ser ácido ascórbico o tripropilamina.

El procedimiento también puede incluir las etapas de aclarado, por ejemplo, aclarar el electrodo entre el contacto con las diferentes soluciones.

Otro aspecto de la invención proporciona además un procedimiento de detección de la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra, en el que el procedimiento incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido; (b) poner en contacto la sonda inmovilizada con una solución que contiene: (i) un complejo de metal de transición; (c) medir la señal electrocatalítica generada; (d) poner en contacto la sonda inmovilizada con una solución que contiene: (i) una muestra pensada para incluir el ácido nucleico diana, y (ii) un complejo de metal de transición; (e) medirse la señal electrocatalítica generada; en el que un incremento de la señal detectada en la etapa (e) sobre la señal generada en la etapa (c) indica que el ácido nucleico diana está presente en la muestra. Preferentemente, el metal de transición del complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del complejo de metal de transición es rutenio. También preferentemente, el complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición. Más preferentemente, el primer complejo de de amonio de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Lo más preferentemente, el complejo de amonio de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

Las soluciones también pueden incluir un segundo complejo de metal de transición para potenciar la señal electrocatalítica generada. Preferentemente, el metal de transición del segundo complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del segundo de complejo de metal de transición es hierro o iridio. También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cinato de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Lo más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ . También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cloruro de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cloruro de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{-2}$  o  $\text{IrCl}_6^{-3}$ .

De forma alternativa, las soluciones también pueden incluir una molécula orgánica como una sonda redox para potenciar la señal electrocatalítica generada. Preferentemente, la molécula orgánica puede ser ácido ascórbico o tripropilamina.

El procedimiento también puede incluir las etapas de aclarado, por ejemplo, aclarar el electrodo entre el contacto con las diferentes soluciones.

La invención también proporciona un procedimiento de detección de un emparejamiento inadecuado entre dos ácidos nucleicos, en el que el procedimiento incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido; (b) poner en contacto la sonda inmovilizada con una solución que contiene: (i) un complejo de metal de transición; (c) medir la señal electrocatalítica generada; (d) poner en contacto la sonda inmovilizada con una solución que contiene: (i) una muestra pensada para incluir el ácido nucleico diana, y (ii) un complejo de metal de transición; (e) medirse la señal electrocatalítica generada; en el que una disminución de la señal detectada en la etapa (e) sobre la señal generada en la etapa (c) indica que hay un emparejamiento inadecuado entre la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana. Preferentemente, el metal de transición del complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del complejo de metal de transición es rutenio. También preferentemente, el complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición. Más preferentemente, el primer

complejo de amonio de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio. Lo más preferentemente, el complejo de amonio de metal de transición es  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ .

- 5 Las soluciones también pueden incluir un segundo complejo de metal de transición para potenciar la señal electrocatalítica generada. Preferentemente, el metal de transición del segundo complejo de metal de transición es uno seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el metal de transición del segundo de complejo de metal de transición es hierro o iridio. También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cinato de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Lo más preferentemente, el segundo complejo de cinato de metal de transición es  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ . También preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cloruro de metal de transición. Más preferentemente, el segundo complejo de cloruro de metal de transición comprende un metal de transición seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, iridio, osmio y renio. Más preferentemente, el segundo complejo de metal de transición es un complejo de iridio cloruro, preferentemente con iridio en sus estados oxidativo que varía desde los estados +3 a +6. Preferentemente, el complejo de cloruro de iridio es  $\text{IrCl}_6^{2-}$  o  $\text{IrCl}_6^{3-}$ .
- 10
- 15

De forma alternativa, las soluciones también pueden incluir una molécula orgánica como una sonda redox para potenciar la señal electrocatalítica generada. Preferentemente, la molécula orgánica puede ser ácido ascórbico o tripropilamina.

- 20 El procedimiento también puede incluir las etapas de aclarado, por ejemplo, aclarar el electrodo entre el contacto con las diferentes soluciones.

En cualquiera de los procedimientos de detección descritos en el presente documento, el soporte sólido puede ser un electrodo. En una realización, el electrodo es un electrodo de oro.

- 25 En cualquiera de los procedimientos de detección descritos en el presente documento, la sonda activa redox puede ser una molécula orgánica, preferentemente ácido ascórbico o tripropilamina, o el segundo complejo de metal de transición puede estar sustituido con una molécula orgánica que tiene una función sustancialmente equivalente al segundo complejo de metal de transición, tal como ácido ascórbico y tripropilamina.

- 30 El ácido nucleico diana que se detecta por el procedimiento de la presente invención puede ser, por ejemplo, ADN monocatenario o bicatenario, ARN monocatenario o bicatenario, ácido nucleico peptídico (ANP) monocatenario o bicatenario o un híbrido de ADN, ARN y/o ANP. La diana también puede ser un polinucleótido, por ejemplo, en una forma purificada o no purificada. La muestra de ácidos nucleicos se puede extraer de cualquier fuente y puede ser natural o sintética. La muestra de ácidos nucleicos puede contener ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN) o copolímeros de ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos, o combinaciones de los mismos. El polinucleótido diana se puede sintetizar enzimática o químicamente *in vitro* o se puede sintetizar no enzimáticamente. La muestra que contiene el polinucleótido diana también puede comprender ADN extragenómico de un organismo, transcritos de ARN del mismo o ADNc preparado a partir de los transcritos de ARN del mismo. Además, el polinucleótido diana se puede sintetizar por la reacción en cadena de la polimerasa o ligasa.
- 35

- 40 Preferentemente, la sonda de ácido nucleico es una secuencia que se sabe que es única para el ácido nucleico diana (por ejemplo, patógeno) que se va a detectar. Estas secuencias únicas se conocen para una serie de patógenos, y los procedimientos para obtener estas secuencias únicas también se conocen (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 4.900.659, "Nucleotide sequence composition and method for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and method for screening for a nucleotide sequence that is specific for a genetically distinct group"). La secuencia de la sonda se puede unir al ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos incluyendo apareamiento de bases.

- 45 Entre el ácido nucleico diana que se puede detectar usando la sonda molecular de la invención está el material genético en forma de ADN o ARN obtenido a partir de cualquier procariota natural, tal como, por ejemplo, bacterias patógenas o no patógenas, incluyendo pero sin limitarse a las especies de *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Chlamydia*, etc., eucariotas tales como, por ejemplo, protozoos y parásitos, hongos, levaduras, plantas superiores, insectos, animales inferiores y superiores, incluyendo mamíferos y seres humanos y células en cultivo de tejidos, o virus tales como, por ejemplo, virus del Herpes, VIH, virus influenza, virus de Epstein Barr, virus de hepatitis B, etc.
- 50

- 55 Los ácidos nucleicos diana de estas fuentes se pueden encontrar, por ejemplo, en muestras de un fluido corporal de un animal, incluyendo un ser humano, tales como, pero sin limitarse a, sangre, orina, fluido linfático, líquido sinovial, bilis, flema, saliva, fluido menstrual y semen. Además, las muestras que contienen ADN o ARN se pueden encontrar, por ejemplo, en fluidos de una planta, tales como, pero sin limitarse a, fluido del xilema, fluido del floema y exudado de plantas. Las muestras que contienen ADN o ARN también se pueden encontrar, por ejemplo, en fuentes no vivas tales como, pero sin limitarse a, alimentos, aguas residuales, muestras forenses, lagos, embalses, ríos y océanos. Los polinucleótidos diana también pueden ser los de organismos muertos o en extinción, por ejemplo, plantas prensadas en colecciones de herbarios, o de pieles, muestras de taxidermia, fósiles, o las de materiales biológicos en colecciones

de museos.

La molécula de ácido nucleico diana se puede amplificar opcionalmente antes de la detección por el procedimiento de la presente invención. El ácido nucleico diana puede estar en forma bicatenaria o bien monocatenaria. En el caso en el que la molécula de ácido nucleico diana sea bicatenaria, en primer lugar se trata preferentemente con un agente de desnaturalización para traducir las dos cadenas a una forma monocatenaria o parcialmente monocatenaria, al inicio de la reacción de amplificación, por procedimientos conocidos en la técnica tales como calentamiento, tratamiento alcalino o por procedimientos enzimáticos. Los procedimientos generales para llevar a cabo este tratamiento se proporcionan por Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. (1989).

Una vez se ha tratado la muestra para exponer cualquier ácido nucleico diana, se puede someter a prueba la solución como se describe en el presente documento para detectar la hibridación entre el ácido nucleico unido y el ácido nucleico diana, si está presente. De forma alternativa, algunas muestras se pueden someter a prueba directamente, por ejemplo, la diana puede existir en una muestra de suero y puede estar directamente accesible, y puede no requerir tratamiento para liberar el ácido nucleico.

Una molécula de ácido nucleico "se puede hibridar" a otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico se puede fusionar con la otra molécula de ácido nucleico bajo las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la solución (véase Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "restricción" de la hibridación. Para el examen preliminar de ácidos nucleicos homólogos, se pueden usar condiciones de hibridación de rigurosidad de restricción baja, correspondientes a una  $T_m$  de 55 °C, por ejemplo, 5X SSC, 0,1 % de SDS, 0,25 % de leche, y sin formamida; o 30 % de formamida, 5X SSC, 0,5 % de SDS). Las condiciones de hibridación de restricción moderada corresponden a una  $T_m$  mayor, por ejemplo, 40 % de formamida, con 5X o 6X SSC. Las condiciones de hibridación de restricción alta corresponden a la mayor  $T_m$ , por ejemplo, 50 % de formamida, con 5X o 6X SSC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la restricción de la hibridación, son posibles emparejamientos inadecuados entre bases. La restricción apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre las dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de  $T_m$  para híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a una  $T_m$  mayor) de las hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado las ecuaciones para calcular  $T_m$  (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 9.50-0.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los emparejamientos erróneos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 11.7- 11.8). Preferentemente, una longitud mínima de un ácido nucleico que se puede hibridar es de al menos 10 nucleótidos; preferentemente, de al menos aproximadamente 15 nucleótidos; y más preferentemente, la longitud es de al menos aproximadamente 20 nucleótidos; y lo más preferentemente, de 30 nucleótidos.

Las "condiciones de hibridación de restricción alta" pueden emplear la hibridación a (1) 1x SSC (10x SSC = NaCl 3 M,  $\text{Na}_3$ -citrato- $2\text{H}_2\text{O}$  0,3 M (88 g/l), pH hasta 7,0 con HCl 1 M), 1 % de SDS (dodecilsulfato de sodio), 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65 °C, (2) 1x SSC, 50 % de formamida, 1 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42 °C, (3) 1 % de seroalbúmina bovina (fracción V),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M (pH 7,2) ( $\text{NaHPO}_4$  1 M = 134 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4 ml 85 % de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  por litro), 7 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65 °C, (4) 50 % de formamida, 5x SSC, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,6), 1x solución de Denhardt (100x = 10 g de Ficoll 400, 10 g polivinilpirrolidona, 10 g de seroalbúmina bovina (fracción V), agua hasta 500 ml), 10 % de sulfato de dextrano, 1 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42 °C, (5) 5X SSC, 5x solución de Denhardt, 1 % de SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65 °C, o bien (6) 5X SSC, 5X solución de Denhardt, 50 % de formamida, 1 % de SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42 °C, lavados con alta restricción de (1) 0,3 - 0,1x SSC, 0,1 % de SDS, a 65 °C, o bien (2)  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  40 mM (pH 7,2), 1 % de SDS, a 65 °C. Las condiciones anteriores están destinadas a usarse para híbridos de se desean para ser utilizado para híbridos ADN-ADN de 50 pares de bases o más. Cuando se cree que el híbrido es menor de 18 pares de bases de longitud, la hibridación y las temperaturas de lavado deben ser de 5 - 10 °C por debajo de la  $T_m$  calculada del híbrido, donde  $T_m$  en °C = (2 x el número de bases A y T) + (4 x el número de bases G y C). Para híbridos que se cree que son de aproximadamente 18 a aproximadamente 49 pares de bases de longitud, la  $T_m$  en °C = (81,5 °C + 16,6 (log<sub>10</sub>M) + 0,41 (% G + C) - 0,61 (% de formamida) - 500/L), donde "M" es la molaridad de cationes monovalentes (por ejemplo,  $\text{Na}^+$ ) y "L" es la longitud del híbrido en pares de bases.

Las "condiciones de hibridación de restricción moderada" pueden emplear la hibridación a (1) 4x SSC (10x SSC = NaCl 3 M,  $\text{Na}_3$ -citrato- $2\text{H}_2\text{O}$  0,3 M (88 g/l), pH hasta 7,0 con HCl 1 M), 1 % de SDS (dodecilsulfato de sodio), 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65 °C, (2) 1x SSC, 50 % de formamida, 1 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42 °C, (3) 1 % de seroalbúmina bovina (fracción V),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM,  $\text{NaHPO}_4$  0,5 M (pH 7,2) ( $\text{NaHPO}_4$  1 M = 134 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4 ml 85 % de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  por litro), 7 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65 °C, (4) 50 % de formamida, 5x SSC, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,6), 1x solución de Denhardt (100x = 10 g de Ficoll 400, 10 g de polivinilpirrolidona, 10 g de seroalbúmina bovina (fracción V), agua hasta 500 ml), 10 % de sulfato de dextrano, 1 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón

desnaturalizado a 42 °C, (5) 5X SSC, 5x solución de Denhardt, 1 % de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65 °C, o bien (6) 5X SSC, 5X solución de Denhardt, 50 % de formamida, 1 % de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42 °C, con lavados con restricción moderada de (1) 0,3 - 0,1x SSC, 0,1 % de SDS, a 65 °C. Las condiciones anteriores están destinadas a usarse para híbridos de se desean para ser  
 5 utilizado para híbridos ADN-ADN de 50 pares de bases o más. Cuando se cree que el híbrido es menor de 18 pares de bases de longitud, la hibridación y las temperaturas de lavado deben ser de 5 - 10 °C por debajo de la  $T_m$  calculada del híbrido, donde  $T_m$  en °C = (2 x el número de bases A y T) + (4 x el número de bases G y C). Para híbridos que se cree que son de aproximadamente 18 a aproximadamente 49 pares de bases de longitud, la  $T_m$  en °C = (81,5 °C + 16,6 (log<sub>10</sub>M) + 0,41 ( % G + C) - 0,61 ( % de formamida) - 500/L), donde "M" es la molaridad de cationes monovalentes (por  
 10 ejemplo, Na<sup>+</sup>) y "L" es la longitud del híbrido en pares de bases.

Las "condiciones de hibridación de baja restricción" pueden emplear la hibridación a (1) 4x SSC (10x SSC = NaCl 3 M, Na<sub>3</sub>-citrato-2H<sub>2</sub>O 0,3 M (88 g/l), pH hasta 7,0 con HCl 1 M), 1 % de SDS (dodecilsulfato de sodio), 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 50 °C, (2) 6x SSC, 50 % de formamida, 1 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 40 °C, (3) 1 % de seroalbúmina bovina (fracción V), Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub>  
 15 0,5 M (pH 7,2) (NaHPO<sub>4</sub> 1 M = 134 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 4 ml 85 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> por litro), 7 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 50 °C, (4) 50 % de formamida, 5x SSC, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,6), 1x solución de Denhardt (100x = 10 g de Ficoll 400, 10 g de polivinilpirrolidona, 10 g de seroalbúmina bovina (fracción V), agua hasta 500 ml), 10 % de sulfato de dextrano, 1 % de SDS, 0,1-2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 40 °C, (5) 5x SSC, 5x solución de Denhardt, 1 % de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 50 °C, o bien (6) 5x SSC, 5x solución de Denhardt, 50 % de formamida, 1 % de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 40 °C, lavados con baja restricción de 2x SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C, o bien (2) 0,5 % de seroalbúmina bovina (fracción V), Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,2), 5 % de SDS. Las condiciones anteriores están destinadas a usarse para híbridos de se desean para ser utilizado para híbridos ADN-ADN de 50 pares de bases o más. Cuando se cree que el híbrido es menor de 18 pares de bases de longitud, la hibridación y las temperaturas de lavado deben ser de 5 - 10 °C por debajo de la  $T_m$  calculada del híbrido, donde  $T_m$  en °C = (2 x el número de bases A y T) + (4 x el número de bases G y C). Para híbridos que se cree que son de aproximadamente 18 a aproximadamente 49 pares de bases de longitud, la  $T_m$  en °C = (81,5 °C + 16,6 (log<sub>10</sub>M) + 0,41 ( % G + C) - 0,61 ( % de formamida) - 500/L), donde "M" es la molaridad de cationes monovalentes (por ejemplo, Na<sup>+</sup>) y "L" es la longitud del híbrido en pares de bases.  
 20  
 25

Los ensayos descritos en el presente documento se pueden usar para detectar patógenos, tales como bacterias o virus, o se pueden usar para detectar la expresión de genes en un sujeto. Por ejemplo, se detectaron genes de *Helicobacter pylori*, un patógeno implicado en úlceras gástricas y cáncer, por los procedimientos descritos en el presente documento. Las dos secuencias pertenecientes al microbio patógeno *Helicobacter pylori* se usan para demostrar la versatilidad y la especificidad ensayo: una que codifica para una proteína de *H. pylori* única y una que representa una pequeña porción del ARNr 23S de este organismo. Ambas secuencias se pueden detectar en el intervalo de concentraciones nanomolares. Además de informar de la presencia de secuencias relacionadas con patógenos, este ensayo puede resolver con exactitud cambios de bases individuales en secuencias diana. Una sustitución de A2143C dentro del ARNr de *H. pylori* que confiere resistencia a antibióticos atenúa significativamente la hibridación a una sonda inmovilizada correspondiente a la secuencia de WT. El emparejamiento erróneo de bases  
 30 individuales introducido por esta mutación ralentiza la cinética de hibridación y permite la discriminación de las dos secuencias en tiempos de hibridación cortos. El ensayo descrito, por lo tanto, puede proporcionar un medio para detectar y genotipar bacterias infecciosas usando procedimientos electroquímicos.  
 35  
 40

La FIG. 1 muestra una representación esquemática del sistema de detección de hibridación de ADN electrocatalítico de la invención, que usa el incremento en la carga de Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> que resulta de la formación de un dúplex de ADN para informar de la hibridación. La introducción de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> hace la reducción electroquímica de este catión catalítica y amplifica la señal dramáticamente. La FIG. 2 ilustra datos representativos obtenidos usando este enfoque para detectar un 30-mero sintético que modela el gen Hpn de *Helicobacter pylori*, una bacteria infecciosa, que está estrechamente relacionada con úlceras gástricas y cáncer. Se modificaron los electrodos de oro con una secuencia de sonda monocatenaria, se trataron los electrodos con mercaptohexanol y se incubaron en dos soluciones tampón  
 45 calentadas (una que contenía la secuencia diana (FIG. 2A) y la otra no (FIG. 2B)). Las condiciones de hibridación fueron de 40 °C, fosfato de sodio 35 mM, NaCl 100 mM, 25 minutos, con o sin secuencia diana de Hpn 4 µM:  
 50

5'-TGT TGC AGC ACT AGC GAT AGT CAT CAT CAA-3' (SEQ ID NO: 1)

El electrodo expuesto a la secuencia diana mostró un incremento pronunciado en la respuesta electroquímica, mientras que el incubado en una solución tampón mostró una disminución en la respuesta (éste es un acontecimiento reproducible, parece ser que el tratamiento con calor desplaza parte del ADN de sonda débilmente unido). La FIG. 3 muestra la excelente reproducibilidad del ensayo.  
 55

## II Detección de ácidos nucleicos usando conjuntos de nanoelectrodos (NEE)

Otro aspecto de la presente invención proporciona la utilización de los ensayos electrocatalíticos descritos en el presente documento en un dispositivo que comprende conjuntos de nanoelectrodos metálicos funcionalizados con oligonucleótidos para detectar niveles extremadamente bajos de moléculas de ácidos nucleicos. La aplicación de los  
 60

ensayos electrocatalíticos en los conjuntos de nanoelectrodos expande sustancialmente el repertorio del alcance de la detección de ácidos nucleicos a una detección biomolecular ultrasensible porque los conjuntos de nanoelectrodos proporcionan una sensibilidad muy alta para la detección biomolecular.

5 El dispositivo para la detección ultrasensible de las moléculas de ácido nucleico incluye una serie de conjuntos de nanoelectrodos metálicos (NEE) que comprende un nanohilo metálico integrado dentro de un sustrato no conductor tal como una membrana de policarbonato y una sonda de ácido nucleico unida al nanohilo metálico. En una realización, el nanohilo metálico comprende oro. En una realización, los nanohilos comprenden plata. En una realización, los nanohilos comprenden platino. En una realización, los nanohilos comprenden una pluralidad de materiales.

10 Los expertos en la técnica reconocerán que otros materiales diversos están dentro del espíritu y alcance de la presente invención.

Preferentemente, el nanohilo metálico varía desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 80 nanómetros de diámetro, y los nanohilos tienen una densidad sobre el sustrato no conductor de desde aproximadamente  $1 \times 10^8$  hasta aproximadamente  $1 \times 10^9$  por centímetro cuadrado.

15 En una realización, la serie de conjuntos de nanoelectrodos de la presente invención es bidimensional, es decir, los nanohilos sobre los nanoelectrodos no sobresalen fuera del sustrato no conductor. En una realización, la serie de conjuntos de nanoelectrodos es tridimensional, es decir, los nanohilos sobre los nanoelectrodos sobresalen fuera del sustrato no conductor. Preferentemente, la parte de los nanohilos que sobresale fuera del sustrato no conductor es de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 300 nanómetros, más preferentemente de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 200 nanómetros.

20 Las técnicas convencionales se usan para preparar una serie de los nanohilos metálicos y los conjuntos de nanoelectrodos. Véase, Menon, VP y Martin, CR, "Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles," *Anal. Chem.*, 67: 1920-1928 (1995), y Yu, S *et al.*, "Nano Wheat Fields Prepared by Plasma-Etching Gold Nanowire-Containing Membranes," *Nano Lett.*, 3:815-818 (2004). En general, el sustrato no conductor que contiene poros cilíndricos nanodimensionados se usa como plantilla para la preparación de los conjuntos de nanoelectrodos.

25 Los nanohilos metálicos se depositan en los poros sobre el sustrato. El procedimiento da como resultado los nanohilos metálicos dentro de los poros del sustrato no conductor, así como películas metálicas finas que cubren ambas caras del sustrato. Preferentemente, las películas metálicas en ambas superficies se pueden retirar aplicando y después retirando una tira de cinta adhesiva Scotch. Las películas metálicas en ambas caras se retiran para proporcionar los conjuntos de nanoelectrodos bidimensionales. Véase la FIG. 13 A. Para preparar los montajes de nanoelectrodos tridimensionales, la superficie del conjunto de nanoelectrodos bidimensional se retira para exponer los nanohilos. Véase la FIG. 13 A. La longitud del nanohilo expuesto es dependiente del tiempo de grabado. Por ejemplo, los tiempos de grabado mayores dan como resultado una mayor exposición de nanohilos.

35 Una parte crítica de los conjuntos de nanoelectrodos incluye una sonda de ácido nucleico que se une al nanohilo metálico expuesto sobre el sustrato no conductor. Como se usa en el presente documento, "una sonda de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico que se puede unir a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente a través de un apareamiento de bases complementarias, normalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en el presente documento, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc) o un resto de azúcar. Además, las bases en una sonda se pueden unir por un engarce distinto de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Por tanto, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes se unen por enlaces peptídicos, en lugar de engarces fosfodiéster. Se entenderá por un experto en la técnica que las sondas se pueden unir a secuencias diana carentes de complementariedad completa con la secuencia de sonda dependiendo de la restricción de las condiciones de hibridación. Mediante el ensayo para determinar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

45 Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para unir la sonda de ácido nucleico a los nanohilos metálicos. Preferentemente, la sonda de ácido nucleico se une al nanohilo metálico por medio de un enlazador que imparte la menor conectividad y proporciona el máximo nivel de conjugación de modo que las conductividades eléctricas medidas corresponden estrictamente al ácido nucleico, y no a las propiedades de los enlazadores. Preferentemente, se usa un enlazador terminado en tiol. En una realización preferida, el procedimiento de acoplamiento implica una reacción en fase de solución entre el ácido 4-mercaptobenzoico y una amina terminal, en la posición 3' o bien 5' en el resto de ribosa. Este procedimiento proporciona una vía altamente conjugada entre el apilamiento de bases del ADN y la partícula. La incorporación de una amina en la posición 3' o 5' se lleva a cabo durante la síntesis de ADN química usando reactivos comercialmente disponibles. Una derivatización en 3' orienta el ADN lejos de la superficie cuando el enlazador se sitúa en el extremo 3' de un oligonucleótido, mientras que la derivatización en 5' proporciona la orientación correcta para un oligonucleótido enlazado en el extremo 5'.

En otra realización preferida, la conjugación del enlazador se logra por la unión del ácido 4-mercaptobenzoico con una alquil-amina lateral en 5' o la incorporación de un enlazador alcanotiol corto en el extremo 3' del ADN usando un reactivo comercialmente disponible. Estos enlazadores dan lugar a enlaces  $\sigma$  con intervención mayor entre la

superficie y el apilamiento de bases de ADN, y se puede usar cuando se desee un enlazador más aislante, tal como, por ejemplo, en la construcción de un transistor de un solo electrón de la invención.

En otra realización, una o una pluralidad de sonda de ácido nucleico se puede unir a un único nanohilo metálico. La pluralidad de la sonda de ácido nucleico en un único nanohilo ayudará a reconocer una señal potenciada conducida al dispositivo de detección, por tanto, mejorará la sensibilidad del ácido nucleico y reducirá el ruido de fondo del procedimiento de detección.

Además, la sonda de ácido nucleico varía de longitud. En una realización, la sonda puede comprender aproximadamente 7, preferentemente aproximadamente 12, preferentemente aproximadamente 15, más preferentemente aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 ó 400, o más nucleótidos.

- 10 Al igual que para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra usando los conjuntos de nanoelectrodos, en general, la detección se realiza con un sistema que comprende conjuntos de nanoelectrodos que contienen las sondas de ácido nucleico unidas a los mismos como electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, en el que ambos electrodos están conectados a un dispositivo de detección de señal. Después de poner en contacto una muestra que contiene un ácido nucleico diana con los conjuntos de nanoelectrodos, se produce la hibridación de la sonda de ácido nucleico con el ácido nucleico de la muestra y da como resultado cambios en las corrientes electrocatalíticas. Los cambios asociados con la hibridación se reflejan en la señal amplificada en el dispositivo de detección y, por tanto, es indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

- 20 Para facilitar la detección de ácido nucleico, se pueden variar las condiciones de hibridación. Por ejemplo, la hibridación se puede realizar bajo condiciones de alta restricción, restricción moderada y de baja restricción. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "restricción" de la hibridación. Para el examen preliminar de ácidos nucleicos homólogos, se pueden usar condiciones de hibridación de rigurosidad de restricción baja, correspondientes a una  $T_m$  de 55 °C, por ejemplo, 5X SSC, 0,1 % de SDS, 0,25 % de leche, y sin formamida; o 30 % de formamida, 5X SSC, 0,5 % de SDS). Las condiciones de hibridación de restricción moderada corresponden a una  $T_m$  mayor, por ejemplo, 40 % de formamida, con 5X o 6X SSC. Las condiciones de hibridación de restricción alta corresponden a la mayor  $T_m$ , por ejemplo, 50 % de formamida, con 5X o 6X SSC. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la restricción de la hibridación, son posibles emparejamientos erróneos entre bases. La restricción apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre las dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de  $T_m$  para híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a una  $T_m$  mayor) de las hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado las ecuaciones para calcular  $T_m$  (véase Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.50-0.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los emparejamientos erróneos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 11.7- 11,8). Preferentemente, una longitud mínima de un ácido nucleico que se puede hibridar es de al menos 10 nucleótidos; preferentemente, de al menos aproximadamente 15 nucleótidos; y más preferentemente, la longitud es de al menos aproximadamente 20 nucleótidos; y lo más preferentemente, de 30 nucleótidos.

- 40 Para que el procedimiento de detección electroquímica funcione en conjuntos de nanoelectrodos, el procedimiento de detección incluye poner en contacto la serie de conjuntos de nanoelectrodos con una muestra bajo una condición de hibridación y detectar un incremento en la señal amplificada en el circuito que esté asociada con la hibridación de la sonda de ácido nucleico en el nanoelectrodo con el ácido nucleico diana en la muestra. El incremento en la señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra. Además, el procedimiento de detección electroquímica se puede usar para detectar cuantitativamente la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra. En una realización, el cambio en la señal amplificada después de la hibridación con relación a la señal antes de la hibridación se puede comparar con un estándar para obtener la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra. De forma alternativa, la señal amplificada después de la hibridación se puede comparar con la señal asociada con la hibridación del ácido nucleico con una muestra de control que no contenga ácido nucleico diana. La cantidad del ácido nucleico diana en la muestra se puede deducir de la diferencia en la amplificación entre las dos.

- 50 Se coloca la muestra en contacto con la serie de conjuntos de nanoelectrodos. El contacto puede tener lugar en un recipiente adecuado. En general, la incubación de la muestra en contacto con la serie se realiza a temperaturas usadas normalmente para la hibridación del ácido nucleico diana en la muestra con la sonda de ácido nucleico.

- El ácido nucleico diana que se va a detectar se puede aislar de muestras similares a un fluido corporal de un animal, incluyendo un ser humano, tales como, pero sin limitarse a, sangre, orina, fluido linfático, líquido sinovial, bilis, flema, saliva, fluido menstrual y semen. Además, las muestras que contienen ADN o ARN se pueden encontrar, por ejemplo, en fluidos de una planta, tales como, pero sin limitarse a, fluido del xilema, fluido del floema y exudado de plantas. Las muestras que contienen ADN o ARN también se pueden encontrar, por ejemplo, en fuentes no vivas tales como, pero sin limitarse a, alimentos, aguas residuales, muestras forenses, lagos, embalses, ríos y océanos. Los polinucleótidos diana también pueden ser los de organismos muertos o en extinción, por ejemplo, plantas prensadas en colecciones de herbarios, o de pieles, muestras de taxidermia, fósiles, o las de materiales biológicos en colecciones de museos.

5 Cuando se analizan células completas, virus u otras muestras de tejido, es necesario extraer los ácidos nucleicos de las células, virus o las muestras de tejido. Después de la recogida de muestra, se pueden liberar los ácidos nucleicos de las células, virus o tejidos. También es necesario separar los ácidos nucleicos de otros elementos del extracto en bruto, por ejemplo, proteínas desnaturalizadas, partículas de la membrana celular y similares. Se pueden usar diversos procedimientos muy conocidos en la técnica para llevar a cabo la separación.

10 La molécula de ácido nucleico diana se puede amplificar opcionalmente antes de la detección por el procedimiento de la presente invención. El ácido nucleico diana puede estar en forma bicatenaria o bien monocatenaria. En el caso en el que la molécula de ácido nucleico diana sea bicatenaria, en primer lugar se trata preferentemente con un agente de desnaturalización para traducir las dos cadenas a una forma monocatenaria o parcialmente monocatenaria, al inicio de la reacción de amplificación, por procedimientos conocidos en la técnica tales como calentamiento, tratamiento alcalino o por procedimientos enzimáticos. Los procedimientos generales para llevar a cabo este tratamiento se proporcionan por Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. (1989).

15 Una vez se ha tratado la muestra para exponer cualquier ácido nucleico diana, se puede someter a prueba la solución como se describe en el presente documento para detectar la hibridación entre el ácido nucleico unido y el ácido nucleico diana, si está presente. De forma alternativa, algunas muestras se pueden someter a prueba directamente, por ejemplo, la diana puede existir en una muestra de suero y puede estar directamente accesible, y puede no requerir tratamiento para liberar el ácido nucleico.

20 Se puede usar el procedimiento de detección que usa conjuntos de nanoelectrodos para diversas aplicaciones tales como para la detección de genes humanos o mutaciones, detección de patógenos, tales como bacterias o virus, o se puede usar para detectar la expresión de genes en un sujeto. Por ejemplo, se pueden detectar genes de *Helicobacter pylori*, un patógeno implicado en úlceras gástricas y cáncer, por los procedimientos descritos en el presente documento. Las dos secuencias pertenecientes al microbio patógeno *Helicobacter pylori* se usan para demostrar la versatilidad y la especificidad ensayo: una que codifica para una proteína de *H. pylori* única y una que representa una pequeña porción del ARNr 23S de este organismo. Ambas secuencias se pueden detectar en el intervalo de concentraciones femtomolares.

30 El procedimiento de detección de la presente invención que usa conjuntos de nanoelectrodos ofrece numerosas ventajas sobre los otros procedimientos de detección. Estas ventajas incluyen muy alta sensibilidad, buen control, buena reproducibilidad, libre de etiquetas y funcionamiento e instrumentación sencilla. Con el procedimiento de detección de la presente invención que usa nanotecnología, se pueden detectar tan sólo alrededor de 1000 moléculas de ácido nucleico.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Materiales y procedimientos.

35 *Productos químicos y materiales.* Se obtuvieron reactivos de síntesis de ADN de Glen Research. Se recibieron 1,6-hexametilendiamina, 99,8 % de 1,4-dioxano anhidro, 6-mercapto-1-hexanol (97 %) (MCH), y trihidrato de ferrocianuro de potasio de Aldrich Chemical Company. Se adquirieron ferricianuro de potasio, 1,1'-carbonildimidazol y cloruro de hexaamin-rutenio de Acros Organics. Se adquirió 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) de Pierce. Se obtuvieron ditiotreitilo (DTT) y 2-mercaptoetanol de Fisher Scientific. Se recibieron obleas de silicio recubiertas con oro de Platypus Technologies. Se obtuvo Pfu ADN polimerasa clonada de Stratagene.

45 *Preparación y purificación de oligonucleótidos modificados.* Se sintetizaron oligonucleótidos usando un sintetizador de ADN/ARN ABI394 de acuerdo con técnicas de fase sólida automatizadas estándar. Se prepararon oligonucleótidos modificados en el extremo 5' terminal con enlazador basado en hexanodiamina (C6) y se purificaron como se describe previamente.<sup>25</sup> Se purificaron rigurosamente todos los oligonucleótidos sin modificar usando HPLC de fase inversa. Se usaron la sonda y las secuencias diana siguientes en los experimentos empleando los oligonucleótidos sintéticos:

HP1a (sonda de *hpn* complementaria de 30 nt):

SH-<sup>5'</sup>TTGATGATGACTATCGCTAGTGCTGCAACA<sup>3'</sup> (SEQ ID NO: 12)

HP1b (sonda de *hpn* complementaria de 18 nt + 12T)

SH-<sup>5'</sup>TTTTTTTTTTTTGATGACTATCGCTAGTGC<sup>3'</sup> (SEQ ID NO: 4)

50 HP1c (sonda de *hpn* no complementaria de 18 nt + 12T)

SH-<sup>5'</sup>TTTTTTTTTTTTGGGATAATTCTTCACCGG<sup>3'</sup> (SEQ ID NO: 5)

HP2a (sonda de ARNr): SH-<sup>5'</sup>GGGTCTTCCGTCTTGCC<sup>3'</sup> (SEQ ID NO: 13)

HP2b (sonda-2 de ARNr): SH-<sup>5</sup>GGTCCACGGGGTCTTTCC<sup>3</sup> (SEQ ID NO: 14)

T1 (sonda de *hpn*) <sup>5</sup>TGTTGCAGCACTAGCGATAGTCATCATCAA<sup>3</sup> (SEQ ID NO: 1)

T2a (sonda de ARNr de WT): <sup>5</sup>GGCAAGACGGAAAGACCC<sup>3</sup> (SEQ ID NO: 2)

T2aMUT (sonda de ARNr de A2143C): <sup>5</sup>GGCAAGACGGAGACCC<sup>3</sup> (SEQ ID NO: 3)

5 T2b (diana n.º 2 de ARNr de WT): <sup>5</sup>GGAAAGACCCCGTGGACC<sup>3</sup> (SEQ ID NO: 15)

T2bMUT (diana n.º 2 de ARNr de A2143C): <sup>5</sup>GGAGACCCCGTGGACC<sup>3</sup>

(SEQ ID NO: 16)

(En ambas secuencias de ARNr de A2143C, el sitio de la mutación de resistencia está subrayado.)

T-NC (diana no complementaria): <sup>5</sup> AAC AGT TCC TGC ATG<sup>3</sup> (SEQ ID NO: 17)

10 Se sintetizaron cadenas de sonda con fluoresceína unida a la base en el extremo 3'-terminal usando un CPG fluoresceína-dT (Glen Research) y modificado con un enlazador terminado en tiol como describe previamente. Se logró la unión de fluoresceína a las cadenas diana con una 5'-fluoresceína-fosforamidita siguiendo técnicas de fase sólida automatizadas estándar. Se purificaron oligonucleótidos modificados con fluoresceína por HPLC de fase inversa.

15 *Modificación de superficies de oro con ADN de sonda.* Se inmovilizaron sondas tioladas monocatenarias sobre electrodos de oro en bruto con  $A = 0,02 \text{ cm}^2$  (Bioanalytical Systems). Antes de la inmovilización de la sonda, se limpiaron los electrodos de oro usando alúmina  $0,05 \mu\text{m}$ , se aclararon en agua, se sometieron a sonicación durante 5 mm, se grabaron por barrido de 0-1,8 V a 200 mV/s en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y se aclaró con agua. Se expusieron de forma normal los electrodos de oro invertidos a sondas tioladas de ADNss en soluciones que contenían SH-ADN  $5 \mu\text{M}$ , HCM 500 nM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM y  $\text{MgCl}_2$  50 mM en una cámara de humedad a temperatura ambiente durante 1 hora. (Cualquier desviación de estas condiciones se describe en capturas de figuras individuales.)  
20 Se logró la manipulación de densidades de película de sonda con soluciones que contenían cantidades variables de  $\text{MgCl}_2$  que variaban desde 10–100 mM. Después del depósito, se aclararon los electrodos en fosfato de sodio 25 mM (pH 7), tampón de NaCl 25 mM. Se confirmó la adsorción de ADN en la superficie del electrodo monitorizando el  
25 bloqueo de ferrocianuro 2 mM en fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM.

Hibridación de secuencias diana. Se expusieron electrodos de oro modificados con ADNss tiolado a secuencias diana y se detectó la hibridación a través de la potenciación de la señal electrocatalítica. Antes de la hibridación de la diana, se registraron medidas electrocatalíticas iniciales de sondas de ADNss inmovilizadas y después de la hibridación de la diana se pudo calcular el cambio en la señal.

30 Medidas electroquímicas. Se llevaron a cabo medidas electroquímicas con un potenciostato CV-50 de Bioanalytical Systems. Se usó una celda de un compartimento ajustada con un capilar de Luggin. Se llevaron a cabo todas las medidas de voltametría cíclica a cabo a temperatura ambiente con un potenciostato CV-50W de Bioanalytical Systems. Se usó una configuración de tres electrodos que consistía en un electrodo de trabajo de oro modificado, un electrodo auxiliar de hilo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Se usó una celda de un compartimento  
35 ajustada con un capilar de Luggin para separar el compartimento de trabajo del compartimento de referencia.

Se midieron las corrientes electrocatalíticas en soluciones de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  2 mM,  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  27  $\mu\text{M}$  en fosfato de sodio 25 mM/NaCl 250 mM (pH 7) a una velocidad de exploración de 100 mV/s. Se cuantificó la carga catódica (Q) integrando los voltamogramas restando el fondo. Se calcularon los cambios de señal correspondientes a la hibridación como sigue  $\Delta Q = (Q_{\text{final}} - Q_{\text{inicial}}) / Q_{\text{inicial}}$ . Las barras de error mostradas en las figuras individuales corresponden a  
40 variabilidades entre múltiples ensayos independientes de cada experimento.

#### *Detección electroquímica de hibridación diana*

Se midió la corriente electrocatalítica obtenida en electrodos de oro modificados con ADN de sonda tiolada, y después se expusieron los electrodos aclarados a secuencias diana y se detectó la hibridación a través de la potenciación de la señal electrocatalítica. Las soluciones de hibridación contenían normalmente ADN diana 500 nM - 20  $\mu\text{M}$  en fosfato de  
45 sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM. Se incubaron los electrodos a 37-50 °C en una cámara de humedad termostatzada y se lavaron exhaustivamente con tampón antes del análisis electroquímico. Las condiciones usadas para experimentos individuales variaron dependiendo del tamaño y de la fuente del ácido nucleico diana; los detalles de diferentes ensayos de hibridación se proporcionan en las capturas de figuras.

#### *Cuantificación basada en fluorescencia de la cobertura de superficie y eficiencias de hibridación.*

50 Se logró la cuantificación de la cobertura de la superficie del electrodo usando ADN marcado con fluoresceína en base al procedimiento descrito por Demers *et al.* Antes del depósito de ADN marcado con fluoróforo, se prepararon electrodos de oro en bruto como se describe anteriormente con grabado electroquímico. Se limpiaron superficies de

oro planas mayores ( $0,28 \text{ cm}^2$ ) en solución de Piranha (3:1  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 20 minutos, seguido de lavado riguroso en agua. Usando una guía que produjo un área de  $0,28 \text{ cm}^2$ , se incubó un oligonucleótido modificado con 3'-fluoresceína-5'-tiol sobre la superficie de oro durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara de humedad. Se realizó la inmovilización de la sonda usando una solución que contenía la sonda 3'-fluoresceína-5'-tiol  $5 \mu\text{M}$ , HCM 500 nM, fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM y cantidades variadas de  $\text{MgCl}_2$  (de 10 mM a 100 mM). Se usaron sustratos tratados con sondas no complementarias como controles. Después del depósito, se lavaron las superficies de oro cuidadosamente con fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM. Después de desplazar las sondas modificadas con fluoróforo con mercaptoetanol 12 mM durante aproximadamente 3-4 horas a temperatura ambiente en una cámara de humedad; durante la noche se llevó a cabo una segunda ronda de desplazamiento. Se midieron las intensidades de fluorescencia para estándares de calibración y muestras retiradas de la superficie de oro en NaOH 50 mM (pH 12) sobre un lector de placas de fluorescencia Wallac VictorF. Se determinaron las cantidades de oligonucleótido modificado con 3'-fluoresceína-5'-tiol desplazado de la superficie por interpolación a partir de una curva de calibración lineal estándar preparada con concentraciones conocidas de la sonda modificada.

Para la medida de las eficiencias de hibridación usando fluorescencia, se introdujeron secuencias diana marcadas a partir de soluciones que contenían diana  $5 \mu\text{M}$  (F1-T2), fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM, y  $\text{MgCl}_2$  100 mM durante 1 hora en un incubador a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Después, se lavaron rigurosamente las superficies con fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM para retirar la diana no hibridada. Se realizó el desplazamiento de dúplex y las medidas de fluorescencia como se describe anteriormente. Se trazó una curva de calibración lineal estándar usando concentraciones conocidas de ADN dúplex (HP2a/F1-T2).

#### 20 *Desnaturalización térmica de dúplex de sonda/diana*

Se realizaron medidas de la desnaturalización térmica con soluciones que contenían cadenas complementarias  $1 \mu\text{M}$  en fosfato de sodio 25 mM (pH 7), NaCl 25 mM. Se obtuvieron medidas monitorizando la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro AVIV.

#### **Ejemplo 2. Fabricación de superficies modificadas con ADN**

El apéndice de un enlazador terminado en tiol a oligonucleótidos sintéticos permite el autoensamblaje de películas de ADN sobre electrodos de oro. Se han preparado superficies de oro modificadas con oligonucleótidos monocatenarios por varios grupos interesados en monitorizar procedimientos electroquímicos en presencia de ADN. Las películas usadas en los experimentos descritos en el presente documento proporcionan oligonucleótidos que contienen un enlazador alifático que está unido de forma postsintética usando una combinación de síntesis en fase sólida y en solución. Un co-adsorbente, mercaptohexanol, se introduce durante el depósito para disminuir la densidad del ADN adsorbido y para minimizar la unión de ADN no específica en la superficie de oro.

Las condiciones empleadas en el presente documentos para el depósito producen películas de alta densidad a partir de oligonucleótidos modificados con tiol en minutos y presentan coberturas que dependen de la cantidad de catión divalente usado en la solución de depósito. Usando oligonucleótidos modificados con fluoresceína, se determinó que se obtuvieron densidades de  $12(\pm 2)$ ,  $23(\pm 3)$ , y  $27(\pm 4)$  pmol/ $\text{cm}^2$  de oligonucleótidos monocatenarios con  $\text{MgCl}_2$  10, 50 o 100 mM presente en el tampón de depósito, respectivamente. Se realizaron medidas de densidad de sonda tanto en electrodos de oro en bruto como en sustratos de oro depositados por vapor para confirmar que existían densidades comparables (fue deseable trabajar con los sustratos mayores para una cuantificación más exacta de las coberturas menos densas). Se observaron coberturas comparables a las medidas en el presente documento con  $[\text{Mg}^{2+}]$  baja en estudios previos en los que se realizó el depósito en presencia de fosfato de sodio 10 mM y NaCl 100 mM.

Para los experimentos electroquímicos descritos a continuación, se usaron películas de ADN que estaban formadas con  $\text{MgCl}_2$  50 mM presente durante el depósito. Aunque las coberturas de superficie más escasas promueven una hibridación de ADN más eficaz (véase más adelante), se logró una mayor reproducibilidad con densidades de ADN mayores que produjeron señales voltamétricas mayores.

#### 45 **Ejemplo 3. Detección de secuencias de ADN diana basadas en la reducción electrocatalítica de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ en superficies modificadas con ADN.**

El  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ , que carece de ligandos que se puedan unir a ADN de forma intercalada, se asocia electrostáticamente con el esqueleto cargado negativamente. Por lo tanto, es un aglutinante neutro de secuencia y una sonda ideal para cuantificar ADN adsorbido sobre una superficie de electrodo.<sup>26</sup> La monitorización de la hibridación con  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  proporcionaría potencialmente un medio para detectar ADN de forma electroquímica. Sin embargo, las películas con coberturas de superficie más escasas que permiten una hibridación eficaz sólo proporcionan señales pequeñas para estas especies activas redox.

Para amplificar señales obtenidas en electrodos modificados con ADN en presencia de  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ , se introdujo un oxidante,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , que permitiría el recambio de  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  regenerando la forma oxidada (FIG. 4). Como se muestra en la FIG. 5, se observan ondas reductoras grandes, irreversibles, en electrodos modificados con ADN sumergidos en soluciones de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  y  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ , en consonancia con el ciclo de reacción propuesto (FIG. 5). Las señales electroquímicas obtenidas con electrodos modificados con ADN a partir de soluciones de  $\text{Ru}(\text{III})$  y  $\text{Fe}(\text{III})$  se amplifican por  $\sim 100$  veces sobre las obtenidas cuando sólo está presente  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  (no se obtiene señal en esta

región cuando sólo está presente  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ . La electrocatálisis requiere que el ADN atraiga el catión a la superficie de oro, ya que no se observa ninguna señal con un electrodo descubierto.

Este ensayo informa sensiblemente de la presencia de una secuencia de ADN diana. La señal de Ru(III)/Fe(III) monitorizada en un electrodo de oro modificado con una secuencia de sonda complementaria a una porción del gen de ARNr 23S de *H. pylori* (secuencia: 5'-GGC AAG ACG GAA AGA CCC-3' (SEQ ID NO: 2)) se incrementa significativamente después de la exposición del electrodo a un oligonucleótido diana sintético (FIG. 5). El cambio en la respuesta electroquímica apenas se detecta en ausencia de Fe(III). Los tiempos de hibridación cortos (< 1 hora) en condiciones suaves (40 °C) son suficientes para observar un incremento en la señal electrocatalítica de > 100 %. En presencia de secuencias no complementarias o también carente de ADN, no se observan diferencias de señales apreciables.

La electrocatálisis de Ru(III)/Fe(III) informa con precisión de la hibridación de secuencias de diferentes longitudes y composición de bases. Tanto la secuencia de ARNr 23S de 18-nt descrita anteriormente como una secuencia de 30-nt correspondiente a un fragmento del gen Hpn (que codifica una única proteína para la secuencia de *H. pylori*: 5'-TGT TGC AGC ACT AGC GAT AGT CAT CAT CAA-3' (SEQ ID NO: 1)) se pueden detectar como se muestra en la FIG. 5A. También es sensible, ya que las concentraciones por debajo de 10 nM produjeron incrementos medibles en la respuesta electroquímica después de la hibridación.

#### Ejemplo 4. Discriminación de dianas que contienen sustituciones de bases individuales.

En experimentos que monitorizan la hibridación de oligonucleótidos de ADN correspondientes a una región del ARNr 23S de *H. pylori* se observó una sensibilidad pronunciada a pares de bases emparejados erróneamente con el complejo diana/sonda. La potenciación en la señal electroquímica observada normalmente con la secuencia de ARNr WT disminuyó significativamente cuando se introdujo una sustitución A-a-C en la posición 2143 dentro del ARNr 23S (secuencia: 5'-GGC AAG ACG GAC AGA CCC-3' (SEQ ID NO: 3), el nucleótido correspondiente a C2143 está en el caso inferior). La variante A2143C es importante porque esta sustitución imparte resistencia a la claritromicina, el antibiótico usado normalmente para combatir *H. pylori* y aproximadamente un 10 % de las infecciones observadas clínicamente son resistentes a la claritromicina.

La discriminación del mutante A2143C es un resultado de la cinética de hibridación más lenta para la secuencia que está emparejada erróneamente con respecto a la sonda. Un estudio sistemático de la eficiencia en la hibridación en función del tiempo para la diana WT frente a A2143C reveló que la extensión de la hibridación para las dos secuencias sólo es comparable con tiempos de incubación de más de 12 horas. El efecto pronunciado provocado por el emparejamiento erróneo de bases individuales dentro del complejo diana/sonda es un hallazgo significativo. Los estudios previos de hibridación dúplex en solución por otros grupos han caracterizado efectos mucho más sutiles, con velocidades de asociación para dos oligonucleótidos de ADN que presentan poca sensibilidad para la pérdida de un solo par de Watson-Crick, y velocidades de disociación que se incrementan en aproximadamente un orden de magnitud en conjuntos emparejados erróneamente.<sup>27</sup> Por lo tanto, parece que las reacciones de hibridación heterogéneas, con un oligonucleótido inmovilizado sobre una superficie del electrodo, son mucho más sensibles a emparejamientos erróneos, un hallazgo que proporciona la base para distinguir secuencias similares con un ensayo de hibridación electroquímica. La densidad de sonda que se usa en los experimentos de la presente invención también parece amplificar el efecto, ya que los estudios que usan resonancia de plasmón superficial en el seguimiento de la hibridación en superficies de oro con coberturas de superficie muy bajas han elucidado efectos similares, pero mucho menos pronunciados.<sup>22</sup> Una superficie con una cobertura alta de oligonucleótidos cargados negativamente puede servir para desestabilizar aún más los dúplex diana/sonda emparejados erróneamente.

El ensayo de detección de ADN electrocatalítico descrito proporciona un medio sensible y específico para ejecutar el genotipado electroquímico. El procedimiento descrito será útil para el análisis genético en un formato multiplexado.

#### Ejemplo 5. Detección de diana de Hpn usando productos de PCR, transcritos de ARN y un 30-mero sintético.

Se sometieron a prueba dos secuencias de sonda con las diferentes dianas: HP2a (sonda de Hpn complementaria) 5'-TTT TTT TTT TTT GAT GAC TAT CGC TAG TGC-3' (SEQ ID NO: 4) y HP2b (sonda de Hpn no complementaria) 5'-TTT TTT TTT TTT GGG ATA ATT CTT CAG CGG-3' (SEQ ID NO: 5). Las bases de timina añadidas permitieron que la sonda fuera más accesibles para la diana. La sonda complementaria detecta eficazmente la presencia de ácidos nucleicos diana diferentes usando el sistema Ru(III)/Fe(III) electrocatalítico.

Las secuencias diana fueron como sigue:

PCR (generada usando PCR asimétrica como ADN monocatenario, la porción complementaria a la sonda está subrayada):

5'-GGA GTC ATC ATG GCA CAC CAT GAA GAA CAG CAC GGC GGT CAT CAC CAC CAT CAC CAC CAC ACA CAC CAC CAC CAC TAT CAC GGC GGT GAA CAC CAC CAT CAC CAC CAC AGC TCT CAT CAT GAA GAA GGT TGT TGC AGC ACT AGC GAT AGT CAT CAT CAT CAA GAA GAG GGT TGC TGC CAC GGC CAT CAC GAG TAA TAT CGG TGT GGC TAG GGG CAA CTT-3' (SEQ ID NO: 6)

ARN (misma secuencia que el producto de PCR, generada *in vitro* a partir de la plantilla de ADN, la parte complementaria a la sonda está subrayada):

5'ATC AAA GGA GTC ATC ATG GCA CAC CAT GAA GAA CAG CAC GGC GGT CAT CAC CAC CAT CAC CAC CAC  
 5 ACA CAC CAC CAC CAC TAT CAC GGC GGT GAA CAC CAC CAT CAC CAC CAC AGC TCT CAT CAT GAA GAA  
 5 GGT TGT TGC AGC ACT AGC GAT AGT CAT CAT CAT CAA GAA GAG GGT TGC TGC CAC GGC CAT CAC GAG  
 TAA TAT CGG TGT GGC TAG GGG CAA CTT-3' (SEQ ID NO: 7)

oligo sintético 30-mero

5'-TGT TGC AGC ACT AGC GAT AGT CAT CAT CAT CAA-3' (SEQ ID NO: 8)

10 Se depositaron soluciones de sonda de ADN (HP2a y HP2b) que contenían ADNss 5 µM, HCM 500nM, MgCl<sub>2</sub> 50mM y tampón fosfato de sodio 25 mM/NaCl a pH 7 durante 1,5 horas a temperatura ambiente en una cámara de humedad. Se expusieron la solución diana que contenía 30-mero sintético y el producto de PCR que contenían diana 500 nM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, y el tampón de fosfato de sodio 25 mM/NaCl a pH 7 a películas de ADN durante 1 hora a 45 °C. Se realizó la hibridación de ARN diana bajo las mismas condiciones, excepto que se usó diana 1 µM.

15 Los resultados se muestran en la FIG. 7, que es un gráfico de barras que muestra la dependencia temporal de la hibridación para la sonda de HP2A (sonda Hpn complementaria) y la sonda HP2B (sonda Hpn no complementaria). Se muestra que las secuencias de ADN diana se pueden detectar como productos de PCR o bien como transcritos de ARN usando los procedimientos descritos en el presente documento.

Ejemplo 6. Preparación de amplicón de PCR asimétrico y dianas de ARN.

20 El gen *hpn* de *H. pylori* se amplificó por PCR a partir de una fuente recombinante (un plásmido de *E. coli* proporcionado por el Dr. Andrew Plaut de la Universidad de Tufts). Se generaron dos productos de PCR, uno usando el procedimiento asimétrico que produce principalmente ADN monocatenario, y otro usando condiciones de PCR convencionales que generarían un producto bicatenario para la transcripción "runoff" de T7 de ARN. Para la reacción anterior, se usaron un cebador de PCR directo (5'-ATC AAA GGA GTC ATC ATG GCA CAC-3' (SEQ ID NO: 9)) y un cebador de PCR inverso (5'- AAG TTG CCC CTA GCC ACA-3' (SEQ ID NO: 10)) en reacciones que contenían 1 µg/ml de ADN de plásmido, cebador directo 500 nM, cebador inverso 5 nM, 1x de tampón de reacción de la ADN polimerasa de Pfu clonado (Tris-HCl 200 mM (pH 8,8), KCl 100 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, 1 % de Triton X-100, 1 mg/ml de seroalbúmina bovina libre de nucleasa), dNTP 1 mM, y 2,5 U de ADN polimerasa de Pfu clonado, tampón de polimerasa y enzima adquirida de Stratagene, en un volumen de reacción total de 100 µl. Para la síntesis del producto de PCR usado para la generación del transcrito de ARN, se usó un cebador de PCR directo que contenía la secuencia del promotor de la T7 polimerasa (5'-GCT AGG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG TCA TCA TGG CAC AC-3' (SEQ ID NO: 11)) con las mismas condiciones de reacción con la excepción de la adición de cebador directo 500 nM e inverso 500 nM. Se realizó la PCR en un Stratagene Robocycler con 30 ciclos a 94 °C durante 2 minutos, 52 °C durante 2 minutos, 72 °C durante 3 minutos. Los productos de PCR se sometieron a extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Se transcribió la diana de ARN a partir de la plantilla de ADN amplificado con la región promotora de T7 usando condiciones estándar. Las dianas de ADN y ARN resultantes tenían las siguientes secuencias:

35 5'GGAGTCATCATGGCACACCCATGAAGAACAGCACGGCGGTTCATCACCACCATCACCACCACACACACCACCACC  
 ACTATCACGGCGGTGAACACCACCATCACCACCACAGCTCTCATCATGAAGAAGGTTGTTGCAGCACTAGCGAT  
 40 AGTCATCATCATCAAGAAGAGGGTTGCTGCCACGGGCATCACGAGTAATATCGGTGTGGCTAGGGGCAACTT<sup>3</sup>  
 (ARN, 219 nt) (SEQ ID NO: 6) y

45 5'ATCAAAGGAGTCATCATGGCACACCCATGAAGAACAGCACGGCGGTTCATCACCACCATCACCACCACACACACC  
 ACCACCACTATCACGGCGGTGAACACCACCATCACCACCACAGCTCTCATCATGAAGAAGGTTGTTGCAGCACT  
AGCGATAGTCATCATCATCAAGAAGAGGGTTGCTGCCACGGGCATCACGAGTAATATCGGTGTGGCTAGGGGC  
 AACTT<sup>3</sup> (ADN, 225 nt) (SEQ ID NO: 7); la porción de la secuencia que es complementaria a la sonda HP1b está subrayada.

### Ejemplo 7. Reducción electrocatalítica de Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> en superficies modificadas con ADN

El Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>, que carece de ligandos que se puedan unir a ADN de forma intercalada, se asocia electrostáticamente con el esqueleto cargado negativamente. Por lo tanto, es un aglutinante neutro de secuencia y una sonda ideal para la cuantificación ADN mono o bicatenario adsorbido sobre una superficie de electrodo. Sin embargo, la concentración limitada de Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> localizada en los electrodos modificados con ADN proporciona una pequeña corriente bajo condiciones adecuadas para la detección de hibridación (es decir, concentraciones de Ru(III) suficientemente bajas para prohibir la adsorción directa de la sonda activa redox). Para proporcionar la máxima sensibilidad para la detección de hibridación de ADN, se introdujo un oxidante, Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>, que permitiría el recambio de Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup> regenerando la forma oxidada (esquema 1), amplificando de este modo significativamente la respuesta obtenida.

55 De hecho, como se muestra en la FIG. 8, se observan ondas reductoras grandes, irreversibles, usando voltametría cíclica (CV) en electrodos modificados con ADN sumergidos en soluciones de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> y Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>, en consonancia con la reacción propuesta. La cantidad de corriente observada informa de la cantidad de ADN presente en la superficie

del electrodo, ya que la respuesta obtenida en superficies con diferentes densidades (controladas variando  $[Mg^{2+}]$  durante el depósito) era directamente dependiente del número de moléculas de ADN inmovilizadas.

Las señales electroquímicas obtenidas con electrodos modificados con ADN a partir de soluciones de Ru(III) y Fe(III) se amplifican por ~100 veces sobre las obtenidas cuando sólo está presente  $Ru(NH_3)_6^{3+}$  (FIG. 8B, recuadro); no se obtiene señal en esta región cuando sólo está presente  $Fe(CN)_6^{3-}$  (datos no mostrados). La electrocatálisis requiere que el ADN atraiga el complejo catiónico a la superficie de oro, ya que no se observa ninguna señal con un electrodo descubierto.

El ensayo electrocatalítico informa sensiblemente de la presencia de una secuencia de ADN diana complementaria. La señal de  $Ru(NH_3)_6^{3+}/Fe(CN)_6^{3-}$  monitorizada en un electrodo de oro con una secuencia de sonda complementaria a una porción del gen de ARNr 23S de *H. pylori* (nucleótidos 2132-2149) se incrementa significativamente después de la exposición del electrodo a un oligonucleótido diana sintético (FIG. 8B). Los tiempos de hibridación cortos (< 1 hora) y las condiciones suaves son suficientes para observar un incremento en la carga integrada de > 100 %. En presencia de secuencias no complementarias o tampón carente de ADN, no se observan diferencias de señales apreciables.

La electrocatálisis de Ru(III)/Fe(III) informa con precisión de la hibridación de secuencias de diferentes longitudes. Tanto la secuencia de ARNr 23S de 18 nucleótidos descrita anteriormente como la secuencia de 30 nucleótidos correspondiente a un fragmento del gen *hpn* (que codifica una proteína rica en histidina de función desconocida única para *H. pylori*) se puede detectar como se muestra en la FIG. 9. Por tanto, el ensayo descrito es versátil y es compatible con diferentes longitudes de secuencia de sonda y composición de bases. Es innecesario que emparejar la longitud de la diana y la sonda, ya que los experimentos en los que se incrementó el tamaño de la diana en 10-15 nucleótidos también produjo una detección satisfactoria de la hibridación (datos no mostrados). El ensayo electrocatalítico también es sensible, ya que las concentraciones por debajo de 10 nM (50 fmol) produjeron incrementos medibles en la respuesta electroquímica después de la hibridación.

#### Ejemplo 8. Efecto de la densidad de sonda inmovilizada

La eficiencia de la hibridación, investigada usando el ensayo electrocatalítico y la cuantificación basada en fluorescencia, era sensible a la densidad de la secuencia de sonda inmovilizada (FIG. 10). Como se describe anteriormente, la densidad de películas de ADN preparadas con diferentes cantidades de  $MgCl_2$  presentes se monitorizó usando oligonucleótidos modificados con fluoresceína. Como la cantidad de  $Mg^{2+}$  en la solución de depósito se incrementa, la densidad de la sonda se incrementa, con películas con 11 pmol ADN/cm<sup>2</sup> obtenidas con  $MgCl_2$  10 mM y películas con 27 pmol ADN/cm<sup>2</sup> obtenidas con  $MgCl_2$  100 mM. También se monitorizó la respuesta obtenida en presencia de  $Ru(NH_3)_6^{3+}$  y  $Fe(CN)_6^{3-}$ , y se incrementó con la cobertura de la superficie. Con la película preparada con  $MgCl_2$  10 mM, la carga promedio medida fue de 0,13(5)  $\mu C$ , mientras que con  $MgCl_2$  100 mM presente durante el depósito de la sonda, la carga promedio medida fue de 0,59(5)  $\mu C$ . La correlación entre estos valores y la densidad del ADN de sonda indica que la señal electroquímica presenta una dependencia directa sobre la concentración del ADN inmovilizado presente en la superficie del electrodo.

Cuando la señal se incrementa después de la hibridación se monitorizó para los electrodos con diferentes coberturas de superficie, se observó que las películas con densidades de sonda menores permitieron una captura de la diana más eficaz (FIG. 10). Se ha observado este efecto en varios estudios y se propone que surge debido a su agrupación estérica cuando las concentraciones locales de ADN inmovilizado son altas. Aunque la película de densidad más baja estudiada en el presente documento (formada con  $MgCl_2$  10 mM) permitió un 87( $\pm$  5) % de hibridación, la película de densidad más alta (formada con  $MgCl_2$  100 mM) presentó un nivel mucho menor de hibridación con un 6( $\pm$  2) % de eficiencia. Las películas preparadas con  $MgCl_2$  50 mM que se usaron rutinariamente en el ensayo de electrocatálisis también presentaron sólo hibridación parcial, formando un 7( $\pm$  2) % de las sondas un complejo con una secuencia de ADN diana. Hay que destacar, sin embargo, que el ensayo electrocatalítico pudo resolver este bajo nivel de complejación de diana con un cambio en la carga integrada, normalmente del 100 %.

Basándose en las dimensiones del dúplex de ADN, ~ 50 pmol/cm<sup>2</sup> es la cobertura máxima de dúplex que se pudo lograr. Por lo tanto, es evidente que la cobertura de una sonda monocatenaria debe estar muy por debajo de este nivel para lograr una hibridación eficaz.

#### Ejemplo 9. Detección de dianas que contienen sustituciones de bases individuales

En experimentos que monitorizan la hibridación de oligonucleótidos de ADN correspondientes a una región del ARNr 23S de *H. pylori* se observó una sensibilidad pronunciada a pares de bases emparejados erróneamente con el complejo diana/sonda. La potenciación en la señal electroquímica observada normalmente con la secuencia de ARNr WT disminuyó significativamente cuando se introdujo una secuencia que contenía una sustitución A-a-C en la posición 2143 (FIG. 9). La secuencia de A2143C es clínicamente significativa porque esta sustitución imparte resistencia a la claritromicina, el antibiótico usado normalmente para combatir *H. pylori*. Más de un 10 % de las infecciones observadas clínicamente son resistentes a la claritromicina.

Basándose en las estabildades térmicas de las secuencias de ARNr usadas para estos experimentos, la observación de la hibridación diferencial es sorprendente. Los dúplex de diana/sonda formados a partir de las secuencias ribosómicas empleadas para este ensayo presentaron valores de  $T_m$  de 58 (2) °C cuando se emparejaban

completamente, y de 52(2) °C cuando está presente la mutación de A2143C que produjo un apareamiento erróneo C-T. Por tanto, es razonable esperar que ambos dúplex se formen en la superficie si la complejación se rige por la estabilidad termodinámica.

5 Para investigar el origen de la hibridación diferencial observada en presencia de la mutación puntual, se monitorizó la dependencia temporal de la hibridación (FIG. 11). Con tiempos de incubación cortos, se observó una diferencia pronunciada en la señal obtenida para la secuencia WT con relación a la secuencia de A2143C. Sin embargo, cuando se permitió que la hibridación procediera más de 12 horas, se obtuvieron resultados comparables con ambas secuencias. Por lo tanto, la discriminación de la mutación A2143C es un resultado de la cinética de hibridación más lenta para la secuencia que está emparejada erróneamente con respecto a la sonda. La velocidad de asociación de 10 ambas secuencias probablemente es similar, por tanto, el cambio observado puede reflejar una velocidad de disociación más rápida para el complejo emparejado erróneamente que limita la acumulación de dúplex hibridados.

#### Ejemplo 10. Detección de dianas de ADN y ARN extendidas

Se sometió a prueba la aplicabilidad del ensayo electrocatalítico para la detección de dianas de ADN y ARN grandes usando una secuencia de un > 200 nucleótidos que contiene el gen *hpn* de *H. pylori* (FIG. 12). Para esos experimentos 15 de hibridación, se emplearon secuencias de sonda que contenía un enlazador de 12 residuos de timina que sirvió para incrementar la accesibilidad de la porción del oligonucleótido usado para la captura de la diana. Usando condiciones de hibridación usando moderadas (1 hora, 45 °C), se detectó específicamente el ADN monocatenario realizado por PCR asimétrica y ARN generado *in vitro* por medio de grandes incrementos en corrientes electrocatalíticas obtenidas en presencia de una sonda complementaria. Se observaron niveles bajos de unión no específica con una secuencia de 20 sonda no complementaria, indicando que los incrementos de señal observados con la sonda complementaria resultaron de la hibridación altamente específica de las dianas. Hay que destacar, sin embargo, que la diana de ARN mostró de forma reproducible niveles más altos de unión no específica.

El ensayo electrocatalítico descrito en el presente documento proporciona un medio sensible para detectar secuencias de ácido nucleico que pertenecen a patógenos infecciosos con alta especificidad usando una lectura electroquímica. El 25 procedimiento es muy sensible, y es adecuado para la detección de niveles bajos de hibridación de ADN a partir de soluciones diluidas de secuencias diana. Una característica particularmente atractiva del procedimiento son las mejoras de señales grandes que resultan de la formación de ADN dúplex sobre la superficie del electrodo. Normalmente, los cambios observados en la carga integrada son mayores del 100 % a pesar de que la extensión de la hibridación en la superficie del electrodo puede ser de tan solo un 5-10 %. Además, el hallazgo inesperado que una 30 única mutación puntual atenúa drásticamente la cinética de la formación de dúplex en la superficie del electrodo indica que el genotipado bacteriano basado en hibridación es viable, y que se puede lograr una discriminación de la secuencia de alta resolución con sondas de ADN inmovilizadas. El desarrollo adicional de herramientas electroquímicas tales como el ensayo notificado en el presente documento que se puede adaptar para un análisis de alto rendimiento de ADN permitirá el análisis eficaz de genes bacterianos y humanos.

#### 35 REFERENCIAS

1. M.M. Shi, "Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes". *Am. J. Pharmacogenomics* 2002, 2, 197-205.
2. W. Vercoutere y M. Akeson, "Biosensors for DNA sequence detection". *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6, 816-822.
3. B.P. Nelson, M.R. Liles, K.B. Frederick, R.M. Com, y R.M. Goodman, "Label-free detection of 16S ribosomal RNA 40 hybridization on reusable DNA arrays using surface plasmon resonance imaging". *Environ. Microbiol.* 2002, 4, 735-743.
4. B.P. Nelson, T.E. Grimsrud, M.R. Liles, R.M. Goodman, y R.M. Corn, "Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays". *Anal. Chem.* 2001, 73, 1-7.
5. E.M. Southern, "DNA microarrays. History and overview". *Methods Mol. Biol.* 2001, 170, 1-15.
6. J. Wang, "From DNA biosensors to gene chips". *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, 3011- 3016.
7. K.M. Millan, y S.R. Mikkelsen, "Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicator". *Anal. Chem.* 1993, 65, 2317-2323.
8. K. Hashimoto, K. Ito, e Y. Ishimori, "Sequence-specific gene detection with gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye." *Anal. Chem.* 1994, 66, 3830.
9. K. Hashimoto, K. Ito, e Y. Ishimori, "Novel DNA sensor for electrochemical gene detection." *Anal. Chem. Acta.* 50 1994, 286, 219.
10. X.-H. Xu, H.C. Yang, T.E. Mallouk, y A.J. Bard, "Immobilization of DNA on an Aluminum(III) Alkanebisphosphonate Thin Film with Electrogenerated Chemiluminescent Detection". *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 8386-8387.

11. S. Liu, M. Wang, P. He, e Y. Fang, "Voltammetric determination of sequence- specific DNA by electroactive intercolator on graphite electrode". *Anal. Chim. Acta* 1996, 335, 239-243.
12. C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, y J.J. Storhoff, "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials". *Nature* 1996, 382, 607-609.
- 5 13. M.E. Napier, C.R. Loomis, M.F. Sistare, J. Kim, A.E. Eckhardt, y H.H. Thorp, "Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization". *Bioconj. Chem.* 1997, 8, 906-913.
14. S.O. Kelley, E.M. Boon, J.K. Barton, N.M. Jackson, y M.G. Hill, "Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA". *Nucl. Acids Res.* 1999, 27, 4830-4837.
- 10 15. P.A. Ropp, y H.H. Thorp, "Site-selective electron transfer from purines to electrocatalysts: voltammetric detection of a biologically relevant deletion in hybridized DNA duplexes". *Chem. Biol.* 1999, 6, 599-605.
16. E.M. Boon, D.M. Ceres, T.G. Drummond, M.G. Hill, y J.K. Barton, "Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes." *Nat. Biotech.* 2000, 18, 1096.
17. M.I. Pividori, A. Merkoci, y S. Alegret, "Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods". *Biosens. Bioelect.* 2000, 15, 291-303.
- 15 18. T.A. Taton, C.A. Mirkin, y R.L. Letsinger, "Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes". *Science* 2000, 289, 1757-1760.
19. R.J. Heaton, A.W. Peterson, y R.M. Georgiadis, "Electrostatic surface plasmon resonance: direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, 3701-3704.
- 20 20. A.W. Peterson, R.J. Heaton, y R.M. Georgiadis, "The effect of surface probe density on DNA hybridization". *Nucl. Acids Res.* 2001, 29, 5163-5168.
21. P.M. Armistead, y H.H. Thorp, "Electrochemical detection of gene expression in tumor samples: overexpression of Rak nuclear tyrosine kinase". *Bioconj. Chem.* 2002, 13, 172-176.
22. A.W. Peterson, L.K. Wolf, y R.M. Georgiadis, "Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces". *J Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 14601-14607.
- 25 23. E. Palecek, M. Fojta, M. Tomschik, y J. Wang, "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage". *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 621-628.
24. H.H. Thorp, "Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation." *Trends in Biotechnology* 1998, 16, 117-121.
- 30 25. B.J. Taft, M.M. O'Keefe, J.T. Fourkas, y S.O. Kelley, "Engineering DNA-electrode connectivities: effect of linker length and structure". *Anal. Chim. Acta* 2003, en imprenta.
26. A.B. Steel, T.M. Heme, y M.J. Tarlov, "Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold". *Anal. Chem.* 1998, 70, 4670-4677.
- 35 27. S. Wang, A.E. Friedman, y E.T. Kool, "Origins of high sequence selectivity: a stopped-flow kinetics study of DNA/RNA hybridization by duplex- and triplex- forming oligonucleotides". *Biochemistry* 1995, 34, 9774-9784.

### Ejemplo 11. Preparación de conjuntos de nanoelectrodos para la detección de ácidos nucleicos

#### Depósito de oro no electrolítico

Se usaron filtros de policarbonato Track Etch obtenidos de Osmonics, Inc como plantillas de membrana. Estas membranas son de 6 mm de grosor, con un diámetro de poro nominal de 10 nm y una densidad de poro de  $5,2 \times 10^8$  poros  $\text{cm}^{-2}$ . Se prepararon los NEE usando el procedimiento de recubrimiento no electrolítico notificado previamente (1) con ligeras modificaciones (2). Se sumergió la membrana de plantilla en metanol durante 2 horas y después se sumergió durante 45 minutos en una solución que es 0,026 M en  $\text{SnCl}_2$  y 0,07 M en ácido trifluoroacético en metanol/agua 50:50 como disolvente. Esto da como resultado el depósito del "sensibilizador" ( $\text{Sn}^{2+}$ ) sobre todas las superficies de membrana (tanto las pareces de poro como las caras de la membrana). Se lavó dos veces la membrana en metanol durante 2,5 min y se sumergió en una solución de  $\text{AgNO}_3$  (0,029 M) en amoníaco acuoso durante 10 minutos. Esto da como resultado el depósito de nanopartículas de Ag sobre todas las superficies de membrana. Después, se lavaron las membranas en metanol durante 5 minutos. Después del tratamiento en  $\text{AgNO}_3$ , se colocó la membrana en una mezcla de recubrimiento de oro que contenía 0.5 ml de solución de recubrimiento de oro comercial Oromerse Part B (Technic Inc., 0,127 M en  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 0,625 M en formaldehído, y 0,025 M en  $\text{NaHCO}_3$ ). La temperatura de este baño se mantuvo a  $\sim 4$  °C. El pH es inicialmente 12, pero se ajustó hasta 10 por adición gota a gota de  $\text{H}_2\text{SO}_4$

0,5 M, con agitación constante. Se colocaron las membranas en el baño de recubrimiento de oro durante 24 horas, dando como resultado el depósito de nanohilos de Au dentro de los poros. Después del recubrimiento, se lavó la membrana con agua y después se sumergió en un 10 % de HNO<sub>3</sub> durante 12 horas. Después se aclaró la membrana exhaustivamente en agua y se secó al aire.

#### 5 *Ensamblaje de NEE 2D*

Se ensamblaron los NEE 2D obtenidos por medio del procedimiento de depósito de oro no electrolítico descrito anteriormente como se notificó previamente (1) con ligeras modificaciones (3). En primer lugar, se fijó una pequeña pieza de la membrana de recubierta de oro en una pieza de cinta de cobre adhesiva con el lado "brillante" de la superficie de oro hacia arriba y la cara áspera de la membrana hacia el adhesivo. Después, se fijó otra tira de cobre adhesivo a la superficie de oro brillante superior y se cubrió sólo una pequeña parte de la membrana. Esto mejoró el rendimiento de la fabricación de NEE reproducibles así como la conexión eléctrica entre el cobre y los NEE. Después, se retiró la capa de superficie superior de Au que no se cubrió con la cinta de lámina de Cu aplicando y retirando sencillamente una tira de cinta adhesiva Scotch 3M (cinta marca Magic N.º 810). Esta etapa expone los extremos con forma de disco de los nanohilos de Au. Después, se calentó el ensamblaje de NEE a 155 °C durante 30 minutos. Después, se aislaron las membranas con cinta N.º 898 marca 3M Scotch en las superficies inferior y superior del ensamblaje así como la cinta de lámina de Cu. Antes de la colocación en el ensamblaje, se perforó un agujero de 0,07 cm<sup>2</sup> en la pieza superior de cinta Scotch. Esta abertura define el área geométrica de los NEE 2D expuestos a la solución.

#### *Preparación y ensamblaje de los NEE 3D*

Después del depósito no electrolítico de oro dentro de los poros de la membrana de policarbonato así como en ambas caras de la membrana, se prepararon los NEE 3D grabando con plasma O<sub>2</sub> los NEE 2D como se describe (4). Se retiró el lado "brillante" (5) de la superficie de oro aplicando y retirando una tira de cinta adhesiva 3M Scotch, lo que expuso los extremos de los nanohilos de oro. Se grabó con plasma O<sub>2</sub> la superficie de membrana "brillante" usando un Plasma Therma 290 Series Systems VII durante 65 segundos. Este procedimiento graba el material de policarbonato y expone ~200 nm de los extremos de nanohilos de oro. Las condiciones de grabado fueron como sigue: energía = 100 W, presión de oxígeno = 150 mTorr, caudal = 30 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Se ensamblaron los NEE 3D como los NEE 2D descritos anteriormente y se sometió a tratamiento térmico en un horno a 155 °C durante 30 min para mejorar el sellado de la membrana de policarbonato alrededor de los NEE. Este procedimiento de fabricación incrementó significativamente el rendimiento de NEE 3D funcionales hasta un ~85 %. El área geométrica de los NEE 3D expuestos a la solución fue de 0,07 cm<sup>2</sup>.

La FIG. 13 A muestra micrografías electrónicas de barrido de las estructuras generadas usando una versión modificada de un procedimiento de recubrimiento no electrolítico descrito previamente.<sup>2</sup> Estos nanoelectrodos bidimensionales (2D) son aproximadamente de 10 nm de diámetro y tienen una separación promedio de 200 nm. Usando el grabado de plasma de oxígeno para retirar una capa fina de policarbonato,<sup>5</sup> se usan los mismos materiales para preparar NEE tridimensionales (3D) que proporcionan nanohilos de Au expuestos. El grabado con plasma dio como resultado una exposición consistente de ~200 nm de los nanohilos de oro. Se logró el sellado de la membrana de policarbonato alrededor de los NEE por tratamiento término, y fue una etapa crucial que redujo significativamente las corrientes de carga de doble capa.<sup>2</sup>

#### *Modificación de las superficies de oro con sonda de ADN y protocolo de hibridación de ADN*

Se pulieron los electrodos de oro de macrodisco de BAS antes de su uso con 0,05 mm de alúmina en polvo usando una rueda de pulido. Después, se lavaron los electrodos de oro de macrodisco con agua Millipore, se sometió a sonicación durante 5 min. y se grabó por barrido desde 0 - 1800 mV a 200 mV/s en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, y se lavó con cantidades copiosas de agua Millipore. Se inmovilizaron las sondas de ADN ss-tioladas sobre electrodos de oro de macrodisco de BAS, NEE 2D y 3D. Se expusieron los electrodos a soluciones que contenían SH-ADN 5 mM, 6-mercapto-1-hexanol 500 nM (97 %), fosfato de sodio 25 mM (pH = 7), NaCl 25 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM en una cámara de humedad a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se lavaron los electrodos en fosfato de sodio 25 mM/NaCl 25 mM (pH = 7). Se confirmó la quimisorción de ADN sobre electrodos de oro por barrido desde 0 - 500 mV en una solución de cianuro férrico 2 mM en fosfato de sodio 25 mM (pH = 7) / NaCl 25 mM a una velocidad de exploración de 100 mV/s. Después, se lavaron los electrodos en fosfato de sodio 25 mM / NaCl 25 mM (pH = 7) y se midieron las corrientes electrocatalíticas como se describe anteriormente. Después se introdujeron soluciones que contenían ADN diana 1 pM - 20 mM en fosfato de sodio 25 mM (pH = 7), NaCl 25 mM y MgCl<sub>2</sub> 100 mM en una cámara de humedad termostatizada a 37 - 40 °C. Después, se volvió a medir la corriente electrocatalítica como se describe anteriormente.

La FIG. 13B muestra esquemáticamente la unión de las sondas de ácido nucleico sobre los nanohilos.

#### *Síntesis y purificación de oligonucleótidos*

Se realizó la síntesis de oligonucleótidos con un sintetizador de ADN/ARN ABI394 usando técnicas en fase sólida automatizadas estándar (6). Se modificó el extremo 5' terminal del ADN con un enlazador de tiol y se purificó por HPLC de fase inversa como se describe previamente (7). Las secuencias de ADN que pertenecen al microbio patógeno *Helicobacter pylori* fueron como sigue:

Sonda: SH- 5' GGGTCTTTCCGTCTTGCC3' (SEQ ID NO. 18)

Diana: 5' GGC A AG ACGG AAAG ACCC3' (SEQ ID NO. 19)

Diana de control (no complementaria): 5'GCACTAGCGATAGTCATC3' (SEQ ID NO. 20)

5 Se cuantificaron los oligonucleótidos midiendo absorbancia a 260 nm usando coeficientes de extinción notificados previamente (8).

### Ejemplo 12. Medidas electroquímicas de ácidos nucleicos

#### Procedimientos

10 Se realizaron medidas de voltametría cíclica usando un potenciostato-galvanostato Epsilon de Bioanalytical Systems (BAS) controlado con el programa informático Epsilon CE de BAS. Se llevaron a cabo todas las medidas con una configuración de tres electrodos a temperatura ambiente. Se usó un electrodo de Ag/AgCl equipado con un capilar de Luggin como electrodo de referencia, y se usó un hilo de platino como contraelectrodo. Se usaron macroelectrodos de oro de BAS (área = 0,02 cm<sup>2</sup>), NEE 2D y 3D como electrodos de trabajo. Se notificaron todos los potenciales frente a Ag/AgCl. Se midieron las corrientes electrocatalíticas en soluciones de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> 5 mM y Ru(NH)<sub>6</sub><sup>3+</sup> 100 mM en fosfato de sodio 25 mM/NaCl 250 mM (pH = 7) a una velocidad de exploración de 100 mV/s. Se cuantificó la carga catódica (Q) integrando el área bajo cada voltamograma y se calcularon los cambios de señal correspondientes a acontecimientos de hibridación como sigue

$$DQ \% = \{((Q_{\text{final}} - Q_{\text{inicial}}) / Q_{\text{inicial}}) * 100\}$$

15 donde Q<sub>final</sub> y Q<sub>inicial</sub> representan cargas catódicas integradas después y antes de la hibridación, respectivamente. Se realizaron todas las medidas electroquímicas al menos en 3 electrodos de oro diferentes y se notificaron las cargas integradas con desviaciones estándar en la tabla 1.

#### Referencias

1. Menon V.P.; Martin C.R. Anal. Chem. **1995**, 67, 1920.
2. Brunetti B.; Ugo P.; Moretto L.M.; Martin C.R. J. Electroanal. Chem. **2000**, 491, 166.
3. Moretto L.M.; Pepe N.; Ugo P. Talanta **2004**, 62, 1055.
- 25 4. Yu S.; Li N.; Wharton J.; Martin C.R. Nano Lett. **2004**, 5, 815.
5. Cheng I.F.; Whiteley L.D.; Martin C.R. Anal. Chem. **1989**, 61, 762.
6. Beaucage S.L.; Caruthers M.H.; Tetrahedron Lett. **1981**, 22, 1859.
7. Taft B.J.; O'Keefe M.O.; Fourkas J.T.; Kelley S.O. Anal. Chim. Acta. **2003**, 496, 81.
8. Lapiere M.A.; O'Keefe M.M.; Taft B.J.; Kelley S.O. Anal. Chem. **2003**, 75, 6327.
- 30 9. Kelley S.O.; Boon E.M.; Jackson N.M.; Hill M.G.; Barton J.K. Nucleic Acids Res., **1999**, 27, 4830.
10. Kelley S.O., Hill M.G. Frontiers in Electrochemistry: Bioinorganic Electrochemistry; Kluwer Academic Publishers: en imprenta, 2004.

#### Resultados

35 Como se muestra en la FIG. 14, las señales de electrocatalisis obtenidas usando NEE muestran grandes incrementos sobre la hibridación de una secuencia de ADN diana.<sup>9</sup> Aunque se miden corrientes muy pequeñas en los NEE modificados con sonda con relación a macroelectrodos, las señales observadas sobre la hibridación de ADN en NEE se acercan o superan las obtenidas con macroelectrodos de Au (tabla 1 y FIG. 14).<sup>10</sup> Para cuantificar el efecto de la hibridación de ADN sobre las señales obtenidas con diferentes electrodos, se compararon los valores de DQ (reflejando corrientes de electrocatalisis integradas antes y después de la introducción del oligonucleótido diana)<sup>11</sup>

40 para NEE 2D, 3D y macroelectrodos. Se obtuvieron valores promedio de un 730 %, 420 % y 80 % (tabla 1), respectivamente. Por tanto, las señales electrocatalíticas medidas en NEE se modularon más fuertemente por hibridación de ADN con relación a las observadas en macroelectrodos. Los experimentos de control en los que se sometieron a prueba secuencias no complementarias no generaron cambios significativos en la respuesta electroquímica medida con cualquiera de los electrodos, indicando que los cambios de señal observados reflejan la

45 formación de un complejo específico entre la diana y la sonda.

Tabla 1 Comparación de señales electroquímicas obtenidas en macro y nanoelectrodos

Electrodo	$\Delta Q$ %*	Q ( $\mu C$ )*	Área geométrica ( $cm^2$ )*
Au macro	80 $\pm$ 10	6.6 $\pm$ 0.6	0,02
NEE 2D	730 $\pm$ 80	8.5 $\pm$ 0.5	0,07
NEE 3D	420 $\pm$ 9-	13 $\pm$ 4	0,07

\*Véase nota 11. Carga integrada después de la hibridación. El área geométrica se los NEE se define por el área expuesta del ensamblaje de nanohilos.

El éxito de los experimentos de hibridación de ADN realizados usando NEE indica claramente que estas nanoestructuras son sustratos útiles para la biosensibilización. Aunque ambos tipos de NEE mostraron cambios de señal positivos cuando estaba presente una cadena de ADN diana, se observaron varias diferencias en el comportamiento de estos electrodos que indicó que las nanoestructuras 3D eran más adecuadas para aplicaciones prácticas. Las corrientes de electrocatálisis medidas en los NEE 3D fueron mayores que en los NEE 2D, consistente con el área de superficie activa incrementada producida por el grabado del sustrato de policarbonato.<sup>12</sup> Además, el procedimiento de grabado usado para generar los nanohilos expuestos incrementó el rendimiento de los electrodos funcionales obtenidos a partir de una membrana individual (85 % para NEE 3D y 45 % para 2D), y produjo electrodos con corrientes capacitivas más pequeñas y señales de fondo más estables durante los experimentos de hibridación de ADN.

Se usaron los NEE 3D para establecer la sensibilidad del ensayo de detección de ADN electrocatalítico realizado sobre la arquitectura a nanoescala (FIG. 15). Cuando se valoró un electrodo de NEE 30 modificado con sonda con una cadena de ADN diana, las soluciones que contenían concentraciones picomolares del analito produjeron cambios detectables en la señal electroquímica. De hecho, una muestra que contenía 5 atomoles de ADN diana incrementó la señal de electrocatálisis en > 200 %. Se realizó este análisis sobre un electrodo con un área geométrica expuesta de 0,07  $cm^2$ , indicando que se pudieron lograr fácilmente límites de detección en zeptomoles con una disminución modesta en el tamaño de la apertura usada en el análisis electroquímico. Estudios previos que usaron el ensayo de electrocatálisis de Ru(III)/Fe(III) ensayo para detectar las mismas secuencias de ADN usando electrodos de oro macroscópicos lograron una sensibilidad en femtomoles.<sup>4</sup> Un límite de detección de nivel atómico se compara favorablemente con procedimientos electroquímicos descritos para la detección directa de oligonucleótidos.<sup>13</sup> Es evidente que los nanoelectrodos sometidos a prueba en el presente documento son una plataforma atractiva para la sensibilización biomolecular debido a los niveles de detección disminuidos y a la amplificación potenciada de los cambios de señal positiva que se producen sobre la hibridación de ADN.

#### REFERENCIAS Y NOTAS

1. (a) Li, C.; Papadopoulos, C.; Xu J.M. *Appl. Phys. Lett.* **1999**, 75, 367. (b) Gooding, J.J.; Wibowo, R.; Liu, J.; Yang, W.; Losic, D.; Orbons, S.; Meams, F.J.; Shapter, J.G.; Hibbert, D.B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9006.
2. (a) Menon, V.P.; Martin, C.R. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1920. (b) Brunetti, B.; Ugo P.; Moretto, L.M.; Martin, C.R. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 491, 166. (c) Moretto, L.M.; Pepe, N.; Ugo, P. *Talanta* **2004**, 62, 1055.
3. Forrer, P.; Schlottig, F.; Siegenthaler, H.; Textor, M. *J. Appl. Electrochem.* **2000**, 30, 533.
4. Lapierre, M.A.; O'Keefe, M.M.; Taft, B.J.; Kelley, S.O. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6327.
5. Yu, S.; Li, N.; Wharton, J.; Martin, C.R. *Nano Lett.* **2004**, 3, 815.
6. Steele, A.B.; Heme, T.M.; Tarlov, M.J. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4670.
7. Blaser, J.; *J. Infect. Dis.*, **1990**, 161, 626.
8. Taft, B.J.; O'Keefe, M.O.; Fourkas, J.T.; Kelley, S.O. *Anal. Chim. Acta.* **2003**, 496, 81.
9. Véase información adicional para condiciones de hibridación y secuencias.
10. Las corrientes medidas en NEE 3D fueron normalmente ~ 2 veces superiores a las medidas en NEE 2D. El área de superficie de Au expuesto en los NEE 3D ( $A = 0,025 cm^2$ ) se debe incrementar en un factor de ~ 850 sobre los NEE 2D ( $A = 2,9 \times 10^{-5} cm^2$ ), en base a las áreas aproximadas de las imágenes de SEM. Sin embargo, se ha observado previamente que la disminución de la capa de difusión entre nanoestructuras 3D adyacentes disminuye la participación de las paredes laterales expuestas en los procesos electroquímicos.<sup>3</sup> Este efecto puede ser responsable de los incrementos de señal relativamente pequeños que se observan en los NEE 3D con respecto a 2D en el ensayo de la presente invención.

11. Se calcularon los cambios de señal como sigue.  $DQ (\%) = \{(Q_{final} - Q_{inicial}) / Q_{inicial}\} * 100$  donde  $Q_{final}$  y  $Q_{inicial}$  son cargas catiónicas integradas después y antes de la hibridación de ADN, respectivamente.

12. Las corrientes observadas en los NEE son mayores de lo que sería previsible en base a las áreas de superficie activa de estas estructuras. Sin embargo, se predice que existen campos eléctricos fuertes alrededor de los NEE que pueden facilitar la reducción de  $Ru(NH)_6^{3+}$  a través de interacciones electrostáticas favorables. (Smith, C.P.; White, H.S.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3343.)

13. (a) Thorp, H.H.; *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 117. (b) Armistead, P.M.; Thorp, H.H. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3764. (c) Gore, M.R.; Szalai, V.A.; Ropp, P.A.; Yang, I.V.; Silverman, J.S.; Thorp H.H. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6586. (d) Patolsky, F.; Lichtenstet, A.; Kotler, M.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 2261. (e) Wang, J.; Polsky, R.; Merkoci, A.; Turner, L. *Langmuir*, **2003**, 19, 989.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of Boston College  
 Kelley, Shana O.  
 Lapierre, Melissa  
 15 O'Keefe, Meaghan  
 <120> DETECCIÓN DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS ELECTROCATALÍTICA  
 <130> 2846/2138B  
 <150> 10/913.925  
 <151> 2004-08-06  
 20 <160> 20  
 <170> PatentIn versión 3.2  
 <210> 1  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> T1 (diana de *hpn*)  
 <400> 1  
 tggtgcagca ctagcgatag tcatcatcaa 30  
 30  
 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> T2a (diana de ARNr de WT)  
 <400> 2  
 ggcaagacgg aaagaccc 18  
 40 <210> 3

# ES 2 385 341 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> T2aMUT (diana de ARNr de A2143C)	
	<400> 3	
	ggcaagacgg acagaccc	18
	<210> 4	
10	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HP1b (sonda de <i>hpn</i> complementaria de 18 nt + 12T)	
15	<400> 4	
	ttttttttt ttgatgacta tcgctagtgc	30
	<210> 5	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HP1c (sonda de <i>hpn</i> no complementaria de 18 nt + 12T)	
	<400> 5	
25	ttttttttt ttgggataat tcttcaccgg	30
	<210> 6	
	<211> 219	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana (producto de PCR)	
	<400> 6	
	ggagtcatca tggcacacca tgaagaacag cacggcggtc atcaccacca tcaccaccac	60
35	acacaccacc accactatca cggcggtgaa caccaccatc accaccacag ctctcatcat	120
	gaagaaggtt gttgcagcac tagcgatagt catcatcatc aagaagaggg ttgctgccac	180
	gggcatcacg agtaatatcg gtgtggctag gggcaactt	219

## ES 2 385 341 T3

	<210> 7	
	<211> 225	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia diana (transcrito de ARN)	
	<400> 7	
	atcaaaggag tcacatggc acacatgaa gaacagcacg gcggtcatca ccacatcac	60
10	caccacacac accaccacca ctatcacggc ggtgaacacc accatcacca ccacagctct	120
	catcatgaag aaggtgttg cagcactagc gatagtcac atcatcaaga agagggtgc	180
	tgccacgggc atcacgagta atacggtgt ggctaggggc aactt	225
	<210> 8	
15	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido 30-mero para detección de diana de Hpn	
20	<400> 8	
	tggtgcagca ctacgatag tcacatcat caa	33
	<210> 9	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR directa para la amplificación del gen <i>hpn</i> de <i>H. pylori</i>	
	<400> 9	
30	atcaaaggag tcacatggc acac	24
	<210> 10	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR inversa para la amplificación del gen <i>hpn</i> de <i>H. pylori</i>	

## ES 2 385 341 T3

<400> 10  
 aagttgcccc tagccaca 18

<210> 11  
 5 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR directa que contiene la secuencia del promotor de la T7 polimerasa

10 <400> 11  
 gctaggtaat acgactcact ataggagtca tcatggcaca c 41

<210> 12  
 <211> 30  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HP1a (sonda de *hpn* complementaria de 30 nt):  
 <400> 12

20 ttgatgatga ctatcgctag tgctgcaaca 30

<210> 13  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HP2a (sonda de ARNr)  
 <400> 13

gggctttcc gtcttgcc 18

30

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> HP2b (sonda-2 de ARNr)  
 <400> 14

	ggtccacggg gtctttcc	18
	<210> 15	
	<211> 18	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> T2b (diana n.º 2 de ARNr de WT):	
	<400> 15	
10	ggaaagaccc cgtggacc	18
	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> T2bMUT diana n.º 2 de ARNr de CA2143C)	
	<400> 16	
	ggacagaccc cgtggacc	18
20		
	<210> 17	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> T-NC (diana no complementaria):	
	<400> 17	
	aacagttcct gcatg	15
30	<210> 18	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Helicobacter pylori</i>	
	<400> 18	
35	gggtctttcc gtcttgcc	18
	<210> 19	

ES 2 385 341 T3

<211> 18

<212> ADN

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 19

5 ggcaagacgg aaagaccc

18

<210> 20

<211> 18

<212> ADN

10 <213> *Helicobacter pylori*

<400> 20

gcactagcga tagtcatc

18

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección electroquímica de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende: (a) proporcionar un dispositivo para detectar la presencia del ácido nucleico diana, comprendiendo dicho dispositivo un nanoelectrodo, en el que el nanoelectrodo comprende al menos un nanohilo metálico integrado dentro de una membrana de policarbonato y una sonda de ácido nucleico unida al nanohilo metálico; (b) poner en contacto la sonda de ácido nucleico con la muestra y una solución que comprende un compuesto de unión a ácido nucleico bajo una condición de hibridación; (c) generar una señal de la interacción electrostática entre la sonda de ácido nucleico y el compuesto de unión a ácido nucleico; (d) poner en contacto la sonda de ácido nucleico con una solución que comprende una sonda activa redox; (e) amplificar la señal generada con la sonda activa redox; y (f) medir la señal amplificada, en el que un incremento de la señal amplificada detectada con relación a una señal amplificada de una muestra de control que no comprende ácido nucleico diana es indicativo de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.
2. Un procedimiento para la detección electroquímica de hibridación de ácido nucleico entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende: (a) proporcionar una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre conjuntos de nanoelectrodos, en el que los conjuntos de nanoelectrodos comprenden un nanohilo metálico integrado dentro de un sustrato no conductor; (b) poner en contacto bajo condiciones de hibridación los conjuntos de nanoelectrodos y la sonda de ácido nucleico inmovilizada con la muestra, y un par redox que comprende un compuesto de unión a ácido nucleico que comprende un primer complejo de metal de transición y una sonda activa redox que comprende un segundo complejo de metal de transición, en el que la muestra y el par redox están en solución; y (c) medir una señal electrostática generada por hibridación de la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana en la muestra, en el que un incremento de la señal detectada con relación a una señal de una muestra de control que no comprende ácido nucleico diana, indica que se ha producido la hibridación de ácido nucleico.
3. Un procedimiento para la detección electroquímica de hibridación de ácido nucleico entre un primer nucleico y un segundo ácido nucleico, que comprende: (a) proporcionar el primer ácido nucleico inmovilizado sobre conjuntos de nanoelectrodos, en el que los conjuntos de nanoelectrodos comprenden un nanohilo metálico integrado dentro de un sustrato no conductor; (b) poner en contacto bajo condiciones de hibridación los conjuntos de nanoelectrodos y el primer ácido nucleico inmovilizado con una solución sospechosa de contener el segundo ácido nucleico, y que contiene un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y un segundo complejo de metal de transición; y (c) medir una señal electrostática generada por hibridación del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico, en el que un incremento de la señal detectada con relación a una señal de una muestra de control que no comprende segundo ácido nucleico, indica que se ha producido la hibridación de ácido nucleico.
4. Un procedimiento para la detección electroquímica de hibridación de ácido nucleico entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico diana en una muestra, que comprende: (a) proporcionar una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre conjuntos de nanoelectrodos, en el que los conjuntos de nanoelectrodos comprenden un nanohilo metálico integrado dentro de un sustrato no conductor; (b) poner en contacto bajo condiciones de hibridación los conjuntos de nanoelectrodos y la sonda de ácido nucleico inmovilizada con la muestra, y un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y una sonda activa redox que comprende un ácido ascórbico o tripropilamina; en el que la muestra y el par redox están en solución; y (c) medir una señal electrostática generada por hibridación de la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana en la muestra, en el que un incremento de la señal detectada con relación a una señal de una muestra de control que no comprende ácido nucleico diana, indica que se ha producido la hibridación de ácido nucleico.
5. Un procedimiento para la detección electroquímica de hibridación de ácido nucleico entre un primer nucleico y un segundo ácido nucleico, que comprende: (a) proporcionar el primer ácido nucleico inmovilizado sobre conjuntos de nanoelectrodos, en el que los conjuntos de nanoelectrodos comprenden un nanohilo metálico integrado dentro de un sustrato no conductor; (b) poner en contacto bajo condiciones de hibridación los conjuntos de nanoelectrodos y el primer ácido nucleico inmovilizado con una solución sospechosa de contener el segundo ácido nucleico, y que contiene un par redox que comprende un primer complejo de metal de transición y una sonda activa redox que comprende un ácido ascórbico o tripropilamina; y (c) medir una señal electrostática generada por hibridación del primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico, en el que un incremento de la señal detectada con relación a una señal de una muestra de control que no comprende segundo ácido nucleico, indica que se ha producido la hibridación de ácido nucleico.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, en el que la sonda de ácido nucleico comprende ADN.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, en el que el ácido nucleico diana comprende ADN.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, en el que el ácido nucleico diana comprende ARN.

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, en el que la sonda de ácido nucleico tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia del ácido nucleico diana.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5, en el que el primer ácido nucleico comprende ADN.
- 5 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5, en el que el segundo ácido nucleico comprende ADN.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5, en el que el segundo ácido nucleico comprende ARN.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 5, en el que el primer ácido nucleico tiene una secuencia que es complementaria a la segunda secuencia de ácido nucleico.
- 10 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nanohilo metálico comprende oro.
- 15 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en el que el primer complejo de metal de transición comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio, y en el que el segundo complejo de metal de transición comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en hierro, cobalto, molibdeno, iridio, osmio y renio, y preferentemente en el que el primer complejo de metal de transición comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en cobalto, hierro, molibdeno, osmio, rutenio y renio.
- 20 16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2-14, en el que el primer complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición, y en el que el segundo complejo de metal de transición es un complejo de cianato o cloruro de metal de transición, y preferentemente en el que el primer complejo de metal de transición es un complejo de amonio de metal de transición.
17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nanohilo metálico comprende un nanohilo de oro.

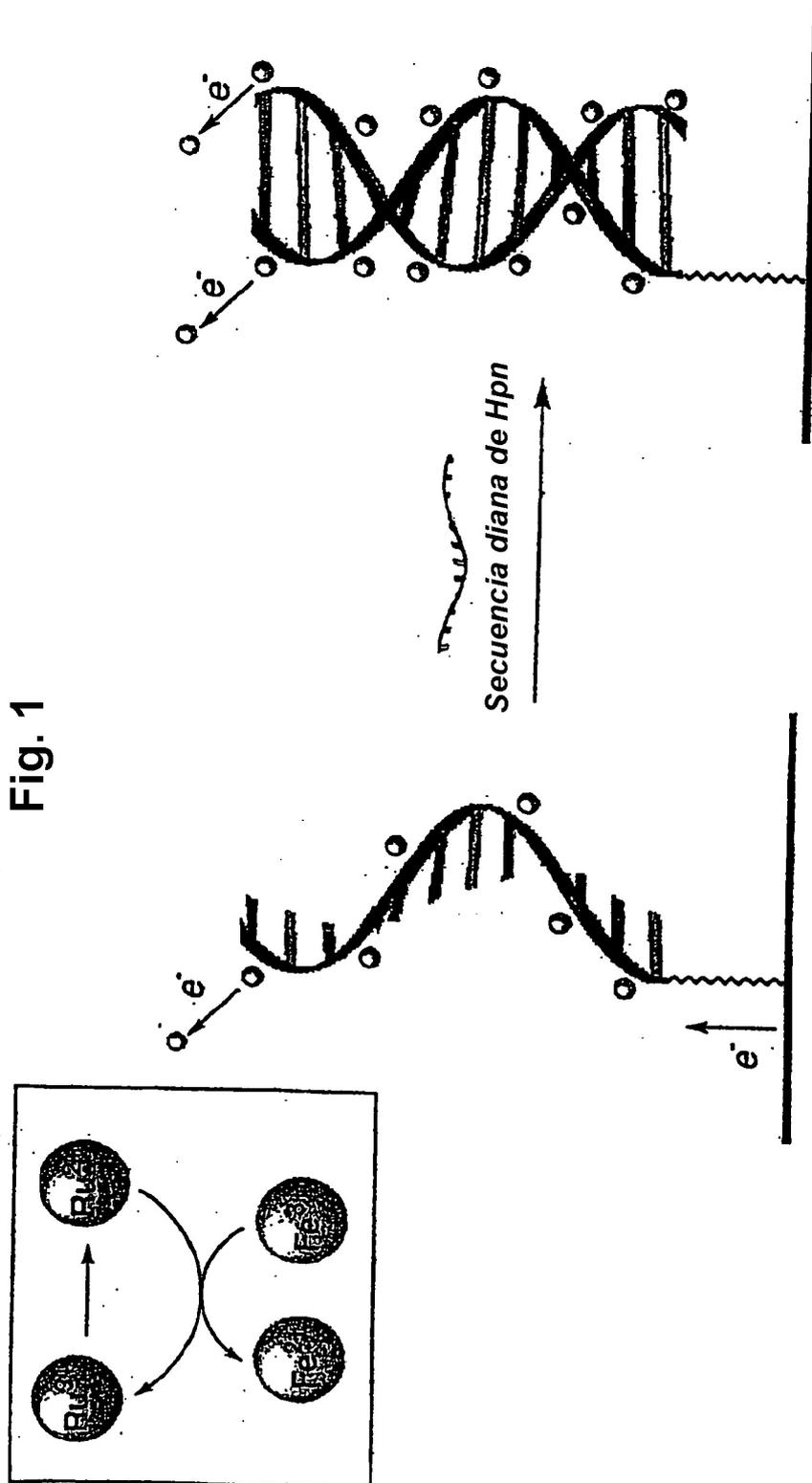


Fig. 1

Fig. 2B

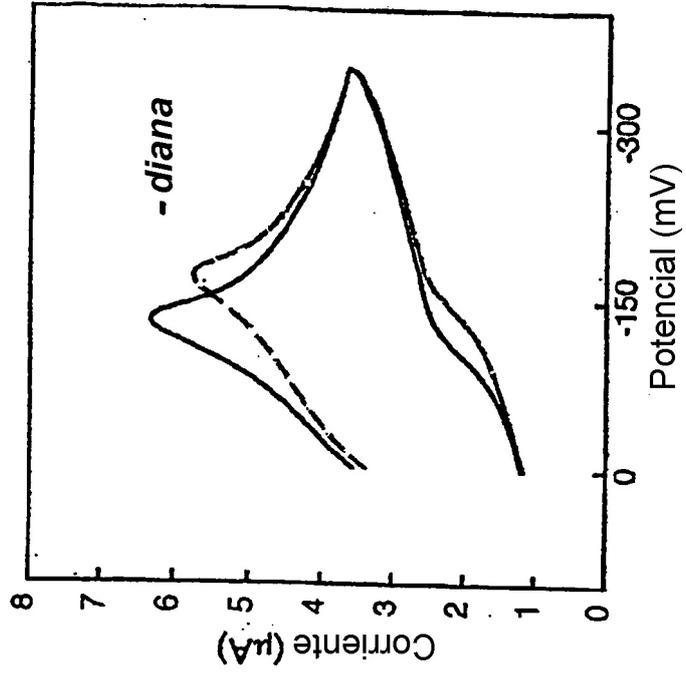


Fig. 2A

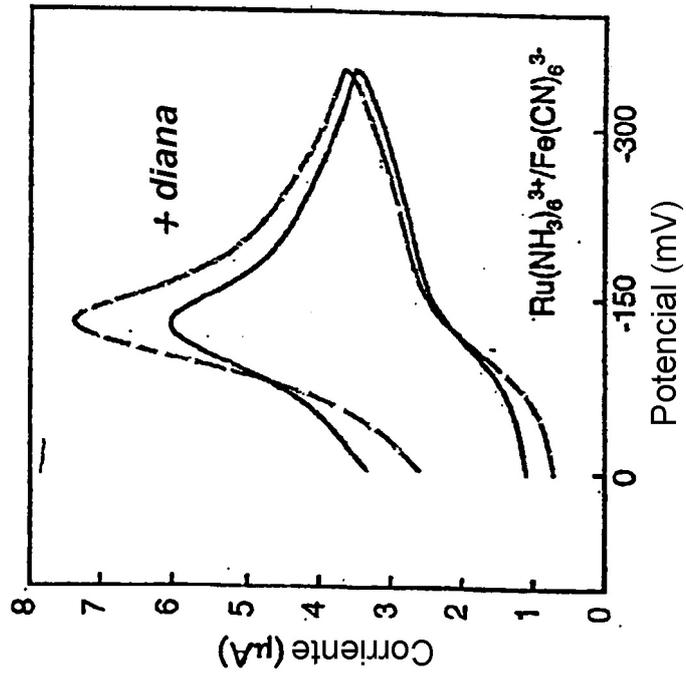


Fig. 3

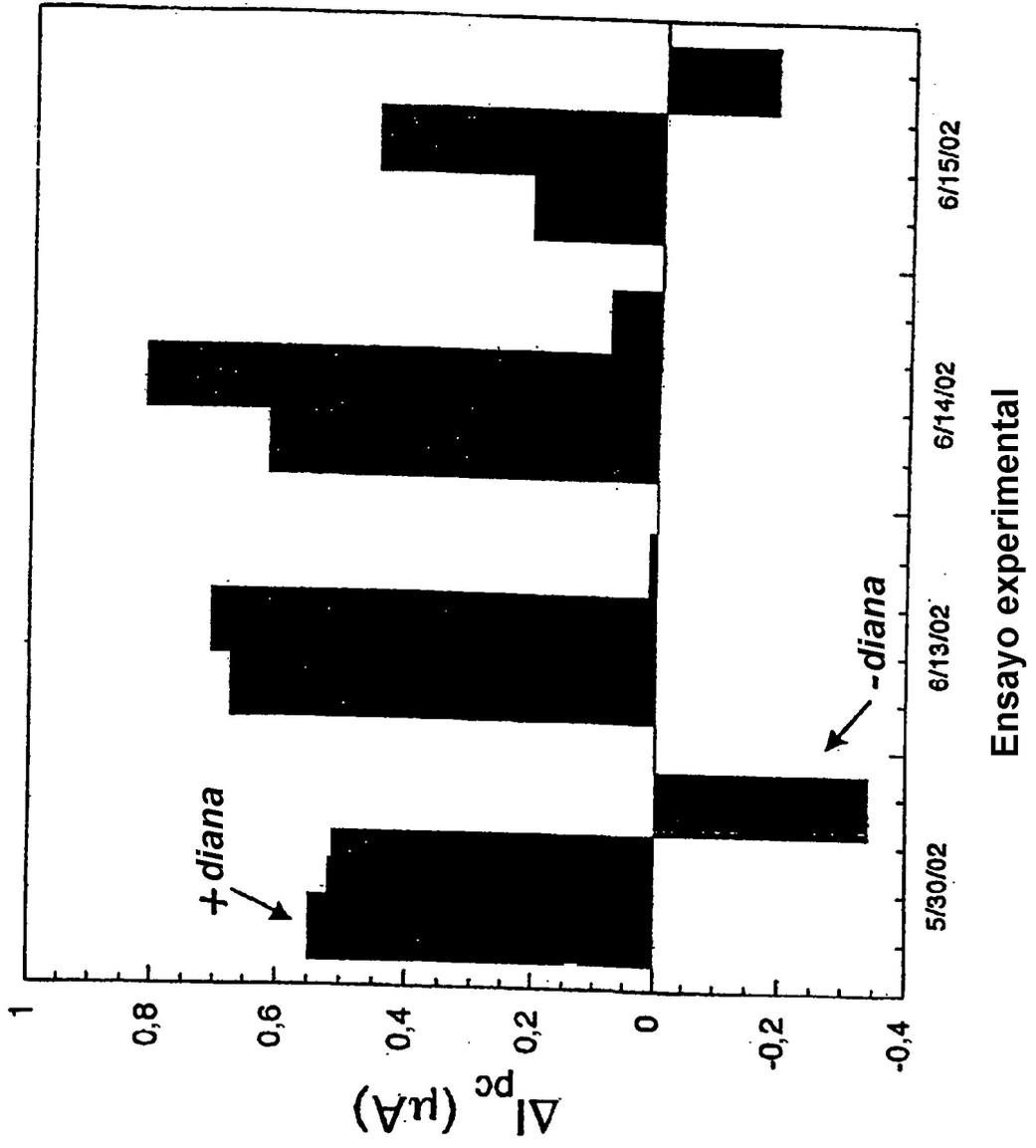


Fig. 4

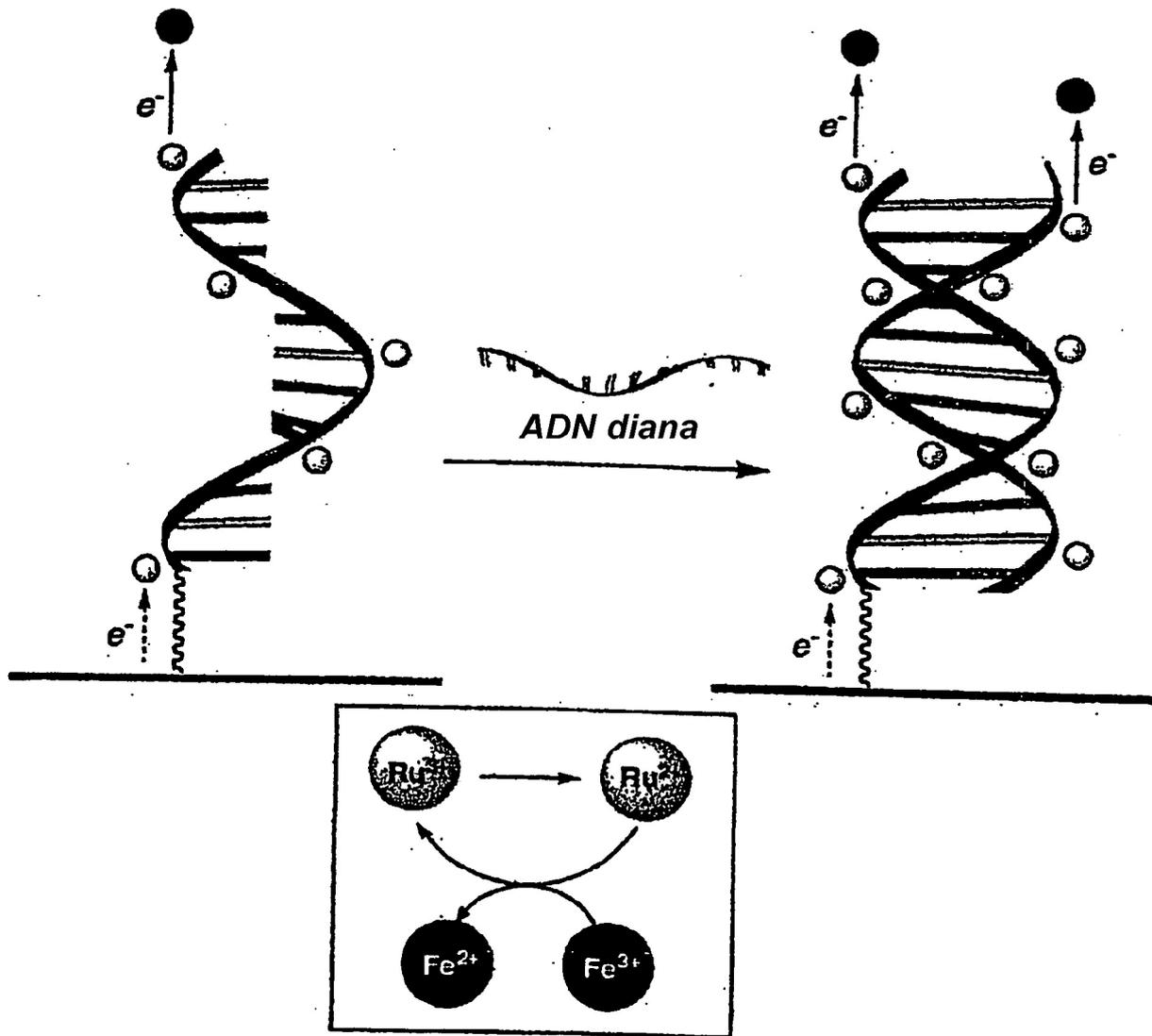


Fig. 5A

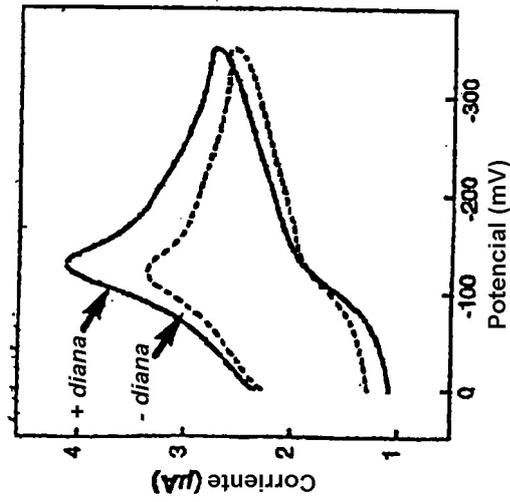


Fig. 5B

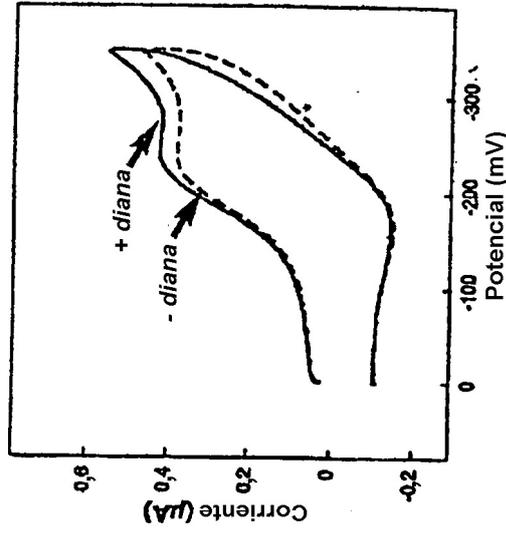


Fig. 5C

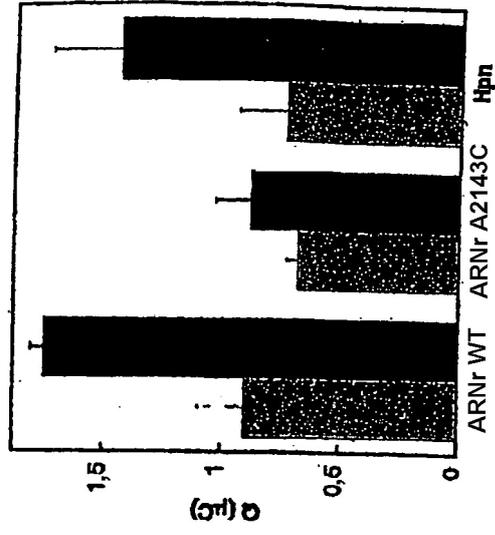


Fig. 6

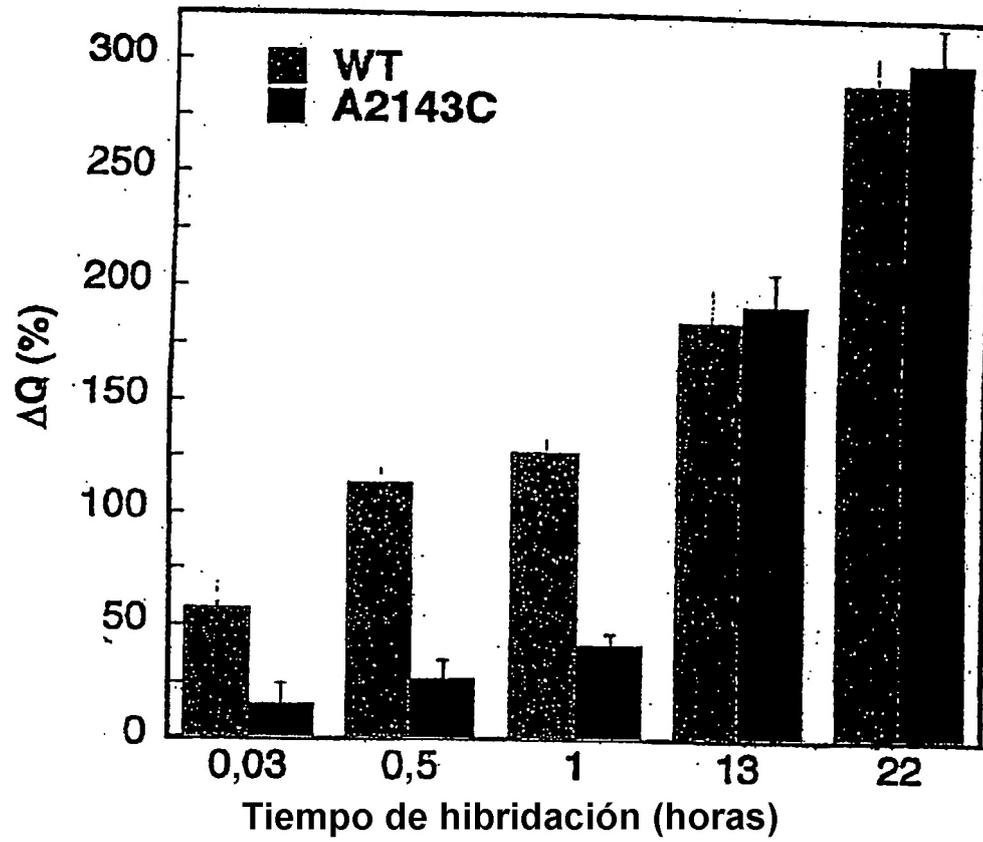
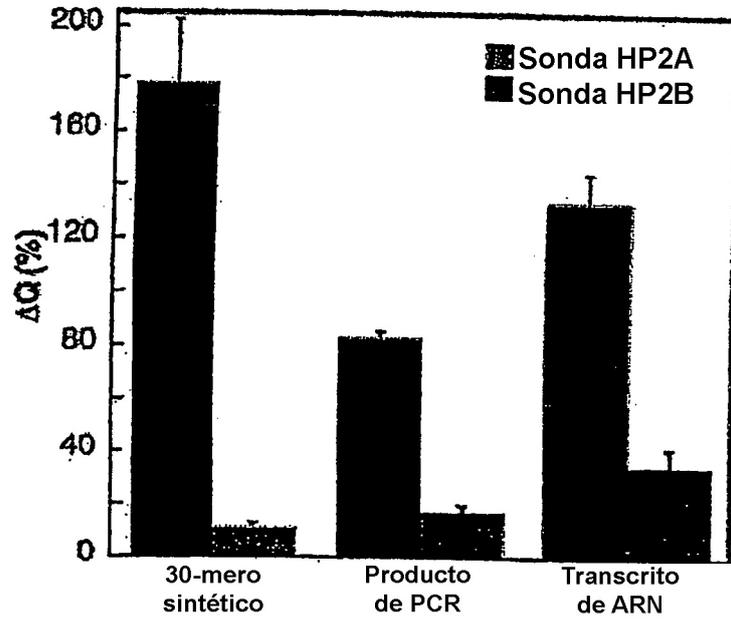


Fig. 7



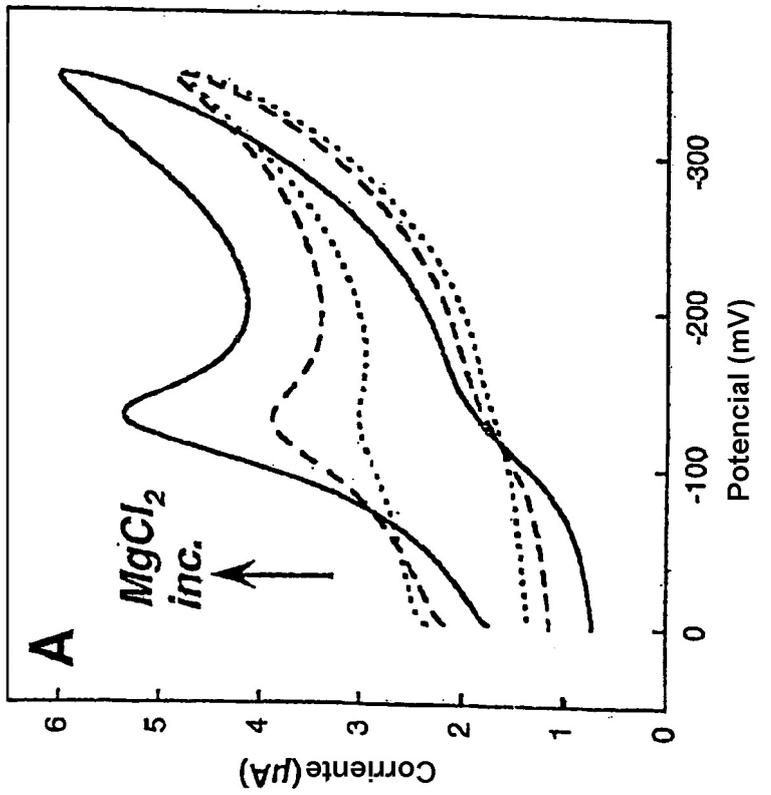
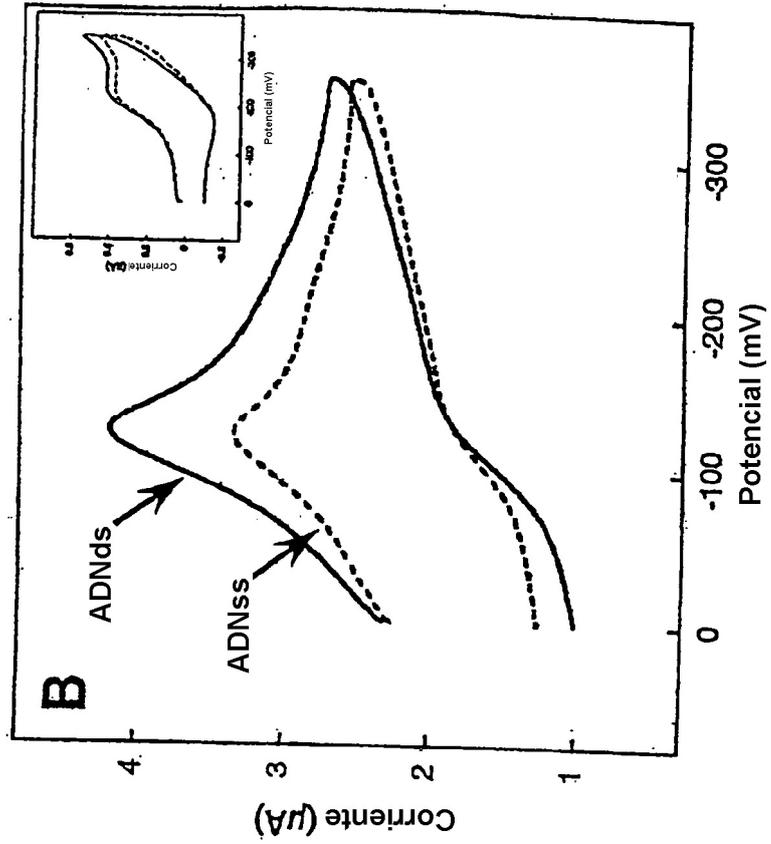


Fig. 8

Fig. 9

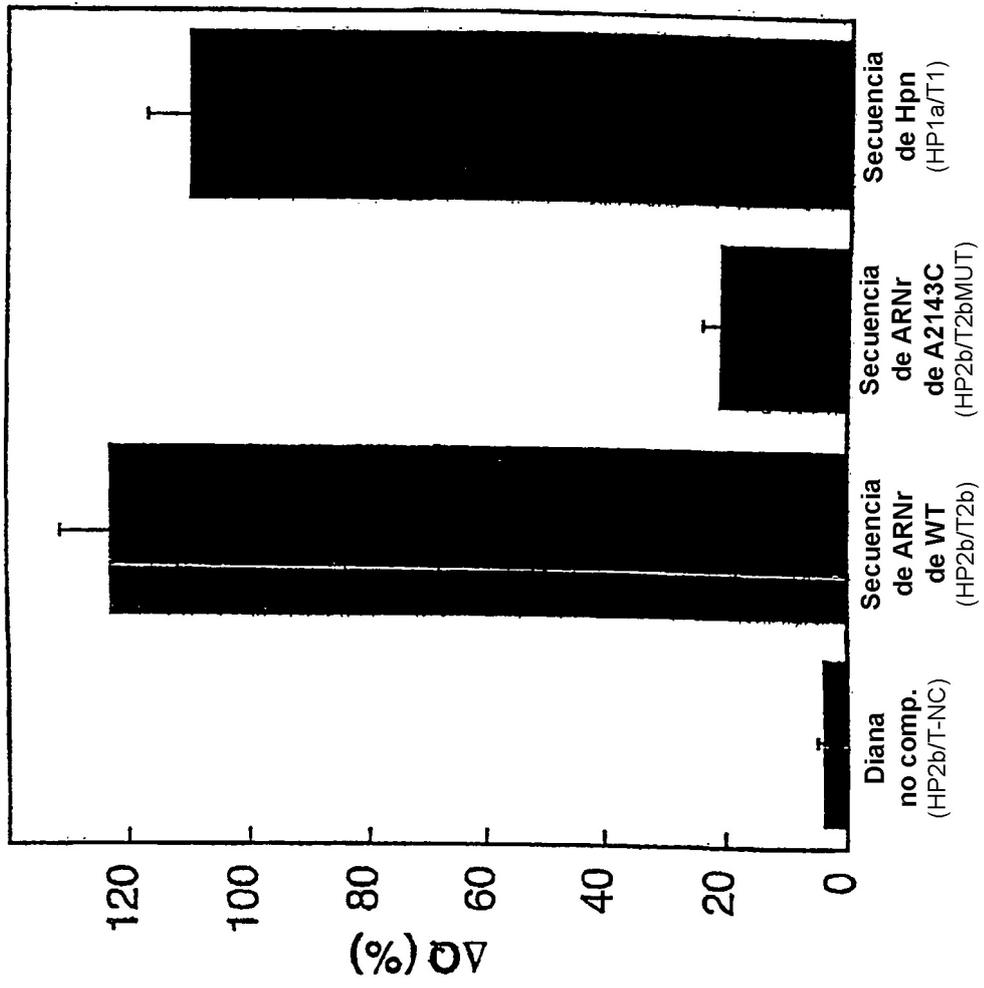
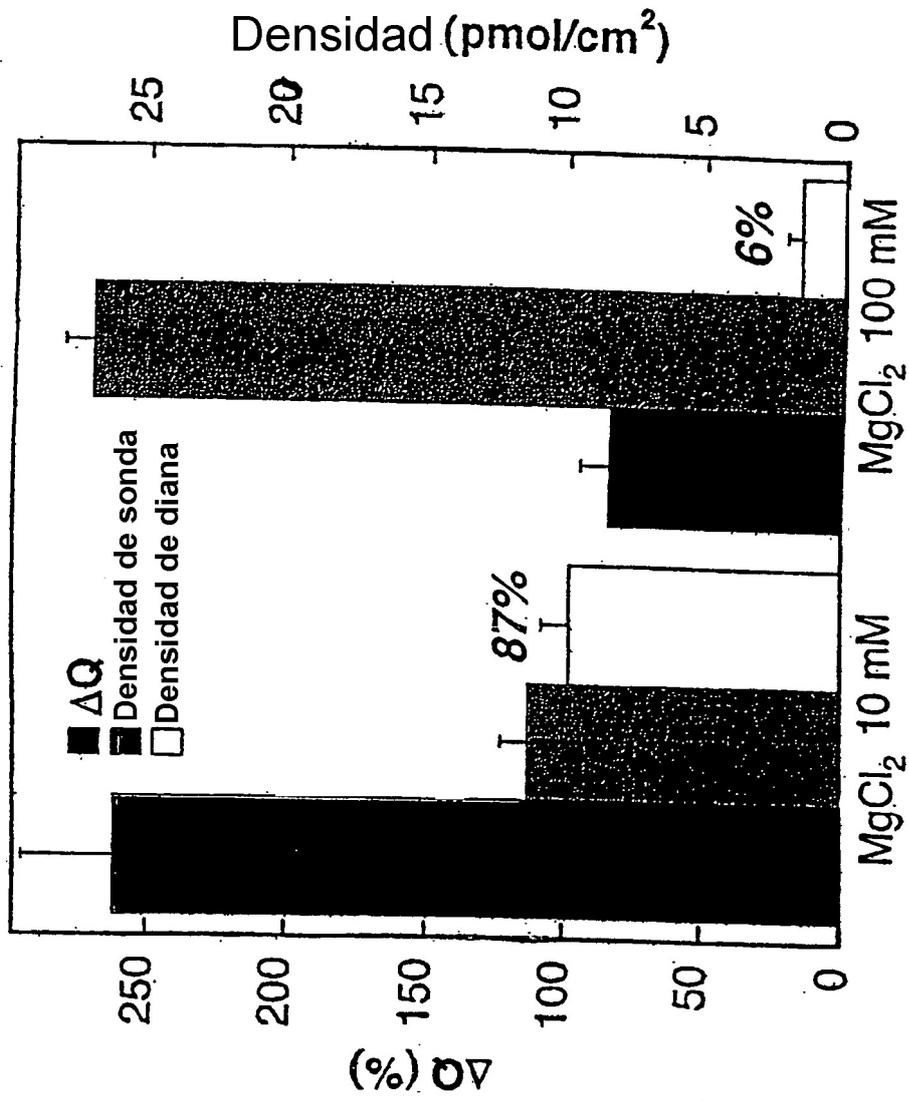
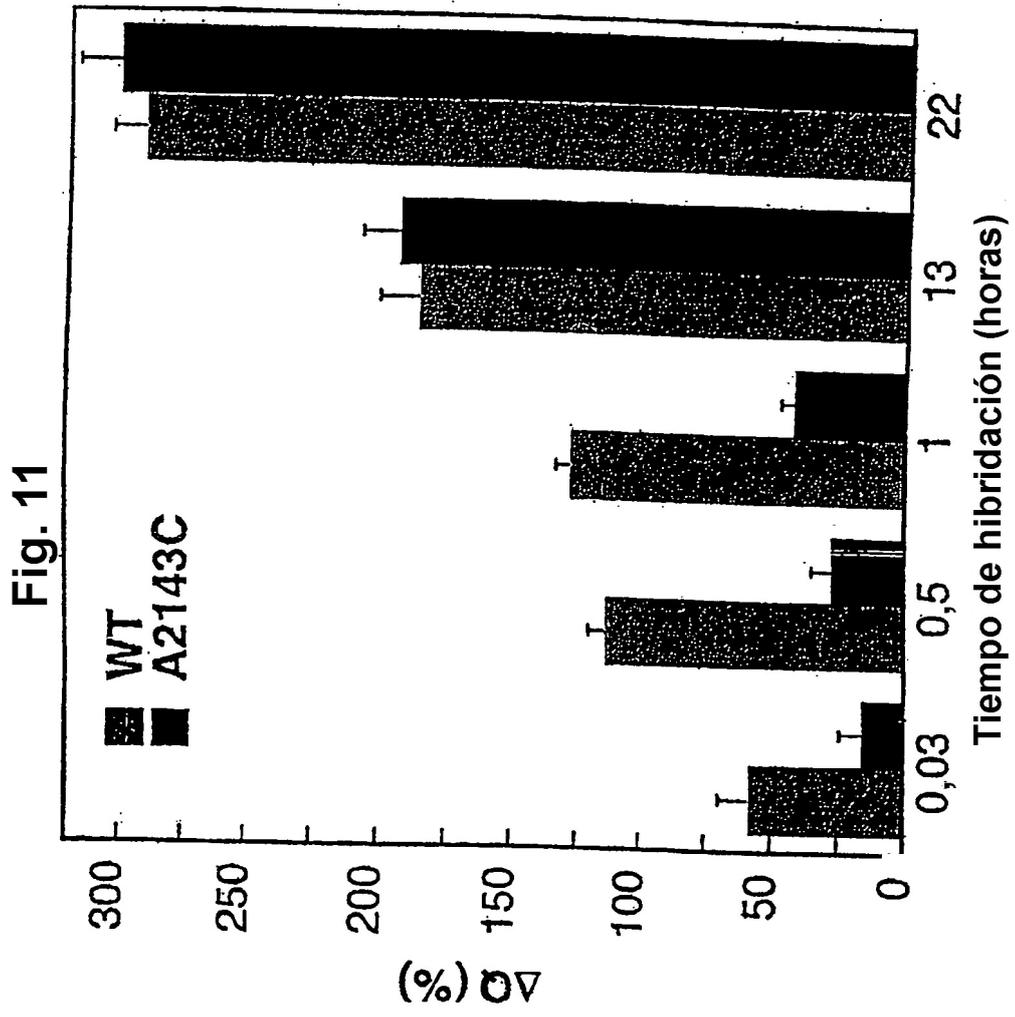


Fig. 10





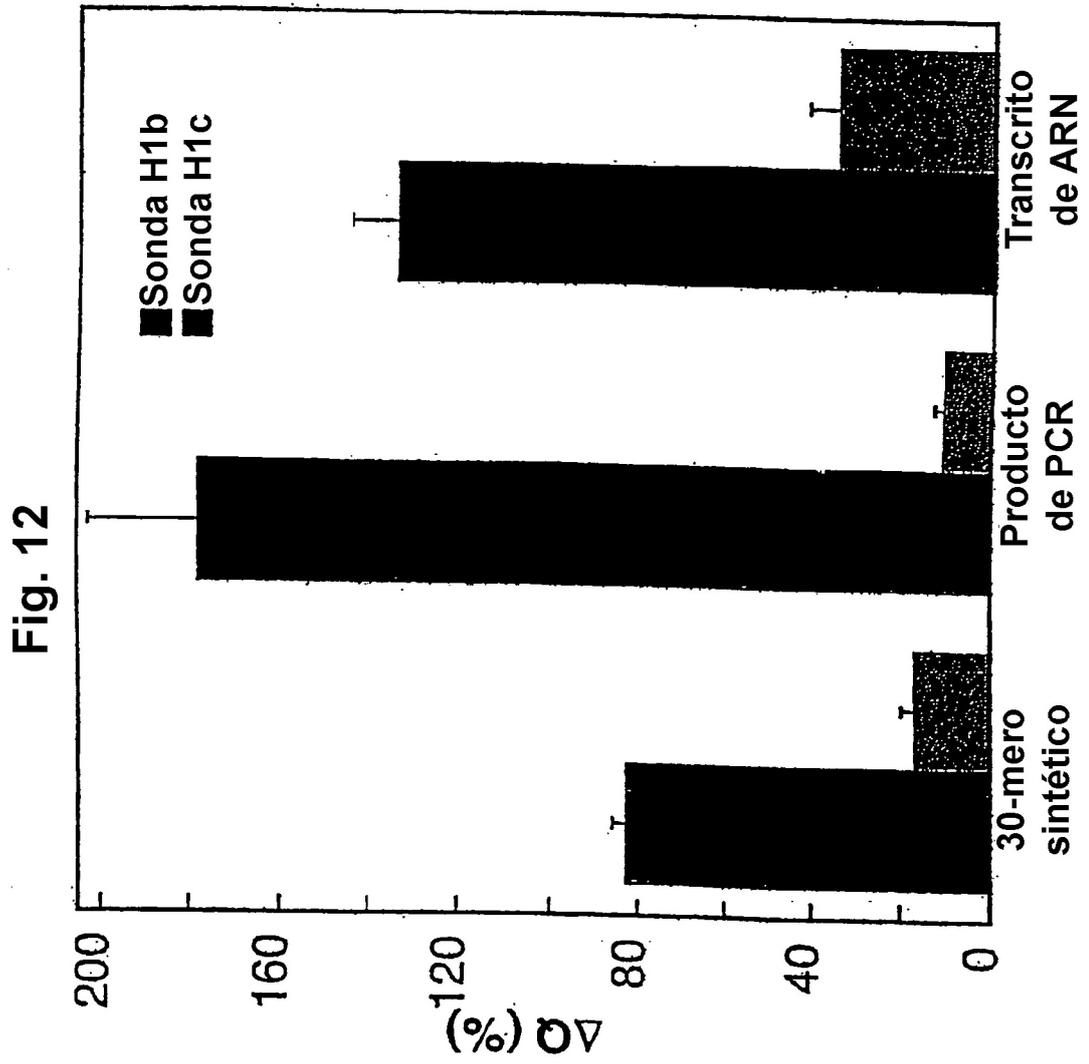


Fig. 13A

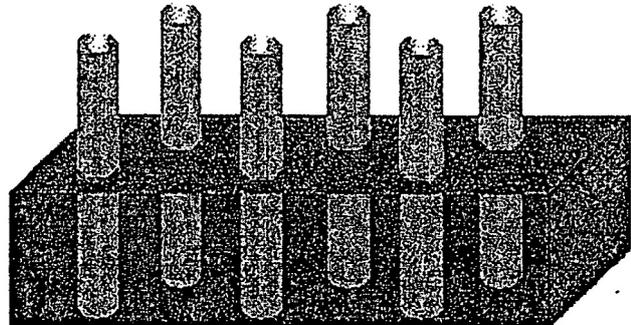
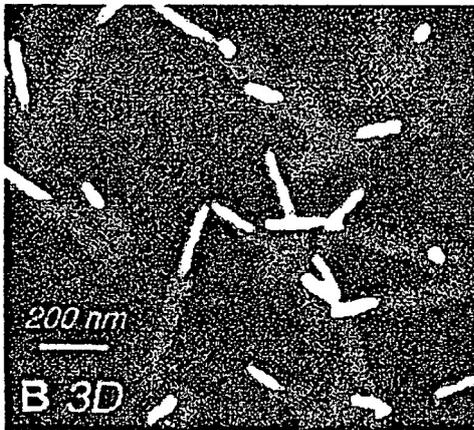
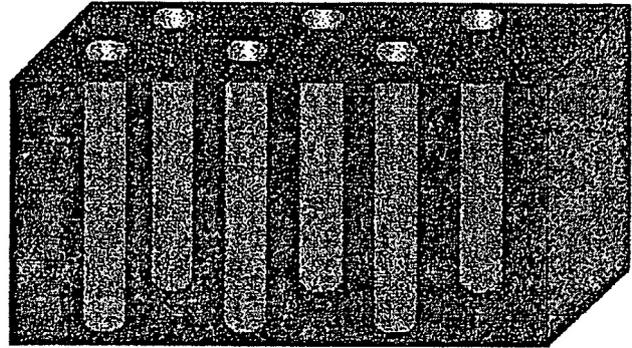
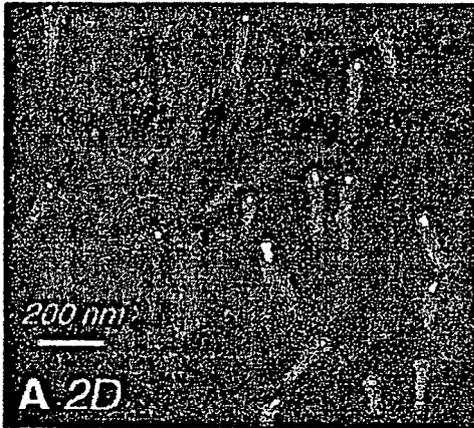
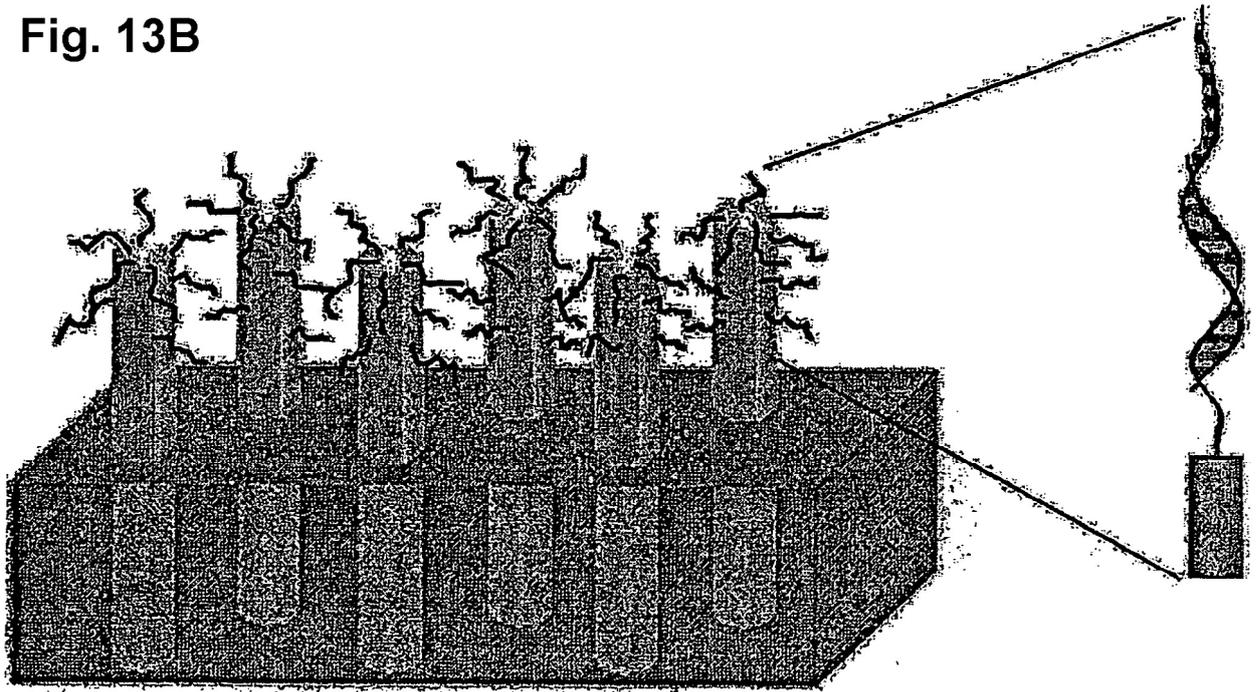


Fig. 13B



**Fig. 14**

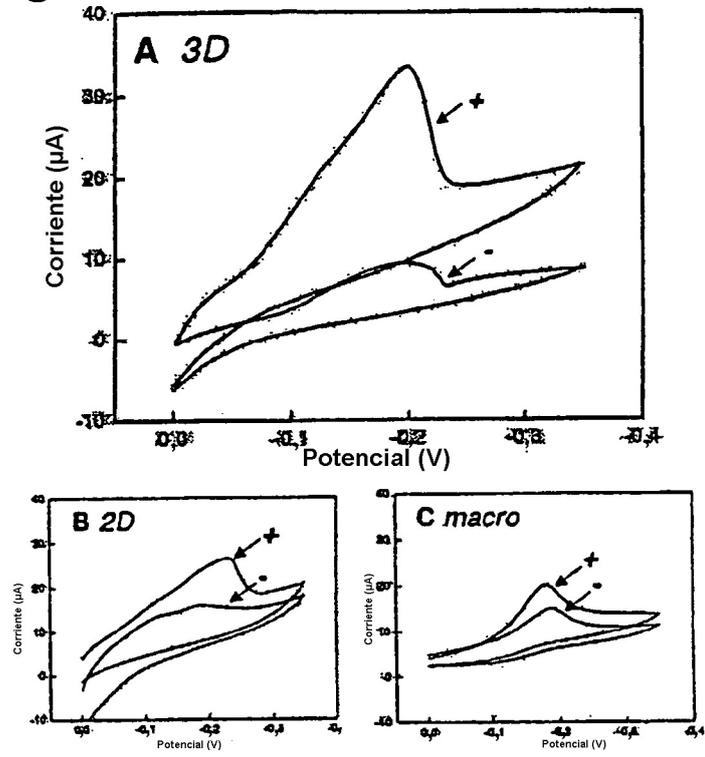


Fig. 15

