

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 487**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08731668 .3**
- 96 Fecha de presentación: **07.03.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2134861**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

54 Título: **Método para el análisis de fusión de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:
08.03.2007 US 905721 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.08.2012

73 Titular/es:
**IDAHO TECHNOLOGY
390 WAKARA WAY
SALT LAKE CITY, UT 84108, US y
UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION**

72 Inventor/es:
**WITTWER, Carl T.;
ZHOU, Luming y
PORITZ, Mark Aaron**

74 Agente/Representante:
Durán Moya, Luis Alfonso

ES 2 386 487 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

Método para el análisis de fusión de ácidos nucleicos

5 PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos Número 60/905.721 solicitada el 8 de marzo del 2007, titulada Primers for Melting Analysis ("Cebadores para el análisis de fusión").

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El proyecto del genoma humano ha conseguido secuenciar la mayoría de regiones del ADN humano. El trabajo de identificación de los genes y alteraciones en las secuencias asociadas con enfermedades continúa a un ritmo rápido. Se utilizan estudios de ligamiento para asociar un fenotipo con marcadores genéticos, tales como repeticiones simples de la secuencia o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para identificar genes candidatos. Las alteraciones en las secuencias, que incluyen SNP, inserciones y deleciones que provocan mutaciones de sentido erróneo, desplazamientos del marco o de corte y empalme, se pueden utilizar entonces para localizar el gen y el espectro de mutaciones responsables.

20 Sin embargo, incluso cuando los detalles genéticos son conocidos, es difícil utilizar este conocimiento en la práctica médica de rutina, en gran parte porque los métodos para analizar el ADN son caros y complejos. Cuando los costes disminuyan de manera significativa y los métodos se simplifiquen drásticamente, se espera que los análisis de ADN sean accesibles para la utilización en la práctica clínica diaria para la detección eficaz de enfermedades y un mejor tratamiento. El análisis ideal de ADN es rápido, sencillo y económico.

25 Cuando una enfermedad está causada por un número limitado de mutaciones, o cuando unas cuantas alteraciones en las secuencias constituyen una proporción amplia de los casos de enfermedades, es viable el genotipado directo. Los métodos tradicionales varían desde la digestión por restricción clásica de productos de PCR hasta métodos fluorescentes en tubo cerrado. Los métodos en tubo cerrado del análisis de ADN pueden ser sencillos de realizar. 30 Una vez se inicia la PCR, no son necesarias adiciones o separaciones posteriores de reactivo. Sin embargo, los métodos en tubo cerrado son habitualmente caros debido, en gran parte, al coste de las sondas fluorescentes utilizadas. Aunque existen muchos diseños refinados, las sondas son a menudo complejas con múltiples colorantes fluorescentes y/o grupos funcionales. Por ejemplo, una estrategia habitual utiliza una sonda fluorescente y un inhibidor ("quencher"), unidos cada uno de manera covalente a una sonda específica de alelo (1). Son necesarias 35 dos de estas sondas "TaqMan[®]" para obtener el genotipo de un SNP. No sólo son costosas las sondas, sino que el tiempo requerido para la hibridación y la separación con la exonucleasa también limita la velocidad a la se puede realizar la PCR.

40 Otro ejemplo de genotipado con tubo cerrado utiliza cebadores Scorpion[®], disponibles de DxS Ltd. Los cebadores Scorpion[®], o "amplicones de autosondeo," descritos originalmente en 1999, se forman durante la PCR a partir de un cebador que incluye una extensión 5' que comprende un elemento sonda, una pareja de secuencias tallo autocomplementarias, una pareja de fluoróforo/inhibidor y un monómero de bloqueo para evitar la copia de la extensión 5' (2). Tal como se ilustra en la figura 1, en el formato de tallo-bucle original, el elemento sonda forma el bucle, y el tallo acerca de manera próxima el fluoróforo y el inhibidor. Después de la PCR, el elemento sonda se 45 hibrida a una parte del producto de extensión, abriendo el tallo y separando el fluoróforo del inhibidor. Posteriormente, se desarrolló un formato de doble cadena adicional, también mostrado en la figura 1, en que el fluoróforo en el cebador Scorpion[®] es inhibido por un inhibidor en una sonda complementaria separada que forma una doble cadena antes de la PCR (3). Después de la PCR, el elemento sonda, que ahora es parte del amplicón, se separa de la sonda inhibidora y se hibrida al amplicón. En ambos casos, el sondeo es una reacción intramolecular.

50 Existen varias ventajas de las reacciones intramoleculares sobre las sondas intermoleculares. En primer lugar, la hibridación intramolecular es rápida y no es una etapa limitante, incluso con los protocolos PCR actuales más rápidos (4). El elemento de sonda se estabiliza mediante la reacción intramolecular, incrementando las temperaturas de fusión de la sonda en aproximadamente 5-15°C, de manera que se pueden utilizar sondas más cortas, de manera 55 ilustrativa en áreas de variación de secuencia elevada. En el formato de tallo-bucle, un único nucleótido sirve como uno de los cebadores y como sonda. Sin embargo, dichas sondas pueden ser complejas y caras. El coste elevado está provocado por la complejidad elevada para producir ciertas sondas. Por ejemplo, cada cebador Scorpion[®] requiere tres modificaciones en el cebador de oligonucleótido (un fluoróforo, un inhibidor y un bloqueador). Sería deseable un sistema de genotipado de tubo cerrado que mantenga las ventajas de los cebadores Scorpion[®], pero 60 que elimine su complejidad y coste.

Se ha utilizado otro método para el genotipado "Polimorfismo de conformación de cadena simple Snapback o SSCP". El SSCP utiliza un cebador de una secuencia específica para introducir una estructura secundaria en los

productos de la PCR que son posteriormente separados mediante electroforesis para revelar los polimorfismos de conformación de cadena simple ("SSCP") (5). En el SSCP Snapback, una cola del cebador complementario de 8-11 pb forma un bucle cerrado en su secuencia complementaria en el producto de extensión, creando una horquilla en el amplicón de cadena simple, que posteriormente se detecta mediante separación en gel.

Tal como se ha descrito más arriba, se pueden utilizar cebadores Snapback para introducir una estructura secundaria de bucle en un producto de extensión. Sin embargo, los cebadores Snapback y otros métodos de la técnica anterior divulgados en la presente invención dependen de la separación en gel posterior a la amplificación, o la utilización de caros cebadores marcadores de manera fluorescente. En comparación, los métodos de la presente invención utilizan un colorante de dsADN y un análisis de fusión para hacer un seguimiento de la hibridación de la horquilla. Según un aspecto de la presente solicitud, después de la PCR, de manera ilustrativa, pero sin limitarse a una PCR asimétrica, la fusión intramolecular de la horquilla permite el genotipado. La hibridación intramolecular se muestra en la figura 2. El método es sencillo porque sólo son necesarios dos cebadores de PCR, siendo la única adición una cola 5' de nucleótidos en, como mínimo, un cebador. No se requieren fluoróforos, inhibidores o bloqueadores covalentes, reduciendo ampliamente el coste de la síntesis y el desarrollo de ensayos. De este modo, en una realización ilustrativa, el colorante de dsADN se desencadena y está libre para unirse y ser liberado del ácido nucleico solamente en base a la fusión.

Una cuestión que ha impedido un método mejor de genotipado gira en torno al hecho de que la mayoría de enfermedades genéticas son complejas. Muchas alteraciones diferentes en las secuencias en los mismos o diferentes genes pueden contribuir a un fenotipo de la enfermedad. La esperanza inicial de que la mayoría de enfermedades humanas estén causadas por un grupo de variantes de secuencia se ha demostrado que no es cierta. Muchos genes pueden contribuir a un fenotipo particular y muchas mutaciones diferentes en un gen pueden causar los mismos patrones de la enfermedad o similares. Por lo tanto, para determinar la unión entre un genotipo y su fenotipo resultante, las pruebas genéticas requieren a menudo un análisis paralelo de muchas regiones codificantes y reguladoras. Existen varios métodos de cribado de ADN para anomalías y son conocidos como métodos de "rastreo". Mientras que el "genotipado" se centra en la detección de alteraciones específicas en las secuencias, el rastreo de mutaciones puede señalar la presencia de una anomalía, la cual se puede identificar a continuación a través de métodos, tales como el genotipado o la secuenciación.

La secuenciación es actualmente el patrón de referencia para la identificación de la variación de secuencia. Aunque están disminuyendo los costes, la secuenciación es todavía un proceso complejo que no es rápido, sencillo o económico cuando se aplica al diagnóstico genético específico o la farmacogenética. Esto sigue siendo cierto para métodos que utilizan colonias (colonias de polimerasa) (6) o PCR de emulsión (7). La secuenciación estándar requiere siete etapas: 1) amplificación mediante PCR, 2) lavado del producto de la PCR, 3) adición de reactivos de secuenciación en ciclos, 4) secuenciación en ciclos para la terminación didesoxi, 5) lavado de los productos de terminación, 6) separación mediante electroforesis capilar, y 7) análisis de los datos. Esta complejidad se puede automatizar y se ha realizado en algunos centros de secuenciación, pero la secuenciación sigue siendo mucho más compleja que los métodos de la presente invención. Además, cuando se analizan genes grandes o múltiples genes, sobre el 90% de los productos secuenciados se vuelven normales. Un método sencillo que pudiera identificar secuencias normales y variantes habituales eliminaría la mayor parte del tiempo, coste y esfuerzo de la secuenciación.

Los cebadores Snapback de la presente invención se pueden utilizar para integrar el rastreo de mutaciones y el genotipado en la misma reacción. El rastreo se puede realizar mediante fusión de amplicón de resolución elevada (8) en la misma reacción y utilizando la misma curva de fusión que el genotipado Snapback. La PCR asimétrica para el genotipado Snapback da lugar a dos especies con diferentes transiciones de fusión, una cadena simple en exceso en una conformación de horquilla y un producto de PCR de cadena doble, preferentemente fundiéndose cada especie a una temperatura diferente. De manera ilustrativa, la horquilla Snapback se fundirá a temperatura baja, y el amplicón de longitud completa se fundirá a temperatura elevada. La horquilla proporciona un genotipado dirigido para variantes habituales, mientras que el amplicón de longitud completa permite el rastreo de cualquier variante de secuencia en el producto de la PCR. De manera similar, se puede utilizar la PCR simétrica utilizando dos cebadores Snapback para rastrear y genotipar dos polimorfismos conocidos en una reacción. En un gen bien caracterizado con una fusión de amplicón precisa, se cree que el genotipado Snapback puede eliminar habitualmente, como mínimo, el 90%, y quizás, como mucho, el 99% de la necesidad de secuenciación en el análisis de la enfermedad genética compleja.

El rastreo y genotipado combinados con cebadores Snapback son atractivos porque sólo son necesarios reactivos de PCR y un colorante de dsADN. No son necesarios oligonucleótidos modificados caros, separaciones, purificaciones o etapas de adición de reactivos. El análisis de tubo cerrado elimina el riesgo de contaminación de la PCR. Además, el apareamiento de cebadores Snapback es rápido y compatible con los protocolos de PCR más rápidos.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Por consiguiente, se dan a conocer aquí cebadores Snapback en varias configuraciones.

5 En un aspecto de la presente invención, se da a conocer un método para el análisis de ácidos nucleicos, comprendiendo el método las etapas de mezclar un ácido nucleico diana con un primer cebador y un segundo
 10 cebador para formar una mezcla, estando los cebadores configurados para amplificar el ácido nucleico diana, en el que el primer cebador comprende un elemento sonda específico para un locus del ácido nucleico diana y una región
 15 cebadora específica de plantilla, en el que el elemento sonda de 5' de la región cebadora específica de plantilla y en el que el primer cebador es un oligonucleótido que no presenta colorantes unidos covalentemente o inhibidores que
 amplifiquen el ácido nucleico diana para generar un amplicón, permitiendo que el elemento sonda se hibride al locus para formar una horquilla, generando una curva de fusión para el elemento sonda mediante la medición de la
 fluorescencia de un colorante que se une a dsADN a medida que se calienta la mezcla, en el que el colorante no está unido covalentemente al primer cebador, y analizando la forma de la curva de fusión. En la presente invención
 se dan a conocer un conjunto de variaciones de este método.

DESCRIPCION BREVE

20 La figura 1 muestra un esquema de la acción de cebadores Scorpion®. El círculo negro es el bloqueador, el círculo rojo es el inhibidor, el círculo verde pequeño es el fluoróforo inhibido y el círculo verde grande es el fluoróforo no
 inhibido.

La figura 2 muestra la hibridación intramolecular de un cebador Snapback.

25 La figura 3 muestra el genotipado de SNP utilizando un colorante de saturación y sondas de oligonucleótidos no
 marcadas.

La figura 4 es un esquema de genotipado utilizando cebadores Snapback.

30 La figura 5A muestra un genotipado que utiliza un cebador Snapback siguiendo una PCR simétrica. Los genotipos
 mostrados son C/C (azul), A/A (negro) y A/C (rojo).

La figura 5B muestra un genotipado que utiliza un cebador Snapback con un bloqueador de la extensión.

35 La figura 6A representa cebadores Snapback que tienen elementos sonda con longitudes diferentes.

La figura 6B es una representación de la derivada de la fusión de productos de amplificación de elementos sonda de
 la figura 6A.

40 Las figuras 6C-F muestran representaciones de la derivada de la fusión para el genotipado de SNP utilizando
 cebadores Snapback que tienen elementos sonda con longitudes diferentes: la figura 6C tiene un elemento sonda de
 8 bases; la figura 6D tiene un elemento sonda de 14 bases; la figura 6E tiene un elemento sonda de 20 bases; la
 figura 6F tiene un elemento sonda de 24 bases.

45 La figura 6G muestra las temperaturas de fusión previstas y observadas para diferentes longitudes de dobles
 cadenas en horquilla que varían de 6 a 28 pb. Los errores en el apareamiento de bases no estaban presentes en el
 extremo 5' de los cebadores snapback. Las temperaturas de fusión previstas (cuadrados llenos) se determinaron
 mediante cálculos estándar de los vecinos más próximos, incluyendo extremos colgantes en ambas partes, pero sin
 50 considerar el bucle de la horquilla. Después de la PCR asimétrica y fusión, se determinaron las Tf observadas
 (círculos llenos) como las alturas máximas de los picos en las representaciones de la derivada negativa después de
 la normalización y la resta del ruido de fondo exponencial. El % de GC de la doble cadena en horquilla variaba de
 8,3 a 32,1%.

55 Las figuras 7A-B representa un posible mecanismo para la inhibición de la PCR con cebadores Snapback,
 mostrando la figura 7A una posible extensión desde el extremo 3' de la cadena menor y mostrando la figura 7B cómo
 un error de apareamiento de dos bases evita su extensión.

60 La figura 7C muestra representaciones de la derivada normalizada de la fusión para cien muestras clínicas utilizando
 un cebador Snapback que tiene un error de apareamiento de dos bases del tipo representado en la figura 7B. Los
 genotipos fueron del tipo natural homocigótico (negro), heterocigótico (gris claro) y mutante homocigótico (gris
 oscuro).

La figura 8A muestra las representaciones de las derivadas de la fusión de elementos sonda de 8, 12, 16 y 20 bases

en cebadores Snapback que tienen un error de apareamiento de dos bases para evitar la extensión desde la horquilla.

5 La figura 8B muestra las representaciones de las derivadas de la fusión de elementos sonda de 12 y 20 bases después de la amplificación asimétrica con plantillas homocigóticas y heterocigóticas apareadas.

La figura 9A representa amplicones Snapback de longitudes variables, en los que las longitudes de los amplicones son: 1 = 120 pb, 2 = 180 pb, 3 = 221 pb, 4 = 271 pb y 5 = 321 pb.

10 La figura 9B muestra representaciones de la derivada de la fusión de los amplicones de la figura 9A, negro (120 pb), rojo (180 pb), azul (221 pb), verde (271 pb) y amarillo (321 pb).

La figura 10A representa amplicones Snapback que tienen diversos tamaños de bucle. Las longitudes de bucle son: 0R = 17 bases, 1R = 34 bases, 2R = 88 bases, 3R = 135 bases, 4R = 177 bases y 5R = 236 bases.

15 La figura 10B muestra representaciones de la derivada de la fusión de los amplicones de la figura 10A. No se realizó la resta del ruido de fondo exponencial, lo que explica la pendiente descendente de la curva de la derivada.

20 La figura 11A muestra representaciones de la derivada de la fusión, en las que se utilizó un cebador Snapback para amplificar cuatro plantillas homocigóticas diferentes, cada una variando únicamente con una base diferente en la posición variable.

25 La figura 11B muestra representaciones de la derivada de la fusión, en las que se utilizó un cebador Snapback para amplificar una plantilla homocigótica apareada y tres plantillas heterocigóticas diferentes, cada una compartiendo un alelo apareado.

30 La figura 11C muestra representaciones de la derivada de la fusión, en las que se utilizó un cebador Snapback para amplificar una plantilla homocigótica apareada y tres plantillas heterocigóticas diferentes con ambos alelos desapareados con respecto al elemento sonda.

35 Las figuras 12A-B muestran representaciones de la derivada de la fusión, en las que el cebador Snapback presenta un error de apareamiento cerca de los extremos de un elemento sonda de 22 bases. La figura 12A demuestra un error de apareamiento en la posición 2, mientras que la figura 12B presenta un error de apareamiento en la posición 20.

Las figuras 12C-D muestran representaciones de la derivada de la fusión, en las que el cebador Snapback presenta un error de apareamiento cerca del centro de un elemento sonda de 22 bases. La figura 12C presenta un error de apareamiento en la posición 8, mientras que la figura 12D presenta un error de apareamiento en la posición 14.

40 La figura 13 muestra una representación de la derivada de la fusión de la mutación G542X de fibrosis quística utilizando un cebador Snapback. Los genotipos mostrados son del tipo natural homocigótico (azul), heterocigótico (negro) y mutante homocigótico (rojo).

45 Las figuras 14A-B muestran representaciones de la derivada (figura 14A) y curvas de fusión normalizadas (figura 14B) del elemento sonda de un cebador Snapback que obtienen información de la región F507 – F508 del exón 10 de CFTR: tipo natural (amarillo), F507del het (negro), F508del het (azul), F508C het (rojo) y F508del homo (verde).

50 La figura 15 muestra una representación de la derivada del genotipado de múltiples locus con cebadores Snapback bilaterales que obtiene información del exón 10 de CFTR: tipo natural (círculos), heterocigoto compuesto F508del/Q493X (diamantes pequeños conectados), heterocigoto 1506V (diamantes pequeños), heterocigoto F508C (cuadrados pequeños), heterocigoto 1507del (cuadrados grandes), heterocigoto F508del (diamantes grandes conectados) y homocigoto F508del (cuadrados conectados).

55 La figura 16 muestra una representación de la derivada de la transferencia de energía de resonancia de LCGreen Plus a LCRed640 utilizando un cebador Snapback marcado en 5' con LCRed640 (fusión a 72°C con trazo rojo). En comparación, la curva de fusión de una sonda marcada con LCRed640 no unida se muestra en azul con una transición de fusión de 63°C.

60 La figura 17 es un esquema del genotipado y rastreo utilizando cebadores Snapback.

Las figuras 18A-B muestran el rastreo de mutaciones y el genotipado simultáneos del exón 4 de CFTR utilizando PCR simétrica y un cebador Snapback. La figura 18A muestra una curva de fusión del amplicón de longitud completa antes de la dilución con agua, mientras que la figura 18B muestra una curva de la derivada después de la dilución de

10 veces con agua. Después de la dilución, las muestras se desnaturalizaron mediante calor y se enfriaron antes de la fusión: tipo natural (negro) y heterocigoto R117H (rojo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 SYBR® Green I (Invitrogen Corp, Carlsbad, California) es un colorante utilizado ampliamente para el análisis de fusión, ya que muestra un cambio amplio en la fluorescencia durante la PCR (10, 15). SYBR® Green I se utilizó por primera vez en el análisis de fusión para distinguir diferentes productos de PCR que diferían en la Tf en 2°C o más (21). Posteriormente, se utilizó SYBR® Green I para identificar deleciones (16), repeticiones de dinucleótidos en genotipos (17) e identificar varias alteraciones en las secuencias (18-21). Sin embargo, la diferencia de Tf entre genotipos puede ser pequeña y puede desafiar la resolución de los instrumentos actuales. De hecho, se ha sugerido que SYBR® Green I, "no debería utilizarse para las aplicaciones rutinarias de genotipado" (22). El genotipado con curvas de fusión con colorantes de ADN específicos de doble cadena utilizados habitualmente pueden dar lugar a un incremento de la Tf con una ampliación de la transición de fusión (23) y la compresión de la diferencia de Tf entre los genotipos. Estos factores disminuyen el potencial del SYBR® Green I para la discriminación de genotipos.

El ADN heterocigótico está formado de cuatro cadenas simples diferentes que pueden crear dos productos de doble cadena homóloga y dos productos de doble cadena heteróloga cuando se desnaturalizan y se enfrían. En teoría, los cuatro productos presentan Tf diferentes y la curva de fusión debe ser una composición de las cuatro transiciones de doble cadena a cadena simple. Sin embargo, los colorantes de ADN específicos de doble cadena se pueden redistribuir durante la fusión (24), provocando una liberación del colorante de las dobles cadenas heterólogas de fusión baja y la redistribución a dobles cadenas homólogas de fusión más elevada. Debido a que SYBR® Green I no es saturante a concentraciones compatibles con la PCR (10), dicha redistribución es plausible y consiste con la ausencia de una transición de doble cadena heteróloga observada.

25 Recientemente, se han desarrollado LCGreen® I y LCGreen® Plus (Idaho Technology, Inc., Salt Lake City, UT) y otros diversos colorantes de saturación para aplicaciones de resolución elevada, que incluyen para el genotipado y el rastreo (véanse las solicitudes de patente de Estados Unidos en trámite Nos. 10/531.966, 10/827.890, 11/485.851, 11/931.174). Cuando sólo se amplifica un producto de PCR y la secuencia es homocigótica, sólo se forman dobles cadenas homólogas. Con colorantes de saturación, las diferencias de Tf entre diferentes genotipos de dobles cadenas homólogas no están comprimidas y es posible una diferenciación clara entre los genotipos, incluso para SNP. Dichos colorantes de saturación también se pueden utilizar para identificar y distinguir múltiples productos presentes en una reacción, de manera ilustrativa dobles cadenas homólogas generadas a partir de la amplificación de múltiples locus o múltiples dianas que son homocigóticas. En cambio, la mayor parte del tiempo sólo se pueden observar algunos productos con SYBR® Green I, presumiblemente debido a la redistribución del colorante.

40 Cuando se amplifican una o más dianas heterocigóticas, los productos de doble cadena heteróloga son fácilmente observables con colorantes de saturación. La capacidad de detectar e identificar dobles cadenas heterólogas es particularmente útil para detectar genotipos heterocigóticos, así como para rastrear mutaciones desconocidas. En muchas circunstancias, esto no es posible con colorantes de dsADN convencionales utilizados en PCR a tiempo real, tales como SYBR® Green I, SYBR® Gold, y bromuro de etidio, donde los productos de doble cadena heteróloga no son observables de manera general.

45 Con colorantes de saturación, es posible distinguir todos los heterocigotos de una base de los homocigotos. En la detección de heterocigotos, la temperatura de fusión absoluta y la influencia de la concentración de ADN no son tan importantes como con métodos que implican la diferenciación entre genotipos homocigóticos. Las dobles cadenas heterocigóticas afectan a la forma de la curva de fusión, particularmente en la parte "inicial" de temperatura baja de la transición. Las diferentes curvas de fusión se pueden hacer coincidir por la temperatura mediante el traslado del eje X para superponerlo con la parte "final" de temperatura elevada de la transición. La presencia o ausencia de las dobles cadenas heterólogas se pueden deducir entonces con una mayor precisión.

50 Se pueden utilizar oligonucleótidos no marcados combinados con colorantes de saturación para el genotipado mediante un análisis de fusión de tubo cerrado (11). De manera ilustrativa, el producto de cadena complementaria a la sonda no marcada se produce en exceso mediante una PCR asimétrica, de manera ilustrativa con el cebador complementario en un exceso de 5-10 veces. La sonda no marcada se puede bloquear en el extremo 3 para evitar la extensión, pero no son necesarias otras modificaciones. La figura 3 muestra un resultado habitual de genotipado de sonda no marcada a partir de ADN genómico. Se amplificó un segmento que comprendía la mutación de SNP G542X de fibrosis quística en presencia de una sonda no marcada de 28 unidades (11). Se muestran los tres genotipos (homocigótico de tipo natural – línea negra continua, heterocigótico . línea roja, y mutante homocigótico – línea discontinua) utilizando sondas emparejadas con el tipo natural (parte superior) o el mutante (parte inferior). Utilizando una sonda no marcada, se puede genotipar la región bajo la sonda, tal como se muestra en la figura 3, y se puede utilizar la curva de fusión del amplicón completo, que tendrá, en general, una transición de fusión más elevada, para rastrear mutaciones en otros puntos del amplicón.

Sin embargo, normalmente es deseable bloquear el extremo 3' de sondas no marcadas para evitar la extensión. El bloqueador es un gasto añadido. De manera adicional, el genotipado con sondas no marcadas requiere tres oligonucleótidos: dos cebadores y una sonda no marcada adicional. Además, las sondas no marcadas producen la mejor señal cuando son relativamente largas, normalmente de 25-35 bases (11). Finalmente, la hibridación intermolecular requerida con sondas no marcadas puede ser bloqueada por la estructura secundaria de la diana, ya que la hibridación intermolecular es normalmente más lenta que la hibridación intramolecular de la estructura secundaria.

Los cebadores Snapback, según el presente documento, se dirigen hacia muchas de estas cuestiones. En primer lugar, sólo son necesarios dos oligonucleótidos, de manera ilustrativa un cebador estándar y un cebador con una cola corta como un elemento sonda integrado. A continuación, no es necesario el bloqueo del extremo 3' porque el elemento sonda es una parte del extremo 5' del cebador y se desea la extensión del cebador. Finalmente, la hibridación de los cebadores Snapback es intramolecular, de manera que la hibridación es rápida y la estructura interna es una cuestión menor. Cuando se utiliza un colorante de saturación, el colorante de saturación pueden estar presente durante la amplificación en una concentración suficiente para detectar dobles cadenas heterólogas tras la fusión del amplicón. De este modo, la combinación de cebadores Snapback y colorantes de saturación proporciona un análisis de ácidos nucleicos en solución en tubo cerrado. Sin embargo, aunque los ejemplos de la presente invención utilizan colorantes de saturación, se entiende que los cebadores Snapback se pueden utilizar con otros colorantes, particularmente en los que no es necesaria una resolución elevada o en los que la adición de colorantes después de la amplificación no es un problema.

En la figura 4 se representa un protocolo de genotipado Snapback ilustrativo. A la izquierda se muestra el cebador Snapback, que tiene una cola -8- que no se hibrida al ácido nucleico diana -20-. El cebador estándar -12- se muestra a la derecha. El ácido nucleico se amplifica, de manera ilustrativa mediante PCR asimétrica, produciendo más de la cadena -14- formada a partir de la extensión del cebador Snapback -10- que de la cadena complementaria -16-. A continuación, el producto de amplificación se enfría, produciendo una mezcla de productos de horquillas intramoleculares -30- del cebador Snapback -10-, junto con un amplicón -40- de longitud completa y doble cadena. Una fusión derivada de esta mezcla de amplificación produce máximos a temperatura baja que representan la fusión de la estructura de horquilla -35- y máximos a temperatura elevada que representan la fusión del amplicón -40- de longitud completa.

Aunque la PCR es el método de amplificación utilizado en los ejemplos de la presente invención, se entiende que puede ser adecuado cualquier método de amplificación que incorpore un cebador. Entre dichos procedimientos adecuados se incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); amplificación con desplazamiento de cadena (SDA); amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA); amplificación por círculo rodante en cascada (CRCA), amplificación isotérmica de ADN mediada por bucles (LAMP); amplificación isotérmica y quimérica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores (ICAN); amplificación dependiente de helicasa basada en la diana (HDA); amplificación mediante por la transcripción (TMA), y similares. Por lo tanto, cuando se utiliza el término PCR, debe entenderse que incluye otros métodos de amplificación alternativos.

Además, aunque se hace referencia a genotipado después de la amplificación, se entiende que los cebadores descritos en la presente invención se pueden utilizar para la detección y/o la cuantificación. El cebador Snapback, tal como se conoce en la técnica, sirve como cebador y como sonda para dichos métodos.

Ejemplo 1. Genotipado con un cebador snapback después de PCR simétrica.

Se utilizó como plantilla (25) una plantilla de plásmido modificado de secuencia de M13 con un contenido de GC del 40%. De otro modo, estaban disponibles para el estudio plásmidos idénticos con A, C, G o T en una posición. Se estudiaron tanto la plantilla "A" como la plantilla "C", así como un heterocigoto "A/C" que se formó mediante la mezcla de cantidades iguales de las plantillas "A" y "C". La concentración de cada plásmido se determinó mediante absorbancia a 260 nm (A_{260}), asumiendo que una A_{260} de 1,0 es 50 µg/ml. Los cebadores de M13 utilizados son el cebador directo 5'-AATCGTCATAAATATTCATTGAATCCCCtattctcgttttctgaactg-3' (SEQ ID NO. (secuencia de identificación número) 1, con la cola mostrada en mayúsculas y la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback mostrada en negrita), y el cebador inverso 5'-atgttagactggatagcgt-3' (SEQ ID NO. 2), que forman un producto de PCR de aproximadamente 130 pb.

La PCR se realizó en volúmenes de reacción de 10 µl con Tris 50 mM (pH 8,3), albúmina de suero bovino 500 µg/ml, $MgCl_2$ 3 mM, 200 µM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, 0,4 U de Klen Taq polimerasa (AB Peptides), 0,5 veces LCGreen® Plus (Idaho Technology), cebadores 0,5 µM y 10^6 copias del plásmido "A" o una concentración equivalente de una mezcla 1:1 de los plásmidos "A" y "C". Se realizó una PCR en un LightCycler® (Roche) durante 35 ciclos con una desnaturalización a 95°C (mantenido 0 s), apareamiento a 50°C (mantenido 0 s), una rampa de 2°C/s hasta la temperatura de extensión a 72°C y un mantenimiento de 8 s a 72°C. Después de la PCR, las

muestras capilares se desnaturalizaron a 94°C (mantenido 0 s) y se enfriaron hasta 40°C. Todas las velocidades de transición entre temperaturas se programaron a 20°C/s a menos que se indicara lo contrario. Las muestras se extrajeron del LightCycler, se colocaron en el instrumento de fusión de alta resolución HR-1™ (Idaho Technology), y se fundieron de 50°C a 87°C en una rampa de 0,3°C/s. Normalmente, se restó el ruido de fondo exponencial de las curvas de fusión, de manera ilustrativa tal como se da a conocer en el documento PCT/US2006/036605, las curvas se normalizan y normalmente se muestran como representaciones de las derivadas. Las curvas de fusión de las derivadas resultantes se muestran en la figura 5A.

La figura 5A muestra representaciones de las curvas de fusión de las derivadas para todos los genotipos de un SNP A/C. Las transiciones de fusión tanto del amplicón (78-82°C) como de la sonda snapback (66-73°C) son claras. Considerando en primer lugar la región del amplicón, tal como se esperaba, el máximo del homocigoto C se encuentra a una temperatura más elevada que el del homocigoto A. Además, el heterocigoto AC muestra una transición amplia a temperaturas inferior debido a la influencia de las dobles cadenas heterólogas (12). La fusión del elemento sonda del cebador Snapback depende del genotipo. La plantilla A apareada perfectamente se funde a la temperatura más elevada (71°C), la plantilla C no apareada se funde a 68°C, y el heterocigoto muestra máximos de fusión a ambas temperaturas. Aunque la intensidad de la señal es baja, la capacidad de obtener genotipos mediante la observación de la fusión del elemento sonda del cebador Snapback es claramente evidente.

Ejemplo 2. Genotipado con cebadores Snapback y con un bloqueador de la extensión utilizando PCR simétrica.

Para incrementar la formación de bucles de los cebadores Snapback y la altura de los máximos del genotipado Snapback (máximos a temperatura baja) en las representaciones de las derivadas, se incorporó un bloqueador de la extensión ante el cebador específico de plantilla y el elemento sonda del cebador Snapback. Mostrado como una "X" en el cebador directo, el bloqueador utilizado era un derivado básico de tetrahidrofurano incorporado como la fosforamida CE dSpacer disponible de Glen Research (número de catálogo 10-1914-90). Se incorporaron diez unidades contiguas de dSpacer a efectos de asegurar el bloqueo de la polimerasa. Los cebadores utilizados fueron el cebador directo 5'-AATCGTCATAAATATTCATTGAATCCCC(X)₁₀tcattctcgtttctgaactg-3' (SEQ ID NO. 3, con la cola mostrada en mayúsculas y la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback mostrada en negrita) y el cebador inverso 5'-atgtttgactggatagcgt-3' (SEQ ID NO. 4).

Se estudiaron tanto la plantilla "A" como el heterocigoto "A/C" del ejemplo 1. Se realizaron la PCR y la fusión tal como se indica en el ejemplo 1. La figura 5B muestra las representaciones de las curvas de fusión de las derivadas para los genotipos A y A/C. Las transiciones de fusión tanto del amplicón (78-82°C) como de la sonda snapback (68-75°C) son claras. Considerando la región del amplicón, el heterocigoto AC presenta una transición amplia a temperaturas inferiores en comparación con el homocigoto. La fusión del elemento sonda del cebador Snapback depende del genotipo. La plantilla A perfectamente apareada se funde en una transición a una temperatura elevada (73°C), mientras que la transición del heterocigoto es bimodal. La señal del elemento sonda se incrementó en la intensidad relativa en comparación con el ejemplo 1.

Una ventaja de utilizar PCR simétrica para el genotipado con cebadores Snapback es que se pueden utilizar dos cebadores Snapback (uno en cada extremo) para obtener información de dos locus diferentes en el producto de PCR. Cada cola se complementa con un locus y los elementos sonda pueden variarse en la longitud y/o el contenido de GC para separar los T_f de los alelos de los dos elementos sonda. Otro modo ilustrativo de obtener información de locus distantes (separados por una distancia tal que un elemento sonda sería inconveniente) es utilizar sólo un cebador Snapback con un único elemento sonda, pero dividiendo el elemento sonda en dos o más segmentos, cada segmento complementario a uno de los locus. El ADN plantilla forma bucles entre los locus y es posible la obtención de haplotipos (13). De manera alternativa, se pueden utilizar un cebador Snapback y una sonda no marcada (11), de manera ilustrativa con PCR asimétrico. Otra opción es mezclar varios cebadores Snapback juntos, cada uno con la misma región de cebador específica de plantilla, pero diferentes elementos sonda que reconocen diferentes locus.

Ejemplo 3. Efecto de la longitud del elemento sonda en la señal de los cebadores Snapback después de PCR asimétrica.

Se investigaron elementos sonda de diferentes longitudes utilizando PCR asimétrica. Los cebadores M13 utilizados se muestran en la tabla 1, en la que las letras mayúsculas indican la cola del elemento sonda, las letras minúsculas definen la región cebadora específica de plantilla y la base en negrita indica la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback.

Tabla 1

Nombre	Cebador directo limitante (0,05 μM)
1F	tcattctcgttttctgaactg (SEQ ID NO: 5)
	Cebador Snapback inverso (0,5 μM)
1R6tail	GAATATatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 6)
1R8tail	TGAATATTatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 7)
1R10tail	ATGAATATTTatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 8)
1R12tail	AATGAATATTTAatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 9)
1R14tail	CAATGAATATTTATatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 10)
1R16tail	TCAATGAATATTTATGatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 11)
1R18tail	TTCAATGAATATTTATGAatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 12)
1R20tail	ATTCAATGAATATTTATGACatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 13)
1R22tail	GATTCAATGAATATTTATGACGatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 14)
1R24tail	GGATTCAATGAATATTTATGACGAatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 15)
1R26tail	GGGATTCAATGAATATTTATGACGATatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 16)

Se realizaron la PCR y la fusión como en el ejemplo 1, a excepción de que se utilizaron 45 ciclos, la concentración limitante del cebador directo fue de 0,05 μM y la concentración del cebador Snapback inverso fue de 0,5 μM . Aunque se utilizó una proporción 10:1, se entiende que pueden ser adecuadas otras proporciones de cebador, tal como se conoce en la técnica, por ejemplo, de 2:1 a 20:1, o incluso hasta, como máximo, 100:1. Para determinar el efecto de la longitud del elemento sonda en el método de cebadores Snapback, se analizaron regiones de sondas con una longitud entre 6 y 28 bases (figura 6A). Las curvas de fusión resultantes se muestran en la figura 6B. Las curvas de fusión de cebadores snapback son visibles incluso con una región de sonda con una longitud de tan solo 6 bases. La capacidad de observar las transiciones de fusión de dobles cadenas de tan solo seis pares de bases fue sorprendente. En comparación con sondas no marcadas de la misma secuencia (11), las transiciones de fusión parecen estabilizarse en 5-10°C o más. La comparación de la fusión utilizando un amplicón generado a partir de un cebador directo 1F y el cebador Snapback inverso 1R26tail frente a la fusión utilizando una sonda no marcada que tenía la misma secuencia que elemento sonda 1R26tail confirmó una estabilización de aproximadamente 10°C debido a la hibridación intramolecular. Se ha observado que la estabilización es incluso superior para cebadores snapback con elementos sonda más cortos que dan lugar a dobles cadenas cortas en horquilla. Por ejemplo, la Tf de una doble cadena Snapback de 6 pb era 40°C superior y la doble cadena Snapback de 8 pb era 35°C superior, que la prevista por el análisis de vecinos más próximos. La relación lineal entre la longitud de las dobles cadenas y la Tf mostrada en la figura 6G sugiere que las temperaturas de fusión se pueden predecir de manera precisa mediante la longitud de la doble cadena.

La Tf de la doble cadena en horquilla también se puede ajustar mediante la introducción intencionada de errores en el apareamiento, análogos de bases o grupos estabilizantes en el elemento sonda del cebador Snapback. Por ejemplo, se pueden utilizar bases que dan lugar a errores en el apareamiento en la plantilla para disminuir la Tf global de la doble cadena en horquilla. Los errores de apareamiento G:T (obtenidos mediante la sustitución de C por T en el elemento sonda) son particularmente atractivos, ya que reducen la Tf de la doble cadena en horquilla mediante la alteración de una pareja C:G estable, aunque la pareja G:T es suficientemente estable que no disminuye de manera significativa la fluorescencia del colorante saturante. Los errores de apareamiento también se pueden utilizar para enmascarar variantes de secuencias que, en el mejor de los casos, son ignoradas, tales como polimorfismos benignos. (26). Si se desea una mayor estabilización de la doble cadena en horquilla, se pueden incluir ácidos nucleicos bloqueados en elemento sonda, o se puede unir un enlazador al surco menor para incrementar la temperatura de fusión.

Se seleccionaron las regiones de sonda de 8, 14, 20 y 24 pb para el genotipado de SNP. Se formaron heterocigotos mezclando los plásmidos apropiados en una proporción 1:1. Los resultados de la tipificación de SNP se muestran en las figuras 6C-F. El genotipado fue posible con todos los cebadores Snapback, incluyendo aquel con una longitud del elemento sonda de tan solo 8 bases (figura 6C).

Ejemplo 4. Utilización de un error de apareamiento terminal de 2 bases para incrementar la señal del elemento sonda: efecto de la longitud del elemento sonda después de PCR asimétrica

Algunos intentos iniciales de obtener genotipos snapback a partir de ADN genómico no funcionó particularmente bien. Con una PCR asimétrica, pareció que se inhibía la amplificación, con señales bajas apareciendo sólo después de muchos ciclos, de manera ilustrativa 60 ciclos o más. Una consideración adicional de las cadenas mayores y menores que se forman proporcionó una posible explicación y solución. En la figura 7A, tanto la cadena mayor como la cadena menor producidas después de la PCR asimétrica se muestran en conformación Snapback. Aunque la cadena mayor no se puede extender desde su extremo 5', la cadena menor presenta un extremo 3' que se puede hibridar y formar un sustrato de polimerasa. La extensión puede tener lugar desde este extremo 3', inhibiendo el

apareamiento del cebador y evitando la formación de la cadena mayor. Una solución a este problema es desaparecer las dos últimas bases en el extremo 5' del cebador Snapback, de manera que no es posible la extensión desde la cadena menor (figura 7B). Aunque se utilizan dos bases para los errores de apareamiento ilustrativos, se entiende que un error de apareamiento de una base inhibirá cierta extensión y, si se desea, se pueden añadir más bases al error de apareamiento. El error de apareamiento se transferirá en sucesivas rondas de amplificación.

Un error de apareamiento de 2 bases incorporado en extremo 5' del elemento sonda de los cebadores Snapback da lugar a señales intensas de la fusión de la sonda. Tal como se ha dado a conocer anteriormente, dicho error de apareamiento evita la inhibición de la PCR que de otro modo puede tener lugar después de la extensión desde el extremo 3' de la cadena menor durante la PCR. Se investigaron diferentes elementos sonda con diferentes longitudes con errores de apareamiento terminales de 2 pb utilizando PCR asimétrica. Los cebadores M13 utilizados se muestran en la tabla 2, en la que las letras mayúsculas indican el elemento sonda o cola, las letras minúsculas definen la región cebadora específica de plantilla, las letras minúsculas en cursiva indican las bases que no están apareadas a la diana y la base en negrita indica la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback.

Tabla 2

Nombre	Cebador directo limitante (0,05 μM)
1F	tcattctcgttttctgaactg (SEQ ID NO: 5)
	Cebador Snapback inverso (0,5 μM)
1R8tailM	ccTGAATATTatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 17)
1R12tailM	gtAATGAATATTTAatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 18)
1R16tailM	cgTCAATGAATATTTATGatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 19)
1R20tailM	tcATTCAATGAATATTTATGACatgtttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 20)

La PCR y la fusión se realizaron como en el ejemplo 3. Se investigaron elementos sonda con longitudes 8, 12, 16 y 20 bases, cada uno con un error de apareamiento terminal de 2 bases. La figura 8A muestra los perfiles de fusión de las derivadas después de la PCR asimétrica utilizando la plantilla "A" perfectamente apareada. Todos los máximos de los elementos sonda son amplios y se identifican fácilmente. De manera sorprendente, el área bajo el elemento sonda de 8 bases es tan amplio como los elementos sonda con longitud más larga.

La capacidad de obtener genotipos se muestra en la figura 8B que utiliza las plantillas "A" y "A/G" (heterocigótico). La plantilla "A" forma un apareamiento perfecto con el elemento sonda, mientras que la plantilla "G" forma un error de apareamiento A/C, dando lugar a un máximo de fusión 6-8°C por debajo del apareamiento perfecto.

Se amplificaron por PCR cien muestras clínicas tipificadas previamente en una placa de 384 pocillos y se fundieron en un LightScanner® (Idaho Technology) de 384 pocillos. Se utilizó un cebador Snapback con un elemento sonda de 16 bases y un error de apareamiento en el extremo 5' de dos bases en una PCR asimétrica, produciendo un producto de PCR de 169 pb y una horquilla con un bucle de 99 bases. Después de la normalización y la resta del ruido de fondo de la región de doble cadena en horquilla, las curvas se mostraron en una representación de derivada negativa y se agruparon automáticamente. El elemento sonda presenta un error de apareamiento G:T en el alelo mutante. La figura 7C muestra que los genotipos son fácilmente diferenciables. El genotipo de todas las muestras en la figura 7C concordaba con los genotipos que se determinaron previamente mediante fusión de alta resolución de amplicones pequeños.

Ejemplo 5. Influencia de la longitud del amplicón en la señal del cebador Snapback con un error de apareamiento de dos bases en el extremo 5' del elemento sonda utilizando PCR asimétrica.

Se utilizó un cebador Snapback que tenía un error de apareamiento terminal de dos bases, como en el ejemplo 4, para estudiar amplicones de diferentes longitudes. La distancia desde el cebador snapback hasta el sitio del SNP se mantuvo constante (la estructura secundaria del bucle permanece igual), mientras que se varió la longitud del amplicón. Se realizó una PCR asimétrica como en el ejemplo 3. Los cebadores M13 utilizados se muestran en la tabla 3, en la que las letras mayúsculas indican el elemento sonda o cola, las letras minúsculas definen la región cebadora específica de plantilla, las letras minúsculas en cursiva indican las bases que presentan un error de apareamiento con la diana y las bases en negrita indican la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback.

Tabla 3

Nombre	Cebador directo limitante (0,05 μ M)
1F	tcattctcgttttctgaactg (SEQ ID NO: 5)
2F	gcaatccgctttgcttctga (SEQ ID NO: 21)
3F	gatattgaagtctttcggg (SEQ ID NO: 22)
4F	gttggagtttctccggtc (SEQ ID NO: 23)
5F	atgaccttatcaaaagga (SEQ ID NO: 24)
Cebador Snapback inverso (0,5 μ M)	
1R22tailM	tcGATTCAATGAATATTTATGACGAtgtagactggatagcgt (SEQ ID NO: 25)

5 El diseño experimental se representa en la figura 9A. En todos los casos, el cebador Snapback es el mismo, formando de este modo el mismo tamaño de bucle cuando el elemento sonda se aparea con el amplicón, con el mismo error de apareamiento de 2 pb en el extremo 5'. Sin embargo, la longitud del amplicón varía de 120 pb a 321 pb.

10 Los resultados se muestran en la figura 9B. Cuanto más largo es el amplicón, más pequeño es el tamaño de la señal del elemento sonda en comparación con la señal del amplicón. Es decir, amplicones más cortos darán lugar, en general, a señales relativas más intensas de los elementos sonda.

Ejemplo 6. Efecto de la longitud del bucle en la señal del elemento sonda.

15 Se investigó el efecto de las diferentes longitudes de los bucles variando la distancia entre el cebador Snapback y el locus del que se desea información. Se realizó una PCR asimétrica como en el ejemplo 3. Los cebadores M13 utilizados se muestran en la tabla 4, en la que las letras mayúsculas indican la cola del elemento sonda, las letras minúsculas definen la región cebadora específica de plantilla y las bases en negrita indican la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback. En este caso, no se utilizaron errores de apareamiento en 5' de 2 pb adyacentes al elemento sonda.

Tabla 4

Nombre	Cebador directo limitante (0,05 μ M)
1F	tcattctcgttttctgaactg (SEQ ID NO: 5)
Cebador Snapback inverso (0,5 μ M)	
0R24tail	GGATTCAATGAATATTTATGACGAcgtccaactgcgga (SEQ ID NO: 26)
1R24tail	GGATTCAATGAATATTTATGACGAatgtagactggatagcgt (SEQ ID NO: 15)
2R24tail	GGATTCAATGAATATTTATGACGAaaaatagcgagaggcttttgc (SEQ ID NO: 27)
3R24tail	GGATTCAATGAATATTTATGACGAaagagcaacactatcataa (SEQ ID NO: 28)
4R24tail	GGATTCAATGAATATTTATGACGAaatgcagatacataacgcca (SEQ ID NO: 29)
5R24tail	GGATTCAATGAATATTTATGACGAacaacattattacaggtaga (SEQ ID NO: 30)

25 El diseño experimental se representa en la figura 10A. Las posiciones relativas de los cebadores antes de la PCR se indican en la parte superior. La PCR y la fusión se realizaron como en el ejemplo 3. La conformación de bucle del cebador Snapback extendido después de la PCR asimétrica se muestra en la parte inferior de la figura 10A. El tamaño del bucle variaba de 17 a 236 pb.

30 Las curvas de fusión derivadas de los seis productos diferentes se muestran en la figura 10B. Cabe indicar que la T_f para el amplicón de longitud completa está directamente relacionada con el tamaño del amplicón. Con respecto a la fusión de la cola de la sonda Snapback en que todas las colas de las sondas tenían el mismo tamaño, los bucles más pequeños dieron lugar a temperaturas de fusión más elevadas, indicando que la estabilización de la hibridación intramolecular está inversamente relacionada con el tamaño del bucle, como mínimo, entre 17 y 236 bases. La relación inversa parece ser logarítmica ente 17 y 150 bases, siendo la T_f inversamente proporcional al logaritmo del tamaño del tamaño. El impedimento estérico puede convertirse en un problema con los bucles que son más pequeños de 17 bases, pero esto no es probablemente un problema en la mayoría de los casos, ya que el tamaño mínimo del bucle está generalmente dictado por el tamaño del cebador. La intensidad de la señal de los cebadores Snapback que forman bucles más grandes se puede disminuir en relación a la señal de amplicón, tal como se observa en el ejemplo 5 y con sondas no marcadas (11). Por ejemplo, la curva de fusión con un bucle con una longitud de bucle de 236 pb (5R) es débil. Con este amplicón ilustrativo, las mejores señales se obtuvieron con tamaños de bucles entre 17 y 177 bases, y se espera que se obtengan buenas señales con bucles de menos de 200 bases. Dado que es preferente una estabilización del elemento sonda y amplias señales relativas, se espera que tamaños de bucles entre 20 y 50 base funcionen bien.

45

Ejemplo 7. Genotipado de todas las posibles variantes de una única base con un cebador snapback.

Se utilizó un único cebador Snapback para amplificar varias plantillas de plásmidos para demostrar que la forma de la curva de fusión del elemento sonda depende de la secuencia amplificada. Se utilizaron cuatro plásmidos M13 diferentes como diana, en los que cada plásmido difería únicamente en una posición con una A, C, G, o T. En este ejemplo, para simular el genotipado de homocigotos, se utilizó sólo un plásmido apareado o con error de apareamiento, mientras que para simular heterocigotos se utilizaron dos plásmidos mezclados en proporciones iguales. Se realizó una PCR asimétrica como en el ejemplo 3. Los cebadores M13 utilizados son 1F *tcattctcgttttctgaactg* (SEQ ID NO: 5) y 1R22Tmis10 *tcATTCAATGAATATTTATGACGAatgtagactggatagcgt* (SEQ ID NO: 31), en los que las letras mayúsculas indican el elemento sonda o cola, las letras minúsculas definen la región cebadora específica de plantilla, las letras minúsculas en cursiva indican las bases que presentan un error de apareamiento con la diana y las bases en negrita indican la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback. El producto de PCR presentaba una longitud de 120 pb.

Utilizando un cebador Snapback con una “A” en la posición variable, se investigaron todas las posibles plantillas apareadas, parcialmente apareadas y completamente desapareadas. Con plantillas homocigóticas, se formaron una doble cadena apareada y tres dobles cadenas con errores de apareamiento (figura 11A), mostrando todas transiciones de fusión únicas. En la transición del amplicón, los productos de PCR de G y C son ligeramente más estables que los productos de PCR de A y T. La transición del elemento sonda es más estable con un apareamiento A:T, seguido de un error de apareamiento A:G, un error de apareamiento A:A y finalmente un error de apareamiento A:C.

La figura 11B muestra la plantilla apareada junto con los tres homocigotos parcialmente apareados. Como en la figura 11A, la plantilla apareada muestra un único máximo de fusión del elemento sonda alrededor de 68°C. Los tres heterocigotos muestran máximos compuestos de la fusión de los elementos sonda con un alelo apareado y el otro con error de apareamiento, normalmente separándose en dos máximos distintos, uno máximo alrededor de 68°C y el otro máximo dependiendo del error de apareamiento concreto.

La figura 11C muestra la plantilla apareada junto con tres heterocigotos con ambos alelos con error de apareamiento. La doble cadena apareada es más estable, mientras que los heterocigotos con error de apareamiento forman dobles cadenas menos estables con el elemento sonda. Cada heterocigoto se funde en una transición amplia claramente única compuesta de dos componentes con error de apareamiento que no se separan en máximos distintos.

Ejemplo 8. Efecto de la posición del error de apareamiento en el elemento sonda de cebadores Snapback

Se utilizaron cebadores Snapback con diferentes elementos sonda para amplificar la misma secuencia diana. Los elementos sonda se diseñaron para colocar la base variable en diferentes posiciones a lo largo del elemento sonda, con el amplicón de la misma longitud. La longitud del elemento sonda fue de 22 bases, con la base variable colocada en la posición 2, 8, 14, ó 20, dando lugar a longitudes de bucle de 26 a 44 bases y un tamaño de amplicón de 120 pb. Aunque las longitudes de los bucles variaban hasta una diferencia máxima de 18 bases, esto sólo debería afectar a la *T_f* absoluta y no la capacidad de diferenciar homocigotos de heterocigotos. Se realizó una PCR asimétrica como en el ejemplo 3. Los cebadores M13 utilizados se muestran en la tabla 5, en la que las letras mayúsculas indican el elemento sonda o cola, las letras minúsculas definen la región cebadora específica de plantilla, las letras minúsculas en cursiva indican las bases que presentan un error de apareamiento con la diana y las bases en negrita indican la posición variable en la plantilla después de la formación de la horquilla Snapback.

Tabla 5

Nombre	Cebador directo limitante (0,05 μM)
1F	<i>tcattctcgttttctgaactg</i> (SEQ ID NO: 5)
	Cebador Snapback inverso (0,5 μM)
1R22Tmis2	<i>acAATATTTATGACGATTCCGCAGatgtagactggatagcgt</i> (SEQ ID NO: 32)
1R22Tmis8	<i>gcTCAATGAATATTTATGACGATTatgtagactggatagcgt</i> (SEQ ID NO: 33)
1R22Tmis14	<i>ctGGGGATTCAATGAATATTTATGatgtagactggatagcgt</i> (SEQ ID NO: 34)
1R22Tmis20	<i>agTTTGAGGGGGATTCAATGAATAatgtagactggatagcgt</i> (SEQ ID NO: 35)

Tanto la plantilla “A” homocigótica como la plantilla “A/G” heterocigótica se amplificaron por separado a efectos de analizar la capacidad de detectar heterocigotos bajo diferentes posiciones del elemento sonda. Cuando la base variable se colocó próxima a cualquiera de los extremos de la sonda en la posición 2 ó 20 de un elemento sonda de 22 bases, era difícil diferenciar heterocigotos de homocigotos (figuras 12A-B). En cambio, cuando la base variable estaba próxima al centro en las posiciones 8 ó 14, los heterocigotos se identificaron fácilmente (figuras 12C-D). Estos resultados sugieren que en condiciones similares a los de este ejemplo, la sonda debería estar próxima al

centro de la región de la variación de secuencia si se desea una discriminación óptima. Las variaciones de secuencia próximas a cualquiera de los extremos del elemento sonda pueden no ser detectadas.

Ejemplo 9. Genotipado de la mutación G542X de fibrosis quística con cebadores Snapback.

El genotipado con cebadores Snapback se realizó para la mutación G542X de CFTR, un único cambio de base de G a T en el exón 11. Las muestras genotipadas de ADN genómico humano se obtuvieron del Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ) y se utilizaron a 50 ng/μl en la PCR. El cebador directo limitante fue tgtgcctttcaaattcagattg (SEQ ID NO: 36) (0,05 μM) y el cebador snapback inverso fue ctGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAcagcaaatgcttctagacc (SEQ ID NO: 37) (0,5 μM). La secuencia del elemento sonda se apareó con la secuencia diana de tipo natural. El tamaño del amplicón fue de 228 pb. La PCR se realizó como en el ejemplo 3, a excepción de que se realizó una desnaturalización inicial a 95°C durante 20 s, la temperatura de apareamiento fue de 53°C, se realizaron 55 ciclos, y el análisis de fusión se realizó a 0,2°C/s desde 55 a 88°C. El tamaño del bucle del cebador Snapback fue de 88 bases y elemento sonda tenía 24 bases.

El genotipado resultante con cebadores snapback se muestra en la figura 13. Las curvas de fusión derivadas se muestran con el máximo de fusión del amplicón a temperatura más elevada en la derecha y los máximos del elemento sonda a temperatura inferior en la izquierda. La fusión del elemento sonda de la plantilla con error de apareamiento tiene lugar a aproximadamente 63°, mientras que la plantilla apareada se funde a aproximadamente 68°C. Los tres genotipos son fáciles de discernir.

Ejemplo 10. Genotipado de las variantes de secuencia (F508del, F507del, y F508C) del exón 10 de la fibrosis quística con cebadores snapback.

El genotipado con cebadores Snapback se realizó en las mutaciones clave en el exón 10 de CFTR, que incluyen F507del, F508del, y F508C. Las muestras genotipadas de ADN genómico humano se obtuvieron del Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ) y se utilizaron a 50 ng/μl en la PCR. El cebador directo limitante fue acttctaagtattgattatggg (SEQ ID NO: 38) (0,05 μM) y el cebador snapback inverso fue tcAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGacatagttcttacctctc (SEQ ID NO: 39) (0,5 μM). La secuencia del elemento sonda se apareó con la secuencia de tipo natural. El tamaño del amplicón fue de 231 pb y el tamaño del bucle del cebador Snapback fue de 58 bases.

Las curvas de fusión resultantes del elemento de sonda con cebadores Snapback se muestran en las figuras 14A-B, como representaciones de la curva de fusión derivada (figura 14A) y de la curva de fusión normalizada (figura 14B). La fusión del elemento sonda de la plantilla de tipo natural tiene lugar a aproximadamente 72°C, mientras que las plantillas con errores de apareamiento funden a temperaturas inferiores, teniendo cada genotipo una curva de fusión característica. Todos los genotipos son fáciles de diferenciar.

Ejemplo 11. Genotipado de múltiples locus con cebadores Snapback bilaterales.

El genotipado Snapback se puede multiplexar a lo largo del eje de la temperatura de manera similar a otras técnicas de fusión (9). Por ejemplo, se pueden utilizar dos o más grupos de cebadores (cada uno con un cebador Snapback) para amplificar y genotipar múltiples locus, de manera ilustrativa teniendo todos los alelos separados en la temperatura de fusión con sus respectivos elementos sonda. De manera alternativa, se pueden genotipar múltiples locus en un amplicón con amplificación utilizando dos cebadores Snapback o un cebador Snapback y una sonda no marcada, cada una puede obtener información de más de un locus mediante la formación de bucles en la plantilla entre las regiones constantes (13).

Cuando se utilizan dos cebadores Snapback para amplificar un único ácido nucleico diana, de manera ilustrativa, se puede utilizar una PCR simétrica para dar lugar a una concentración suficiente de ambos productos de cadenas. En el presente ejemplo, el gen de CFTR se amplificó utilizando una PCR simétrica, con cada cebador a 0,5 μM. Los cebadores incluían un error de apareamiento en el extremo 5' de dos bases y un elemento sonda con 17 bases (Snapback 1) o con 28 bases (Snapback 2) que producía un producto PCR de 249 pb del exón 10 de CFTR con bucles en horquilla de 69 y 66 bases, respectivamente. Las concentraciones del ADN plantilla fueron 5 ng/μl. Se recubrieron los volúmenes de reacción de 2 μl en una placa de 96 pocillos fueron recubiertos con 10-15 μl de aceite mineral (Sigma), se centrifugó la placa (1500 g durante 3-5 min), y se realizó la PCR en un ciclador térmico PTC-200 (Bio-Rad). Se realizó una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 10 segundos y 72°C durante 15 segundos.

Dado que la formación de amplicón de longitud completa de doble cadena es una reacción intermolecular que depende de la concentración y la formación de bucles en horquilla Snapback es una reacción intramolecular que es, en general, independiente de la concentración, la dilución del producto de PCR favorecerá la formación de bucles

Snapback, en comparación con el mismo producto de PCR no diluido. De este modo, en este ejemplo ilustrativo, después de la PCR, las muestras de CFTR se diluyeron con agua (18 μ l para una dilución de 10 veces), se centrifugaron, se calentaron hasta 95°C (por encima de la temperatura de fusión para el amplicón de longitud completa) en un LightScanner[®], se extrajeron del instrumento para un enfriamiento por debajo de 40°C (temperatura ambiente, que está por debajo de la temperatura de fusión de las horquillas de este ejemplo), seguido de la obtención de fluorescencia durante el calentamiento a 0,15°C/s en un LightScanner[®]. Se ha descubierto que el calentamiento y el enfriamiento, de manera ilustrativa el enfriamiento rápido (de manera ilustrativa, como mínimo, 2°C/s, y de manera más ilustrativa, como mínimo, 5° C/s), posterior a la dilución y anterior a la fusión con obtención de fluorescencia, producían una buena señal a partir de las horquillas Snapback. Sólo se observaron transiciones de fusión débiles de horquillas en PCR simétrica (i) sin dilución o (ii) con dilución y sin calentamiento y enfriamiento antes de la obtención de fluorescencia durante la fusión. Se entiende que se pueden utilizar otros métodos para favorecer la formación de bucles intramoleculares Snapback, tales como con el ajuste del pH.

El Snapback 1 cubría las variantes F508del, I507del, F508C, e I506V con transiciones de fusión entre 46-60°C. El Snapback 2 más largo cubría la variante Q493X y fundía entre 66 y 72°C. Los datos se muestran en la figura 15 como una representación de la derivada negativa después de la normalización y la resta del ruido de fondo. Se podían diferenciar el tipo natural (círculos), el heterocigoto compuesto F508del/Q493X (diamantes pequeños conectados), heterocigoto I506V (diamantes pequeños), heterocigoto F508C (cuadrados pequeños), heterocigoto I507del (cuadrados grandes), heterocigoto F508del (diamantes grandes conectados), y homocigoto F508del (cuadrados conectados).

Aunque en este ejemplo se utilizó una dilución de diez veces, se entiende que se pueden utilizar otras proporciones de dilución dependiendo del grado de minimización deseado de la señal del amplicón de longitud completa. Si sólo se desea un genotipado, puede ser apropiada una dilución mayor, mientras que si se desean tanto el genotipado como el rastreo, puede ser apropiado una dilución menor. De manera alternativa, la muestra se puede fundir para el rastreo sin dilución y a continuación fundirse de nuevo después de la dilución para el genotipado. Además, aunque el producto de amplificación PCR se diluyó en este ejemplo, puede ser posible obtener un resultado similar deteniendo la amplificación de PCR antes de la fase de estabilización, limitando de este modo la cantidad de amplicón de longitud completa, con una concentración resultante inferior del amplicón.

Se han demostrado métodos adicionales para favorecer la formación de bucles Snapback sobre dobles cadenas del amplicón de longitud completa después de PCR simétrica. Por ejemplo, esta formación de horquillas se puede favorecer mediante un enfriamiento rápido después de la desnaturalización. Esto se puede conseguir en capilares en el LightCycler mediante el enfriamiento a una velocidad programada de -20°C/s y también se ha observado a -10°C/s y -5°C/s. De manera alternativa, se puede obtener un enfriamiento rápido suficiente para favorecer las horquillas mediante enfriamiento en termocicladores en bloque, tales como el MJ PTC-200, en los que las muestras desnaturalizadas se enfriaron por debajo de 35°C en 60 segundos. La formación de horquillas después de la desnaturalización se puede favorecer de manera elevada mediante el enfriamiento de muestras desnaturalizadas en capilares mediante su inmersión en agua helada, en la que se puede obtener una temperatura inferior a 5°C en menos de 2 segundos. Si las muestras se enfrían rápidamente, no requieren necesariamente diluirse después de PCR simétrica, dependiendo de las cantidades deseadas de horquilla y doble cadena de amplicón de longitud completa.

Un pH elevado, de manera ilustrativa desde pH 8,5 a 11,0, también favorece la formación de horquillas sobre los amplicones de doble cadena de longitud completa. La PCR se puede realizar a pH elevado, o el pH se puede incrementar después de la PCR, de manera ilustrativa mediante la adición de una solución diluida de NaOH o un tampón de pH elevado. Por ejemplo, la formación de horquillas está favorecida después de la amplificación de PCR en tampones de AMP (aminometil propanol) de pH 8,9 a 10,8. De manera alternativa, la PCR se puede realizar en tampón Tris 10 mM, pH 8,5, y añadiendo tampones AMP 10 mM entre pH 9 y 1 después de la PCR para hacer que la solución sea más básica. El NaOH no tamponado diluido también se puede añadir directamente, por ejemplo, se pueden añadir 1-9 μ l de NaOH 0,01 M a los productos de reacción de una PCR de 10 μ l tamponados con Tris 10 mM, pH 8,5. En resumen, el producto de amplificación se puede ajustar mediante la combinación de uno o más de los siguientes puntos para favorecer la formación de horquillas durante la hibridación intermolecular: 1) concentración de producto inferior, de manera ilustrativa obtenida mediante la limitación de la cantidad de producto PCR producido (número bajo de ciclos o concentraciones de cebador bajas), o mediante la dilución después de la PCR; 2) enfriamiento rápido después de la desnaturalización; y 3) pH elevado (de manera ilustrativa 8,5-11,0) obtenido mediante el desarrollo de la PCR a pH elevado o mediante la adición de una solución básica después de completar la PCR.

60 **Ejemplo comparativo 12. Cebadores Snapback como dadores de transferencia de energía para genotipado multicolor.**

Sería posible incluso un multiplexado mayor si se pudieran "colorear" diferentes elementos sonda con diferentes

fluoróforos. Esta estrategia se ha observado con iFRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia inducida), en la que una solución de un colorante de dsADN (SYBR Green I) en presencia de una doble cadena de ADN proporciona una fluorescencia dadora a un colorante aceptor unido covalentemente a una cadena de la doble cadena (14).

Para demostrar la transferencia de energía por resonancia y la viabilidad del multiplexado de colores con cebadores snapback, se comparó un cebador Snapback con un colorante LCRed640 (Roche Diagnostics) unido covalentemente al extremo 5' con una sonda marcada en 5' de la misma secuencia. Para la amplificación de Snapback, la secuencia del cebador directo fue 1F (tcattctcgttttctgaactg (SEQ ID NO: 5)) y la del cebador Snapback fue Red640-GGATTCAATGAATATTTATGACGAatgttttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 15). Para la reacción con sonda marcada utilizada como control, el cebador directo fue de nuevo 1F, el cebador inverso fue 1R (atgttttagactggatagcgt (SEQ ID NO: 40)) y la sonda marcada fue Red640-GGATTCAATGAATATTTATGACGA-P (SEQ ID NO: 41), en la que "P" es un 3'-fosfato. La PCR se realizó en presencia de 0,5 veces LCGreen Plus tal como se ha descrito en el ejemplo 3, a excepción de que la temperatura de extensión fue de 74°C, se realizaron 50 ciclos, la concentración del cebador directo fue de 0,1 µM, la concentración del cebador inverso (Snapback o normal) fue de 0,5 µM, y la de la sonda marcada (si estaba presente) fue de 0,5 µM. El análisis de fusión se realizó en el LightCycler® en el canal F2 (LCRed640) a 0,2°C/s desde 50 a 87°C.

La figura 16 muestra representaciones de la derivada de la fusión en el canal LCRed640 que muestran la transferencia de energía por resonancia entre LCGreen Plus y LCRed640 unido covalentemente. Las transiciones de fusión de LCRed640 son calaras utilizando cebadores Snapback o sondas marcadas, aunque el bucle intramolecular estabiliza las dobles cadenas Snapback en aproximadamente 9°C en relación a la doble cadena intermolecular. Mediante el marcaje de diferentes cebadores Snapback con diferentes fluoróforos que son excitados por el mismo colorante de dsADN (por ejemplo, LCGreen Plus), se puede conseguir el multiplexado de colores. Se utilizan técnicas de compensación del color, de manera preferente métodos que justifican el efecto de la temperatura en la interferencia entre canales (9), para deconvolucionar la señal espectral compleja en componentes individuales.

En la figura 16, la reacción de control de la sonda marcada revela un máximo de fusión a 63°C, un resultado de FRET entre LCGreen Plus unido y la sonda marcada. El cebador Snapback marcado, estabilizado en aproximadamente 9°C a partir de la unión intramolecular, presenta una temperatura de fusión de aproximadamente 72°C.

Ejemplo 13. Genotipado Snapback combinado con rastreo de amplicones.

La amplificación asimétrica con cebadores Snapback produce tanto una horquilla para el genotipado como un producto de doble cadena para el rastreo de amplicones. Por lo tanto, son posibles tanto el genotipado como el rastreo a partir de la misma curva de fusión con cebadores Snapback. En la figura 17 se muestra un esquema para dicho método. Dado que el genotipado Snapback se realiza normalmente con PCR asimétrica, la señal de amplicón no es tan intensa como con amplificación simétrica, y la precisión del rastreo de heterocigotos es actualmente desconocida. No obstante, el potencial para cribar mutaciones y variantes de secuencia específicas de un genotipo en un proceso es atractivo y puede eliminar potencialmente el 99% de la carga de secuenciación en el análisis del gen completo. Cualquier diferencia de secuencia en la secuencia entre los cebadores desvía la transición de fusión del amplicón a temperaturas inferiores debido a las dobles cadenas heterólogas formadas. Además, con horquillas Snapback, se pueden identificar de manera definitiva variantes habituales bajo el elemento sonda. Las variantes homocigóticas también se identifican mediante el elemento sonda, pero no pueden alterar la fusión del amplicón. Finalmente, si la transición del amplicón indica una variante heterocigótica, pero la transición snapback es normal, se sugiere una variante rara o nueva fuera de la región sondada y puede requerir la secuenciación para la identificación.

Como alternativa a la PCR asimétrica, se pueden realizar el rastreo y el genotipado en dos etapas utilizando un cebador Snapback y una PCR simétrica, con y sin dilución. Tal como se ha descrito anteriormente, la PCR simétrica hasta la fase de estabilización favorece la formación de amplicón de doble cadena de longitud completa, mientras que la dilución favorece la formación de bucles Snapback. Los cebadores fueron tctcagggtatattatgagaaataaatgaa (SEQ ID NO: 42) y gtAAGGAGGAACGCTCTATCtctcacaataataaagagaaggca (SEQ ID NO: 43) y se amplificó un producto de PCR de 211 pb que incluía el exón 4 de CFTR. El bucle de la horquilla fue de 46 bases con una longitud de la doble cadena de la horquilla de 18 pb. La PCR se realizó como en el ejemplo 11, a excepción de que se utilizaron volúmenes de 5 µl con Mg⁺⁺ 2 mM y 0,25 µM de cada cebador. El ciclo de temperatura incluía una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, se guió de 36 ciclos de 95°C durante 30 s, 62°C durante 10 s, y 72°C durante 30 s. La obtención de curvas de fusión para el rastreo fue de 60 a 95°C antes de cualquier adición o dilución. La figura 18A muestra las curvas de fusión para rastreo de varias muestras de tipo natural y un heterocigoto individual R117H resultante de un cambio de base G a A. El heterocigoto individual R117H es claramente visible, lo cual indica que se pueden utilizar dichas curvas de fusión simétricas sin dilución para el rastreo. La figura 18B muestra una representación de la derivada del mismo producto de amplificación posterior a la dilución con 45 µl de

agua (una dilución de 10 veces) y el calentamiento y el enfriamiento tal como se ha descrito anteriormente antes de la obtención de datos de la fusión. De nuevo, el heterocigoto R117H es fácilmente distinguible para la identificación específica mediante genotipado con cebadores Snapback. Aunque en ambas curvas se observa el mismo heterocigoto, esto demuestra que es posible rastrear y genotipar con la misma amplificación de PCR utilizando un cebador Snapback.

Ejemplo 14. Obtención de haplotipos con cebadores Snapback.

Mediante la combinación de la amplificación específica de alelo con el genotipado con cebadores Snapback, se da a conocer un método sencillo para la obtención de haplotipos. Se consideran dos locus genéticos, A y B, cada uno con dos alelos, A1, A2, y B1, B2. Se diseña el elemento cebador de un cebador snapback para que se aparee al locus A y se diseña el elemento cebador del cebador Snapback para que se aparee al locus B, con el segundo cebador diseñado para flanquear el locus B, de manera que el locus B es amplificado por los dos cebadores. Si el cebador Snapback se diseña sólo para extender el alelo 1 del locus A (de manera ilustrativa colocando el extremo 3' en la posición variable del locus A), entonces el tipo de locus B identificado mediante la fusión del elemento sonda se debe asociar con (el mismo haplotipo que) el alelo A1. De este modo, si el elemento sonda extiende A1, el elemento sonda se aparea con B1, y la curva de fusión de la sonda indica un apareamiento, está presente un haplotipo A1B1. Si la curva de fusión de la sonda indica un error de apareamiento, está presente un haplotipo A1B2. Si el elemento cebador extiende A2, el elemento sonda se aparea con B1, y la curva de fusión de la sonda indica un apareamiento, está presente un haplotipo A2B1. Si la curva de fusión de la sonda indica un error de apareamiento, está presente un haplotipo A2B2.

REFERENCIAS

1. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes ("Discriminación alélica mediante PCR de traducción de muescas con sondas fluorogénicas"). *Nucleic Acids Res.* 1993 Agosto 11; 21(16): 3761-6.
2. Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence ("Detección de productos PCR utilizando amplicos de autosondeo y fluorescencia"). *Nat Biotechnol* 1999; 17: 804-7.
3. Solinas A, Brown LJ, McKeen C, Mellor JM, Nicol J, Thelwell N, Brown T. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications ("Cebadores Scorpion de doble cadena en análisis de SNP y aplicaciones de FRET"). *Nucleic Acids Res* 2001; 29:E96.
4. Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection ("Modo de acción y aplicación de cebadores Scorpion para la detección de mutaciones"). *Nucleic Acids Res* 2000; 28:3752-61.
5. Wilton SD, Honeyman K, Fletcher S, Laing NG. Snapback SSCP analysis: engineered conformation changes for the rapid typing of known mutations ("Análisis SSCP Snapback: cambios diseñados de conformación para el tipificado rápido de mutaciones conocidas"). *Hum Mutat* 1998; 11:252-8.
6. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome ("Secuenciación precisa de polonias multiplexadas de un genoma bacteriano desarrollado"). *Science* 2005;309:1728-32.
7. Wetmur JG, Kumar M, Zhang L, Palomeque C, Wallenstein S, Chen J. Molecular haplotyping by linking emulsion PCR: analysis of paraoxonase 1 haplotypes and phenotypes ("Obtención de haplotipos moleculares mediante PCR de emulsion por unión: análisis de haplotipos y fenotipos de paraoxonasa 1"). *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 2615-9.
8. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis ("Sensibilidad y especificidad del rastreo de polimorfismos de un solo nucleotide mediante análisis de fusión de alta resolución"). *Clin Chem* 2004; 50: 1748-54.
9. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays ("Ensayos de PCR multiplexados a tiempo real"). *Methods* 2001; 25: 430-42.
10. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification ("Monitorización continua de fluorescencia de la amplificación de ADN de ciclos rápidos"). *Biotechniques* 1997; 22: 130-1, 4-8.
11. Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, Wang L, Wittwer CT. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye ("Genotipado de tubo cerrado con sondas de oligonucleótidos marcadas y un colorante de ADN saturante"). *Clin Chem* 2004; 50: 1328-35.
12. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen ("Genotipado de alta resolución mediante análisis de fusión de amplicones utilizando LCGreen"). *Clin Chem* 2003; 49: 853-60.
13. Pont-Kingdon G, Lyon E. Direct molecular haplotyping by melting curve analysis of hybridization probes: beta 2-adrenergic receptor haplotypes as an example (Obtención directa de haplotipos moleculares mediante análisis de curvas de fusión de sondas de hibridación: haplotipos de receptores beta 2-adrenérgicos como ejemplo). *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e89.

14. Howell WM, Jobs M, Brookes AJ. iFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. ("iFRET: un sistema de fluorescencia mejorada para análisis de fusión de ADN"). *Genome Res* 2002; 12: 1401-7.
15. Wittwer C T, et al., Real-Time PCR. In: Persing D, et al., eds. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. (Microbiología molecular de diagnóstico: principios y aplicaciones") ASM Press, 2004.
- 5 16. Aoshima T, Sekido Y, Miyazaki T, Kajita M, Mimura S, Watanabe k, Shimokata K, Niwa T. Rapid Detection of Deletion Mutations in Inherited Metabolic Diseases by Melting Curve Analysis with LightCycler. ("Detección rápida de mutaciones por delección en enfermedades metabólicas heredadas mediante análisis de curvas de fusión con LightCycler"). *Clin Chem* 2000; 46: 119-22.
- 10 17. Marziliano N, Pelo E, Minuti B, Passerini I, Torricelli F, Da Prato L. Melting Temperature Assay for a UGT1A Gene Variant in Gilbert Syndrome ("Ensayo de la temperatura de fusión para una variante génica UGT1A en síndrome de Gilbert"). *Clin Chem* 2000; 46: 423-55.
18. Lipsky R H, Mazzanti C, Rudolph J, Xu K, Vyas G, Bozak D, Radel M, Goldman D. DNA Melting Analysis for Detection of Single Nucleotide Polymorphisms ("Análisis de fusión de ADN para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido"). *Clin Chem* 2001; 47: 635-44.
- 15 19. Pirulli D, Boniotto M, Puzzer D, Spanò A, Amoroso A, Crovella S. Flexibility of Melting Temperature Assay for Rapid Detection of Insertions, Deletions, and Single-Point Mutations of the AGXT Gene Responsible for Type 1 Primary Hyperoxaluria ("Flexibilidad del ensayo de la temperatura de fusión para la detección rápida de inserciones, deleciones y mutaciones puntuales del gen AGXT responsables para la hiperoxaluria primaria de tipo 1"). *Clin Chem* 2000; 46: 1842-44.
- 20 20. Tanriverdi S, Tanyeli A, Baslamisli F, Köksal F, Kiliç Y, Feng X, Batzer G, Tzipori S, Widmer G. Detection and Genotyping of Oocysts of *Cryptosporidium parvum* by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis ("Genotipado de oocistas de *Cryptosporidium parvum* mediante PCR a tiempo real y análisis de curvas de fusión"). *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3237-44.
- 25 21. Hladnik U, Braida L, Boniotto M, Pirulli D, Gerin F, Amoroso A, Crovella S. Single-tube genotyping of MBL-2 polymorphisms using melting temperature analysis ("Genotipado con un único tubo de polimorfismos MBL-2 utilizando el análisis de la temperatura de fusión"). *Clin Exp Med.* 2002; 2: 105-08.
22. von Ahsen N, Oellerich M, Schütz E. Limitations of Genotyping Based on Amplicon Melting Temperature. ("Limitaciones del genotipado basado en la temperatura de fusión de amplicones"). *Clin Chem* 2001; 47: 1331-1332.
- 30 23. Douthart R J, Burnett J, Beasley F, Frank B, Binding of Ethidium Bromide to Double-Stranded Ribonucleic Acid. ("Unión de bromuro de etidio a ácido ribonucleico de doble cadena"). *Biochemistry* 1973; 12: 214-20.
24. Aktipis S, Martz W, Kindelis A. Thermal Denaturation of the DNA-Ethidium Complex. Redistribution of the Intercalated Dye During Melting. ("Desnaturalización térmica del complejo ADN-etidio. Redistribución del colorante intercalado durante la fusión"). *Biochemistry* 1975; 14: 326-31.
- 35 25. Highsmith WE, Jr., Jin Q, Nataraj AJ, O'Connor JM, Burland VD, Baubonis WR, Curtis FP, Kusukawa N, Gamer MM. Use of a DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. I: construction of the toolbox and evaluation of heteroduplex analysis ("Utilización de herramientas de ADN para la caracterización de métodos de rastreo de mutaciones. I: construcción de las herramientas y evaluación del análisis de dobles cadenas heterólogas"). *Electrophoresis* 1999; 20: 1186-94.
- 40 26. Margraf RL, Mao R, Wittwer CT. Masking selected sequence variation by incorporating mismatches into melting analysis probes ("Enmascaramiento de la variación de secuencias seleccionadas mediante la incorporación de errores de apareamiento en sondas de análisis de fusión"). *Hum Mutat.* 2006 Mar; 27(3): 269-78.

Aunque la presente invención se ha descrito con detalle en referencia a realizaciones preferentes, existen variaciones y modificaciones que se encuentran en el alcance y el espíritu de la invención tal como se describe y define en las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> University of Utah Research Foundation
Idaho Technology, Inc.
Wittwer, Carl T
Zhou, Luming
Poritz, Mark A
- 55 <120> Cebadores para el análisis de fusión
- <130> P01520-WO-00
- <150> US 60/905, 721
- 60 <151> 2007-03-08
- <160> 43

<170> Patent In version 3. 5

<210> 1
 <211> 49
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> plásmido sintético

10 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(28)
 <223> posición de unión a la sonda para el cebador Snapback

15 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (29)..(49)

20 <400> 1
 aat cgt cat a aatattcatt gaatcccctc attctcgttt tctgaactg 49

<210> 2
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> plásmido sintético

30 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)

35 <400> 2
 atgttagact ggat agcgt 20

<210> 3
 <211> 59
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> plásmido sintético

45 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1) .. (28)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(38)
 <223> t en bloqueador de extensión de derivado básico de tetrahidrofurano

55 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (39)..(55)

60 <400> 3
 aatcgtcata aatattcatt gaatcccnn nnnnnnntc attctcgttt tctgaactg 59

<210> 4

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

<220>
 <221> primer_bind
 10 <222> (1)..(20)

<400> 4
 atgttttagac tggatagcgt 20

15 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

<220>
 <221> primer_bind
 25 <222> (1)..(20)

<400> 5
 tcattctcgtt ttctgaactg 21

30 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

<220>
 <221> misc_binding
 40 <222> (1)..(6)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
 <221> primer_bind
 45 <222> (7)..(26)

<400> 6
 gaatatatggt tagactggatagcgt 26

50 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

<220>
 <221> misc_binding
 60 <222> (1)..(8)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (9)..(28)

5 <400> 7
 tgaatattat gtttagactggatagcgt 28

<210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

15

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(10)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

20

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (11)..(30)

25 <400> 8
 atgaatattt atgttagactggatagcgt 30

<210> 9
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

35

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(12)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

40

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (13)..(32)

45 <400> 9
 aatgaatatt taatgttag actggatagcgt 32

<210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

55

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(14)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

60

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (15)..(34)

<400> 10
caatgaatat ttatatgttt agactggata gcgt 34

5 <210> 11
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador para el plásmido artificial

<220>
<221> misc_binding
15 <222> (1)..(16)
<223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
<221> primer_bind
20 <222> (17)..(36)

<400> 11
tcaatgaata tttatgatgt ttagactgga tagcgt 36

25 <210> 12
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador para el plásmido artificial

<220>
<221> misc_binding
35 <222> (1)..(18)
<223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
<221> primer_bind
40 <222> (19)..(38)

<400> 12
ttcaatgaat atttatgaat gtttagactg gatagcgt 38

45 <210> 13
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador para el plásmido artificial

<220>
<221> misc_binding
55 <222> (1)..(20)
<223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
<221> primer_bind
60 <222> (20)..(40)

<400> 13
attcaatgaa ttttatgac atgttagac tggatagcgt 40

<210> 14
 <211> 42
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

 10 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(22)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 15 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (23)..(42)

 <400> 14
 20 gattcaatga atatattatga cgatgttag actggatagcgt 42

 <210> 15
 <211> 44
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

 30 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 35 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)

 <400> 15
 40 ggattcaatg aatattatg acgaatggtt agactggatagcgt 44

 <210> 16
 <211> 46
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

 50 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(26)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 55 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (27)..(46)

 <400> 16
 60 gggattcaat gaatattat gacgatatgt ttagactgga tagcgt 46

 <210> 17
 <211> 30

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 10 <223> error de apareamiento de dos bases

 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(10)
 15 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (11)..(30)
 20
 <400> 17
 cctgaatatt atgttagac tggatagcgt 30

 <210> 18
 25 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 35 <223> error de apareamiento de dos bases

 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(14)
 40 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (15)..(34)
 45
 <400> 18
 gtaatgaata ttaatgttt agactggatagcgt 34

 <210> 19
 50 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1).. (2)
 60 <223> error de apareamiento de dos bases

 <220>
 <221> misc_binding

<222> (3)..(18)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 <220>
 5 <221> primer_bind
 <222> (19)..(38)

 <400> 19
 cgccaatgaa tatttatgat gtttagactg gatagcgt 38
 10
 <210> 20
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> error de apareamiento de dos bases

 <220>
 25 <221> misc_binding
 <222> (3)..(22)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 <220>
 30 <221> primer_bind
 <222> (23)..(42)

 <400> 20
 tcattcaatg aatatttatg acatgttag actggatagcgt 42
 35
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 45 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)

 <400> 21
 gcaatccgct ttgcttctga 20
 50
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 60 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)

<400> 22
 gatatttgaa gtctttcggg 20

5 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

15 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)

<400> 23
 gttggagttt gcttccggtc 20

20 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

30 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)

<400> 24
 atgaccttt atcaaaagga 20

35 <210> 25
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> error de apareamiento de dos bases

50 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

55 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)

<400> 25
 tcgattcaat gaatatttat gacgatgttt agactggatagcgt 44

60 <210> 26
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

5 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

10 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(41)

<400> 26
 15 ggattcaatg aatatttatg acgacgtcca atactgcgga a 41

<210> 27

<211> 45
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

25 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

30 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(45)

<400> 27
 35 ggattcaatg aatatttatg acgaaaaat a gcgagaggct ttgc 45

<210> 28
 <211> 44
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

45 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

50 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)

<400> 28
 55 ggattcaatg aatatttatg acgataagag caacactatc ataa 44

<210> 29
 <211> 44
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(24)
 5 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)
 10
 <400> 29
 ggattcaatgaatattatg acgaaat gca gat acat aac gccca 44

 <210> 30
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15

 <220>
 20 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(24)
 25 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)
 30
 <400> 30
 ggattcaatg aatatttatg acgaacaaca ttattacagg taga 44

 <210> 31
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 40 <223> cebador para el plásmido artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 45 <223> error de apareamiento de dos bases

 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(24)
 50 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)
 55
 <400> 31
 tcattcaatg aatatttatg acgaatggtt agactggata gcgt 44

 <210> 32
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> error de apareamiento de dos bases

10 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

15 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)

20 <400> 32
 acaatattta tgacgattcc gcagatgttt agactggata gcgt 44

<210> 33
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2) error de apareamiento
 <223> error de apareamiento de dos bases

35 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

40 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)

45 <400> 33
 gctcaatgaa tatttatgac gattatgttt agactggata gcgt 44

<210> 34
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

60 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)

5 <400> 34
 ctgggggattc aatgaatatt tatgatgttt agactggata gcgt 44

<210> 35
 <211> 44
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> error de apareamiento de dos bases

20 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(24)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

25 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (25)..(44)

30 <400> 35
 agtttgaggg ggattcaatg aataatgttt agactggata gcgt 44

<210> 36
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> primer_bind
 40 <222> (1)..(22)

<400> 36
 tgtgccttc aaattcagat tg 22

45 <210> 37
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> contiene varias secuencias de gen de CFTR de Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (1)..(2)
 <223> error de apareamiento de dos bases

<220>
 <221> misc_binding
 60 <222> (3)..(26)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (27)..(46)

5 <400> 37
 ctgaaagac aatatagtct tggagacagc aaatgctgc tagacc 46

<210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(21)

15 <400> 38
 acttctaag atgattatggg 21

20 <210> 39
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> contiene varias secuencias de gen de CFTR de Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> error de apareamiento de dos bases

30

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (3)..(30)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

35

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (31)..(50)

40 <400> 39
 tcaatatcat ctttggtgtt tcctatgatg acatagtttc ttacctctcc 50

45 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador para el plásmido artificial

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)

55 <400> 40
 atgttagac tggat agcgt 20

60 <210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sonda para plásmido artificial

5 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)..(24)
 <223> probe

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> unido a fluoróforo

15 <400> 41
 ggattcaatg aatatttatg acga 24

<210> 42
 <211> 30

20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> primer_bind
 25 <222> (1)..(30)

<400> 42
 tctcagggtg ttttatgagaaataaatgaa 30

30 <210> 43
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> contiene varias secuencias de gen de CFTR de Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(2)
 <223> error de apareamiento de dos bases

<220>
 <221> misc_binding
 45 <222> (3)..(20)
 <223> región de unión de la sonda para el cebador Snapback

<220>
 <221> primer_bind
 50 <222> (21)..(45)

<400> 43
 gtaaggagga acgctctatc tcct cacaat aataaagaga aggca 45

REIVINDICACIONES

1. Método para el análisis de ácidos nucleicos que comprende las etapas de
 5 mezclar un ácido nucleico diana con un primer cebador y un segundo cebador para formar una mezcla, estando los
 cebadores configurados para amplificar el ácido nucleico diana, en el que el primer cebador comprende un elemento
 sonda específico para un locus del ácido nucleico diana y una región cebadora específica de plantilla, en el que el
 elemento sonda se encuentra en 5' de la región cebadora específica de plantilla, y en el que el primer cebador es un
 oligonucleótido que no presenta ningún colorante ni inhibidor unido covalentemente;
 10 amplificar el ácido nucleico diana para generar un amplicón,
 permitir que el elemento sonda se hibride al locus para formar una horquilla, y
 generar una curva de fusión para el elemento sonda midiendo la fluorescencia de un colorante que une los dsADN
 cuando se calienta la mezcla, en el que el colorante no está unido covalentemente al primer cebador.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que el primer cebador se suministra a una concentración superior a la del
 15 segundo cebador para la amplificación asimétrica.
3. Método, según la reivindicación 1, en el que el primer cebador comprende además una región 5' con error de
 apareamiento del elemento sonda.
- 20 4. Método, según la reivindicación 1, en el que el primer cebador no presenta un bloqueador de extensión.
5. Método, según la reivindicación 1, en el que el primer y segundo cebadores son suministrados esencialmente a la
 misma concentración, y en el que el segundo cebador comprende un elemento sonda específico para un segundo
 locus del ácido nucleico diana y una región cebadora específica de plantilla, en el que el elemento sonda del
 25 segundo cebador se encuentra 5' de la región cebadora específica de plantilla.
6. Método, según la reivindicación 5, que comprende además la etapa de diluir el amplicón antes de la generación
 de una curva de fusión.
- 30 7. Método, según la reivindicación 1, en el que la horquilla presenta un bucle de entre 20 y 50 bases.
8. Método, según la reivindicación 1, en el que elemento sonda es inferior a 10 bases.
9. Método, según la reivindicación 1, en el que el locus presenta un polimorfismo de un solo nucleótido conocido y el
 35 polimorfismo de un solo nucleótido está localizado no más próximo de 8 bases desde un extremo del elemento
 sonda.
10. Método, según la reivindicación 1, en el que
 40 el ácido nucleico diana comprende además un segundo locus, y
 la región cebadora específica de plantilla del primer cebador está configurada para amplificar el ácido nucleico diana
 sólo si está presente un alelo concreto del segundo locus.
11. Método, según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de analizar la forma de la curva de fusión.
- 45 12. Método, según la reivindicación 1, en el que la mezcla se ajusta para favorecer la formación de horquillas en el
 elemento sonda antes de la generación de la curva de fusión.
13. Método, según la reivindicación 1, en el que la amplificación se termina antes de alcanzar la fase de
 50 estabilización, para limitar la concentración de amplicón.

Fig. 1

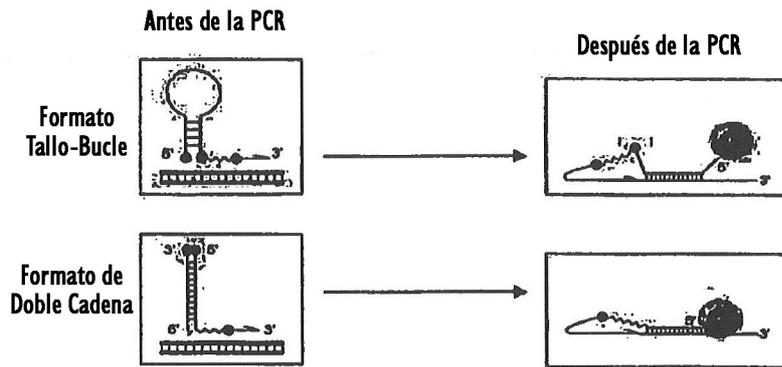
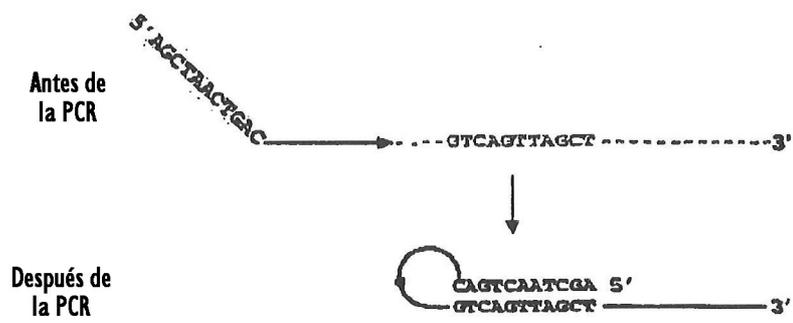
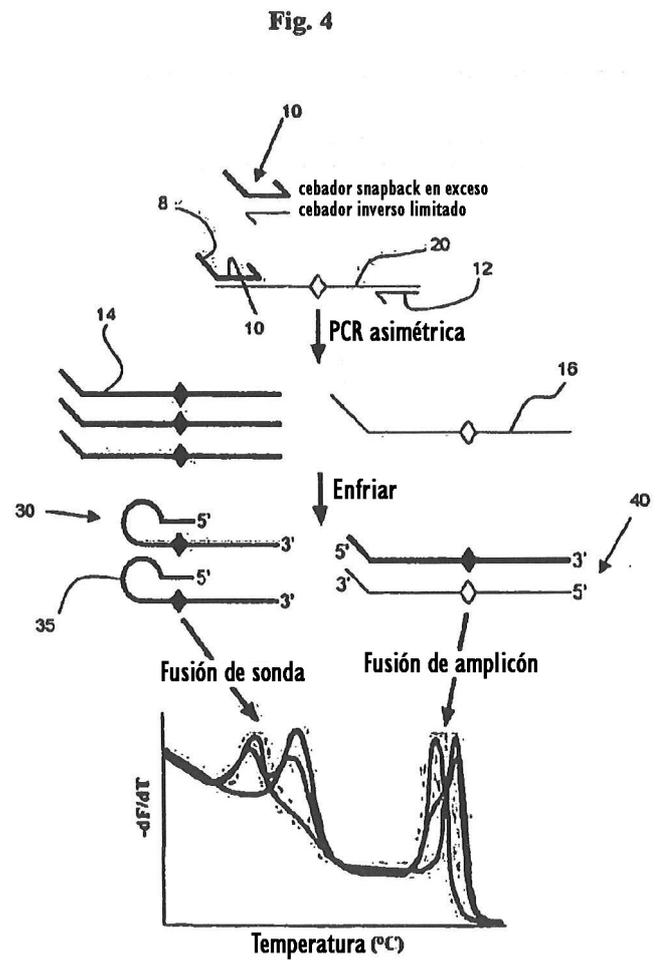
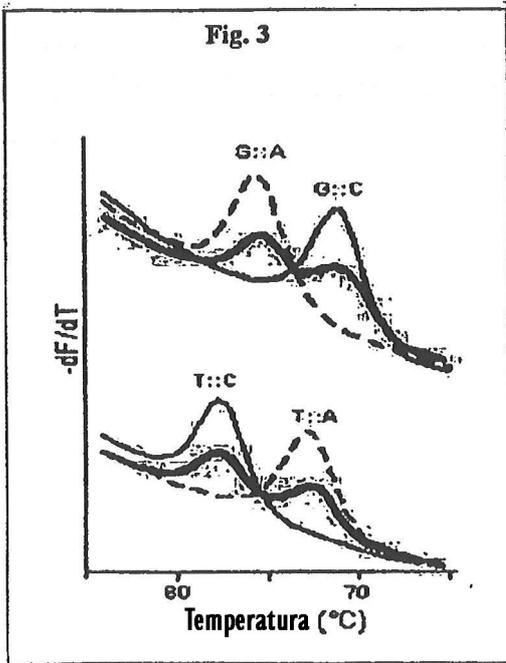
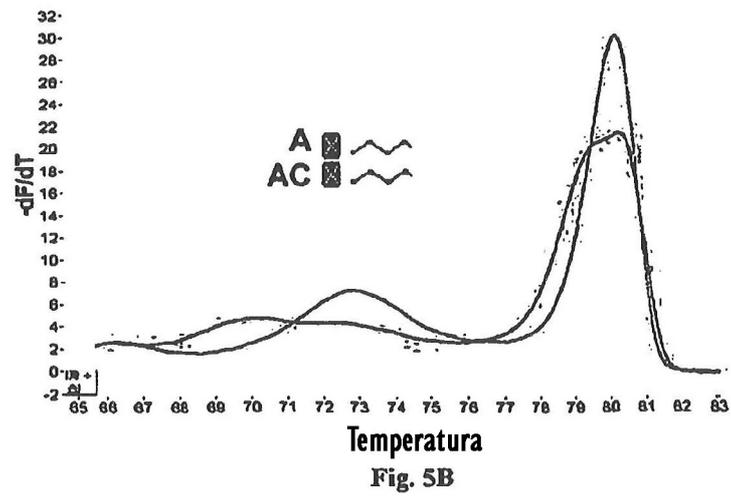
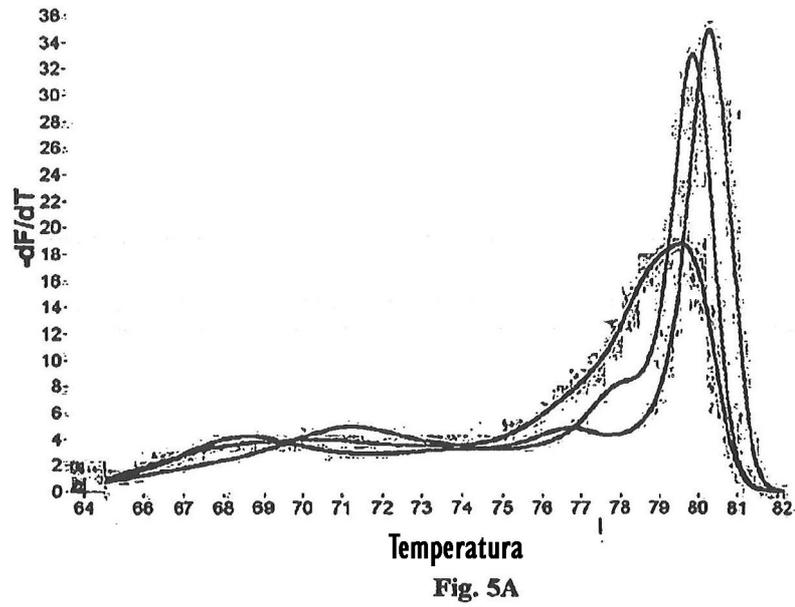


Fig. 2







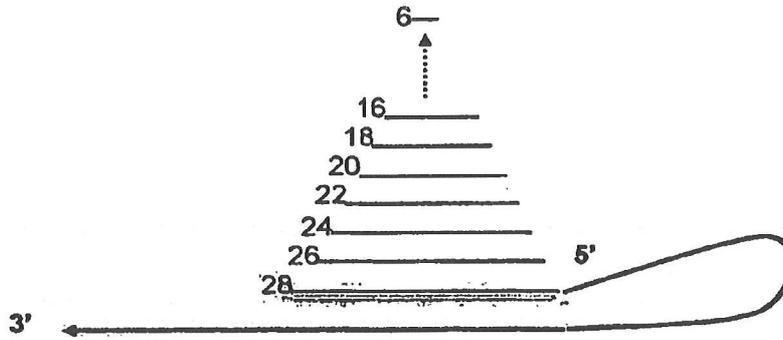


Fig. 6A

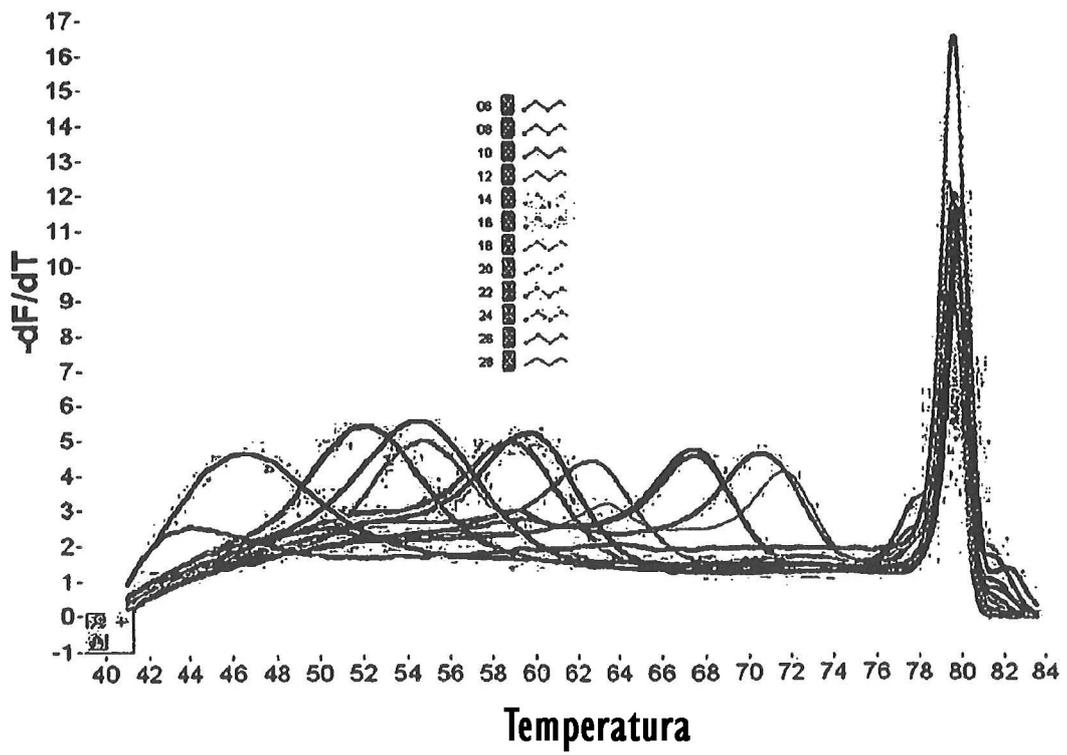


Fig. 6B

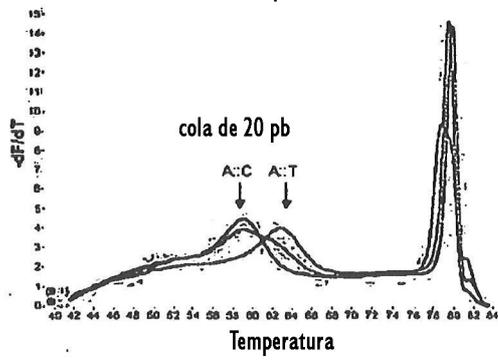
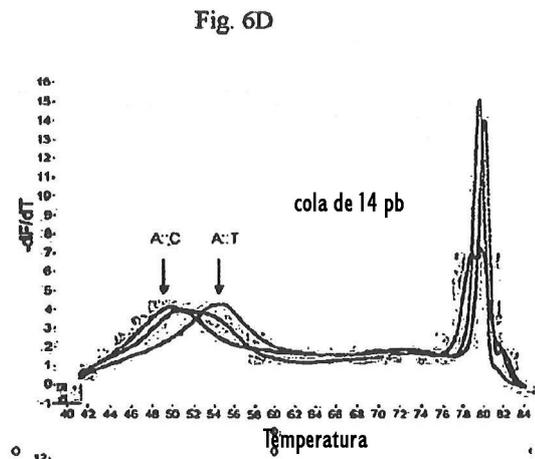
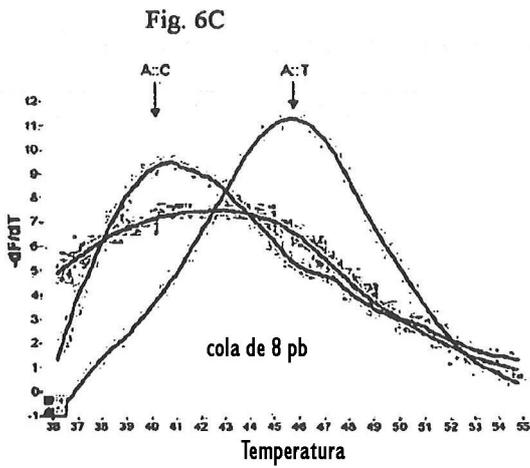


Fig. 6E

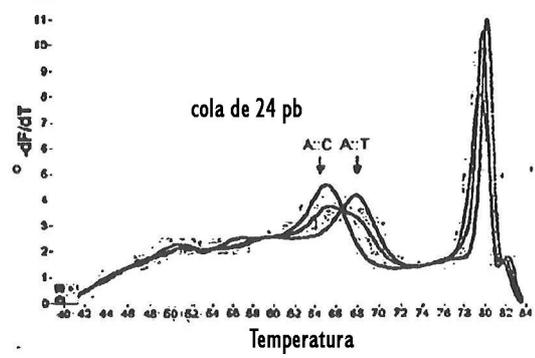


Fig. 6F

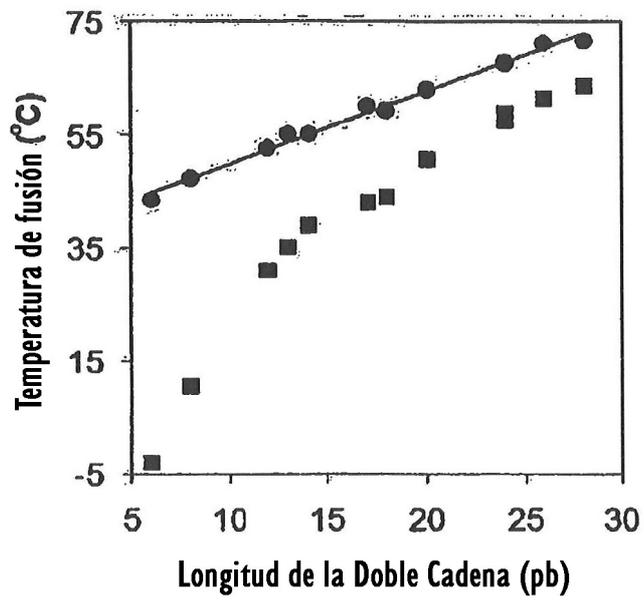


Fig. 6G

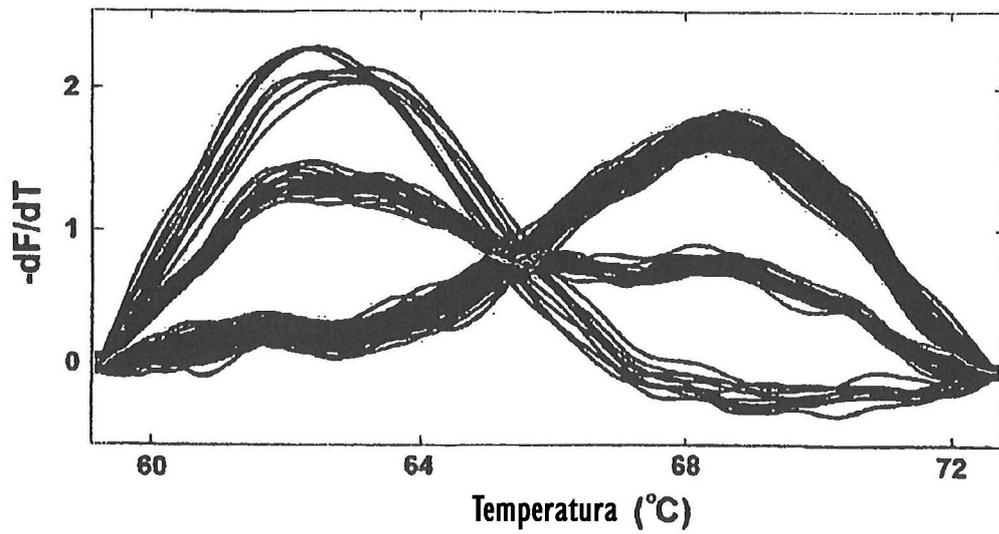
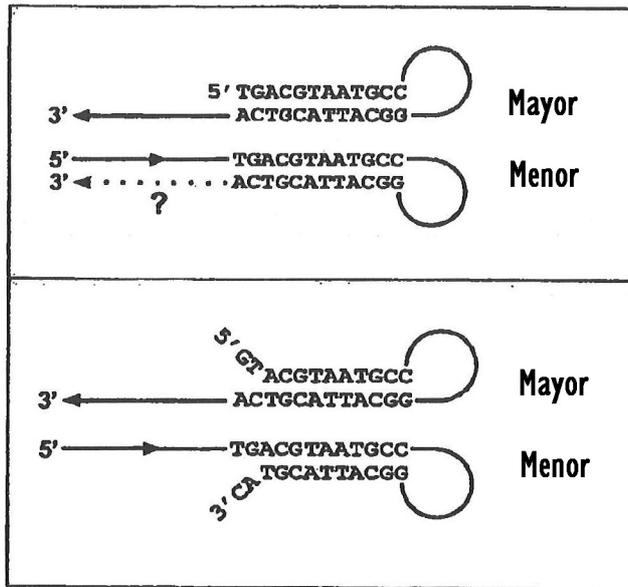
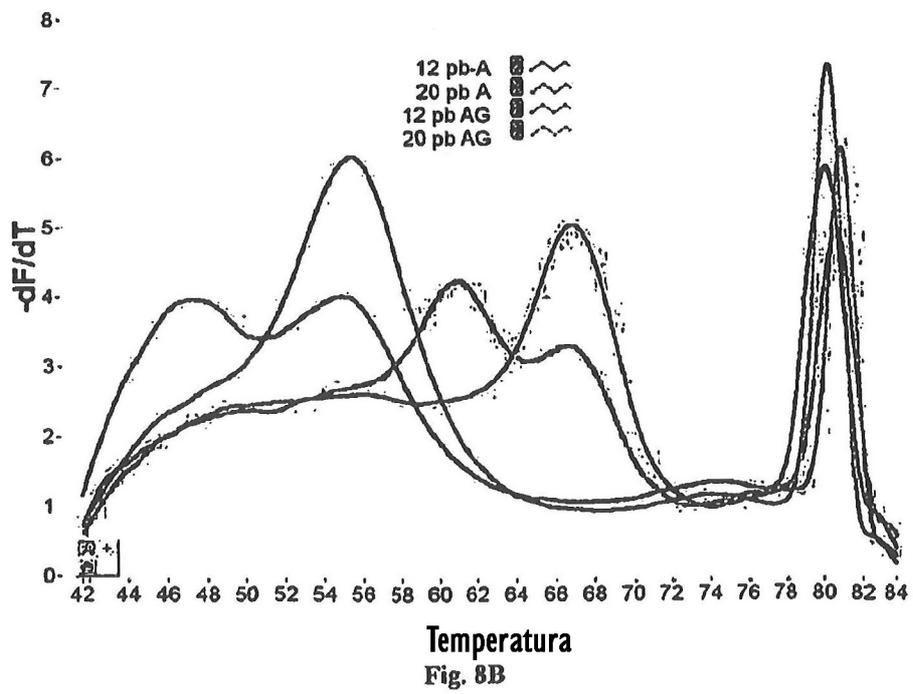
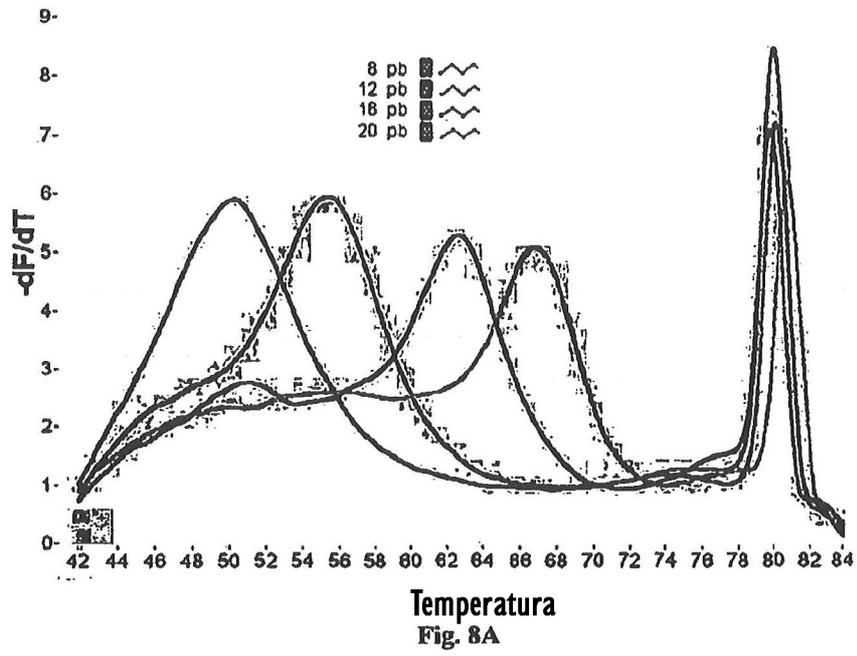


Fig. 7C



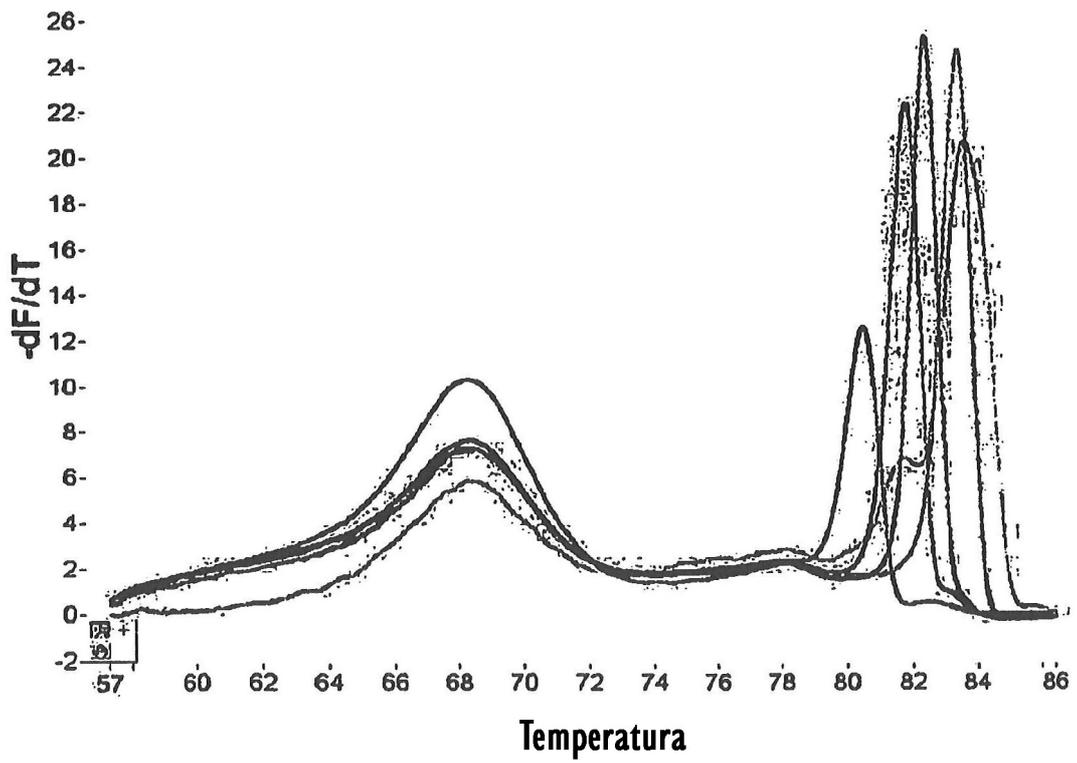
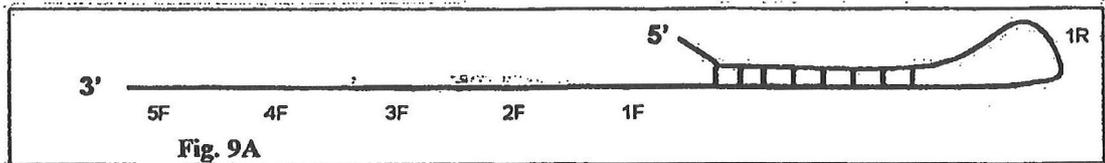
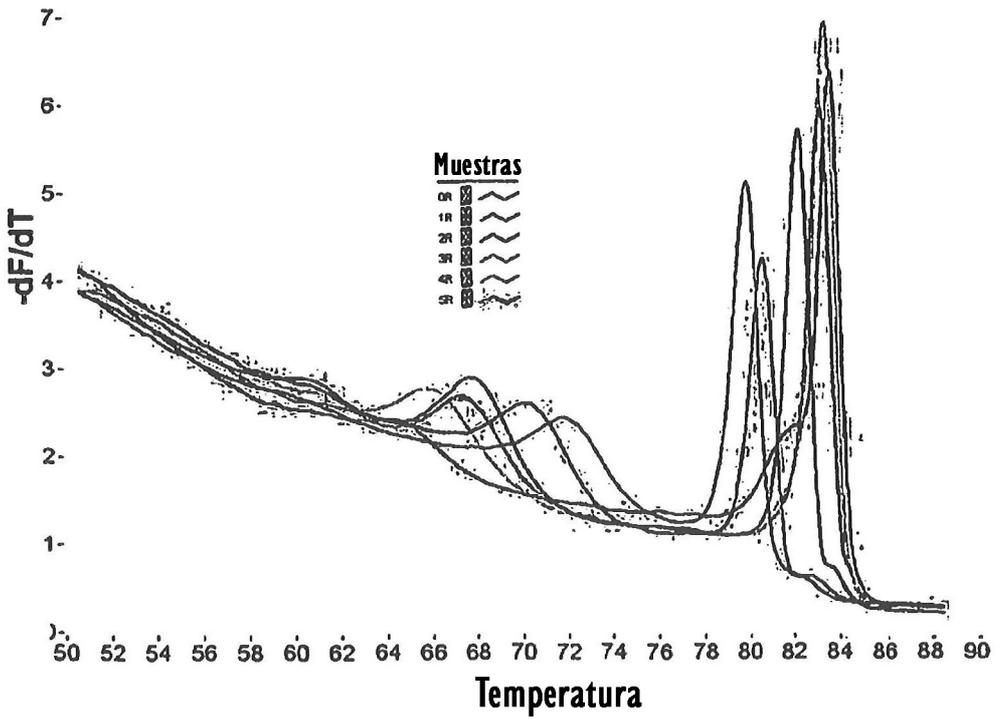
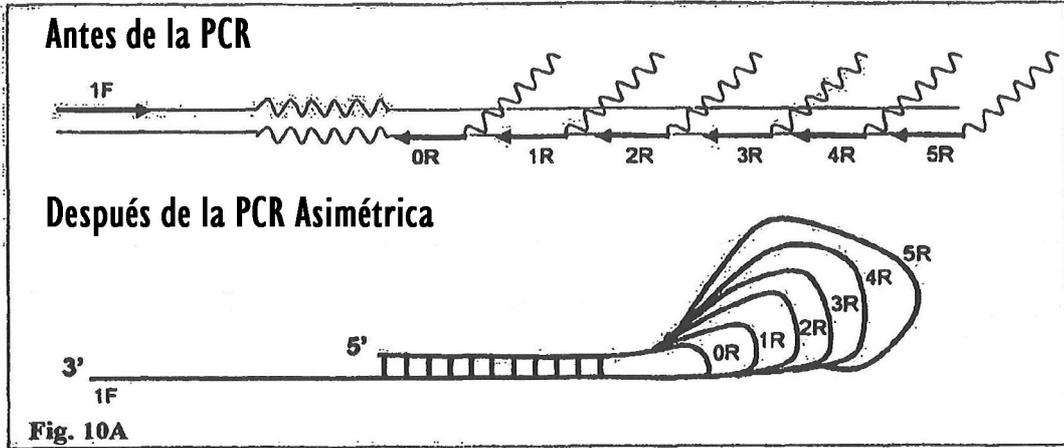


Fig. 9B



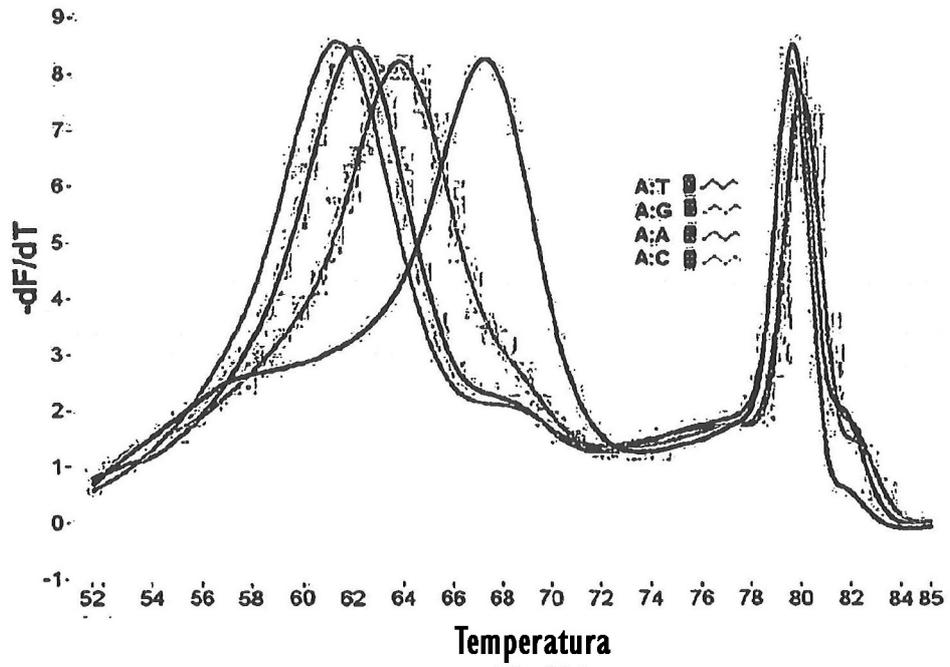


Fig. 11A

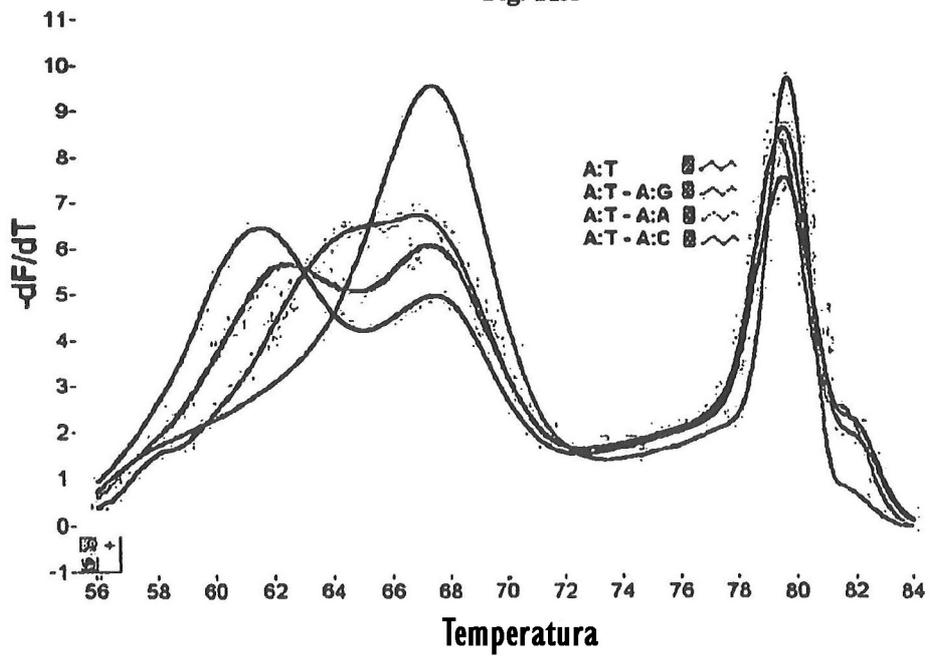


Fig. 11B

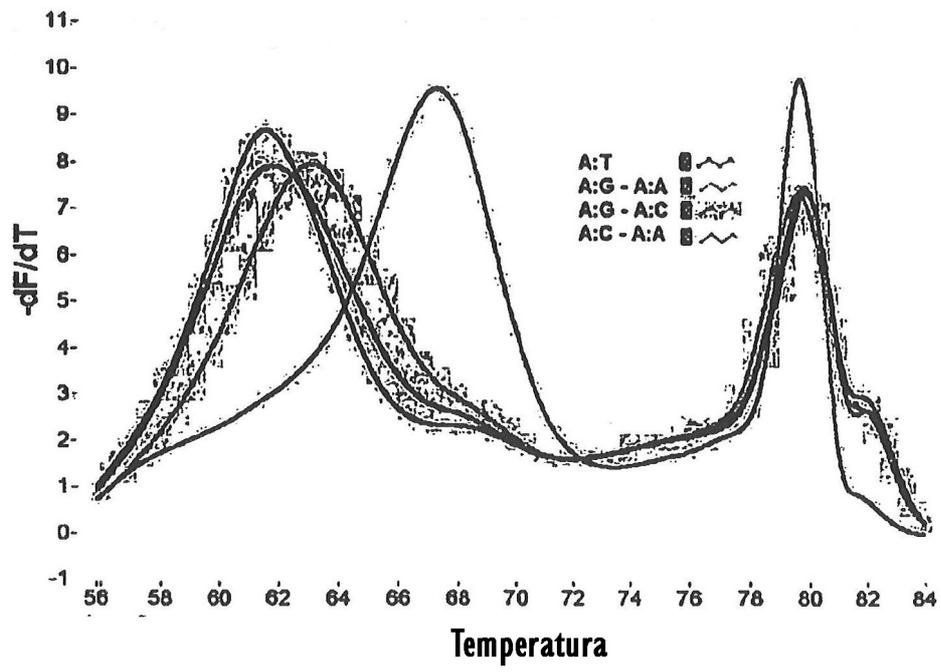


Fig. 11C

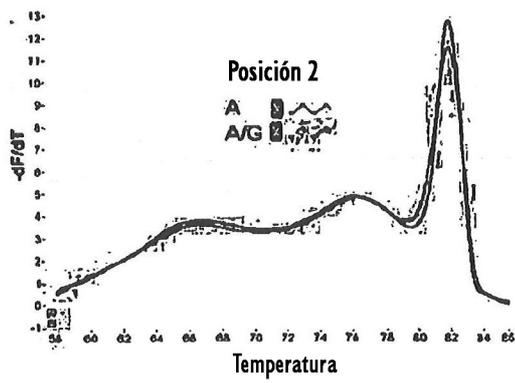


Fig. 12A

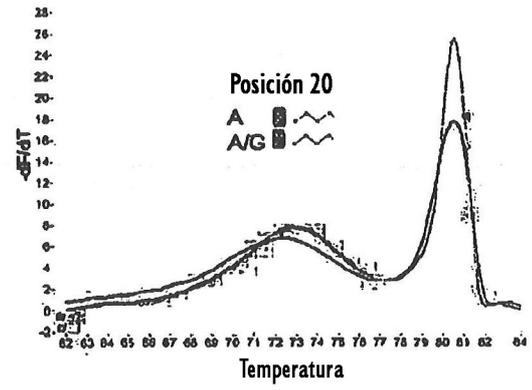


Fig. 12B

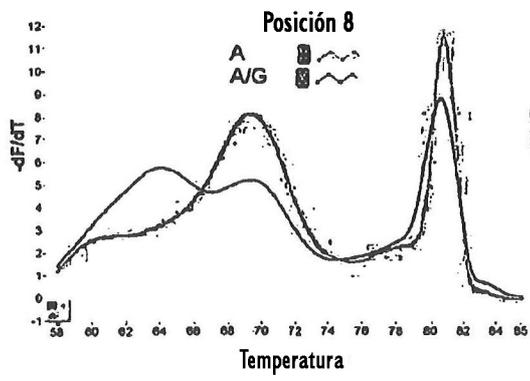


Fig. 12C

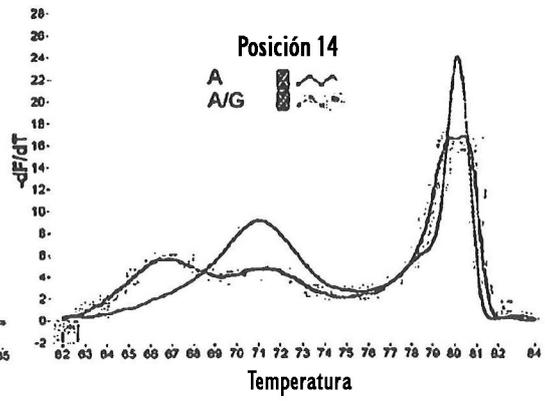


Fig. 12D

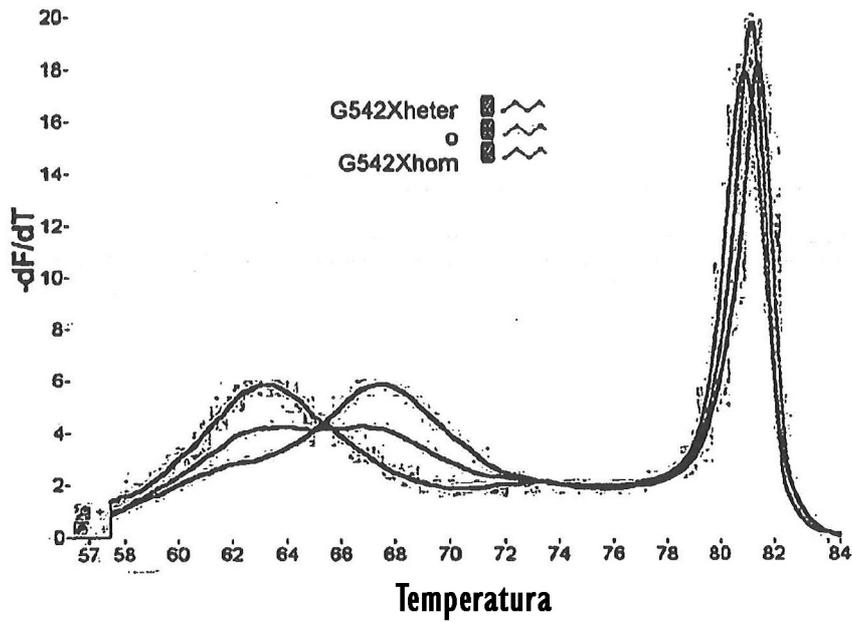


Fig. 13

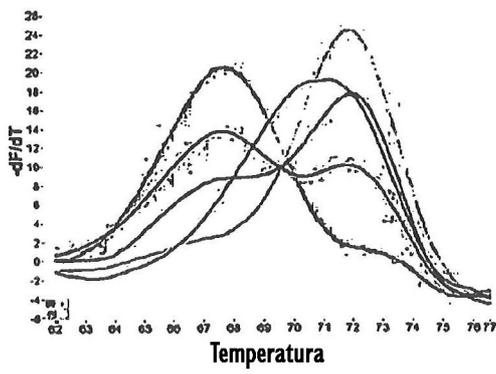


Fig. 14A

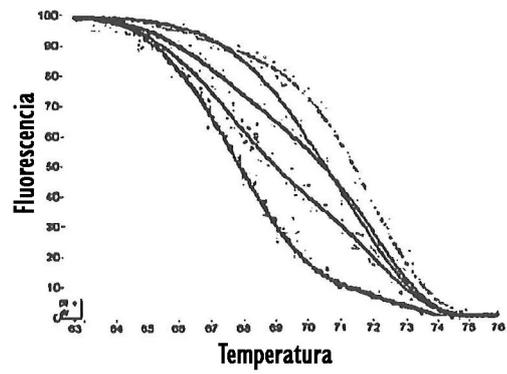


Fig. 14B

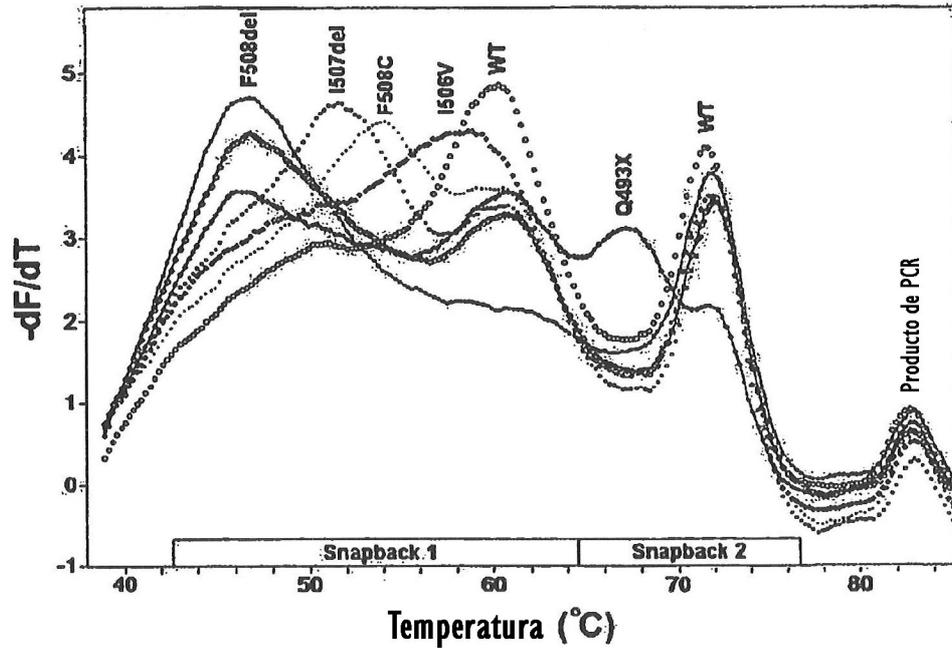


Fig. 15

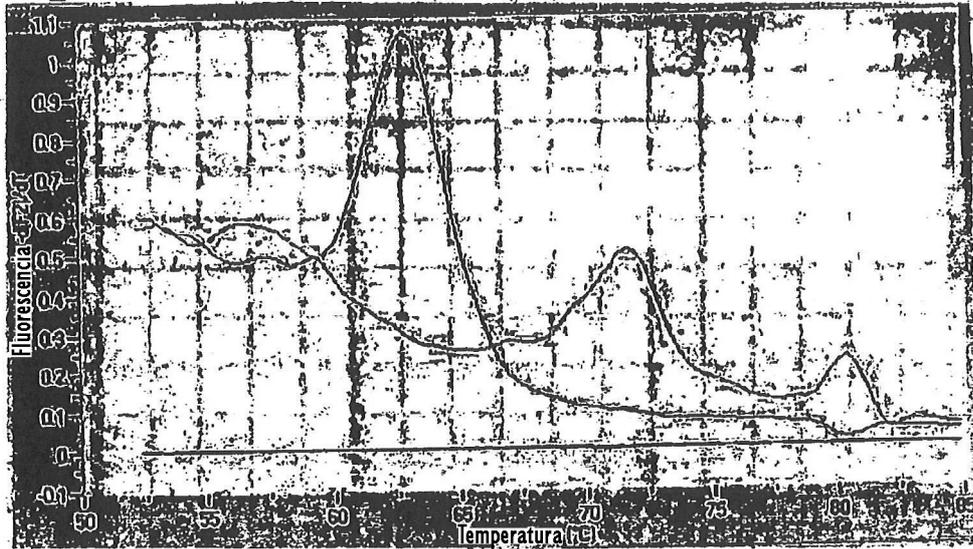
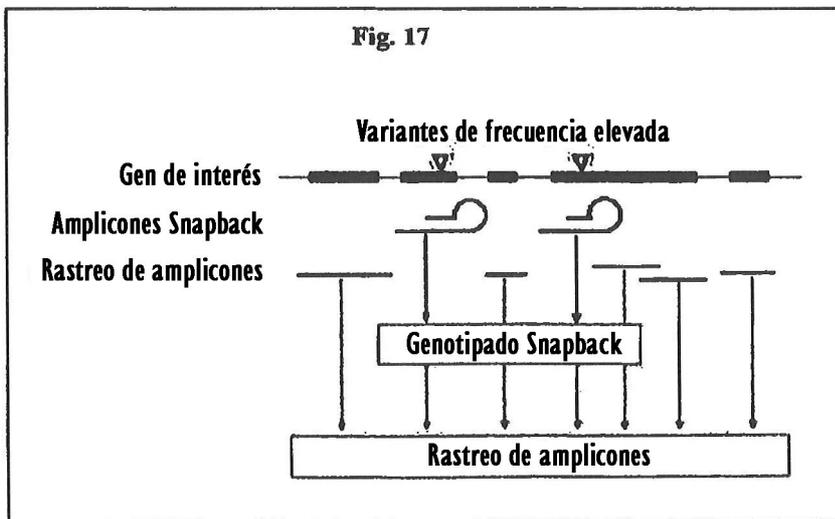


Fig. 16



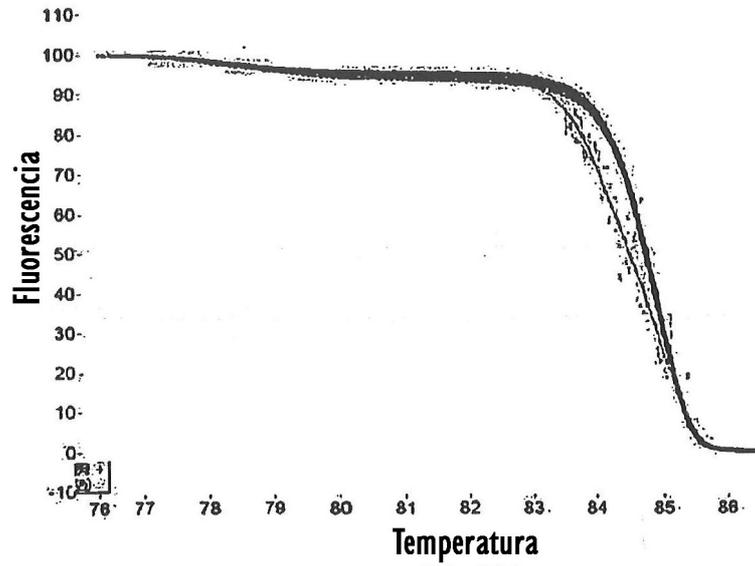


Fig. 18A

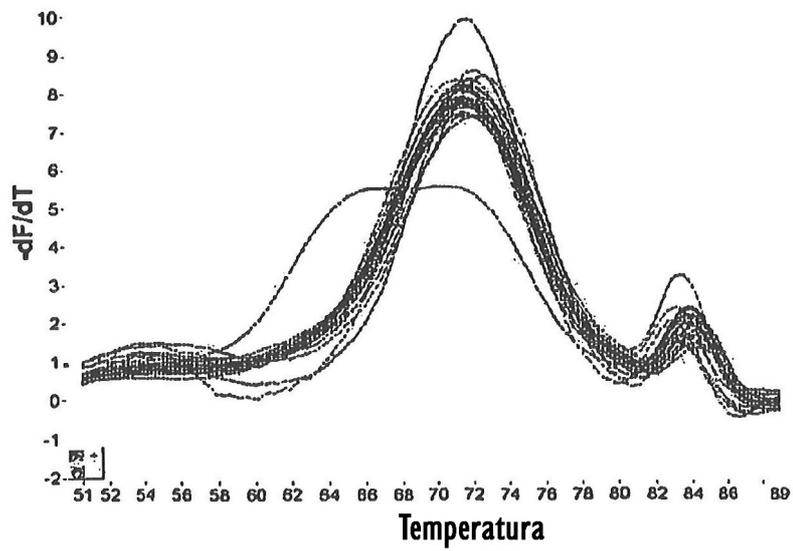


Fig. 18B