

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 007**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07075511 .1**
96 Fecha de presentación: **14.11.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **1921169**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54 Título: **Sonda de hibridación para la detección de ácido nucleico, tallos universales, métodos y kits**

30 Prioridad:
12.11.1993 US 152006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.08.2012

73 Titular/es:
**PHRI PROPERTIES, INC.
65 BERGEN STREET
NEWARK, NJ 07107-3001, US**

72 Inventor/es:
**Tyagi, Sanjay;
Kramer, Fred R. y
Lizardi, Paul M.**

74 Agente/Representante:
Rizzo, Sergio

ES 2 386 007 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

Sonda de hibridación para la detección de ácido nucleico, tallos universales, métodos y kits**Descripción**

5 [0001] La presente invención hace referencia al campo de los ensayos que incluye las sondas de hibridación de ácido nucleico. Los ensayos resultan útiles para la detección de genes específicos, segmentos génicos, moléculas de ARN u otros ácidos nucleicos. Tales ensayos se utilizan clínicamente para, por ejemplo, muestras de tejido, sangre y orina, así como en la investigación en tecnología alimentaria, agricultura y biología.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Las sondas de hibridación de ácido nucleico son utilizadas para detectar secuencias diana específicas en una mezcla compleja. Los ensayos de hibridación convencionales y heterogéneos, como los descritos en *Gillespie and Spiegelman* 15 (1965), normalmente comprenden las siguientes fases: inmovilización de al menos el ácido nucleico diana en papel, perlas o superficies de plástico, con o sin utilizar sondas de captura; adición de un exceso de sondas marcadas que son complementarias a la secuencia de la diana; hibridación; eliminación de las sondas no hibridadas; y detección de las sondas que continúan unidas a la diana inmovilizada.

20 [0003] Las sondas no hibridadas son eliminadas mediante el lavado a fondo de los híbridos. Ésta es normalmente la parte del procedimiento que más tiempo ocupa, y a menudo utiliza formatos complejos como hibridación en sándwich. El uso de superficies sólidas alarga el tiempo que tarda la hibridación al restringir la movilidad de la diana, o el acceso a la misma. La gran área que presentan las superficies sólidas 25 retiene no específicamente sondas no hibridadas, dando lugar a la señal de fondo. Además, las superficies sólidas pueden interferir con la señal de las sondas. El requisito de que los híbridos de la sonda-diana sean aislados excluye la detección *in vivo* y la detección concurrente de los ácidos nucleicos durante las reacciones de síntesis (detección en tiempo real).

30 [0004] Se conocen diversos esquemas de detección en fase de solución, a veces conocidos como ensayos homogéneos. Con "homogéneo" queremos decir ensayos que se llevan a cabo sin separar las sondas no hibridadas de los híbridos de la sonda-diana. Estos esquemas a menudo utilizan el hecho de que la fluorescencia de numerosas etiquetas fluorescentes puede verse afectada por el entorno químico 35 inmediato. Uno de estos esquemas está descrito por Heller et al. (1983) y también por Cardullo et al. (1988). Utiliza un par de sondas de oligodeoxinucleótido complementarias a regiones contiguas de una cadena de ADN diana. Una sonda

contiene un marcador fluorescente en su extremo 5' y la otra sonda contiene un marcador fluorescente diferente en su extremo 3'. Cuando las sondas son hibridadas con la secuencia diana, los dos marcadores se encuentran muy cerca uno de otro. Al estimular la muestra con una luz de una frecuencia apropiada, se produce una transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, en inglés) de un marcador al otro. Esta transferencia de energía produce un cambio medible en la respuesta espectral, señalando indirectamente la presencia de la diana. Estos marcadores a veces se conocen como pares de FRET. Sin embargo, las propiedades espectrales alteradas son sutiles, y los cambios son pequeños en relación con la señal de fondo. La monitorización exige instrumentos sofisticados, y, aun así, la sensibilidad se encuentra limitada. Además, la señal de hibridación es, en algunos casos, una señal negativa; es decir, la presencia de la diana da lugar a una reducción en la cantidad de fluorescencia medida a una longitud de onda determinada.

[0005] Esta técnica requiere que dos sondas no asociadas se unan simultáneamente a una secuencia diana de una sola cadena. La cinética de esta hibridación de tres moléculas es demasiado lenta como para que esta técnica sea adecuada para la detección en tiempo real. Las exigencias de que la diana sea de una sola cadena hace que la técnica no sea adecuada para la detección *in vivo* de ácidos nucleicos de doble cadena.

[0006] Otro esquema en fase de solución también utiliza un par sondas de oligodeoxinucleótido. Sin embargo, aquí las dos sondas son completamente complementarias tanto entre ellas como con las cadenas complementarias de un ADN diana (Morrison, 1987; Morrison, 1989; Morrison et al., 1989; Morrison and Stols, 1993). Cada sonda incluye fluoróforo conjugado a su extremo 3' y un extintor de fluorescencia conjugado a su extremo 5'.

[0007] Cuando las dos sondas de oligonucleótido están anilladas entre sí, el fluoróforo de cada sonda se encuentra próximo al extintor de fluorescencia de la otra sonda. Si el marcador fluorescente es entonces estimulado mediante una frecuencia adecuada de luz, la fluorescencia es desactivada por el extintor de fluorescencia. Sin embargo, cuando una sonda está unida a la diana, no se da el efecto de extinción de la sonda complementaria. Las sondas son lo suficientemente largas para no desactivarse a sí mismas cuando se unen a la diana.

[0008] En este tipo de ensayo, hay dos consideraciones del diseño opuestas. Es recomendable contar con una concentración alta de sondas para asegurar que la hibridación de las sondas con la diana sea rápida. También es recomendable contar con una concentración baja de sondas para que la señal de las sondas unidas a la diana no sea eclipsada por la señal de fondo de las sondas no hibridadas con la diana

o con otras sondas. La situación requiere esperar un periodo relativamente largo para que la fluorescencia de fondo disminuya antes de leer la señal fluorescente.

[0009] Los ensayos que siguen este esquema comienzan fundiendo una mezcla de sondas y muestra que puede contener secuencias diana. Después, se baja la temperatura, provocando la hibridación competitiva. Algunas sondas hibridarán con la diana, si la hay; algunas hibridarán con sondas complementarias; y algunas no hibridarán y crearán la señal de fondo. Se lleva a cabo un ensayo de control paralelo sin diana, obteniéndose sólo un nivel de fondo de fluorescencia. Si la muestra contiene suficiente diana, se obtiene un nivel detectablemente más alto de fluorescencia residual.

[0010] Con este esquema es necesario retrasar la lectura de la fluorescencia residual durante un periodo de tiempo considerable para permitir que casi todo el exceso de sondas se anile a sus complementarias. Se debe llevar a cabo también una reacción de control paralela. Además, se utiliza una baja concentración de sondas para reducir el fondo fluorescente. Así, la cinética es pobre y da lugar a un ensayo inherentemente lento. Esto excluye la detección en tiempo real. Estos problemas son particularmente serios para las dianas de dos cadenas. Las sondas, así como las dianas, tienen que fundirse, lo que hace que el ensayo no sea adecuado para su uso *in vivo*. Además, la señal no es sólo residual, es una señal diferencial, mediante la comparación con un control externo.

[0011] Se ha descrito otro esquema en fase de solución que utiliza el fenómeno conocido como desplazamiento de cadena descrito por Diamond et al., 1988, es decir, la patente estadounidense nº 4.766.062. Normalmente, estos ensayos implican un complejo de sonda de ácido nucleico bimolecular. Una cadena sencilla más corta que comprende un subconjunto de la secuencia diana se anilla a una sonda más larga de cadena sencilla que comprende la región completa de la sonda de unión a la diana. El complejo de sonda así descrito comprende partes de cadena sencilla y de doble cadena. Estas referencias sugerían que estos complejos de sonda podrían también comprender un marcador P^{32} unido a la cadena más corta o un fluoróforo y un extintor de fluorescencia que podrían situarse uno cerca del otro cuando se formara el compuesto de sonda.

[0012] Se afirma que en los ensayos que utilizan estos compuestos de sonda, la detección de la diana se logra mediante un proceso de dos fases. Primero, la parte de cadena sencilla del compuesto hibrida con la diana. Se describe que el reconocimiento de la diana sigue a continuación cuando, mediante el mecanismo de prolongación del apareamiento, el ácido nucleico diana desplaza la cadena más corta que lleva el marcador del compuesto de sonda. Se afirma que la cadena con el marcador se libera

en la solución, desde la que podrá ser aislada y detectada. En una configuración alternativa presentada como una sonda marcada con P³² para el procedimiento de captura, los dos ácidos nucleicos de cadena sencilla se unen en una sola molécula.

5 [0013] Estos compuestos de sonda con desplazamiento de cadena tienen inconvenientes. El mecanismo consta de dos fases, en las que el complejo de sonda debe primero unirse a la diana, y después debe ocurrir el desplazamiento de cadena, mediante prolongación del apareamiento, antes de que se reconozca la diana o se genere una señal. No se ha afirmado que los complejos de sonda bimoleculares se formen con gran eficacia, lo que da como resultado que en las preparaciones de sonda
10 la mayoría de las regiones de unión a la diana puedan no estar anilladas a una cadena marcada. Esto puede provocar la competición entre las regiones de unión a la diana marcadas o sin marcar por la misma secuencia de la diana. Aún más, puede haber problemas con la caída no específica de cadenas marcadas. Además, puede resultar necesario que la cadena marcada desplazada sea separada de los compuestos de
15 sonda no hibridados antes de que se pueda detectar la señal. Este requisito hace que dicho compuesto de sonda sea inadecuado para un ensayo homogéneo.

[0014] Las sondas de hibridación también han tenido otros usos además del de sondas de detección. La patente estadounidense nº 5.118.801 concedida a Lizardi et al. describe una sonda que contiene un interruptor molecular para la detección de una
20 secuencia diana de ácido nucleico poco común. La sonda tiene tres elementos esenciales: una secuencia de sonda de 20-60 nucleótidos rodeada de secuencias de interruptor de 10-40 nucleótidos que son complementarios entre ellos; el estado del interruptor es útil para generar de manera selectiva una señal detectable si la sonda hibridiza con la diana. Las secuencias de interruptor no están marcadas y la sonda no
25 emite señal cuando las secuencias de interruptor están abiertas. La interacción con la diana no es lo que genera la señal. Cuando están abiertas, las sondas de Lizardi et al. participan en una reacción de amplificación. Se detectan los amplicones, más que las dianas. Se deduce la presencia de la diana de la presencia de amplicones, los cuales, según Lizardi et al., pueden ser detectados por los medios convencionales de 1988.
30 Se ha afirmado que las sondas descritas en la patente estadounidense nº 5.118.801 se basan en la interacción con una tercera molécula para su funcionamiento mecánico, sin la cual se unen a la diana y se cierran.

[0015] Es un objetivo de la presente invención superar las limitaciones, mencionadas arriba, de los ensayos y las sondas de hibridación convencionales y de los ensayos y
35 sondas de hibridación homogéneas existentes.

[0016] Otro objeto de esta invención son las sondas de hibridación que generan una señal cuando se produce la hibridación con una secuencia de ácido nucleico diana

pero que muestran una señal leve o no generan señal alguna cuando no están hibridados, y los ensayos en los que se usan estas sondas.

[0017] Otros objetos de la presente invención son los kits que pueden usarse para obtener tales sondas de ácido nucleico específicas para las secuencias diana elegidas.

[0018] Otro objeto de esta invención son los ensayos homogéneos en los que se usan dichas sondas.

[0019] Otro objeto de esta invención son las sondas de hibridación y métodos rápidos en los que la detección se lleve a cabo de una manera rápida y sin retraso.

[0020] Otro objeto de la presente invención son las sondas de hibridación y los métodos que pueden detectar ácidos nucleicos *in vivo*.

[0021] Otro objeto de la presente invención son las sondas de hibridación y los métodos que pueden detectar ácidos nucleicos *in situ*.

[0022] Otro objeto de la presente invención son las sondas de hibridación y los métodos que pueden detectar secuencias diana de ácido nucleico en una amplificación de ácido nucleico y otras reacciones de síntesis en tiempo real.

[0023] Otro objeto de la presente invención son las sondas de hibridación y ensayos que permiten la detección de dianas de ácido nucleico sin el uso de un equipo caro.

[0024] Con el fin de comprender el potencial completo del proceso de hibridación en el sector del diagnóstico y la investigación, se necesita una técnica para observar la hibridación en soluciones con sondas que presentan poca señal, o ninguna por sí mismas, pero producen una señal detectable cuando están hibridadas con una diana. Preferentemente, la sonda debería permitir la observación del progreso de las reacciones que producen los ácidos nucleicos con la cinética bien lineal o bien exponencial. La sonda debería también permitir la detección de ácidos nucleicos *in vivo* (e *in situ*) sin la destrucción de tejido o células. Por supuesto, la sonda debería también ser útil en los ensayos de hibridación convencionales. Además, los ensayos deberían permitir una detección de dianas muy sensible directamente o conjuntamente con técnicas de amplificación. Preferentemente, la sonda debería también ser capaz de generar una señal de hibridación detectable a simple vista. Por último, las sondas deberían permitir la detección de distintas dianas en un solo ensayo. Los objetos de la presente invención son ensayos y sondas de hibridación de ácido nucleico que satisfagan todos o casi todos los requisitos mencionados.

Resumen de la invención

[0025] La invención incluye ensayos, kits y sondas de hibridación detectables de manera conformacional. También incluye tallos universales y kits que incluyen dichos tallos para realizar sondas. Por tanto, los siguientes párrafos describen:

1. Una sonda unitaria marcada para la detección de al menos una cadena de ácido nucleico que contenga una secuencia diana de ácido nucleico predeterminado en condiciones de ensayo preseleccionadas incluyendo la temperatura de detección, comprendiendo dicha sonda:

5 una secuencia de complemento de diana de cadena sencilla que tiene de 10 a 140 nucleótidos, que tiene un extremo terminal 5' y un extremo terminal 3', y que es complementaria a la secuencia de la diana;

10 un tallo dúplex de 3 a 25 nucleótidos de longitud que contiene una secuencia de brazo 5' adyacente a y unida de manera covalente a dicho terminal 5' y una secuencia de brazo 3' adyacente a y unida de manera covalente a dicho terminal 3', teniendo dicho dúplex una temperatura de fusión por encima de dicha temperatura de detección en las condiciones de ensayo preseleccionadas; y

15 al menos un par de marcadores, cada par comprende una primera parte de marcador conjugado a la sonda en la proximidad de dicha secuencia de brazo 5' y una segunda parte de marcador próxima a dicho primer marcador y conjugado a la sonda en la proximidad de dicha secuencia de brazo 3',

20 teniendo dicha sonda; en dichas condiciones de ensayo preseleccionadas en ausencia de dicha secuencia diana, una señal característica cuyo nivel se encuentra en función del grado de interacción de dichas primera y segunda partes marcadoras, teniendo dicha señal un primer nivel a 10 °C por debajo de dicha temperatura de fusión, un segundo nivel a 10 °C por encima de dicha temperatura de fusión y un tercer nivel a dicha temperatura de detección,

25 en el que, en las condiciones de ensayo preseleccionadas, a la temperatura de detección y en presencia de un exceso de dicha secuencia diana, la hibridación de la secuencia complemento diana a la secuencia diana altera el nivel de dicha señal característica de dicho tercer nivel hacia el segundo nivel en una

30 cantidad de al menos el diez por ciento de la diferencia entre el primer y el segundo nivel.

2. La sonda del párrafo 1, en la que dicha sonda unitaria es una sonda unimolecular.

35 3. La sonda del párrafo 1, en la que dicha sonda unitaria es una sonda bimolecular que consta de una primera molécula que contiene aproximadamente la mitad de dicha secuencia de complemento de diana incluyendo dicho extremo terminal 5', la secuencia de brazo 5' y la primera parte de marcador; y una

segunda molécula que contiene aproximadamente la mitad de la secuencia de complemento de diana que incluye dicho terminal 3', la secuencia de brazo 3' y la segunda parte de marcador.

4. La sonda del párrafo 1, en la que al menos un par de marcadores es un par de FRET.
- 5
5. La sonda del párrafo 1, en la que dicha temperatura de fusión es al menos de 5°C por encima de dicha temperatura de detección.
6. La sonda del párrafo 5, en la que al menos un par de marcadores es un par de FRET.
- 10
7. Una sonda unimolecular según el párrafo 6.
8. La sonda según el párrafo 6, en la que dichas secuencias de brazo 5' y 3' son inmediatamente adyacentes a dicha secuencia de complemento de diana.
9. Una sonda unimolecular según el párrafo 8.
10. La sonda del párrafo 6, en la que dicha primera y segunda parte marcadora
- 15
- están unidas de manera covalente a dicha sonda unitaria.
11. Una sonda unimolecular según el párrafo 10.
12. La sonda del párrafo 6, en la que dicha temperatura de fusión es de al menos 10 °C por encima de dicha temperatura de detección.
13. Una sonda unimolecular según el párrafo 12.
- 20
14. La sonda del párrafo 6, en la que el par de FRET son un activador y un extintor de la fluorescencia.
15. Una sonda unimolecular según el párrafo 14.
16. La sonda del párrafo 7, en la que dicho par de FRET es EDANS y DABCYL.
17. La sonda del párrafo 1, en la que dichas secuencias de brazo 5' y 3' están
- 25
- unidas de manera covalente y directa a dicha secuencia de complemento de diana.
18. Una sonda unimolecular según el párrafo 17.
19. La sonda del párrafo 1, en la que al menos una de dichas secuencias de brazo 5' y 3' es al menos parcialmente complementaria a la cadena de ácido nucleico que contiene la secuencia diana.
- 30
20. Una sonda unimolecular según el párrafo 19.
21. La sonda del párrafo 1, en la que cada una de dichas secuencias de brazo 5' y 3' comprende secuencias complementarias vecinas de al menos tres nucleótidos.
- 35
22. Una sonda unimolecular según el párrafo 21.
23. La sonda del párrafo 1, en la que las secuencias de sonda se seleccionan de entre el grupo compuesto por ADN, ARN y mezclas de ADN y ARN.

24. La sonda del párrafo 1, en la que dicha primera y segunda parte de marcador están unidas covalentemente a dicha sonda unitaria.
25. La sonda del párrafo 24, en la que dicha primera y segunda parte de marcador están unidas covalentemente a través de un espaciador de alquilo.
- 5 26. Una sonda unimolecular según el párrafo 25.
27. La sonda del párrafo 1 sujeta a una superficie sólida.
28. Una sonda unimolecular según el párrafo 27.
29. La sonda del párrafo 1, en la que dicha temperatura de fusión es al menos de 5°C por encima de dicha temperatura de detección, en la que dichas 10 secuencias de brazo 5' y 3' están unidas de manera covalente y directa a dicha secuencia de complemento de diana, en la que dicha primera y segunda parte marcadora están unidas covalentemente a dichas secuencias de brazo 5' y 3', y dicho al menos un par de marcadores son un activador y un extintor de fluorescencia.
- 15 30. Una sonda unimolecular según el párrafo 29.
31. La sonda del párrafo 29 sujeta a un soporte sólido.
32. Una sonda unimolecular según el párrafo 31.
33. La sonda del párrafo 29, en la que dicha secuencia de complemento de diana tiene de 20 a 60 nucleótidos.
- 20 34. Una sonda unimolecular según el párrafo 33.
35. La sonda del párrafo 34 sujeta a un soporte sólido.
36. Una sonda de hibridación unitaria para la detección de al menos un ácido nucleico diana que comprende una secuencia diana preseleccionada en un ensayo de hibridación de ácido nucleico preseleccionado, siendo capaz dicha 25 sonda de asumir una conformación cerrada y una conformación abierta, que comprenden:
- i. una secuencia de complemento de diana de 10 a aproximadamente 140 nucleótidos complementarios a dicha secuencia diana de ácido nucleico preseleccionada, teniendo un terminal 5' y un terminal 3',
 - 30 ii. un par de afinidad que comprende una primera fracción de afinidad unida covalentemente a dicho extremo terminal 5' y una segunda fracción de afinidad unida covalentemente a dicho extremo terminal 3', dicho par de afinidad interactúa lo suficiente como para mantener dicha sonda en la conformación cerrada en dicho ensayo preseleccionado en 35 la ausencia de dicha diana de ácido nucleico; y
 - iii. un par de marcadores que comprende una primera parte de marcador conjugada a dicha sonda próxima a dicha primera fracción de afinidad

- un primer oligonucleótido de 5 a 20 nucleótidos que tiene un primer grupo reactivo covalentemente en su extremo terminal 3' y tiene conjugado a él en una ubicación distinta de su terminal 3' al menos una primera parte de marcador de un primer par de marcadores, y
- 5 un segundo oligonucleótido, complementario a dicho primer oligonucleótido, de 5 a 20 nucleótidos que tiene un segundo grupo reactivo covalentemente en su extremo terminal 5' y que tiene conjugado a él en una ubicación distinta de su terminal 5' al menos una segunda parte de marcador de dicho primer par de marcadores,
- 10 encontrándose los marcadores próximos cuando dichos oligonucleótidos hibridan el uno con el otro,
- en el que, al menos una parte de marcador de dicho primer par de marcadores afecta a una característica físicamente medible del otro cuando dichos primer y segundo marcador se encuentran próximos el uno al otro hasta un punto
- 15 detectablemente diferente de cuando no se encuentran próximos el uno al otro.
50. El tallo universal del párrafo 49 en el que dicho primer y segundo oligonucleótidos son elegidos de entre un grupo compuesto por ADN, ARN y mezclas de ADN y ARN.
51. El tallo universal del párrafo 50, en el que dicho primer grupo reactivo covalentemente y dicho segundo grupo reactivo covalentemente son elegidos
- 20 cada uno de entre el grupo compuesto por hidroxilo, fosfato, sulfhidrilo, amino, alquil fosfato, alquilamino e hidroxil alquilo.
52. El tallo universal del párrafo 49, en el que cada uno de dichos primer y segundo oligonucleótidos incluyen secuencias complementarias vecinas de al
- 25 menos tres nucleótidos.
53. El tallo universal del párrafo 49, en el que dicho primer par de marcadores es un par de FRET.
54. El tallo universal del párrafo 49, en el que dichos primer y segundo oligonucleótidos hibridan uno con el otro dando lugar a un saliente ligable en el
- 30 que uno de dicho extremo 5' y dicho extremo 3' se extiende más allá del otro al menos dos nucleótidos.
55. El tallo universal del párrafo 54 en el que dicho primer par de marcadores es un par de FRET.
56. El tallo universal del párrafo 49 en el que dichos primer y segundo oligonucleótidos se guardan por separado en un par de recipientes.
- 35 57. El tallo universal del párrafo 49 en el que uno de dichos primer y segundo oligonucleótidos se encuentra sujeto a una superficie sólida.

58. Un kit para utilizar un tallo universal para construir al menos una sonda según el modo de realización 1 que comprende:
un tallo universal según el párrafo 49, e información suficiente para la unión covalente a dicho tallo de una secuencia de complemento de diana según el párrafo 1.
59. El kit del párrafo 58, en el que el primer par de marcadores de dicho tallo universal es un par de FRET.
60. El kit del párrafo 58, en el que el primer y el segundo oligonucleótido de dicho tallo universal son envasados por separado.
61. El kit del párrafo 60, en el que dicha información es suficiente para unir covalentemente al primer oligonucleótido una primera cadena de ácido nucleico que contenga aproximadamente la mitad de la secuencia de complemento de diana según el modo de realización 1, incluyendo el extremo terminal 3', y para unir covalentemente al segundo oligonucleótido una segunda cadena de ácido nucleico que contenga aproximadamente la mitad de dicha secuencia de complemento de diana, incluyendo su extremo terminal 5'.
62. El kit del párrafo 61 en el que uno de dichos primer y segundo oligonucleótidos está sujeto a una superficie sólida.
63. El kit del párrafo 58 en el que el primer y el segundo oligonucleótidos de dicho tallo hibridan el uno con el otro dando lugar a un saliente ligable en el que uno de dichos terminales 5' y 3' se extiende más allá del otro al menos dos nucleótidos, y en el que dicha información es suficiente para ligar a dicho tallo una cadena sencilla auto-hibridante que es complementaria a dicho saliente e incluye una secuencia de complemento de diana según el párrafo 1.
64. Un kit según el párrafo 63 que contiene al menos dos tallos con diferente temperatura de fusión bajo las condiciones de ensayo preseleccionadas.
65. El kit del párrafo 64, en el que dichos tallos tienen un primer y segundo oligonucleótido común.
66. El kit del párrafo 63 en el que el primer par de marcadores de dicho tallo universal es un par de FRET.
67. El kit del párrafo 63, en el que cada uno de dichos primer y segundo oligonucleótidos de dicho tallo incluyen secuencias complementarias vecinas de al menos tres nucleótidos.
68. El kit del párrafo 63, en el que uno de dichos primer y segundo oligonucleótidos está sujeto a una superficie sólida.
69. Un ensayo para detectar al menos una cadena de ácido nucleico que contiene una secuencia diana preseleccionada bajo condiciones de ensayo

preseleccionadas, incluyendo una temperatura de detección, comprendiendo los siguientes pasos:

añadir a una muestra una sonda unitaria según el párrafo 1 en dichas condiciones de ensayo preseleccionadas, y

5 determinar cualquier cambio en el nivel de dicha señal característica a dicha temperatura de detección.

70. El ensayo del párrafo 69, en el que dicho paso de determinación comprende la medición.

71. Un ensayo en tiempo real según el párrafo 70.

10 72. Un ensayo en tiempo real según el párrafo 69.

73. El ensayo del párrafo 70, en el que dicho paso de determinación comprende la medición en función del tiempo.

15 74. El ensayo del párrafo 70 que además comprende el paso de añadir a un control sin diana la sonda del modo de realización 1 en las condiciones de ensayo preseleccionadas y medir cualquier cambio en dicho nivel para dicho control, en el que dicho paso de determinación incluye calcular la diferencia entre el cambio en el nivel para dicho control y el cambio en el nivel para dicha muestra.

20 75. El ensayo del párrafo 69 que además comprende el paso de añadir a un control sin diana la sonda del modo de realización 1.

76. El ensayo del párrafo 69, en el que dicha sonda es una sonda bimolecular según el modo de realización 3, y el ensayo se lleva a cabo en su totalidad por debajo de la temperatura de fusión de dicha sonda.

25 77. El ensayo del párrafo 69, en el que la temperatura de fusión de dicha sonda es de al menos 5 °C por encima de dicha temperatura de detección, en el que dichas secuencias de brazo 5' y 3' se unen covalentemente y directamente a dicha secuencia de complemento de diana, en el que dichos primer y segundo marcadores se unen covalentemente a dicha secuencia de brazo 5' y 3', y dicho al menos un par de marcadores son un activador y un extintor de la fluorescencia.

30 78. Un ensayo en tiempo real según el párrafo 77.

79. El ensayo del párrafo 77, en el que dicha sonda es una sonda bimolecular según el modo de realización 3, y el ensayo se lleva a cabo en su totalidad por debajo de la temperatura de fusión de dicha sonda.

35 80. El ensayo del párrafo 69, en el que el paso de la determinación es cuantitativo.

81. El ensayo del párrafo 69, en el que dicha sonda es una sonda unimolecular.

82. El ensayo del párrafo 81, en el que el paso de la determinación es cuantitativo.

83. Un ensayo según el párrafo 81 que comprende además el paso de añadir a un control sin diana dicha sonda unimolecular según el párrafo 2.
84. El ensayo del párrafo 81, en el que la temperatura de fusión de dicha sonda es de al menos 5 °C por encima de la temperatura de detección, en el que dichas secuencias de brazo 5' y 3' se unen covalentemente y directamente a dicha secuencia de complemento de diana, en el que dicha primera y segunda parte de marcador se unen covalentemente a dichas secuencias de brazo 5' y 3', y dicho al menos un par de marcadores son un activador y un extintor de la fluorescencia.
85. El ensayo del párrafo 81, en el que dicha secuencia diana de ácido nucleico es un producto de una reacción de amplificación, y en el que dicho paso de añadir dicha sonda a una muestra precede a la finalización de dicha reacción de amplificación.
86. Un ensayo según el párrafo 85, que además comprende el paso de añadir dicha sonda a un control negativo, paso que precede a la finalización de dicha reacción de amplificación en dicho control negativo.
87. Un ensayo en tiempo real según el párrafo 86.
88. El ensayo del párrafo 87, en el que dicho paso de determinación incluye el cálculo de la diferencia entre el cambio en el nivel para dicho control y el cambio en el nivel para dicha muestra.
89. El ensayo del párrafo 85, en el que dicho paso de determinación incluye la medición repetida a lo largo del tiempo durante dicha reacción de amplificación.
90. El ensayo del párrafo 89, en el que la temperatura de fusión de dicha sonda es de al menos 5 °C por encima de la temperatura de detección, en el que dichas secuencias de brazo 5' y 3' se unen covalentemente y directamente a dicha secuencia de complemento de diana, en el que dichas primera y segunda parte de marcador se unen covalentemente a dichas secuencias de brazo 5' y 3', y dicho al menos un par de marcadores son un activador y un extintor de la fluorescencia.
91. El ensayo del párrafo 85, en el que dicha reacción de amplificación es una amplificación de un indicador de ARN por ARN polimerasa.
92. El ensayo del párrafo 85 en el que dicha reacción de amplificación es una reacción PCR.
93. El ensayo del párrafo 85 en el que dicha reacción de amplificación es una reacción SDA.
94. El ensayo del párrafo 85 en el que dicho par de marcadores es un par de FRET.

95. El ensayo del párrafo 69 en el que dicha sonda, según el modo de realización 1, está sujeta a una superficie sólida.
96. El ensayo del párrafo 95 que incluye al menos una sonda sujeta adicional según esta invención que tenga una secuencia de complemento de diana diferente y esté unida a la misma superficie de soporte en una determinada ubicación.
97. Un ensayo para detectar al menos una diana de ácido nucleico que contenga una secuencia diana preseleccionada que comprende los siguientes pasos:
añadir a una muestra una sonda unitaria según el párrafo 36 en dichas condiciones de ensayo preseleccionadas, y
determinar cualquier cambio en el nivel de dicha característica medible.
98. El ensayo del párrafo 97 en el que dicho paso de determinación comprende la medición.
99. El ensayo del párrafo 98 en el que dicha medición comprende comparar visualmente con un estándar.
100. El ensayo del párrafo 97 en el que dicha diana de ácido nucleico es producto de una reacción de amplificación, y en el que dicha sonda es unimolecular.
101. El ensayo del párrafo 100 en el que dicho paso de añadir dicha sonda precede a la finalización de dicha reacción de amplificación.
102. Un kit para realizar el ensayo del párrafo 69 que comprende una sonda según el modo de realización 1 e instrucciones para llevar a cabo el ensayo.
103. El kit del párrafo 102 que además incluye uno o más reactivos elegidos del grupo compuesto por sales, tampones, inhibidores de la nucleasa, enzimas de restricción y desnaturalizantes.
104. Un kit de amplificación según el párrafo 102 que incluye uno o más componentes elegidos del grupo compuesto por cebadores, nucleótidos, polimerasas y polimerasas-molde.
105. El kit de amplificación del párrafo 102 en el que la sonda es unimolecular.
106. Un kit de ensayo de colorante vital según el párrafo 102 que incluye uno o más componentes elegidos del grupo compuesto por agentes permeabilizantes, precursores de liposomas y contracolorantes.
107. Un kit de ensayo *in situ* según el párrafo 102 que incluye uno o más componentes elegidos del grupo compuesto por fijadores, agentes deshidratantes, proteasas y detergentes.
108. El kit de campo del párrafo 102 en el que dicha sonda es una sonda sujeta.

109. Un kit según el párrafo 108 que incluye al menos una sonda sujeta adicional según esta invención que tiene una secuencia de complemento de diana diferente y unida a la misma superficie de apoyo en un punto predeterminado.

5 110. Un kit según el párrafo 108 que incluye una sonda de control positivo según la presente invención.

111. Un kit según el párrafo 108 en el que dicha sonda es unimolecular.

[0026] Las sondas según esta invención son “unitarias”, con lo que queremos decir bien sondas bimoleculares unidas como una pareja y operables en un ensayo como unidas, o bien cadenas sencillas unimoleculares. Éstas comprenden al menos: una secuencia de ácido nucleico monocatenaria que es complementaria al ácido nucleico diana deseado, aquí denominado “secuencia de complemento de diana”; regiones 5’ y 3’ que flanquean la secuencia de complemento de diana que interactúan de manera reversible mediante secuencias de ácido nucleico complementario o miembros adjuntos de otro par de afinidad; y un grupo de marcadores interactivos para generar una señal. Las sondas preferidas de la presente invención incluyen secuencias de ácido nucleico complementarias, o “brazos”, que interactúan de manera reversible mediante hibridación la una con la otra en las condiciones de detección cuando la secuencia de complemento de diana no está unida a la diana. Cuando la sonda unitaria es unimolecular, todos los componentes anteriores se encuentran en una molécula. Cuando la sonda unitaria es bimolecular, en cada molécula se encuentra media, o aproximadamente media secuencia de complemento de diana, un miembro del par de afinidad y un miembro del par de marcadores.

25 **[0027]** Las partes de marcadores generadores de señal son “pares” ajustados de tal manera que al menos una parte de marcador puede alterar al menos una característica físicamente medible de otra parte de marcador cuando se encuentran a escasa distancia pero no cuando están separadas lo suficiente. Las partes de marcadores se hayan conjugadas a la sonda de manera que la proximidad entre marcadores se regula mediante el estado de la interacción del par de afinidad. En ausencia de la diana, las partes de marcadores se mantienen cerca unas de otras mediante la interacción de unión del par de afinidad. Denominamos esta conformación como estado “cerrado”. Cuando no se genera la señal detectable que indica la diana en el estado cerrado, cosa que sucede en la mayoría de los modos de realización, 35 decimos que el estado cerrado es el estado “apagado”.

[0028] Cuando la secuencia de complemento de diana hibrida con su diana, tiene lugar un cambio conformacional en la sonda unitaria, separando el par de afinidad y,

como consecuencia, las partes de marcadores. Denominamos esta conformación como el estado “abierto”, que en la mayoría de los modos de realización es el estado “encendido”. La separación es causada por la termodinámica de la formación de la hélice de la secuencia de complemento de diana y la secuencia diana.

5 La formación de la hélice de la secuencia de complemento de diana y la secuencia diana, tanto completa como fragmentada, reduce la atracción del par de afinidad en las condiciones del ensayo. Se genera una señal porque la separación del par de afinidad altera la interacción de las partes de marcadores y uno puede medir desde ese momento una diferencia en al menos una característica de al menos una parte de
10 marcador conjugada a la sonda. Un aspecto importante de las sondas de la presente invención es que no cambian a la conformación abierta cuando están unidas de manera no específica.

[0029] Las sondas según esta invención tiene una característica medible, que denominamos a veces “señal”, que difiere dependiendo de si la sonda se encuentra
15 abierta o cerrada. La característica medible se haya en función de la interacción de las partes de marcadores y el grado de interacción entre tales partes de marcadores varía en función de su separación. Como se ha afirmado, las sondas unitarias de la presente invención tienen una conformación cerrada y una conformación abierta. Las partes de marcadores se encuentran más separadas en la conformación abierta que en la
20 cerrada, y esta diferencia es suficiente para producir un cambio detectable en al menos una característica medible. En la conformación cerrada, las partes de marcadores se encuentran “próximas” entre sí, es decir, están lo suficientemente cerca como para interactuar de manera que la característica medible difiera en la cantidad, calidad o nivel detectable de la conformación abierta, cuando no interactúan de esta
25 manera. Por supuesto, es recomendable que la diferencia sea lo más grande posible. En algunos casos es recomendable que en el estado “apagado” la característica medible sea una señal tan próxima a cero como sea posible.

[0030] La característica medible puede ser una señal de luz característica que resulte de la estimulación de al menos un miembro de un par de transferencia de energía de
30 resonancia fluorescente (FRET). Puede ser un cambio de color como resultado de la acción de un par supresor de enzimas o un par cofactor de enzimas en un sustrato para formar un producto detectable. En todos estos casos, decimos que las sondas tienen una señal característica cuyo nivel depende de si las partes de marcadores se encuentran próximas entre sí debido a que las sondas están en la posición cerrada o
35 están separadas debido a que las sondas están en la posición abierta.

[0031] Como se ha afirmado, la sonda puede generar una señal detectable tanto en la conformación abierta como en la cerrada. La elección de marcadores dicta en qué

estado se genera una señal o que se generen diferentes señales en cada estado. Nuestros marcadores interactivos preferidos son un par de fluoróforo/extintor, preferentemente conjugados covalentemente a la sonda, más preferentemente a las partes del brazo que no son complementarias a la diana. De este modo, nuestras sondas más preferidas generan una señal fluorescente positiva de una determinada longitud de onda cuando están unidas a la diana en el estado abierto y son estimuladas con una fuente de luz apropiada. Cuando nos referimos a estas sondas también nos referimos a esta conformación como el estado “encendido”.

[0032] Se describen aquí “tallos universales” y kits que contienen los mismos. Un tallo universal según esta invención puede usarse para construir sondas según esta invención para la detección de una u otra secuencia diana ligando o uniendo covalentemente al tallo universal un oligonucleótido o oligonucleótidos que contengan una secuencia complementaria a la secuencia diana deseada.

[0033] La invención también comprende métodos de ensayo que utilizan al menos una sonda unitaria según la presente invención. Los ensayos de esta invención pueden usarse para dianas que sean de una sola cadena o de dos cadenas. Sin embargo, para los ensayos que incluyan un paso o pasos que puedan separar el par de afinidad de manera independiente a la diana, sólo serán adecuadas las sondas unimoleculares. Los ensayos de la presente invención pueden llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos pueden llevarse a cabo *in situ* en tejidos vivos o fijados sin destrucción del tejido. Los ensayos preferidos de la presente invención no requieren separación o lavado para eliminar las sondas no unidas, aunque el lavado puede mejorar el rendimiento. Nuestros ensayos más preferidos son ensayos homogéneos.

[0034] Los ensayos según la presente invención comprenden al menos añadir al menos una sonda unitaria según esta invención a una muestra que pueda contener cadenas de ácido nucléico que contengan la secuencia diana, en condiciones de ensayo apropiadas para la sonda, y determinando si hay un cambio en la característica medible de la sonda en comparación con la característica en las mismas condiciones en ausencia de la secuencia diana. Los ensayos pueden ser cualitativos o cuantitativos. En algunos modos de realización, puede ser deseable realizar un control que no contenga diana y comparar la respuesta de la muestra con la respuesta del control. El nivel de la señal puede medirse para determinaciones cuantitativas. Un cambio puede detectarse simplemente para ensayos cualitativos. Cuando se usa un control, puede calcularse la diferencia en el cambio de señal entre la muestra y el control.

[0035] Los ensayos según la presente invención pueden incluir poner en contacto al menos una sonda unimolecular de la invención con reacciones de amplificación u otras

reacciones de síntesis de ácido nucléico, por ejemplo: reacciones en cadena de polimerasa, PCR, (Erlich et al., 1991); reacciones de amplificación mediadas por replicasa Q-beta, (Lomeli et al., 1989); reacciones de amplificación por desplazamiento de hebra (Walker et al., 1992); replicación automantenida de secuencia, 3SR, (Guatelli et al., 1990); y reacciones de transcripción y replicación. Las sondas bimoleculares, como se ha afirmado arriba, no son adecuadas para su uso en cualquier reacción, p.ej., PCR, en la que el par de afinidad se separaría de manera independiente a la diana; pero pueden usarse en otras reacciones, p.ej., la transcripción. Sin embargo, en dichas reacciones preferimos sondas unimoleculares. Estos ensayos pueden ser cualitativos o cuantitativos. Pueden detectar diana sintetizada en tiempo real. Por supuesto, pueden utilizarse tanto sondas unimoleculares como sondas bimoleculares de la invención en ensayos de reacciones completadas.

[0036] Esta invención también proporciona un medio para localizar y asilar diana amplificada. Por ejemplo, utilizando una sonda preferida que contiene un par de marcadores de fluoróforo/extintor, se pueden identificar productos de PCR, cuantificarlos y, de manera opcional, aislarlos tras la electroforesis en un gel mediante la estimulación de la sonda hibridada en el gel, indicando cualquier señal resultante la presencia, cantidad e ubicación de la diana. Del mismo modo, la invención facilita un medio para identificar y, de manera opcional, aislar cualquier ácido nucléico deseado de una mezcla de ácidos nucléicos que es separada mediante medios físicos, como cromatografía o electroforesis.

[0037] Se describen aquí kits de reactivos y macromoléculas para llevar a cabo los ensayos según la presente invención.

[0038] En esta descripción nos referimos a veces a “sonda”, “diana”, “oligonucleótido”, “ácido nucléico”, “cadena” y otros términos en singular. Los profesionales del sector entienden que muchos términos utilizados para describir moléculas pueden usarse en singular y referirse tanto a una sola molécula como a numerosas moléculas. Por ejemplo, aunque una secuencia diana pueda ser detectada por una sonda en un ensayo (y de hecho cada sonda individual interactúa con una secuencia diana individual), los ensayos exigen numerosas copias de la diana. En estos casos, los términos deben entenderse en su contexto. Tales términos no deben quedar limitados a significar bien una sola molécula o bien múltiples moléculas.

Breve descripción de los dibujos

[0039]

La FIG. 1 es una representación esquemática de una sonda bimolecular preferida según la invención en la conformación “cerrada”.

La FIG. 2 es una representación esquemática de la sonda de la FIG. 1 en la conformación “abierta”.

La FIG. 3 es una representación esquemática de la sonda del Ejemplo I, nuestra sonda unimolecular preferida.

5 La FIG. 4 es una representación esquemática del uso de un tallo universal como en el Ejemplo II.

La FIG. 5 es una representación esquemática de la sonda unimolecular del Ejemplo III.

10 La FIG. 6 representa las curvas de desnaturalización térmica de las sondas del Ejemplo I y III.

La FIG. 7 es una fotografía que ilustra los resultados del Ejemplo V.

La FIG. 8 es un gráfico de la cinética de hibridación de las sondas del Ejemplo V.

15 La FIG. 9 es una representación esquemática de la sonda unimolecular con secuencias de horquilla en los brazos, unida a la secuencia diana.

La FIG. 10 es una representación esquemática de una sonda unimolecular fijada o sujeta según la invención.

Descripción detallada de la invención

20 **[0040]** Las sondas de hibridación de la invención se pueden fabricar a partir de ADN, ARN o de alguna combinación de ambos. Las sondas pueden incluir nucleótidos modificados. Las conexiones entre nucleótidos en las sondas pueden incluir enlaces diferentes de los enlaces fosfodiéster. La FIG. 1 muestra de manera esquemática una versión bimolecular de la sonda unitaria 1. La sonda 1 incluye una secuencia de
25 complemento de diana monocatenaria 2 que tiene un extremo terminal 5' y un extremo terminal 3', que en la sonda bimolecular 1 incluye la secuencia 2a y la secuencia 2b, que juntas son complementarias a la secuencia diana preseleccionada contenida en una cadena diana de ácido nucléico. La sonda 1 puede considerarse como una cadena sencilla, la versión unimolecular, en la que una secuencia 2 de complemento
30 de diana sencilla es cortada por su punto medio aproximadamente. La siguiente descripción describe la sonda 1 considerada de tal modo, es decir, como la versión unimolecular, por conveniencia. De este modo, la descripción se dirige a tanto las versiones unimoleculares como a las bimoleculares.

35 **[0041]** Desde la secuencia 2, y unida a la misma, se encuentra un par de afinidad, representado aquí como los brazos de oligonucleótidos 3, 4. El par de afinidad interactúa de manera reversible con suficiente fuerza como para mantener la sonda en el estado cerrado en las condiciones de detección en ausencia de secuencia diana,

pero con la suficiente debilidad para favorecer la hibridación de la secuencia de complemento de diana y su secuencia diana de manera termodinámica durante la interacción del par de afinidad. Este equilibrio permite que la sonda experimente un cambio en su conformación del estado cerrado al estado abierto. Además, el par de

5 afinidad debe separarse sólo cuando la sonda se una a la diana y no cuando la sonda se una de manera no específica.

[0042] El mecanismo por el que la sonda cambia de la conformación cerrada a la abierta se describirá para el modo de realización en el que el par de afinidad son brazos de oligonucleótidos complementarios, pero se deducirá la generalización a

10 otros pares de afinidad. En relación con la FIG. 1, los brazos 3, 4 se eligen de manera que en las condiciones de ensayo preseleccionadas, que incluyen la temperatura de detección, hibridan uno con el otro, formando un tallo dúplex 5, al que nos referimos a veces como tallo de brazos. En ausencia de diana, la asociación de los brazos 3, 4 se favorece de manera termodinámica y se mantiene el tallo dúplex 5, manteniendo a la

15 sonda 1 en la conformación cerrada mostrada en la FIG. 1. En la FIG. 2, la secuencia de complemento de diana 2 (que comprende las secuencias 2a y 2b) es hibridada a la secuencia diana 8 del ácido nucleico diana 9. Esa hibridación forma una hélice doble relativamente rígida de una longitud adecuada. La versión bimolecular mostrada en la FIG. 2 es una hélice rota. En las sondas de esta invención, la formación de una hélice

20 por la interacción de la secuencia de complemento de diana y la secuencia diana se favorece de forma termodinámica en las condiciones de ensayo a una temperatura de detección y provoca la separación de los brazos 3, 4, lo que tiene como resultado la disolución del tallo dúplex 5 y el mantenimiento de la conformación abierta mostrada en la FIG. 2. Las regiones de brazo 3 y 4 no interactúan la una con la otra para formar

25 el tallo dúplex cuando la secuencia de complemento de diana 2 está hibridada a la secuencia diana 8. Puesto que la interacción de la secuencia de complemento de diana 2 con la secuencia diana 8 produce la separación de los brazos 3 y 4, nos referimos a veces a este mecanismo como un “salto”. El cambio de la conformación cerrada a la conformación abierta que se produce cuando la secuencia de

30 complemento de diana hibrida con la secuencia diana puede producirse a pesar de la presencia de una mella o la presencia de uno o más nucleótidos mal emparejados. Cabe destacar que la unión no específica de la sonda no disminuye la asociación de los brazos de este modo. Esta característica da lugar a una señal de fondo muy baja de sondas “abiertas” de manera poco adecuada.

[0043] El par de afinidad ilustrado en el modo de realización preferido de las FIG. 1 y 2 es un par de secuencias de ácido nucleico complementarias. Los brazos 3, 4 se eligen de manera que el tallo dúplex 5 (FIG. 1) sea un híbrido más pequeño que el híbrido de

la secuencia de complemento de diana 2 y la secuencia diana 8 (FIG. 2). En la versión bimolecular, el tallo dúplex 5 debe ser más pequeño que cada parte de la hélice rota que incluye 2a y 2b. Si se cumple esta limitación, afirmamos que cada uno de 2a y 2b contienen “aproximadamente la mitad” de la secuencia de complemento de diana 2. Los pares de afinidad adecuados pueden ser conjugados a la secuencia de complemento de diana mediante los métodos conocidos en la técnica. Nosotros preferimos que el par de afinidad se una de manera covalente y directa a la secuencia de complemento de diana.

[0044] Una sonda unitaria según la presente invención cuenta con una característica medible, que a veces llamamos señal característica o simplemente la señal, debido al par de marcadores. La sonda 1 incluye las fracciones de marcadores 6, 7 conjugadas a y formando parte de la sonda 1 en el extremo 5' y 3', respectivamente, del tallo dúplex 5. Las partes de marcadores 6, 7 están situadas de manera que su proximidad, y por lo tanto su interacción la una con la otra, sea alterada por la interacción de los brazos 3, 4. Los marcadores 6, 7 pueden conjugarse en otro sitio a los brazos 3, 4 o a la secuencia 2 cerca de su enlace con el tallo 5, es decir, cerca de los brazos 3, 4. Algunos marcadores interactuarán en un grado detectablemente superior cuando se conjuguen internamente a lo largo de los brazos. Esto se debe a que no se verán afectados por la desintegración de los extremos.

[0045] Se puede usar más de un par de fracciones de marcadores. Además, no es necesaria una correspondencia molecular de uno a uno entre los miembros del par de marcadores, especialmente donde un miembro pueda afectar a, o ser afectado por, más de una molécula de otro miembro. Las partes de marcadores adecuadas para su uso en las sondas de la presente invención interactúan de manera que al menos una parte pueda alterar al menos una característica medible físicamente de otra parte de marcador de manera dependiente de la proximidad. La señal característica del par de marcadores es detectablemente diferente según si la sonda está en su conformación abierta o en la conformación cerrada.

[0046] Por ejemplo, en relación con las FIGS. 1 y 2, las fracciones de marcadores preferidas son un par de FRET, más preferentemente un fluoróforo 7 y un extintor 6. En ese modo de realización, la señal característica es la fluorescencia de una determinada longitud de onda. Cuando la sonda 1 se encuentra en el estado cerrado (FIG. 1), la parte marcadora 6 extingue la fluorescencia de la parte 7. Cuando la parte 7 es estimulada por una frecuencia de luz adecuada, se genera una señal fluorescente desde la sonda en un primer nivel, que puede ser cero. La sonda 1 está “apagada”. Cuando la sonda 1 se encuentra en estado abierto (FIG. 2), la parte de marcador 6 se encuentra lo suficientemente separada de la parte de marcador 7 de manera que la

transferencia de energía de resonancia fluorescente entre ellos se impide de manera sustancial, si no por completo. Por lo tanto, la parte de marcador 6 no es capaz de extinguir de manera efectiva la fluorescencia de la parte de marcador 7. Si la parte 7 es estimulada, se genera una señal fluorescente de un segundo nivel, más alta que la primera. La sonda 1 está “encendida”. La diferencia entre los dos niveles de fluorescencia es detectable y medible. Mediante este uso de fracciones fluorescentes y extintoras, la sonda sólo está “encendida” en la conformación “abierta” e indica que la sonda está unida a la diana mediante la emanación de una señal fácilmente detectable. El estado conformacional de la sonda altera la señal generada desde la sonda mediante la regulación de la interacción entre los marcadores.

[0047] En los modos de realización en los que el par de afinidad son brazos de oligonucleótidos complementarios, se eligen determinadas longitudes de secuencias de complemento de diana y secuencias de brazo para el correcto funcionamiento termodinámico de la sonda en las condiciones del ensayo de hibridación proyectado. Las personas con experiencia en los ensayos de hibridación entenderán que las condiciones pertinentes incluyen concentraciones de la sonda, la diana y solución, temperatura de detección, presencia de desnaturalizantes y excluidores por volumen, y otros factores que influyen en la hibridación. La longitud de la secuencia de complemento de diana puede variar de 10 nucleótidos a aproximadamente 140 nucleótidos. En los modos de realización bimoleculares, cada parte de la secuencia de complemento de diana debe tener una longitud de al menos 10 nucleótidos. El límite inferior se establece por la distancia mínima a la que no hay una diferencia detectable en la característica medible (o señal característica) afectada por la interacción entre las partes de marcadores utilizadas cuando la sonda está cerrada, de cuando la sonda está abierta. De ese modo, la longitud mínima de la secuencia de complemento de diana 2 para una sonda particular depende de la identidad del par de marcadores y su conjugación a la sonda. Nuestros grupos de marcadores preferidos son la fracción fluorescente ácido 5-[(2-aminoetil)amino]-naftaleno-1-sulfónico (EDANS) y la fracción de extintor ácido 4-[4-(dimetilamino)-fenilazo] benzoico (DABCYL). Para EDANS y DABCYL, la extinción se elimina esencialmente mediante una separación de 60 Angstroms, que equivale en longitud a 20 pares de nucleótidos en un ácido nucléico de doble hélice. De este modo, en el modo de realización preferido de las FIGS. 1 y 2, la secuencia de complemento de diana 2, que comprende a 2a y 2b, debería ser al menos de 20 nucleótidos de largo. Acortar la secuencia 2 debilitaría progresivamente la señal de las sondas hibridadas, reduciendo así la diferencia en el nivel de señal entre las sondas abiertas y cerradas.

[0048] La longitud máxima de la sonda es menos estricta y se determina por la flexibilidad conocida de las moléculas de ácido nucleico de doble hélice (Shore et al., 1981). Debido a la flexibilidad en el híbrido sonda-diana, es posible que los extremos de las moléculas de ácido nucleico de doble hélice se toquen si la longitud de la doble hélice de sonda-diana supera los 140 pares de nucleótidos aproximadamente. Como será evidente para los profesionales de la técnica, esta distancia puede variar según los ácidos nucleicos en la doble hélice (ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN) y el tipo de doble hélice formado (forma A, forma B, forma Z, etc). Por ejemplo, si la secuencia de complemento de diana 2 (FIG. 1) es más larga de 140 nucleótidos aproximadamente y se une a una diana para formar una doble hélice de ADN:ARN de forma A, puede darse una extinción no deseable en la conformación abierta. La extinción ocasional, aunque puede no destruir completamente la capacidad de la sonda de generar una señal detectable, tiende a degradar el rendimiento de la sonda. La extinción no deseable puede reducirse conjugando el par de marcadores a una ubicación diferente de la de los extremos de los brazos u otro par de afinidad.

[0049] La longitud máxima de la secuencia de complemento de diana está limitada por el requisito funcional de que una sonda asume una conformación abierta favorecida de manera termodinámica cuando está unida a la diana. Las secuencias de complemento de diana excesivamente largas forman hélices dobles de sonda-diana con una flexibilidad suficiente para que tanto la hélice sonda-diana como la hélice del tallo de brazos puedan estar presentes en el mismo compuesto. La sonda permanecería entonces en estado cerrado. Por lo tanto, la longitud máxima de la secuencia de complemento de diana debe ser lo suficientemente corta, y la hélice sonda-diana resultante por tanto lo suficientemente rígida, para que la sonda asuma una conformación abierta cuando esté unida a la diana. Por las razones anteriores, la longitud máxima de la secuencia de complemento de diana no debe exceder en ningún caso los 140 nucleótidos aproximadamente, con lo que queremos decir dentro del 10% de ese número según los factores explicados arriba.

[0050] Cuando se diseñen sondas según esta invención, se debe prestar atención a la naturaleza helicoidal del ADN de doble cadena. Cuando una sonda unimolecular se encuentra en la conformación abierta, la separación máxima de las partes de marcadores se consigue si las partes están ubicadas en lados opuestos de la hélice doble sonda-diana. Por ejemplo, si los marcadores están conjugados al extremo 5' y 3' del tallo dúplex distal del enlace de la secuencia de complemento de diana, y se espera una hélice doble de la secuencia diana-secuencia de complemento de diana de forma B, la elección de secuencias de complemento de diana de 16, 26, 37, 47, 58, 68 o 79 nucleótidos de longitud conseguirá la máxima separación orientando las partes

marcadoras en una configuración trans en lados opuestos de la doble hélice, como las partes de marcador 6, 7 mostradas en la FIG. 2. En este margen de tamaños, preferimos las secuencias de complemento de diana que se encuentran de 1 a 3 nucleótidos de estas longitudes. Preferimos las secuencias de complemento de diana que tienen una longitud en el rango de los 20 a 60 nucleótidos. La secuencia de complemento de diana de nuestro modo de realización preferido construido hasta el momento es de 35 nucleótidos.

[0051] En los modos de realización preferidos que tienen secuencias de ácido nucleico como par de afinidad, las secuencias de brazo deben ser lo suficientemente largas para que, en las condiciones del ensayo y a la temperatura de detección, cuando la sonda no esté unida a una diana, los brazos estén asociados, y las partes de marcadores se mantengan muy cerca unas de otras. Según las condiciones de ensayo utilizadas, las longitudes de brazo de 3-25 nucleótidos pueden llevar a cabo esta función. A menudo, un margen intermedio de 6-15 nucleótidos es apropiado. La longitud real se elegirá en relación con la secuencia de complemento de diana de manera que la sonda permanezca en la conformación cerrada en ausencia de diana y asuma la conformación abierta cuando esté unida a la diana. A medida que la secuencia de complemento de diana aumenta su tamaño hasta 100 nucleótidos, la longitud del brazo puede aumentar hasta 15-25 nucleótidos. Por encima de la secuencia de complemento de diana de 100 nucleótidos de longitud, la longitud del brazo no aumenta más.

[0052] Cuando se usan secuencias de oligonucleótidos como par de afinidad, el límite superior de la longitud de los brazos se rige por dos criterios relacionados con la termodinámica de las sondas según la invención. Primero, preferimos que la temperatura de fusión del tallo del brazo, en las condiciones del ensayo, sea superior a la temperatura de detección del ensayo. Preferimos tallos con temperaturas de fusión al menos 5°C superiores a la temperatura del ensayo y, más preferentemente al menos 10 °C superior.

[0053] Segundo, la energía liberada mediante la formación del tallo debe ser menor que la energía liberada mediante la formación del híbrido de secuencia diana-secuencia de complemento de diana de manera que la apertura de la sonda mediante la diana sea favorecida de manera termodinámica. Así, la temperatura de fusión del híbrido secuencia diana-secuencia de complemento de diana es mayor que la temperatura de fusión del tallo. Por lo tanto, las secuencias de brazo deben ser más cortas que la secuencia de complemento de diana. En los modos de realización bimoleculares, como ya se ha afirmado, las secuencias de brazo deben ser más cortas que cada parte de la secuencia de complemento de diana.

[0054] Por lo tanto, la temperatura de fusión del tallo de brazos debe estar por encima de la temperatura del ensayo, de manera que la sonda no se abra antes de que la secuencia de complemento de diana hibride con la diana, pero suficientemente por debajo de la temperatura de fusión del híbrido, completo o fragmentado, de la secuencia de complemento de diana con la secuencia diana para asegurar el correcto funcionamiento de la sonda y, así, la generación de una señal detectable. Preferimos una temperatura de fusión del tallo de brazos de al menos 5°C, más preferentemente al menos 10 °C, por encima de la temperatura del ensayo y al menos unos 20 °C por debajo de la temperatura de fusión del híbrido de la secuencia de complemento de diana con la secuencia diana.

[0055] Un experto en la técnica se dará cuenta de que estos parámetros variarán con las condiciones del ensayo de hibridación y de que esas condiciones deben ser consideradas a la hora de diseñar las secuencias de ácido nucleico de sondas de la presente invención. Dicho de otra manera, la sonda debe construirse para que funcione como se ha descrito arriba en las condiciones del ensayo en el que se vaya a usar para que se trate de una sonda según la presente invención. Una construcción determinada puede ser una sonda según esta invención para un conjunto de condiciones de ensayo pero no para otro conjunto de condiciones de ensayo. La longitud de los brazos y su contenido de guanosina-citidina afectan a la temperatura de fusión del tallo dúplex. Para una temperatura de fusión deseada, en unas condiciones de ensayo determinadas, los profesionales de la técnica pueden calcular fácilmente una longitud y un contenido de guanosina-citidina de los brazos. La temperatura de fusión del tallo duplex de la sonda puede determinarse empíricamente para unas condiciones de ensayo dadas utilizando los métodos descritos a continuación en el Ejemplo IV.

[0056] Vemos estos parámetros como consideraciones de diseño que son útiles como directrices. Puesto que el comportamiento de las sondas en soluciones compuestas no puede siempre predecirse con seguridad, las pruebas empíricas son muy útiles para confeccionar sondas según la invención para funcionar de manera óptima en unas condiciones de ensayo determinadas, es decir, para maximizar la diferencia de la señal de encendido frente a la señal de apagado y, si se desea, minimizar el nivel de la señal de apagado.

[0057] En determinados modos de realización preferidos, la secuencia de cada brazo forma una estructura interna secundaria, como un tallo en estructura de horquilla, cuando la sonda está abierta. Se ilustra una sonda unitaria 90 de este diseño en la FIG. 9. La sonda 90 es unimolecular, pero esta característica del diseño se aplica también a las sondas bimoleculares. Una vez que la secuencia de complemento de

diana 91 se ha unido a la secuencia diana 92 de la diana 93 y han formado una hélice sonda-diana, los brazos 94, 95 se separan, y se genera una señal mediante la separación de las fracciones de marcadores 96, 97. La conformación abierta mostrada en la FIG. 9 está estabilizada porque los brazos abiertos 94, 95 se pliegan sobre sí mismos para formar las horquillas 98, 99. Las horquillas están compuestas de secuencias complementarias vecinas que forman un tallo que tiene al menos 3 pares de nucleótidos de longitud. Esto estabiliza la conformación abierta, porque se libera energía adicional cuando cada brazo separado 94, 95 forma una estructura de horquilla interna. Además, los brazos que contienen estas estructuras de horquilla se acortan de forma efectiva y de ese modo es menos probable que interactúan entre sí. Con esta característica, es posible utilizar brazos, en el intervalo de los 10-25 nucleótidos, que son relativamente más largos de lo que resultaría apropiado para que los brazos sin esta característica mantuvieran las partes de marcadores más unidas en la conformación cerrada. Por consiguiente, las sondas con esta característica pueden presentar una señal más definida debido al nivel más bajo de fondo en la conformación cerrada.

[0058] Otro medio para estabilizar la conformación abierta es que una o ambas secuencias de brazo sea al menos parcialmente complementaria a las secuencias adyacentes a la secuencia diana. Las secuencias complementarias pueden situarse en el brazo en una ubicación proximal o distal de la unión del brazo y la secuencia de complemento de diana. Además, una secuencia de brazo puede ser completamente complementaria a las secuencias adyacentes a la diana sin establecer restricciones indebidas al diseño de una sonda elaborada para una diana específica. Esta característica aumenta la estabilidad termodinámica de la conformación abierta. Observamos que aunque algunas partes de los brazos puedan ser complementarias a la diana, la interacción de la secuencia de complemento de diana con la secuencia diana debe ser suficiente para cambiar la sonda a la conformación abierta. Esta característica del diseño se aplica tanto a los modos de realización unimoleculares como a los modos de realización bimoleculares.

[0059] Las FIGS. 1-5 muestran nuestro par de marcadores preferido como una parte luminiscente (7, 37, 46, 55) y una parte extintora (6, 38, 45, 56). Se puede utilizar cualquier par de marcadores para generar una señal donde un miembro del par pueda alterar de manera detectable al menos una característica medible físicamente del otro cuando están muy cerca, pero hasta un punto diferente cuando están separados. Alternativamente, ambos miembros pueden alterar de manera detectable tal característica de un miembro cuando se encuentran muy cerca, pero de manera

diferente cuando están lejos. Además, es necesario que los marcadores estén conjugados a la sonda.

[0060] Los marcadores luminiscentes que deben emparejarse con los extintores adecuados pueden elegirse de cualquiera de las siguientes categorías conocidas: un marcador fluorescente, un marcador radioluminiscente, un marcador quimioluminiscente, un marcador bioluminiscente y un marcador electroquimioluminiscente. El uso de múltiples partes de extintores con una sola parte luminiscente aumentará la extinción. En este caso, un par de marcadores comprende una parte fluorescente “emparejada” con varias partes extintoras, otros pares de marcadores útiles incluyen una enzima indicadora y el inhibidor apropiado.

[0061] Aunque no se prefiere, un par útil de marcadores puede generar una señal en la conformación cerrada y estar inactivo en la conformación abierta. Los ejemplos de tales pares son una enzima y su cofactor y fragmentos o subunidades de enzimas que deben estar cerca unos de otros para que la enzima esté activa. En los modos de realización de este tipo, la conformación cerrada es el estado “encendido”.

[0062] Nuestros marcadores favoritos se eligen de manera que la transferencia de energía de resonancia fluorescente sea el modo de interacción entre los dos marcadores. En esos casos, la característica física medible de los marcadores podría ser una disminución en la vida del estado de excitación de un marcador, la completa o parcial extinción de la fluorescencia de un marcador, un aumento de la fluorescencia de un marcador o una despolarización de la fluorescencia de un marcador. Los marcadores pueden excitarse con una banda de radiación de longitud de onda estrecha o ancha. Del mismo modo, la radiación emitida puede ser observada en un intervalo estrecho o amplio de longitudes de onda, bien con la ayuda de un instrumento, o bien mediante observación visual directa. Los ejemplos de tales pares son fluoresceína/sulforodamina 101, fluoresceína/butanoato de pireno, fluoresceína/fluoresceína, acridina/fluoresceína, acridina/sulforodamina 101, fluoresceína/etenoadenosina, fluoresceína/eosina, fluoresceína/eritrosina y antranilamida-3-nitrotirosina/fluoresceína. Serán evidentes otros pares de marcadores para los profesionales del sector.

[0063] Nuestras sondas preferidas, tanto unimoleculares como bimoleculares, descritas más específicamente en los Ejemplos, permiten la detección de la hibridación a simple vista y sólo se necesita una lámpara ultravioleta simple como dispositivo de excitación. Estas sondas cumplen los siguientes criterios: sólo una parte de marcadores es fluorescente, y su fluorescencia es visible a simple vista; la otra parte de marcadores extingue esta fluorescencia de una forma extremadamente eficaz; y no se produce una extinción significativa a distancias superiores de dos

vueltas de una hélice doble de ácido nucleico aproximadamente. Por supuesto, pueden usarse múltiples copias de una o ambas partes de los marcadores.

[0064] Nuestro marcador fluorescente preferido es EDANS y nuestra parte de extinción preferida es DABCYL. El espectro de absorción del DABCYL tiene una
5 buena coincidencia con el espectro de emisión del EDANS, dando lugar a una transferencia de energía muy eficiente. Se ha demostrado que se puede lograr una reducción de 40 veces la fluorescencia de EDANS al unirla a DABCYL a través de un espaciador de octapéptidos, y una reducción de más de 200 veces en la fluorescencia uniendo EDANS directamente a DABCYL. Además, no se da la extinción de la
10 fluorescencia de EDANS por DABCYL a distancias superiores a 60 Angstroms. Finalmente, DABCYL no tiene fluorescencia propia (Matayoshi et al., 1990; Wang et al., 1991).

[0065] Se conjugan EDANS y DABCYL a la sonda en la región de los brazos de oligonucleótidos u otro par de afinidad. En nuestras sondas preferidas hasta la fecha,
15 tanto unimoleculares como bimoleculares, EDANS y DABCYL se unen covalentemente a los extremos libres 5' y 3' de los brazos, en posición distal al enlace de los brazos y la secuencia de complemento de los brazos. Por supuesto, las posiciones de EDANS y DABCYL en los extremos 5' y 3' respectivamente, pueden invertirse. Las partes de EDANS y DABCYL pueden conjugarse a cualquier posición a lo largo de las porciones
20 terminales de la sonda, siempre que se encuentren próximas entre sí en la conformación cerrada de la sonda, y lo suficientemente separadas una de otra en la conformación abierta.

[0066] En relación con la FIG. 1, situar las partes de marcadores a lo largo del tallo dúplex 5, en lugar de en los extremos libres 5' y 3' de los brazos, puede aumentar la
25 interacción entre las partes de marcadores cuando la sonda se encuentra en la conformación cerrada. Es bien sabido que los nucleótidos terminales de una hélice doble se desenredarán y rehibridan de forma aleatoria a una velocidad que depende de la temperatura. Por lo tanto, situar las partes de marcadores de manera interna a lo largo del tallo tendrá como resultado una separación menor de las partes debida a que
30 los extremos se desenreden.

[0067] Cuando se sitúan los marcadores a lo largo del tallo dúplex, debe prestarse atención a la estructura helicoidal del tallo dúplex. Las partes de los marcadores pueden estar conjugadas a los nucleótidos escalonados a lo largo de cada brazo de manera que cuando los brazos se anillen, las partes de marcadores se encuentren en
35 el mismo lado de la hélice de tallo dúplex. Esta ubicación maximizará todavía más la interacción de las partes de marcadores en la conformación cerrada.

[0068] Como se ha afirmado con anterioridad, se pueden utilizar múltiples marcadores, p.ej., múltiples partes de EDANS y DABCYL. El uso de múltiples marcadores, en algunos casos, permite ensayos con una mayor sensibilidad. Por ejemplo, cuando el par de afinidad son brazos de oligonucleótidos, se puede lograr una multiplicidad de marcadores distribuyendo un número de partes de EDANS en un brazo y un número correspondiente de partes de DABCYL en el otro brazo, de manera que cada parte de EDANS pueda estar cerca de una parte de DABCYL cuando se forma la hélice del tallo de los brazos. También se puede lograr una multiplicidad uniendo covalentemente múltiples marcadores a los brazos, de manera que imiten un racimo de uvas. No debe usarse una multiplicidad de marcadores con partes de marcadores que se extingan a sí mismas. En la aplicación preferida, puede mejorarse la extinción en la conformación cerrada ubicando una sola parte de EDANS en un brazo y múltiples partes de DABCYL en el otro brazo de manera que cuando se forma la hélice del tallo, al menos una parte de DABCYL sea adyacente a una parte de EDANS en un momento dado.

[0069] La conjugación de las partes de marcador con cualquier ubicación en la sonda debe ser estable en las condiciones del ensayo. La conjugación debe ser covalente, forma que nosotros preferimos. Los ejemplos de conjugación no covalente incluyen, sin carácter limitativo, enlaces iónicos, intercalación, unión ligando-proteína e interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. De manera apropiada, serán evidentes los medios estables de asociación de las partes de marcadores a las sondas para los profesionales del sector. El uso del término “conjugación” aquí engloba todos los medios de asociación de las partes de marcadores a la sonda que sean estables en las condiciones de uso. Consideramos que las partes de marcadores conjugadas de manera estable se incluyen en la molécula de la sonda a la que se conjugan.

[0070] A veces conjugamos partes de marcadores a las sondas mediante enlace covalente a través de espaciadores, preferentemente espaciadores de alquilo lineales. La naturaleza del espaciador no es crítica. Por ejemplo, EDANS y DABCYL pueden unirse mediante espaciadores de alquilo de seis carbonos, conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Los espaciadores de alquilo aportan a las partes de marcadores una flexibilidad suficiente para interactuar entre sí para una eficaz transferencia de energía de resonancia fluorescente, y como consecuencia, una extinción eficiente. Los componentes químicos de los espaciadores adecuados serán evidentes para los profesionales de la técnica. La longitud de un espaciador de cadena de carbono puede variar de forma considerable, al menos de 1 a 15 carbonos. Sin embargo, en el caso de múltiples marcadores conjugados a un brazo en configuración de “racimo de uva”, es deseable un espaciador bifurcado múltiple.

[0071] Las sondas de hibridación y los tallos universales de la presente invención pueden comprender moléculas de ácido nucleico que pueden unirse mediante los métodos de síntesis en fase sólida comúnmente conocidos, mediante ligamiento de secuencias sintéticas o fragmentos de restricción o mediante la combinación de estas técnicas. Las sondas más simples pueden unirse mediante síntesis de un solo oligonucleótido que comprende una secuencia de brazo que flanquea la secuencia de complemento de diana. Las partes de marcadores son entonces conjugadas a los extremos de los oligonucleótidos. Se puede preparar una sonda bimolecular como dos oligonucleótidos marcados y sintetizados por separado. Se puede convertir una sonda bimolecular en la sonda unimolecular correspondiente uniendo las porciones de secuencia de complemento de diana, como mediante el ligamiento en un puente. La síntesis directa es especialmente apropiada en los casos en los que se puede llevar a cabo con un rendimiento aceptable.

[0072] El uso de una combinación de síntesis y ligamiento es ilustrado mediante la reunión de una sonda de ADN unimolecular a partir de dos oligodeoxinucleótidos sintetizados directamente. Un oligonucleótido contiene la secuencia de complemento de diana, una secuencia del primer brazo completo unido covalentemente a una de las partes del marcador, y una parte de la secuencia del segundo brazo. El brazo y la parte del brazo de este oligonucleótido hibridan entre sí. El segundo oligonucleótido comprende el resto de la secuencia del segundo brazo unido covalentemente a la otra parte de marcador. El segundo oligonucleótido es complementario a la región del primero saliente y no hibridada. Los dos oligonucleótidos se anillan entre sí. Finalmente, la sonda se compone mediante ligamiento del compuesto anillado.

[0073] Alternativamente, se sintetizan los dos oligonucleótidos, comprendiendo cada uno una parte sustancial, "aproximadamente la mitad" según nuestro uso del término, de la secuencia de complemento de diana, una secuencia de brazo situada en 5' en un oligonucleótido y en 3' en el otro y partes de marcadores adecuados. Si se desea una sonda unimolecular, estos dos oligonucleótidos se anillan a través de un oligonucleótido puente y se ligan. A continuación, se purifica la sonda desde el puente mediante purificación en gel u otros medios conocidos en la técnica. Si se desea una sonda bimolecular, la sonda se compone mediante el anillado de dos oligonucleótidos.

[0074] Se describen aquí kits que contienen un tallo universal e instrucciones para usar el tallo universal para preparar sondas según la invención para la detección de una variedad de secuencias diana preseleccionadas. El tallo universal comprende partes de regiones de brazos, cada una conjugada a un miembro del par de marcadores. En su uso para la fabricación de sondas unimoleculares según esta invención, el tallo puede proporcionarse y usarse como una unidad, con los brazos

hibridados el uno con el otro, de manera que se forma un extremo de enlace del dúplex, que comprende grupos reactivos. De modo opcional, el extremo de enlace puede incluir un saliente o extremo romo ligable. Alternativamente, otros agentes de enlace bioquímicos, o agentes químicos, pueden estar presentes en los extremos de

5 enlace 5' y 3' del tallo universal. El ligamiento químico puede implicar grupos reactivos, como hidroxilo, fosfato, sulfhidrilo, amino, alquil fosfato, alquilamino o hidroxil alquilo. Preferimos los grupos reactivos de modo covalente.

[0075] Es ventajoso tener el tallo universal hibridado en el momento en el que se prepara la sonda, porque esto evita automáticamente unir la misma región del brazo a

10 ambos extremos de la sonda. Sin embargo, de modo alternativo, el tallo universal no necesita estar hibridado durante la preparación de la sonda si se usan reacciones de unión mutuamente excluyentes para cada porción del brazo. En el último caso, las partes del brazo pueden mantenerse separadas para la reacción secuencial, pero aún nos referimos a las porciones de brazo como un tallo universal. En la preparación de

15 sondas bimoleculares, y en la preparación de sondas unimoleculares mediante ligamiento de sondas bimoleculares, preferimos que las dos partes del tallo se faciliten y se usen por separado.

[0076] Se describen aquí tallos universales que comprenden partes de brazo de oligonucleótidos de 5 a 20 nucleótidos de longitud. Los nucleótidos de las partes de

20 brazo en el tallo universal no necesitan estar implicados en el reconocimiento de la secuencia diana y no lo estarán excepto en casos especiales, tal y como se entenderá. El tallo sólo tiene que participar en la regulación del estado conformacional de la sonda unitaria. Los tallos universales aquí descritos incluyen pares de FRET como marcadores, más preferentemente EDANS y DABCYL, cada uno conjugado a un

25 extremo del tallo dúplex, distal al extremo de enlace, como se describe a continuación. Hemos preparado los dos oligonucleótidos de tallo universal mediante síntesis en estado sólido. Sin embargo, las secuencias naturales con una longitud y una temperatura de fusión adecuadas también pueden adaptarse para su uso como tallos.

[0077] Como reconocerá un profesional de la técnica, los tallos que tienen oligonucleótidos que comprenden una secuencia saliente que es complementaria a sí

30 misma pueden provocar la asociación no deseable de dos tallos. De ese modo, se prefiere, aunque no sea un requisito, evitar el uso de oligonucleótidos que formen tales dímeros.

[0078] El uso de un tallo universal puede incluir la síntesis de un oligonucleótido que

35 comprenda una secuencia de complemento de diana flanqueada por las partes restantes de las secuencias de brazos de la sonda final. Este oligonucleótido hibrida por sí mismo mediante las partes de brazos restantes, creando un extremo enlazable.

Si el tallo universal incluye un saliente, el oligonucleótido deberá tener un saliente complementario al saliente del tallo universal. Este oligonucleótido es entonces unido al tallo universal, preferentemente mediante ligamiento enzimático o químico, como se ha descrito arriba. De ese modo, el tallo universal es incorporado al tallo de sonda final de una sonda unimolecular.

5 [0079] Un tallo universal resulta especialmente beneficioso para los investigadores que deseen diseñar una variedad de sondas unimoleculares o bimoleculares. Los tallos universales pueden formar parte de un kit que comprenda uno o más tallos e instrucciones para preparar los oligonucleótidos de secuencia de complemento de
10 diana apropiados, o los fragmentos de restricción apropiados, y su unión posterior a un tallo. Las instrucciones deben describir las partes de las secuencias de brazos, si las hay, requeridas para flanquear la secuencia de complemento de diana y formar los extremos enlazables adecuados descritos arriba. Un kit puede incluir numerosos tallos universales variando en la temperatura de fusión y/o la longitud del tallo de sonda final
15 que se formará. El kit puede tener un oligonucleótido de tallo común y múltiples versiones de otro oligonucleótido de tallo variando su longitud. De este modo, el kit puede incluir tallos adecuados para la preparación de sondas con diversas longitudes de secuencia diana o con la misma secuencia diana para su uso en una variedad de condiciones de ensayo diferentes preseleccionadas. Las instrucciones en el kit de
20 tales características dirigirá al usuario al tallo universal adecuado para su uso con una determinada secuencia de complemento de diana según los principios aquí expuestos. Los kits también pueden incluir, de modo opcional, enzimas y reactivos, de manera que el usuario del kit pueda usar fácilmente el tallo universal para diseñar y preparar sondas.

25 [0080] Los ensayos de acuerdo con la presente invención, que pueden ser cualitativos o cuantitativos, no requieren lavado para eliminar las sondas no unidas. Un ensayo según esta invención puede comprender así añadir una sonda unitaria según esta invención a una muestra que pueda contener cadenas que contengan secuencia diana y determinar si se produce la señal detectable o no en las condiciones de ensayo a la
30 temperatura de detección. Se prefieren los ensayos homogéneos, aunque las sondas según esta invención pueden usarse en ensayos de hibridación heterogénea. Se puede realizar un control sin secuencia diana de manera simultánea, en cuyo caso se puede comparar la generación de señal de la muestra y del control, bien de forma cualitativa o cuantitativa, midiendo ambas y calculando la diferencia. Los ensayos de
35 esta invención incluyen la detección en tiempo real y en el punto final de productos específicos monocatenarios o bicatenarios de reacciones de síntesis de ácido nucleico, como la transcripción, la replicación, la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR), la replicación automantenida de secuencia (3SR), reacción de amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y la reacción de amplificación mediada por replicasa Q-beta. En los ensayos en los que las sondas unitarias se sometan a fusión u otra desnaturalización, las sondas deben ser unimoleculares.

5 **[0081]** Los ensayos cuantitativos pueden emplear los métodos cuantitativos conocidos en la técnica. Un punto final de una muestra puede compararse a puntos finales de una serie de diluciones diana, por ejemplo. Además, se pueden tomar lecturas con el paso del tiempo y compararlas con las lecturas de un control positivo o negativo, o ambos, o compararlas con las curvas de uno o más miembros de una serie de diluciones diana.

10 **[0082]** Los ensayos según la presente invención incluyen la detección *in situ*, cualitativa o cuantitativa, de ácidos nucleicos en, por ejemplo, tejidos fijados sin destrucción del tejido. Puesto que se puede utilizar un gran exceso de sondas sin necesidad de lavado y sin generar una gran señal de fondo, los ensayos *in situ* de esta invención son especialmente útiles. Los ensayos de hibridación *in situ*, según esta invención incluyen “pintado cromosómico”, para el mapeo de cromosomas, y para la detección de anomalías cromosómicas (Lichter et al., 1990).

15 **[0083]** Los ensayos de esta invención incluyen ensayos *in vivo*. Se puede usar un gran exceso de sondas sin la necesidad de lavado. Los ensayos pueden ser para dianas bicatenarias, así como para dianas monocatenarias. Las sondas según la presente invención son útiles como “colorante vital” (agentes que pueden teñir constituyentes específicos de células sin matarlas) en ensayos para la detección de dianas *in vivo*. Pueden usarse en ensayos para localizar ácidos nucleicos específicos entre diversas células vivas u orgánulos en células vivas. Pueden utilizarse en ensayos para

20 identificar tipos específicos de células en un tejido o en un organismo vivo. En los ensayos según la presente invención, las sondas pueden situarse en el interior de las células según las técnicas conocidas, p.ej., mediante liposomas o haciendo que las membranas celulares sean porosas para las moléculas de ácido nucleico.

25 **[0084]** Mediante el uso de múltiples sondas que generen señales detectables diferentes y que no interfieren, p.ej., fluorescencia con diferentes longitudes de onda o fluorescencia y formación de productos teñidos, los ensayos de esta invención pueden detectar múltiples dianas en un solo ensayo. Además, pueden usarse múltiples sondas, cada una de ellas específica para diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana, pero teniendo el mismo par de marcadores, para aumentar la señal. Si

30 se usan múltiples sondas para una misma diana, deben unirse a la diana de manera que las sondas vecinas no se extingan unas a otras.

[0085] Además, se pueden diseñar sondas especiales según esta invención para detectar múltiples secuencias diana. Si se incorporan múltiples secuencias de complemento de diana a una sonda, el diseño de la sonda debe hacerse de forma que la hibridación de cualquiera de las secuencias con su diana haga que la sonda cambie de la conformación cerrada a la conformación abierta.

[0086] Determinados modos de realización preferidos de ensayos según la presente invención comprenden la adición de sondas según esta invención a una muestra y la visualización a simple vista para la detección de una secuencia específica de ácido nucleico diana en la mezcla compleja. Mediante la comparación con los estándares positivos o los resultados obtenidos con los estándares positivos, la visualización puede ser cuantitativa de manera aproximada. En determinadas situaciones, como en el caso de desear información sobre el tamaño de un ácido nucleico, el ácido nucleico en la muestra puede ser primero fraccionado mediante electroforesis en gel no desnaturizante, y luego el gel mismo puede someterse a ensayo directamente. Alternativamente, se puede llevar a cabo la hibridación en fragmentos de restricción, bien sin fraccionamiento o bien antes del fraccionamiento, como en el Ejemplo VI.

[0087] De este modo, con esta invención se puede eliminar la necesidad de procedimientos a menudo utilizados como la técnica de Southern y Northern Blot (Sambrook et al., 1989). Sin embargo, las sondas de la presente invención son también muy útiles en tales ensayos heterogéneos. Un gran inconveniente de estos ensayos, como es la necesidad de lavado a fondo para reducir la señal de fondo de las sondas que no han hibridado con la diana, se mejora mediante el uso de las sondas de esta invención.

[0088] Nuestras sondas preferidas, tanto unimoleculares como bimoleculares, emanan un alto nivel de señal positiva sólo en la conformación abierta unidos a la diana, mientras que emiten una señal escasa o nula en la conformación cerrada. Además, nuestras sondas preferidas no asumen la conformación abierta a menos que estén unidas a la diana, y permanecen cerradas cuando se unen de manera no específica. Como se ha descrito arriba, esto lleva a una señal de fondo que es inexistente o muy baja de forma natural. Por lo tanto, el uso de estas sondas simplifica enormemente los ensayos convencionales heterogéneos porque o no se requiere lavado, o se requiere un lavado suave y poco riguroso para reducir la señal de fondo presente tras la hibridación. Además, las hibridaciones convencionales se pueden llevar a cabo en condiciones generalmente menos rigurosas.

[0089] Las sondas según la invención se abren muy rápidamente en el momento de interacción con una secuencia diana. La capacidad de interactuar depende de la concentración, tal y como reconocerán los expertos en ensayos de hibridación. Las

condiciones del ensayo podrán elegirse de manera que las sondas respondan a la presencia de ácidos nucleicos diana y generen la señal muy rápidamente. Debido a esto, los ensayos según la presente invención incluyen el control en tiempo real de la producción de ácidos nucleicos específicos. Los procesos de síntesis como la transcripción, replicación o amplificación pueden vigilarse incluyendo sondas en la mezcla de reacción y midiendo la fluorescencia de manera continua o intermitente. Se usan las sondas en un exceso considerable de manera que las sondas relativamente abundantes encuentren sus dianas en las cadenas de ácido nucleico nacientes antes de que las dianas sean secuestradas por la unión de cadenas complementarias.

5
10 **[0090]** El uso de las sondas de esta invención en ensayos para la identificación de productos de las reacciones de amplificación de ácido nucleico elimina generalmente la necesidad de un análisis posterior a la amplificación para detectar los productos deseados y diferenciar los productos deseados de las reacciones secundarias o productos de fondo no deseados. Por supuesto, las sondas según la invención pueden
15 añadirse al final de un proceso de síntesis para una detección de punto final de productos. En los ensayos para controlar el progreso de una reacción de amplificación, las sondas pueden estar presentes durante la síntesis. La presencia de las sondas mejora el margen de exactitud, precisión y margen dinámico de las estimaciones de la concentración de ácido nucleico diana. Las reacciones en tubos cerrados pueden controlarse sin abrir los tubos. Por tanto, los ensayos que utilizan estas sondas pueden
20 limitar el número de falsos positivos, porque la contaminación puede ser limitada.

[0091] Las sondas unimoleculares según la invención son especialmente útiles en ensayos para el seguimiento de reacciones en cadena de polimerasa, puesto que las sondas según esta invención pueden abrirse y cerrarse con una velocidad superior a
25 la velocidad del ciclo térmico. Una sonda, preferentemente una que esté “apagada” en la posición cerrada, y que incluya una secuencia de complemento de diana que presente complementariedad con un producto de la amplificación esperado, se incluye en una mezcla de reacción en cadena de polimerasa. En este modo de realización, la sonda tiene tal temperatura de fusión que permanece cerrada en las condiciones de
30 reacción a la temperatura de anillamiento de la reacción en cadena de polimerasa. La sonda puede permanecer cerrada, aunque no es necesario, a la temperatura de extensión, si ésta es superior a la temperatura de anillamiento. A la temperatura de anillamiento, la secuencia de complemento de diana hibrida con su diana y la sonda genera señal. Durante la disminución desde la temperatura de desnaturalización a la
35 temperatura de anillamiento y una vez a la temperatura de anillamiento, las sondas fundidas (es decir, abiertas), que no encuentran su diana se cierran rápidamente a través de un evento intramolecular. La señal, p.ej., la fluorescencia, puede por lo tanto

leerse a la temperatura de anillamiento. También es posible programar una temperatura diferente en el ciclo de reacción a la que se lea la fluorescencia. En el diseño de una sonda para su uso en una reacción de PCR, se elegiría naturalmente una secuencia de complemento de diana que no sea complementaria a uno de los
5 cebadores de PCR.

[0092] Algunas sondas pueden ser desplazadas de su secuencia diana mediante el anillamiento de la cadena complementaria del producto, como los cebadores de PCR. Esto puede evitarse aumentando la concentración de sondas o diseñando una asimetría en la síntesis de las cadenas de los productos en la reacción en cadena de
10 polimerasa. En la amplificación asimétrica, se sintetiza una parte mayor de la cadena que contiene la diana en relación con la síntesis de la cadena complementaria.

[0093] Del mismo modo, otros esquemas de amplificación de ácido nucleico (véase Landegren, 1993, para una revisión) pueden ser vigilados, o sometidos a ensayo, con modos de realización de las sondas de esta invención. Pueden utilizarse las sondas
15 apropiadas, por ejemplo, en reacciones de amplificación mediada por replicasa Q-beta, replicación automantenida de secuencia, amplificación basada en la transcripción, y amplificación por desplazamiento de hebra, sin ninguna modificación en el esquema de amplificación.

[0094] Determinados modos de realización de ensayos según la presente invención utilizan múltiples sondas de hibridación unidas a una superficie o superficies sólidas.
20 Puesto que se usan sondas de la invención, no es necesario un lavado. Cuando las sondas están unidas a una superficie sólida, nos referimos a ellas como "sondas sujetas". Se muestra una sonda de este tipo en la FIG. 10, la cual muestra una sonda 101 que tiene una secuencia de complemento de diana 104, los brazos complementarios 105 y 106, y un par de marcadores 107, 108 conjugados a los brazos
25 complementarios 105, 106. La sonda 101 está sujeta a la superficie sólida 103 mediante una fracción de unión 102. La fracción de unión 102 puede ser covalente o no covalente. Preferimos el enlace covalente. Se puede utilizar cualquier tipo de superficie 103, incluyendo perlas, membranas, pocillos de microvaloración, y tiras reactivas. Preferimos las superficies
30 que son neutrales con respecto a los componentes de la sonda, es decir, superficies que no interactúan con los ácidos nucleicos, no interactúan con los marcadores y no interfieren con la señal de la sonda. Un ejemplo de tal superficie sería una superficie recubierta con un agente siliconizante.

[0095] Una superficie útil no interfiere de forma significativa con: a) la capacidad del
35 par de afinidad, preferentemente secuencias de brazos, de la sonda de mantener la conformación cerrada; b) la hibridación de la secuencia de complemento de diana a la diana; c) la capacidad del par de afinidad de permanecer desplazado, preferentemente

de las secuencias de brazo de la sonda para permanecer no hibridadas entre sí en la conformación abierta; d) la interacción de partes de marcadores cercanos en la conformación cerrada, preferentemente la extinción de una parte luminiscente por la parte extintora; y e) la acción de las partes de marcadores en la conformación abierta, preferentemente la capacidad de la parte luminiscente de producir luminiscencia cuando se estimula con luz de una frecuencia apropiada. Tales superficies son conocidas en la técnica.

[0096] Las sondas de esta invención pueden sujetarse mediante numerosas fracciones moleculares de enlace 102 conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Por ejemplo, una parte de enlace adecuada 102 comprende una cadena de alquilo o una cadena de oligonucleótidos (como la oligouridine). Preferimos las partes de enlace de oligonucleótidos porque se incorporan fácilmente a las sondas. Como apreciarán los expertos en la técnica, la secuencia de nucleótidos de tal fracción de enlace de oligonucleótidos no debe ser sustancialmente complementaria a ninguna otra secuencia de la sonda.

[0097] Las sondas sujetas son útiles, de manera ventajosa, en ensayos para la determinación simultánea de un conjunto predeterminado de secuencias diana. Por ejemplo, puede prepararse una serie de sondas luminiscentes, comprendiendo cada una de ellas una secuencia de complemento de diana diferente. Cada sonda puede unirse a la misma superficie de apoyo, como una tira reactiva, en su propia localización predeterminada. Tras entrar en contacto con el soporte y la muestra en condiciones de hibridación, el soporte puede estimularse con luz de una frecuencia apropiada. Se producirá la luminiscencia en aquellas localizaciones en las que las sondas sujetas hayan formado híbridos con moléculas diana de la muestra.

[0098] Tales ensayos resultan especialmente útiles en situaciones clínicas, p.ej., en las que un paciente tiene una infección obvia, y el médico necesita saber la identidad del agente infeccioso para prescribir un tratamiento efectivo con rapidez.

[0099] Los kits de ensayo aquí descritos incluyen al menos una sonda de esta invención e instrucciones para llevar a cabo un ensayo. Los kits pueden incluir también reactivos de ensayo, p.ej., sales, tampones, inhibidores de la nucleasa, enzimas de restricción y desnaturalizantes. Los kits pueden incluir una diana o una diana modelo para una prueba de control positivo, y una "muestra" sin diana para una prueba de control negativo.

[0100] Los kits para ensayos de amplificación pueden incluir, además de parte de lo anterior, o todo, cebadores, nucleótidos, polimerasas y polimerasa-molde para el ensayo y para los ensayos de control.

[0101] Los kits de colorante vital pueden incluir, además de la sonda y las instrucciones, agentes permeabilizantes, precursores de liposomas, tampones, sales, contracolorantes y filtros ópticos.

5 **[0102]** Los kits *in situ* pueden incluir, además de la sonda y las instrucciones, fijadores, agentes deshidratantes, proteasas, contracolorantes, detergentes, filtros ópticos y platinas de microscopia recubiertas.

10 **[0103]** Los kits de campo pueden incluir, además de las instrucciones, sondas sujetas según esta invención. Al menos una sonda puede estar sujeta a las perlas, pocillos o a la tira reactiva. Se pueden incluir múltiples sondas, incluyendo una sonda de control positivo que hibridará con un componente de muestras no infectadas.

[0104] Los kits de campo pueden incluir, además de las instrucciones, sondas no sujetas según esta invención. Tales kits pueden ser para agentes o genes infecciosos. Los kits para genes pueden incluir una diana negativa, y a veces, una positiva.

15 **[0105]** Las sondas construidas pueden probarse para determinar si son sondas unitarias de la presente invención en las condiciones de ensayo determinadas. Se puede diseñar una prueba que sea apropiada para el par de afinidad y las fracciones marcadoras utilizadas en la sonda construida. La prueba debe llevarse a cabo en las condiciones del ensayo de hibridación, utilizando el detector que se usará, y generalmente comprende los siguientes pasos: primero, se mide el nivel de señal que
20 se genera en ausencia de diana, después se mide el nivel de señal que se genera cuando hay un exceso de sondas en presencia de un nivel mínimo de diana necesario para que pueda detectarse. Si el nivel de señal de la primera medición es acorde al nivel esperado de los marcadores cercanos, si el nivel de señal de la segunda medición es acorde al nivel esperado debido a la apertura de las sondas, y si el
25 detector puede distinguir de manera fiable entre los niveles de señal de las dos mediciones, la construcción es una sonda según esta invención en ese ensayo.

[0106] Si la sonda construida tiene brazos de oligonucleótidos como par de afinidad, la sonda construida debe pasar la prueba descrita en el Ejemplo IV para ser una sonda según esta invención.

30 **[0107]** Los siguientes Ejemplos ilustran diversos modos de realización de la invención. No pretenden restringir la invención, que no queda limitada a estos modos de realización específicos.

EJEMPLO I: Síntesis de la Sonda A

35 **[0108]** La Sonda A se muestra en la FIG. 3. La FIG. 3 muestra la secuencia de nucleótidos de una sonda unimolecular 30 que comprende la secuencia de complemento de diana 31 y los brazos complementarios. La sonda concreta que se

muestra en la FIG. 3 es para la detección del gen de la integrasa del virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 (Muesing et al., 1985). La secuencia de complemento de diana 31, que se extiende, de 5' a 3', del nucleótido 32 al nucleótido 33 es complementaria a la secuencia diana 5'-
5 AATGGCAGCAATTTCCACCAGTACTACAGTTAAGGC-3'. Se entenderá que se podrá sustituir una secuencia de complemento de diana de la misma longitud, complementario a otra diana. La sonda 30 se compuso utilizando el método de ligamiento de los dos primeros oligonucleótidos descrito arriba. Cada uno de los dos oligonucleótidos 34, 35 fue preparado mediante síntesis en estado sólido. Durante la
10 síntesis del oligodeoxinucleótido 34, identificado mediante un recuadro en la FIG. 3, se introdujo un nucleótido modificado en el extremo terminal 5'. El nucleótido comprende un grupo sulfhidrilo unido covalentemente al fosfato 5' por medio de un espaciador hexaalquilo. El oligonucleótido 34 se unió entonces a la parte de marcador de EDANS 37. Se utilizó el método de Connoly y Rider (1985), incorporado aquí
15 mediante referencia, para unir una forma reactiva de sulfhidrilo de EDANS (1,5-IAEDANS, Molecular Probes, Eugene, oregon) a un oligonucleótido por medio de una unión tioéter. Después, se purificó el oligonucleótido 34 mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Durante la síntesis del oligonucleótido 35, se utilizó el método de Nelson et al. (1989), que se incorpora aquí mediante referencia, para introducir un
20 grupo amino primario unido covalentemente por medio de espaciador hexaalquilo al oxígeno 3' del nucleótido del extremo terminal 3'. Se fosforilaron alrededor de 2,5 mg de oligonucleótido 35 en el extremo 5' con P^{32} utilizando polinucleótido quinasa T4. El P^{32} se usó para seguir el oligonucleótido durante la síntesis y la purificación. Después, el oligonucleótido fosforilado se disolvió en 300 μ l de 0,2 M de bicarbonato de sodio y
25 reaccionó con 300 μ l 60 mg/ml de la forma de reactivo amino de la parte de marcador 38, éster succinimidílico DABCYL (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Se añadió el reactivo amino DABCYL a una mezcla de reacción en continua agitación en 15 alícuotas de 20 μ l cada una, a lo largo de un periodo de 72 horas. Después, se precipitó la mezcla de reacción con alcohol etílico. A continuación, se purificó el
30 oligonucleótido 35 mediante HPLC. Los oligonucleótidos 34 y 35, se anillaron entonces el uno al otro y se ligaron mediante incubación con T4 ADN ligasa, a 16 °C. Los productos ligados fueron purificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de 7 M de urea. La banda que contenía la Sonda A mostró una fluorescencia blanca-azulada en presencia de urea (debido al EDANS), era de color
35 naranja (debido al DABCYL), y era radioactiva (debido al P^{32}). La Sonda A purificada se eluyó del gel y se guardó en 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 que contenía 1 mM de EDTA (Tampón TE).

EJEMPLO II: Tallo universal y método para usar el mismo

[0109] La FIG. 4 muestra la sonda 40, denominada también Sonda B, diseñada utilizando un tallo universal según esta invención. En relación con la FIG. 4, el tallo universal 41, definido por la línea 42 para mayor claridad, comprende las regiones de brazo 43, 44, a la que puede ligarse una cadena que contenga cualquier secuencia de complemento de diana, como se describe a continuación.

[0110] Para formar el tallo universal 41, se produjeron dos oligonucleótidos 43, 44 mediante síntesis en estado sólido. El oligonucleótido 43 fue fosforilado utilizando polinucleótido quinasa T4. Los oligonucleótidos 43, 44 son complementarios. Uno de ellos, en este caso el oligonucleótido 43, es 5 nucleótidos más largo que el otro, el oligonucleótido 44. En relación con la FIG. 4, esos cinco nucleótidos son 5'-ATCCG. El oligonucleótido 43 se conjugó a la parte de marcador 45, una parte de DABCYL, en el extremo 3'. El oligonucleótido 44 fue conjugado a la parte de marcador 46, una parte de EDANS, en el extremo 5'. Se llevaron a cabo estas conjugaciones y los oligonucleótidos conjugados fueron purificados como se describe en el Ejemplo I. Después, se anillaron los oligonucleótidos 43, 44 situando así las partes de marcadores 45, 46 muy próximas una de otra.

[0111] El oligonucleótido 47, preparado mediante síntesis en estado sólido, incluye una secuencia de complemento de diana, representada con una línea en la FIG. 4, flanqueada por las regiones que comprenden las partes restantes 48, 49 de las secuencias de brazo. Las partes de brazo 48, 49 se anillaron una a otra para formar un saliente complementario al saliente en el tallo universal. El saliente, 5'-CGGAT, comprende los primeros cinco nucleótidos de la parte de brazo 48. Después, el oligonucleótido 47 se anilló al tallo universal 41 y se ligó al mismo, en las condiciones del Ejemplo I. La Sonda B fue aislada de la mezcla de ligamiento mediante electroforesis en gel. Aunque las secuencias de tallo 43, 44 y las partes de brazo 48, 49 estaban anilladas por separado antes de ser mezcladas, podrían haberse anillado tras la mezcla. El tallo de brazo final de la sonda 40 comprende la combinación de las regiones 44 y 48 y las regiones 43 y 49, respectivamente.

EJEMPLO III: Síntesis de la Sonda C

[0112] La Sonda C, una sonda unimolecular mostrada en la FIG. 5, se construyó mediante el segundo método de dos oligonucleótidos descrito arriba. El oligonucleótido 51, que se extiende del extremo 5' de la sonda 50 al nucleótido 52, y el oligonucleótido 53, que se extiende desde el nucleótido 54 hasta el extremo terminal 3' de la sonda 50, fueron preparados mediante síntesis en estado sólido. El oligonucleótido 51 fue

conjugado a EDANS 55 en el extremo 5' y el oligonucleótido 53 fue conjugado a BADCYL 56 en el extremo terminal 3'. Las conjugaciones y la purificación de los oligonucleótidos conjugados se llevaron a cabo como se ha descrito en el Ejemplo I.

5 **[0113]** En este punto, las dos moléculas, los oligonucleótidos 51 y 53 pueden ser anillados para formar una sonda bimolecular de esta invención. Se formó una sonda unimolecular a partir de estos oligonucleótidos mediante el anillamiento de los mismos a un oligonucleótido puente que tiene la secuencia 5'-AATGGCAGCAATTTCCACAGTACTACAGTTAAGGC-3' y ligada a la unión de los nucleótidos 52 y 54. La sonda unimolecular fue purificada entonces mediante electroforesis como se describe en el Ejemplo I. La Sonda C tiene la misma secuencia de complemento de diana que la Sonda A pero fue diseñada para su uso en condiciones diferentes. La secuencia de complemento de diana, 5' a 3', del nucleótido 10 57 al nucleótido 58. El tallo dúplex 59 de la Sonda C tiene ocho pares de bases de longitud.

15

EJEMPLO IV: Pruebas de las sondas construidas

[0114] Este ejemplo describe la prueba para determinar si una sonda construida con secuencias de brazo de ácido nucléico es una sonda según la presente invención en unas condiciones determinadas de ensayo. Se proporcionan los datos de una de tales sondas construidas, la Sonda A, y se evalúan. Se determinó que la Sonda A era una sonda según esta invención en un ensayo a 20 °C sin ninguna sal.

[0115] Las sondas de esta invención presentan una temperatura de fusión característica, T_m , la temperatura a la que dos cadenas de ácido nucléico hibridadas se separan debido a la energía térmica. Se determinó la temperatura de fusión de la Sonda A mediante la observación del nivel de la señal de fluorescencia a medida que la temperatura aumentaba de 10 °C a 80 °C en condiciones de ensayo predeterminadas: el tampón TE sin sal añadida. La concentración de las sondas era de 150 pmoles en un volumen de tampón TE de 2 ml. Las curvas de desnaturalización o transición térmica se registraron con un fluorómetro Perkin-Elmer LS-5B. La parte de EDANS de la Sonda A fue excitada a 336 nm, y se observó el nivel de fluorescencia a 480 nm. Se muestran los resultados en la FIG. 6. El seguimiento instrumental 25 representa la curva de desnaturalización térmica de la Sonda A en las condiciones de ensayo. La T_m de la sonda se indica mediante el punto de inflexión de la curva de desnaturalización térmica. La temperatura de fusión, T_m , de la Sonda A era de 27 °C.

30 **[0116]** Los siguientes niveles de señal, en este caso, fluorescencia, se anotaron de la curva de desnaturalización térmica: un primer nivel a $T_m-10^\circ\text{C}$, un segundo nivel a $T_m+10^\circ\text{C}$, y un tercer nivel a la temperatura de detección del ensayo preseleccionado.

Una sonda construida es una sonda de esta invención en condiciones de ensayo preseleccionadas si en tales condiciones a la temperatura de detección, la adición de exceso de dianas modelo da como resultado un cambio en el nivel de señal en la dirección hacia el nivel a $T_m+10^\circ\text{C}$ en una cantidad igual a al menos el diez por ciento de la diferencia entre los niveles de señal a $T_m-10^\circ\text{C}$ y $T_m+10^\circ\text{C}$. La “diana modelo” es una cadena de ácido nucleico que contiene una secuencia complementaria a la secuencia de complemento de diana de la sonda construida y no más de un nucleótido adicional inmediatamente adyacente, 5' o 3', a la misma. A menudo, la diana real cumplirá esta definición. La concentración de sondas construidas utilizadas para medir el nivel de señal en presencia de diana modelo es la misma concentración utilizada para medir los niveles de señal en ausencia de diana, es decir, la concentración utilizada para obtener la curva de desnaturalización térmica.

[0117] En la Sonda A, los niveles de señal se determinaron mediante el seguimiento instrumental 60 presentado en la FIG. 6, como sigue: a $T_m-10^\circ\text{C}$, un nivel de dos unidades; a $T_m+10^\circ\text{C}$, un nivel de 16 unidades; y a la temperatura de detección, 20°C , un nivel de 2,5 unidades. La adición de un exceso de diana a la temperatura de detección cambió el nivel de 2,5 unidades a 14,5 unidades en 3 horas utilizando grandes excesos de diana modelo, como se describe a continuación. De ese modo, la Sonda A es una sonda de esta invención en estas condiciones de ensayo preseleccionadas.

[0118] La diana modelo era una cadena de ADN que tenía la secuencia: 5'-CAGACAATGGCAGCAATTTCCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGT-3' producida mediante síntesis en estado sólido y purificada por HPLC. La secuencia subrayada identifica la secuencia diana en la Sonda A. La diana modelo, 25 nmoles, se añadió a 2 ml de tampón TE que contenían 150pmoles de Sonda A. Se observó la fluorescencia con el paso del tiempo en un fluorómetro Perkin-Elmer LS-5B con una cubeta de cuarzo mantenida a la temperatura de detección. El seguimiento instrumental 82 en la FIG. 8 muestra los resultados. La FIG. 8 muestra que pronto se dio una alta tasa de cambio de la fluorescencia, disminuida con el paso del tiempo y se aproxima a una meseta. El punto de prueba es el nivel de la meseta, aunque, en este caso, no se necesita esperar mucho tiempo si se logra un nivel “que pase la prueba” antes. Como se reconocerá, el tiempo hasta el nivel de la meseta depende de la concentración de diana modelo. Por ejemplo, cuando se redujo la concentración de diana modelo a una quinta parte, el seguimiento instrumental 81 en la FIG. 8, no se alcanzó la meseta ni siquiera después de 10 horas.

[0119] Otra construcción, la Sonda C, se sometió a ensayo en unas condiciones preseleccionadas diferentes, 10 mM de MgCl_2 en tampón TE a 37°C . Su curva de

desnaturalización térmica, el seguimiento instrumental 61 en la FIG. 6, da su T_m a 61°C. A partir de los datos del seguimiento instrumental 61, y de la medición de la señal en presencia de un exceso de diana modelo a 37°C, se determinó que la Sonda C era una sonda según esta invención en las condiciones de ensayo preseleccionadas. Un modo de realización bimolecular de la Sonda C se sometió a ensayo en las mismas condiciones preseleccionadas utilizadas en la prueba del modo de realización unimolecular de la Sonda C unitaria. Se determinó que la sonda bimolecular era una sonda de la presente invención. Las sondas bimoleculares presentan prácticamente la misma cinética de hibridación que sus homólogas unimoleculares.

EJEMPLO V: Demostración de la función de la sonda

[0120] Se realizaron pruebas adicionales con la Sonda A para demostrar la función de la sonda. La Sonda A fue sometida a ensayo con exceso de ADN diana y con un exceso de ARN diana. El ADN diana era la diana modelo descrita arriba. El ARN diana era un ARN de 880 nucleótidos correspondiente al gen de la integrasa del VIH-1 (Muesing et al., 1985). La secuencia de la diana modelo de ADN está contenida en la secuencia de ARN diana.

[0121] Los ácidos nucleicos diana y la Sonda A fueron suspendidas en tampón TE. Se prepararon cinco tubos de plástico con tapa a presión de 0,5 ml que contenían: 1) 1.000 pmoles de ADN diana; 2) 80 pmoles de ARN diana; 3) 80 pmoles de ARN diana y 15 pmoles de Sonda A; 4) 1.000 pmoles de ADN diana y 15 pmoles de Sonda A; y 5) 15 pmoles de Sonda A. El volumen final de cada prueba se ajustó a 6 µl con tampón TE.

[0122] Mientras se iluminaban los tubos con luz ultravioleta de un Transiluminador (Modelo nº 3-3100, Fotodyne, New Berlin, Wisconsin), se mezclaron los tubos pipeteando suavemente dos veces con una micropipeta Gilson. Se observó una fluorescencia azul intenso, que indica que la detección de las dianas por la Sonda A se observó a simple vista y se fotografió. Los resultados 71-75, correspondientes a los tubos 1-5, respectivamente, se muestran en la FIG. 7.

[0123] La aparición de una señal fluorescente fue prácticamente instantánea en el tubo que contenía el ADN diana y se produjo en algunos minutos en el tubo con el ARN diana. Se cree que el retraso con el ARN diana se debe a la cantidad más baja de diana utilizada, aunque podría deberse al secuestro de la secuencia diana por las secuencias de alrededor en el ARN. En una prueba de control, se mezclaron ácidos nucleicos no relacionados con la Sonda A. No se observó fluorescencia en estos controles (datos no mostrados).

[0124] A partir de los resultados de estos experimentos, deducimos que: a) en ausencia de diana, las sondas bien diseñadas de esta invención presentan un nivel de señal de fondo muy bajo; b) la hibridación sonda-diana puede producir un cambio de señal detectable para el ojo humano; c) las sondas de esta invención funcionan tanto con dianas de ADN como de ARN; y d) en presencia de diana, las sondas de esta invención pueden “encenderse” muy rápidamente, en escasos segundos. Además, el enfriamiento o calentamiento rápido de la Sonda A en ausencia de secuencia diana demostró que la sonda también se “apaga” muy rápidamente, casi de manera instantánea.

[0125] La muestra usada en la prueba descrita en la FIG. 8, el seguimiento 82, fue calentada posteriormente a 95°C, enfriada rápidamente en un baño de hielo, e incubada de nuevo a 20°C, la temperatura de detección. Se siguió la cinética de la generación de señal como antes. El seguimiento durante la incubación a 20°C fue casi indistinguible del seguimiento 82. Esto demuestra que con sondas unimoleculares bien diseñadas de esta invención que tengan brazos de oligonucleótidos como par de afinidad, los híbridos sonda-diana son desnaturalizables térmicamente de forma reversible. Así, estos modos de realización son adecuados para su incorporación en las reacciones de ciclo térmico, como para PCR, para la detección en tiempo real de productos de amplificación.

EJEMPLOS VI: Ensayos

[0126] Los ensayos que utilizan las sondas de esta invención empiezan simplemente con la adición de las sondas al material de interés en condiciones que sean propicias para la hibridación. Los métodos para procesar las muestras y observar la señal de fluorescencia pueden variar con la naturaleza de las muestras. Los tejidos pueden fragmentarse mecánicamente o mediante incubación con sales caotrópicas. Los tejidos más fragmentados pueden usarse directamente en los ensayos. Sin embargo, algunos tejidos contienen materiales fluorescentes de manera natural que pueden interferir con la detección de la señal. En esos casos, los ácidos nucleicos pueden aislarse de los materiales fluorescentes bien antes o bien después de la hibridación. La fluorescencia de las sondas abiertas puede ser observada mediante fluorómetros.

[0127] Las sondas unitarias preferidas de la presente invención son útiles en pruebas de campo para las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, una prueba para la malaria puede comenzar con la adición de tiocianato de guanidina a una muestra de sangre para la lisis de las células, la desintoxicación de las células y la desnaturalización de los componentes. Un gran exceso de sonda (en relación con la concentración de diana máxima esperada) que es complementaria al ARN ribosómico de los parásitos de la

malaria pueden añadirse entonces, y se permite que ocurra la hibridación. Se puede observar la fluorescencia de las sondas abiertas visualmente o con la ayuda de un fluorómetro. La detección de una señal fluorescente positiva indica una infección por el parásito de la malaria.

5 **[0128]** Las sondas según esta invención pueden usarse para localizar fragmentos de ácido nucleico específicos en un gel u otro medio, por ejemplo en el que se desea información sobre el tamaño de un ácido nucleico determinado. Los ácidos nucleicos en la muestra pueden ser primero fraccionados mediante electroforesis en gel y después bañar el gel en una solución que contenga las sondas. La localización en el
10 gel a la que migren los ácidos nucleicos diana será detectable por la señal característica como resultado de la hibridación.

[0129] Las sondas de la presente invención, preferentemente unimoleculares, preferentemente con un fluorescente y un extintor como partes de marcador, pueden utilizarse como colorantes vitales para la detección de células que albergan un ácido
15 nucleico diana. Los nucleótidos modificados son especialmente útiles para tales sondas. Para situar las sondas en las células, se añade un agente permeabilizante, como tolueno, al tejido antes de la adición de las sondas. Alternativamente, las sondas pueden ser encapsuladas en liposomas y estos liposomas se funden con las células. Tras la llegada de las sondas, tiene lugar la hibridación dentro de las células. Cuando
20 el tejido se observa con un microscopio fluorescente, las células que contienen el ácido nucleico diana se verán fluorescentes. La localización subcelular de un ácido nucleico diana también puede percibirse en estos experimentos.

[0130] La producción de ácidos nucleicos en las reacciones de síntesis puede observarse incluyendo las sondas diseñadas de manera adecuada en la mezcla de
25 reacción y observando el nivel de señal, p.ej., la fluorescencia, en tiempo real. Las sondas deben ser diseñadas para que sean complementarias a un segmento de ácido nucleico que sea producido. Los ejemplos de tales reacciones son la síntesis de ARN por ARN polimerasa dependiente de ADN y por Q-beta replicasa. Las sondas unimoleculares son especialmente útiles en el seguimiento de una reacción en
30 cadena de la polimerasa, puesto que se abren y se cierran a una velocidad mayor que la de los ciclos térmicos utilizados en esta reacción. Una temperatura adicional en cada ciclo, que es de 5-12°C más baja que la temperatura de fusión del tallo de la sonda, puede incluirse como temperatura de detección. En cada ciclo, el nivel de fluorescencia indicará la cantidad de cadena de ADN diana presente. Debe utilizarse
35 en la mezcla de reacción un exceso de sondas, como un exceso de cebadores de PCR. La PCR puede ser asimétrica. La observación en tiempo real de los productos correctos, en oposición a la detección de punto final, mejora la precisión y el margen

dinámico de las estimaciones de las concentraciones de ácido nucléico diana de las reacciones en cadena de polimerasa y elude la necesidad de análisis posterior a la amplificación.

5 [0131] Las sondas de esta invención pueden usarse también para controlar otras reacciones de amplificación de ácido nucléico, como las reacciones de amplificación por desplazamiento de hebra y las reacciones de replicación automantenida de secuencia. Se diseñan sondas útiles y se utilizan de manera similar a las sondas para productos de la reacción en cadena de polimerasa.

10 EJEMPLO VII: Sondas sujetas

[0132] Las sondas de la presente invención pueden usarse en ensayos en los que estén sujetas a un soporte sólido como se ha explicado arriba y como se muestra en la FIG. 10.

15 [0133] En un modo de realización preferido, se preparan múltiples sondas. Cada sonda contiene una secuencia de complemento de diana única. Todas pueden contener el mismo par de marcadores, un fluoróforo y un extintor. Cada sonda también incluye una cadena de oligonucleótidos que se extiende desde el extremo de un brazo.

20 [0134] Cada sonda se encuentra sujeta mediante una cadena de oligonucleótidos a una localización específica en una tira reactiva asignada a la misma. El diseño permite a las secuencias de complemento de diana participar libremente en la hibridación homogénea. En un ensayo en el que se usa este modo de realización, la tira reactiva está en contacto con una muestra que puede contener una o varias secuencias diana diferentes.

25 [0135] Las sondas sujetas interactúan entonces con sus secuencias diana correspondientes. Las sondas que interactúan de dicho modo cambiarán al estado abierto. La tira reactiva se ilumina con luz de una frecuencia apropiada. La fluorescencia de determinadas ubicaciones en la tira reactiva indica la presencia de las secuencias diana correspondientes. Serán evidentes otras configuraciones de los
30 ensayos de la sonda sujeta para aquellos expertos en la técnica.

REFERENCIAS

[0136] Cardullo, R.A., Agarwal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C. y Wolf, D.E., (1988), Detection of hybridization by nonradiative fluorescence energy transfer, Proc. Natl.
35 Acad. Sci. U.S.A. 85, 8790-8794.

- [0137] Connolly, B.A. y Rider, P., (1985), Chemical synthesis of oligonucleotide containing a free sulphhydryl group and a subsequent attachment of thiol specific probes, *Nucleic Acids Res.* 13, 4485-4502.
- 5 [0138] Diamond, S.E., Brewen, J.G., Williams, J.I., Ellwood, M.S., Collins, M. y Fritsch, E.F., (1988), Displacement polynucleotide assay method and polynucleotide complex reagent therefor, *Patente estadounidense nº 4,766,062.*
- [0139] Erlich, H.A., Gelfand, D. y Sninsky, J.J., (1991), Recent advances in the polymerase chain reaction, *Science* 252, 1643-1651.
- 10 [0140] Gillespie, D. y Spiegelman, S., (1956), A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane, *J. Mol. Biol.* 12, 829-852.
- [0141] Guatelli, J.C., Whitfield, K.M., Kwok, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D. and Gingeras, T.R., (1990), Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1874-1878.
- 15 [0142] Heller, M.J., Morrison, L.E., Prevatt, W.D. y Akin, C., (1983), Homogeneous nucleic acid hybridization diagnostics by nonradiative energy transfer, *Solicitud de patente europea 070685.*
- [0143] Landegren, U., (1993), Molecular mechanics of nucleic acid sequence amplification, *Trends Genet.* 9, 199-204.
- 20 [0144] Lichter, P., Tang, C.J.C., Call, K., Hermanson, G., Evans, G.A., Housman, D. and Ward, D.C., (1990), High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones, *Science* 247, 64-69.
- [0145] Lomeli, H., Tyagi, S., Pritchard, C.G., Lizardi, P.M. y Kramer, F.R., (1989), Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes, *Clin. Chem.* 25 39, 1826-1831.
- [0146] Matayoshi, E.D., Wang, G.T., Krafft, G.A. y Erickson, J.E., (1990), Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer, *Science* 247, 954-958.
- [0147] Morrison, L.E., (1987), Competitive homogeneous assays, *Solicitud de patente europea 87300195.2*
- 30 [0148] Morrison, L.E., (1989), Lifetime-resolved assay procedures, *Patente estadounidense nº 4,822,733.*
- [0149] Morrison, L.E., Halder, T.C. y Stols, L.M., (1989), Solution phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization, 35 *Analyt. Biochem.* 183, 231-244.

- [0150] Morrison, L.E. y Stols, L.M., (1993), Sensitive fluorescence-based thermodynamic and kinetic measurements of DNA hybridization in solution, *Biochemistry* 32, 3095-3104.
- [0151] Muesing, M.A., Smith, D.H., Cabrilla, C.D., Benton, C.V., Lasky, L.A. y Eopon, D.J., (1985), Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/adenopathy retrovirus, *Nature* 313, 450-458.
- [0152] Nelson, P.S., Fry, R.A. y Liu, E., (1989), Bifunctional oligonucleotide probes synthesized using a novel CPG support are able to detect single base pair mutations, *Nucleic Acids Res.* 17, 7187-7194.
- 10 [0153] Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., (1989), *Molecular cloning--a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0154] Shore, D., Langowski, J. and Baldwin, R.L., (1981), DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4833-4827.
- 15 [0155] Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G. y Malinowski, D.P., (1992), Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique, *Nucleic Acids Res.* 20, 1691-1696.
- [0156] Wang, G.T., Matayoshi, E.D., Huffaker, H.J. y Krafft, G.A., (1991), Design and synthesis of new fluorogenic HIV protease substrates based on resonance energy transfer, *Tetrahedron Lett.* 31, 6493-6496.
- 20

Reivindicaciones

1. Un proceso para la detección de la presencia o ausencia de al menos una secuencia diana de ácido nucléico que comprende:
 - 5 i. añadir a una muestra que pueda contener dicha al menos una secuencia diana una sonda de hibridación de oligonucleótidos con conformación doble que tiene una secuencia de complemento de diana hibridable a dicha al menos una secuencia diana flanqueada por un par de secuencias de brazo complementarias que pueden interactuar de
 - 10 manera reversible y son capaces de hibridar entre ellas para formar un tallo dúplex y en el que las secuencias de brazo complementarias están marcadas, respectivamente, con un par de partes de marcadores interactivas, en las que al menos una de las partes de marcadores puede modificar una característica físicamente medible de la otra parte de marcador cuando se encuentra muy cerca de la otra parte de marcador mencionada, pero no cuando se encuentran lo suficientemente separadas; y
 - 15 ii. detectar a una temperatura que es al menos 5°C más baja que la temperatura de fusión de dicho tallo dúplex, como indicador de la presencia de dicha al menos una secuencia diana en la muestra, un cambio en la característica físicamente medible en condiciones en las que la secuencia de complemento de diana hibrida con dicha al menos una secuencia diana y las secuencias de brazo complementarias se separan dando lugar a la disolución del dúplex.
 - 25 2. El proceso de la reivindicación 1 en el que el par de marcadores son una parte luminiscente y una parte extintora.
 3. El proceso de la reivindicación 2 en el que el par de marcadores es un par de FRET y en el que la parte luminiscente es un fluoróforo, p.ej., EDANS, y la parte extintora es un extintor no fluorescente, p.ej., DABCYL.
 - 30 4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 en el que dicha muestra es un tejido fijado y dicha detección es una detección *in situ* sin destrucción del tejido.
 5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 en el que el proceso es un ensayo *in vitro* y la secuencia diana es una secuencia de ácido nucléico en una célula viva.
 - 35 6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 en el que la muestra se encuentra en un gel.

7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6 para la detección de la presencia o ausencia de al menos dos secuencias diana que comprende añadir a la muestra una sonda de conformación doble hibridable con cada secuencia diana y generar una señal que es diferente y no interfiere con la señal de otra sonda o sondas de conformación doble.
- 5

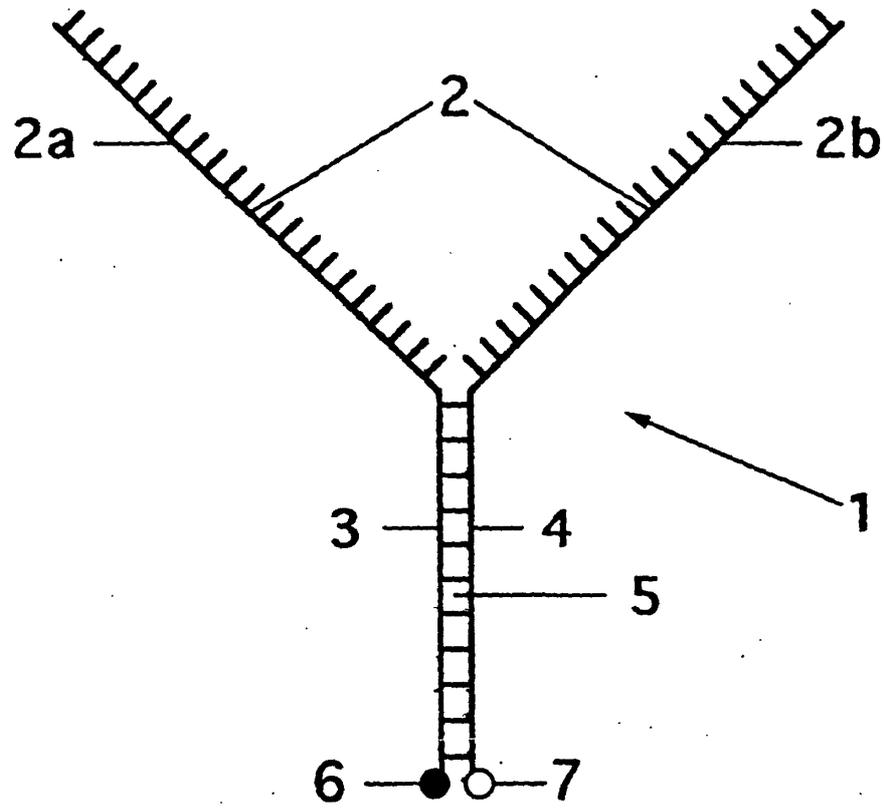


FIG. 1

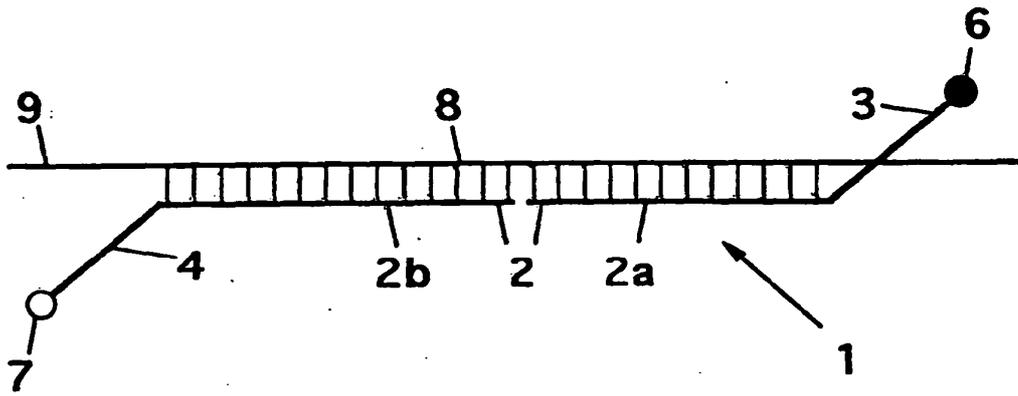


FIG. 2

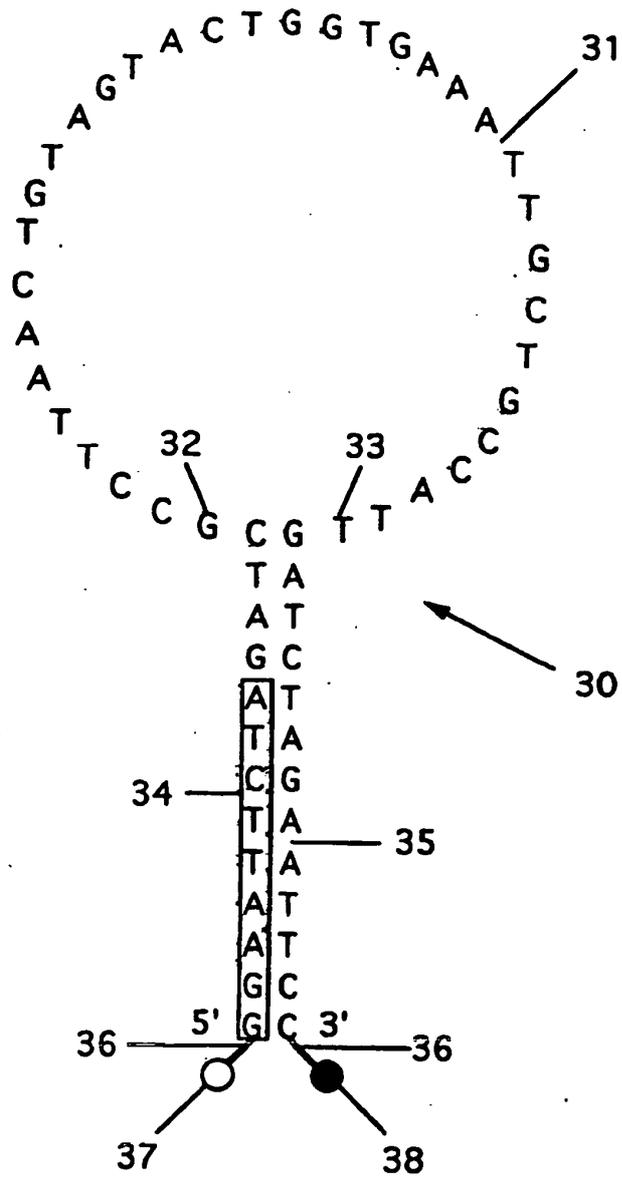


FIG. 3

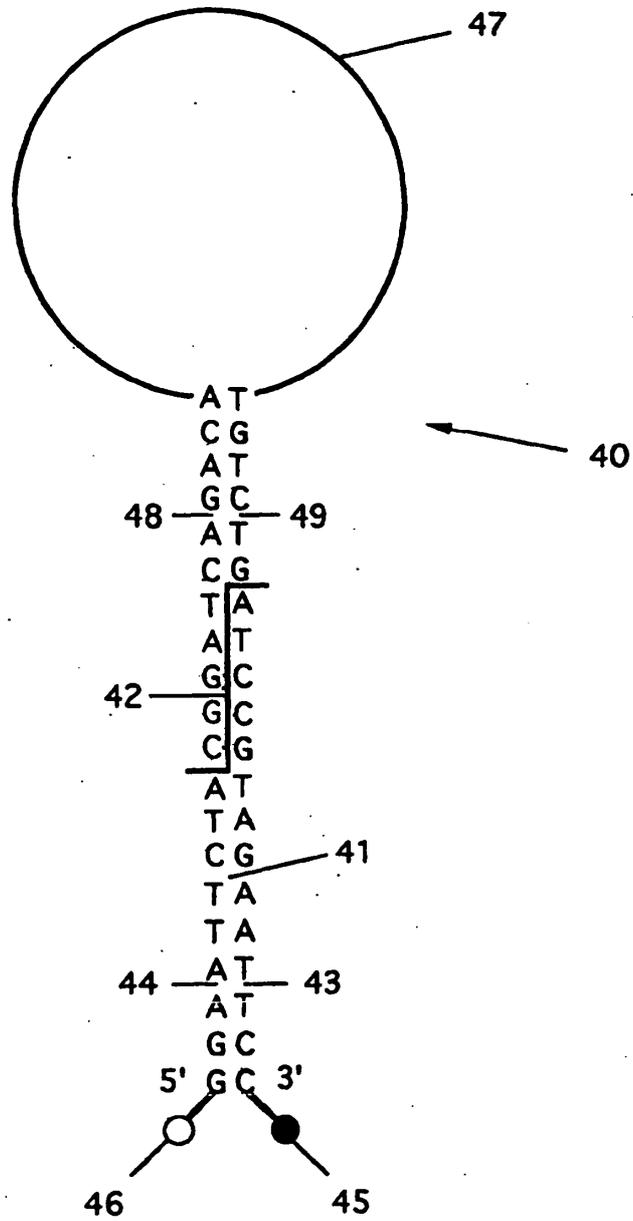


FIG. 4

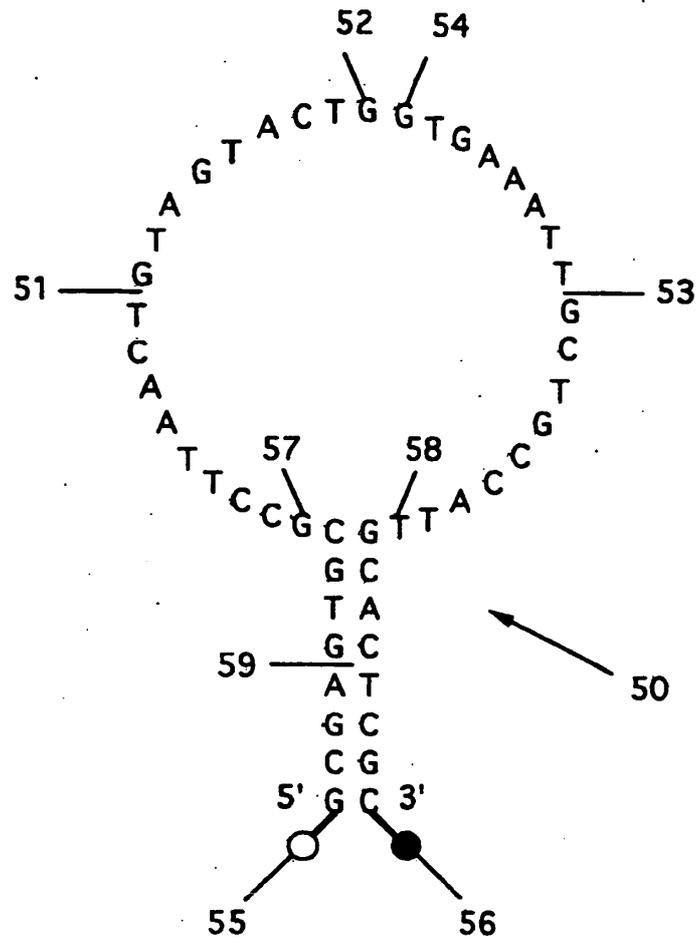


FIG. 5

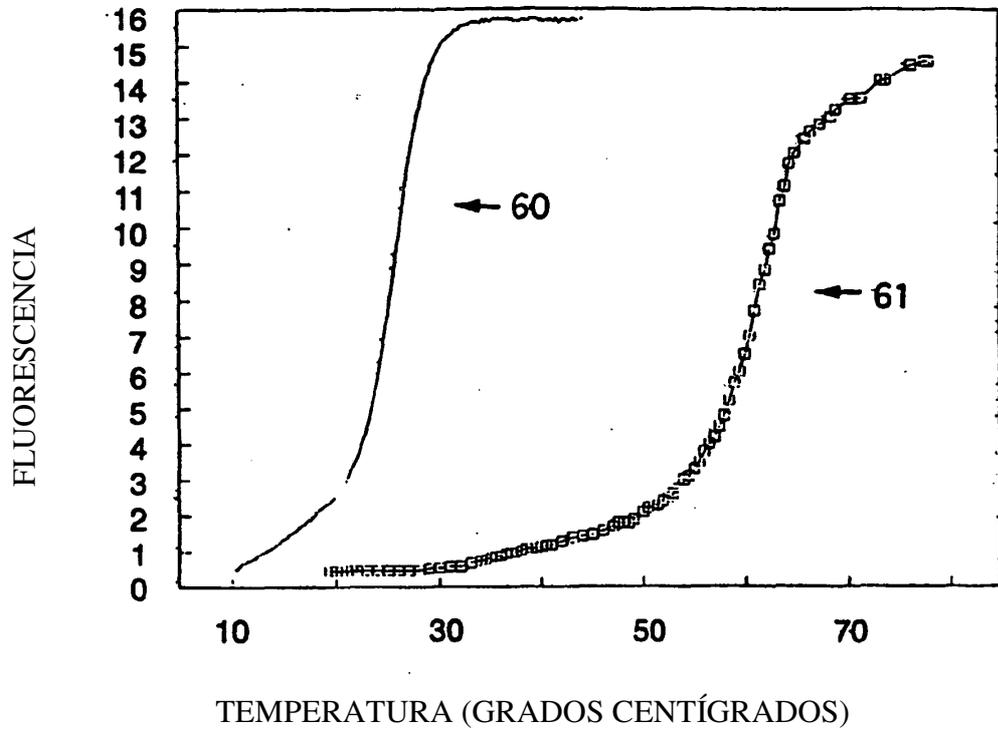


FIG. 6

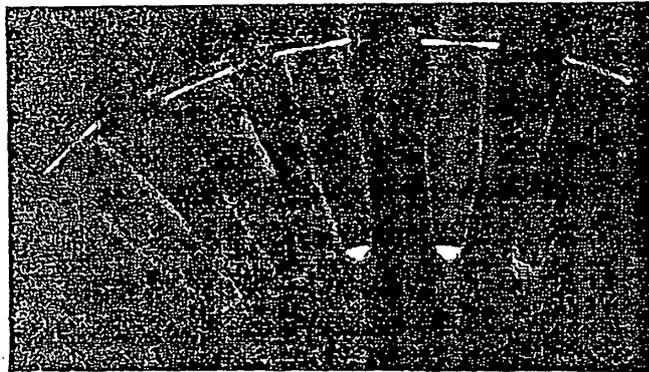
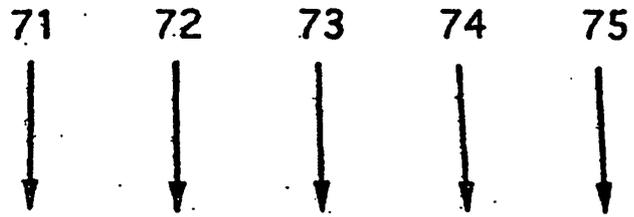


FIG. 7

Cinética de hibridación

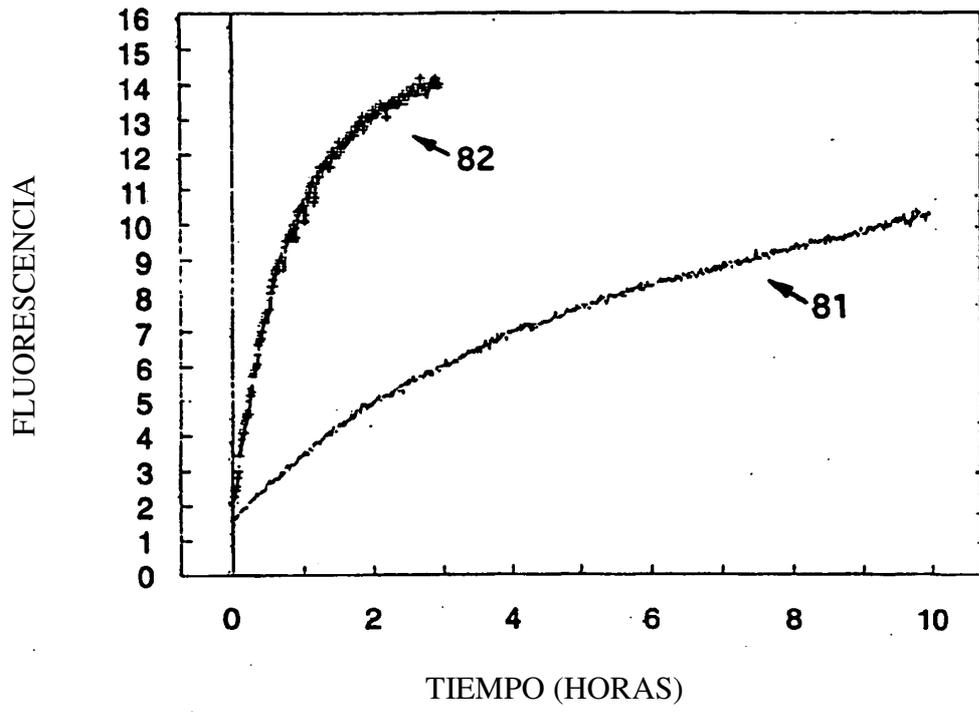


FIG. 8

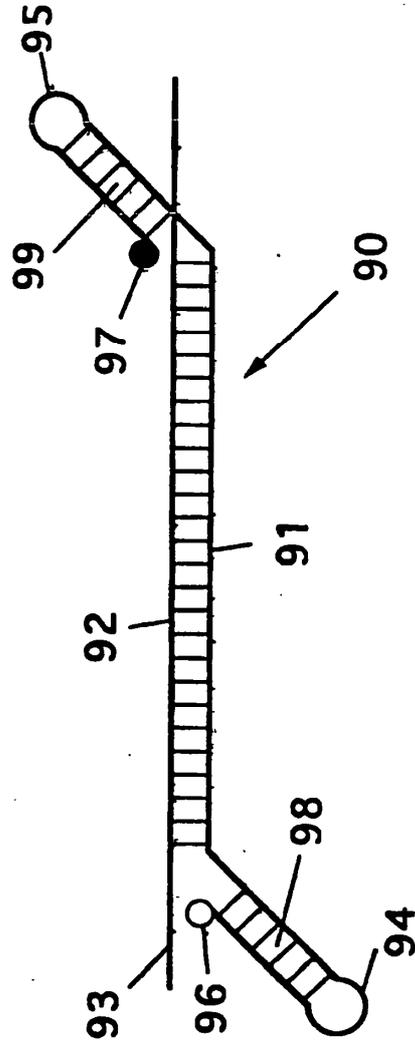


FIG. 9

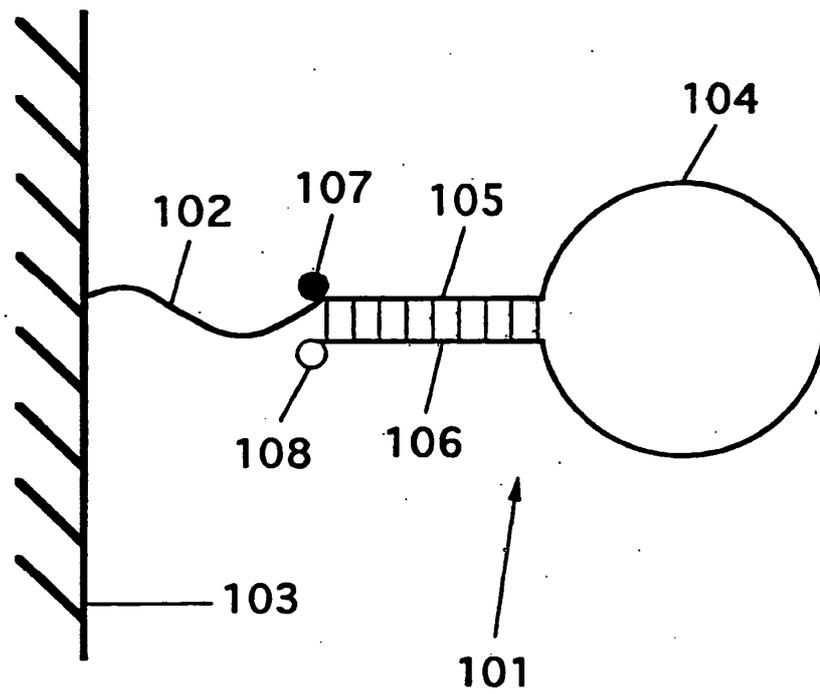


FIG. 10