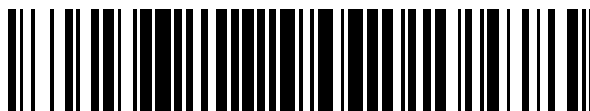


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 819**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08760101 .9**
- 96 Fecha de presentación: **27.05.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2162549**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

54 Título: **Procedimiento para detectar ácidos nucleicos**

30 Prioridad:  
**15.06.2007 DE 102007027654**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2012**

73 Titular/es:  
**GNA BIOSOLUTIONS GMBH (100.0%)  
Am Klopferspitz 19a  
82152 Planegg/Martinsried, DE**

72 Inventor/es:  
**STEHR, JOACHIM A.;  
KLAR, THOMAS A.;  
FELDMANN, JOCHEN;  
HRELESCU, CALIN;  
PARAK, WOLFGANG;  
RASCHKE, GUNNAR;  
SPERLING, RALF;  
WUNDERLICH, MICHAEL;  
KÜRZINGER, KONRAD;  
HEINDL, DIETER y  
NICHTL, ALFONS**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 389 819 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

Procedimiento para detectar ácidos nucleicos

*Antecedentes del invento*

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para detectar ácidos nucleicos, de acuerdo con la porción de pre-caracterización de la Reivindicación 1.

*Nivel actual de desarrollo técnico*

10 Muchos procedimientos para detectar ácidos nucleicos se basan en la técnica del análisis de curvas de fusión. Con esta técnica se explota el efecto de que las cadenas de ácido nucleico de doble hebra se pueden deshibridar en cadenas de hebra sencilla en el caso de un aumento de temperatura, un proceso que se describe en este contexto como "fusión". La temperatura de fusión depende, *inter alia*, del grado de complementariedad de los dos compañe-  
15 ros de hibridación.

A partir de la solicitud publicada de EE.UU. US 2004/0219520 A1 y del artículo de C. Mirkin et al. titulado "One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes", J. Am. Chem. Soc., 1998, volumen 120, páginas 1959-1964, se conoce un procedimiento para detectar ácidos nucleicos en que se utilizan nanopartículas de oro que están funcionalizadas con oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos que se van a detectar y las nanopartículas de oro funcionalizadas son disueltos o suspendidos en un medio acuoso para muestras. Una fracción de los oligonucleótidos tiene una secuencia de bases que es capaz de hibridarse con un primer segmento de las moléculas de ácido nucleico que se van a detectar, y otra fracción de los oligonucleótidos tiene una secuencia de bases que es capaz de hibridarse con un segundo segmento de las moléculas de ácido nucleico que se van a detectar. En virtud de la hibridación, las nanopartículas de los ácidos nucleicos se conectan con objeto de formar grandes agregados, lo que da lugar a un ensanchamiento y un desplazamiento hacia el rojo de su resonancia de plasmones de partícula. Lo último puede ser determinado mediante mediciones de extinción lumínica. Ahora, si se aumenta gradualmente la temperatura de la muestra, se produce una deshibridación y, como consecuencia, una disolución de los agregados, a una temperatura de fusión que es característica del ácido nucleico que se va a detectar. Con una curva de fusión que indica la extinción lumínica en función de la temperatura, esto puede ser observado como una abrupta transición. Mirkin et al. comunican que fueron capaces de distinguir curvas de fusión de ácidos nucleicos, cuyos segmentos eran completamente complementarios de las secuencias de bases de los oligonucleótidos de las nanopartículas funcionalizadas, de aquellos ácidos nucleicos que diferían en una base. También se comunica que ha sido posible detectar ácidos nucleicos totalmente complementarios en una mezcla de ácidos nucleicos totalmente complementarios que difieren en una base.

En el procedimiento conocido, puede resultar desventajoso que la determinación de la curva de fusión lleve un tiempo considerable, típicamente de 30 minutos a 120 minutos, porque, después de cada paso de temperatura, se ha de observar una espera hasta que se hayan alcanzado una temperatura uniforme y un equilibrio entre ácidos nucleicos hibridados y deshibridados en la muestra. Además, el procedimiento conocido puede causar dificultades a la hora de detectar ácidos nucleicos que difieren en una base en una mezcla de ácidos nucleicos totalmente complementarios que difieren en una base.

Además, a partir del artículo de A. O. Govorov et al. titulado "Generating heat with metal nanoparticles", Nano Today, 2007, volumen 2, nº 1, páginas 30-38, se sabe que se pueden excitar nanopartículas de oro y nanopartículas de plata para generar calor irradiándolas con luz. En este artículo, también se comunica que, en el caso de una excitación idéntica, el calor generado por dos partículas de oro adyacentes es mayor que el calor generado por dos partículas individuales. Este efecto cooperativo se atribuye a una interacción de Coulomb entre las nanopartículas adyacentes.

En el artículo de J. L. West et al. titulado "Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumours under magnetic resonance guidance", PNAS, 2003, volumen 100, nº 23, páginas 13.549-13.554, se conocen nanopartículas, consistentes en partículas de sílice rodeadas por una cubierta de oro ("nanocubiertas"), que generan calor, particularmente bajo una irradiación con luz infrarroja. Los autores proponen emplear las nanopartículas para la disolución térmica de tumores.

Jacobson et al., en "Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling to an attached metal nanocrystal antenna", Nature, 2002, volumen 415, páginas 152-155, describen una nanopartícula de oro que está covalentemente enlazada con un segmento de ácido nucleico en forma de bucle que conecta los extremos autocomplementarios de una molécula de DNA en forma de horquilla con otra. La nanopartícula de oro es excitada para generar calor por medio de un acoplamiento inductivo a un campo magnético de radiofrecuencia, con objeto de aumentar la temperatura local de la molécula de DNA que está unida a la nanopartícula y, de este modo, inducir una deshibridación de los extremos autocomplementarios. En el mismo artículo, Jacobson et al. describen también un procedimiento en el que oligonucleótidos están unidos a una nanopartícula de oro por uno de sus extremos y portan un fluoróforo en su otro extremo. Los oligonucleótidos complementarios de los mismos están unidos a un glóbulo de

5 agarosa revestido con estreptavidina. Los dos oligonucleótidos complementarios se hibridan. Posteriormente se provoca una deshibridación, específicamente mediante un aumento local de la temperatura por medio de la excitación de las nanopartículas de oro en un campo magnético de radiofrecuencia, o mediante un aumento de la temperatura de la muestra. En cada caso, se determina el grado de hibridación basándose en la fluorescencia del sobrenadante.

*Problema subyacente al invento*

10 El problema que subyace al invento es proporcionar un procedimiento mejorado para detectar ácidos nucleicos.

*Solución de acuerdo con el invento*

15 Con el fin de alcanzar el objetivo, el invento enseña un procedimiento para detectar ácidos nucleicos, procedimiento que tiene las características de la Reivindicación 1.

20 En el sentido del presente invento, las nanopartículas son partículas que, en virtud de su tamaño, presentan unas propiedades ópticas especiales, en particular unos espectros de absorción o espectros de dispersión característicos que no aparecen, o no aparecen tan claramente, en el material masivo. Las nanopartículas metálicas descritas por A. O. Govorov et al., anteriormente referidas, y las descritas por J. M. Jacobson et al., anteriormente referidas, se nombran meramente a modo de ejemplo. Las nanopartículas tienen un diámetro de entre 5 nm y 80 nm.

25 Las nanopartículas pueden ser globulares pero, en particular, también se tienen en consideración las formas no globulares, por ejemplo, las nanopartículas de tipo varilla. Se conocen procedimientos para producir y funcionalizar las nanopartículas a partir de, por ejemplo, el artículo de Mirkin et al.

30 En relación con el presente invento, el término "oligonucleótido" abarca preferiblemente no sólo desoxiligorribonucleótidos sino también oligonucleótidos que contienen uno o más compuestos nucleotídicos análogos con modificaciones en su cadena principal [por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotioatos o ácidos nucleicos peptídicos (PNA; del inglés, *peptide nucleic acids*)], en particular en un azúcar de la cadena principal [por ejemplo, derivados 2'-O-*alquílicos*, 3'- y/o 5-aminorribosas, ácidos nucleicos bloqueados (LNA; del inglés, *locked nucleic acids*), ácidos nucleicos de hexitol o triciclo-DNA; a este respecto, véase el artículo de D. Renneberg y C. J. Leumann titulado "Watson-Crick base-pairing properties of tricyclo-DNA", J. Am. Chem. Soc., 2002, volumen 124, páginas 5993-6002], o contienen los compuestos de base análogos, por ejemplo, 7-desazapurina, o bases universales tales como nitroindol, o bases naturales modificadas tales como N4-etilcitosina. En una realización del invento, los oligonucleótidos son productos de conjugación o quimeras con compuestos análogos no nucleosídicos, por ejemplo, PNAs. En una realización del invento, los oligonucleótidos contienen, en una o más posiciones, unidades no nucleosídicas tales como espaciadores, por ejemplo, hexaetilenglicol o espaciadores C<sub>n</sub> en que n es entre 3 y 6. Hasta el punto en que los oligonucleótidos contienen modificaciones, estos se eligen de tal modo que una hibridación con analitos de DNA/RNA naturales sea también posible con la modificación. Las modificaciones preferidas influyen en el comportamiento de fusión, preferiblemente en la temperatura de fusión, en particular con objeto de poder distinguir híbridos que tienen diferentes grados de complementariedad en sus aminoácidos (discriminación por apareamiento incorrecto). Las modificaciones preferidas abarcan LNA, 8-aza-7-desazapurina, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina y/o interrupciones no básicas en el oligonucleótido.

45 En el sentido del presente invento, el término "hibridación" significa la formación de una hebra doble. Con el invento es posible asegurar que las hembras dobles se deshibridan ("funden") al menos parcialmente como resultado de un aumento local de temperatura, por ejemplo, en virtud de la excitación de las nanopartículas para generar calor. En una realización del invento, el oligonucleótido es elegido de tal modo que se deshibrida del ácido nucleico que se va a detectar a una temperatura de fusión inferior a 80 °C, preferiblemente claramente inferior a 80 °C. El oligonucleótido es preferiblemente elegido de tal modo que se deshibrida del ácido nucleico que se va a detectar a una temperatura de fusión superior a 40 °C. La temperatura de fusión es la temperatura a la cual la curva de fusión presenta la magnitud máxima del gradiente (punto extremo de la derivada de la curva de fusión). Además, los oligonucleótidos preferidos son elegidos de tal modo que son suficientemente específicos para el ácido nucleico con objeto de detectarlo. Una persona experta en la técnica puede ajustar el punto de fusión y la especificidad basándose, *inter alia*, en la longitud del nucleótido. Los oligonucleótidos preferidos tienen una longitud de entre 8 bases y 40 bases, particularmente de entre 12 bases y 25 bases preferiblemente. El oligonucleótido preferido es al menos parcialmente complementario, particular y preferiblemente totalmente complementario, o complementario con la excepción de una o dos bases, de un segmento del ácido nucleico que se va a detectar.

60 Es una ventaja alcanzable del invento que, como resultado de la excitación de las nanopartículas para generar calor, se pueda obtener un calentamiento local de la muestra en las inmediaciones de las nanopartículas. De este modo, se puede desencadenar una fusión sin que la muestra entera tenga que ser calentada con este fin. En virtud del calentamiento local, la región de hibridación dentro de los agregados de nanopartículas, discutidos adicionalmente más adelante, puede ser calentada muy rápidamente, por ejemplo, en unos pocos microsegundos, desde una temperatura inicial hasta una temperatura local deseada, con objeto de comprobar si esto da lugar a una fusión. Es una

ventaja alcanzable del invento que se pueda registrar una curva de fusión más rápidamente que con el nivel actual de desarrollo técnico.

5 En particular, el invento es adecuado para aplicación en procedimientos con múltiples pocillos y en un análisis de DNA de alta eficacia.

*Estructura y desarrollo adicional de la solución de acuerdo con el invento*

10 Los diseños ventajosos y los desarrollos adicionales que se pueden emplear individualmente o en combinación forman el contenido de las reivindicaciones dependientes.

15 En una realización preferida del invento, la nanopartícula es excitada para generar calor con radiación electromagnética, por ejemplo, con luz, preferiblemente por medio de un efecto optotérmico. Las fuentes de luz preferidas son láseres, diodos emisores de luz (LEDs; del inglés, *light-emitting diodes*) y lámparas de flash. La fuente de luz puede emitir la luz de modo pulsado o continuamente. Entran en consideración las fuentes de luces tanto monocromáticas como policromáticas, en particular las fuentes de luz blanca. En el sentido del presente invento, el término "luz" incluye el espectro de radiación electromagnética que va desde el infrarrojo lejano hasta el ultravioleta lejano. También es concebible excitar las nanopartículas con campos de radiofrecuencia, por ejemplo, con un campo magnético de radiofrecuencia, preferiblemente del modo descrito por los anteriormente referidos Jacobson et al.

20 En una realización preferida del invento, la nanopartícula incluye al menos un metal, preferiblemente un metal noble, tal como, por ejemplo, oro o plata. En una realización, la nanopartícula consiste totalmente en el metal; en otra, el metal forma sólo una parte de la nanopartícula, por ejemplo, su revestimiento. Un ejemplo de la última realización lo constituye los nanorrevestimientos de sílice/oro descritos por el anteriormente referido J. L. West. A este respecto, el contenido entero del susodicho documento es parte de la presente descripción por referencia.

25 La nanopartícula es puesta en contacto con el ácido nucleico que se va a detectar, preferiblemente por difusión. Preferiblemente, se disuelve o suspende una pluralidad de ácidos nucleicos y nanopartículas del mismo tipo en el medio, y la propiedad proporciona información acerca del grado de hibridación de la pluralidad de oligonucleótidos con la pluralidad de ácidos nucleicos. Las nanopartículas están preferiblemente presentes en el medio en una concentración de entre 0,5 nM (nanomoles/litro) y 50 nM. Los ácidos nucleicos que se van a detectar están preferiblemente presentes en el medio en una concentración de entre 100 pM y 10 mM. Además, un medio preferido contiene una sal, preferiblemente sal común (NaCl). La concentración preferida de sal se extiende entre 0,01 M y 1 M.

35 La propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación del ácido nucleico con el oligonucleótido es preferiblemente una propiedad óptica, tal como, por ejemplo, el color o la intensidad cromática de un marcador coloreado, por ejemplo, de una molécula colorante o de un nanocrystal semiconductor coloidal (punto cuántico). Por ejemplo, se puede unir un marcador coloreado a uno de los compañeros de hibridación, preferiblemente al ácido nucleico que se va a detectar, o se puede utilizar un marcador coloreado que sea capaz de intercalarse entre los compañeros de hibridación en el curso de la hibridación. De un modo particularmente preferido, con esta realización del invento se explota el hecho de que ciertos marcadores de fluorescencia, en particular colorantes fluorescentes, pierden su fluorescencia al menos parcialmente (sofocación) en las inmediaciones de las nanopartículas. Con esta realización del invento, es posible asegurar que se puede inferir el grado de hibridación basándose en la intensidad cromática o el color.

45 En una realización preferida del invento, la propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación es una propiedad de la nanopartícula, preferiblemente una propiedad óptica de la nanopartícula. El invento explota preferiblemente el hecho de que las nanopartículas, en virtud del hecho de que están adyacentes entre sí, son capaces de cambiar sus propiedades ópticas, en particular de tal modo que su espectro de extinción se desplaza y/o ensancha espectralmente.

50 En una variante de realización preferida, el ácido nucleico que se va a detectar incluye al menos dos segmentos y se proporcionan al menos dos nanopartículas, estando al menos una de las nanopartículas funcionalizada con un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con el primer segmento del ácido nucleico, y estando al menos una de las nanopartículas funcionalizada con un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con el segundo segmento del ácido nucleico. Las nanopartículas funcionalizadas son puestas en contacto con una muestra en que se va a detectar el ácido nucleico y se mide la propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación de los oligonucleótidos con el ácido nucleico que se va a detectar. En esta realización del invento, es posible asegurar que, cuando las nanopartículas están conectadas entre sí por la hibridación, la proximidad relativa de las nanopartículas origina un cambio mensurable en sus propiedades ópticas. Las nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos se forman preferiblemente de tal modo que se hibridan con el ácido nucleico que se va a detectar en una configuración de cabeza a cabeza, es decir, los segmentos de los oligonucleótidos con los que están unidos a sus nanopartículas están lo más próximo posible entre sí en el estado hibridado. Pero también son concebibles las configuraciones de cabeza a cola y de cola a cola, como se describe, por ejemplo, en el esquema 1 del artículo anteriormente referido de C. A. Mirkin.

En otra realización concebible del invento, tanto el al menos un oligonucleótido como el ácido nucleico que se va a detectar están unidos a una nanopartícula. También con esta realización del invento es posible asegurar que dos nanopartículas están unidas entre sí en virtud de la hibridación, lo que puede dar lugar a un cambio mensurable en las propiedades ópticas.

5 En el caso de al menos alguna de las nanopartículas, varios oligonucleótidos están preferiblemente unidos a una nanopartícula común en cada caso. Una ventaja alcanzable de esta realización del invento es que, en el curso de la hibridación de los oligonucleótidos con el ácido nucleico, pueden surgir agrupamientos consistentes en tres o más nanopartículas. Como resultado, se puede explotar ventajosamente el hecho de que el cambio en la propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación aumenta con el tamaño del agregado. En particular, esto puede facilitar la detección del cambio en la propiedad y, por lo tanto, de la hibridación.

10 De acuerdo con el invento, se llevan a cabo al menos las tres operaciones siguientes: a) medir la propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación del ácido nucleico con los oligonucleótidos, a una temperatura inicial predeterminada; b) excitar la al menos una nanopartícula para generar calor; y c) medir de nuevo la propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación del ácido nucleico con el oligonucleótido. Con el invento, por comparación de los resultados de la medición antes y después de la excitación de las nanopartículas para generar calor, se puede asegurar la determinación de una señal de fusión que es una medida del cambio en el grado de hibridación en virtud del calentamiento local de la muestra.

15 De acuerdo con el invento, se llevan a cabo varias veces las operaciones a) a c), por lo que, en el curso de las pasadas, la al menos una nanopartícula es excitada para generar calor de un modo variablemente intenso, preferiblemente aumentando de pasada en pasada, por ejemplo, irradiando con diferentes cantidades de luz. Las señales de fusión determinadas en el curso de las pasadas son preferiblemente comparadas entre sí. Como resultado, se puede registrar una curva de señales de fusión que indica la señal de fusión en función del grado de excitación de las nanopartículas. Preferiblemente, se registran entre 5 y 50 señales de fusión, particular y preferiblemente entre 10 y 20 señales de fusión. A partir de la curva de señales de fusión, se puede determinar un umbral de fusión que indica el grado de excitación al cual comienza la fusión. Con esta realización del invento, se puede asegurar la detección del ácido nucleico basándose en un umbral de fusión que es específico del ácido nucleico a una temperatura inicial dada y para unos oligonucleótidos dados.

20 En un procedimiento preferido de acuerdo con el invento, se determina el umbral de fusión para varias temperaturas iniciales con objeto de determinar una curva de umbrales de fusión. Con este fin, se llevan preferiblemente a cabo las operaciones a) a c) varias veces a una primera temperatura inicial predeterminada, por lo que, en el curso de las pasadas, la al menos una nanopartícula es excitada para generar calor de un modo variablemente intenso, y se comparan las señales de fusión de las pasadas con objeto de determinar un primer umbral de fusión. Además, se llevan a cabo las operaciones a) a c) varias veces a una segunda temperatura inicial predeterminada, por lo que, en el curso de las pasadas, la nanopartícula es excitada para generar calor de un modo variablemente intenso, con objeto de determinar un segundo umbral de fusión. De una manera particularmente preferida, se repite el procedimiento a otras temperaturas iniciales, por lo que, para este fin, de una manera particularmente preferida, se aumenta gradualmente la temperatura inicial. Con esta realización del invento, se puede asegurar la detección del ácido nucleico basándose en una curva de umbrales de fusión que es específica del ácido nucleico.

25 Los inventores han establecido que el umbral de fusión disminuye uniformemente al aumentar la temperatura inicial, al menos dentro de un intervalo de temperaturas iniciales. Atribuyen esto al hecho de que al aumentar la temperatura inicial, disminuye el calentamiento local adicional en virtud de la excitación de las nanopartículas, lo que es necesario con objeto de desencadenar la fusión. En una realización del invento, se determina el gradiente de la curva de umbrales de fusión dentro de un intervalo predeterminado de temperaturas iniciales. Por este medio, se puede asegurar una detección del ácido nucleico basándose en un gradiente que es específico del ácido nucleico. En otra realización del invento, la curva de umbrales de fusión es linealmente extrapolada hasta un punto cero del umbral de fusión. Con esta realización del invento, se puede asegurar que se detecta un ácido nucleico basándose en un punto cero que es específico del mismo.

30 En el caso de los agregados de nanopartículas que se forman por la hibridación de los oligonucleótidos con el ácido nucleico que se va a detectar, a ciertas temperaturas se puede producir un apareamiento (crecimiento de agregados), en el curso del cual aumenta el tamaño de los agregados. En el artículo de J. J. Storhoff et al. titulado "What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?", J. Am. Chem. Soc., 2000, volumen 122, páginas 4640-4650, cuyo contenido a este respecto es parte de la presente descripción por referencia, se describen detalles relativos a este efecto. Para oligonucleótidos dados, esta temperatura de apareamiento puede ser específica de ciertos ácidos nucleicos. En una realización del invento, el ácido nucleico es por lo tanto detectado basándose en una temperatura de apareamiento que es específica del ácido nucleico para oligonucleótidos dados.

35 El umbral de fusión puede ser una función del tamaño de los agregados porque, por ejemplo, un agregado es incapaz de emitir el calor tan rápidamente al ambiente como una sola nanopartícula, lo que da lugar a una acumulación de calor en el agregado. También entra en consideración un efecto cooperativo de varias nanopartículas como una

causa, lo que tiene como resultado que los agregados de nanopartículas generan más calor, suministrada la misma excitación, que las nanopartículas individuales; véase el artículo de A. O. Govorov et al. anteriormente referido, cuyo contenido a este respecto es parte de la presente descripción por referencia. El umbral de fusión disminuye preferiblemente con el tamaño del agregado. En una realización del invento, el ácido nucleico es por lo tanto detectado en virtud del hecho de que un umbral de fusión a una temperatura inicial que es sustancialmente mayor o igual que la temperatura de apareamiento se encuentra por debajo de cierto valor.

Alternativamente, el ácido nucleico puede ser detectado en virtud del hecho de que, por debajo de la temperatura de apareamiento, un umbral de fusión después de un proceso de apareamiento es menor que antes de él (histéresis). Por ejemplo, se puede determinar al menos un umbral de fusión a al menos una temperatura inicial por debajo de la temperatura de apareamiento, se puede luego elevar temporalmente la temperatura inicial hasta la temperatura de apareamiento o por encima de ella, y se puede determinar luego una vez más al menos un umbral de fusión a al menos una temperatura inicial por debajo de la temperatura de apareamiento. Por comparación de los umbrales de fusión, se pueden detectar un apareamiento y, por lo tanto, el ácido nucleico para el cual es específica la temperatura de apareamiento.

Con el invento también es posible detectar varios ácidos nucleicos diferentes en la misma muestra. Si, por ejemplo, el primer ácido nucleico tiene una temperatura de fusión que está situada por debajo de la temperatura de fusión del segundo ácido nucleico que se va a detectar, el primer ácido nucleico puede ser detectado por la presencia de un umbral de fusión a una temperatura por debajo de su temperatura de fusión, y el segundo ácido nucleico puede ser detectado por detección de un umbral de fusión a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión del segundo ácido nucleico pero por encima de la temperatura de fusión del primer ácido nucleico. En una realización del invento, se llevan por lo tanto a cabo las operaciones a) a c) al menos una primera vez y una segunda vez, siendo variable en el curso de las pasadas la temperatura inicial predeterminada, y siendo comparadas las señales de fusión de las pasadas.

Con objeto de poder distinguir el primer ácido nucleico del segundo ácido nucleico a la primera temperatura inicial basándose en su umbral de fusión, puede resultar ventajoso explotar el hecho de que el primer ácido nucleico presenta un apareamiento a la primera temperatura o incluso ya por debajo de la primera temperatura, pero no el segundo ácido nucleico. Esto es porque, como se explicó anteriormente, el apareamiento puede dar lugar a una acusada reducción del umbral de fusión. En una realización particularmente preferida del invento, la primera temperatura se encuentra por lo tanto en, o por encima de, una temperatura de apareamiento del primer ácido nucleico que se va a detectar.

También es concebible detectar varios ácidos nucleicos diferentes mediante el uso de nanopartículas diferentes que tienen propiedades de excitación diferentes puesto que, por ejemplo, generan diferentes cantidades de calor en el caso de una excitación idéntica. En una realización preferida del invento, se proporcionan por lo tanto varias fracciones de nanopartículas que tienen propiedades de excitación diferentes ya que, por ejemplo reaccionan a la misma excitación con un calentamiento diferente, y las nanopartículas de una primera fracción se funcionalizan para un primer ácido nucleico que se va a detectar, y las nanopartículas de la segunda fracción se funcionalizan para un segundo ácido nucleico que se va a detectar, que es diferente del primer ácido nucleico. Por ejemplo, las fracciones de nanopartículas pueden diferir en virtud del hecho de que las nanopartículas tienen un tamaño diferente, o consisten en materiales diferentes o combinaciones de materiales diferentes, o tienen proporciones diferentes de un cierto material o de una cierta combinación de materiales. Las fracciones pueden ser distinguidas en virtud del hecho de que las nanopartículas presentan propiedades de excitación diferentes. Por ejemplo, si las diversas nanopartículas generan cantidades diferentes de calor en el caso de una excitación idéntica, los umbrales de fusión se desplazan unos con respecto a otros y, en cada caso, son característicos de la fracción de nanopartículas asociadas. También es concebible que las nanopartículas de una fracción reaccionen más intensamente a una excitación de un tipo, por ejemplo, una radiación electromagnética de una longitud de onda, y las nanopartículas de otra fracción reaccionen más intensamente a una excitación de otro tipo, por ejemplo, una radiación electromagnética de otra longitud de onda. En una realización del invento, las fracciones son por lo tanto excitadas mediante tipos de excitación diferentes. Con este fin, se proporcionan preferiblemente dos, tres o más fuentes de excitación, particular y preferiblemente láseres de diferente longitud de onda. Como resultado, se puede asegurar que el umbral de fusión para el primer ácido nucleico que se va a detectar difiere notablemente del umbral para el segundo ácido nucleico que se va a detectar. Como resultado, se pueden detectar varios ácidos nucleicos en la misma muestra. Por supuesto, también se puede proporcionar una tercera, una cuarta o más fracciones con nanopartículas, que de nuevo generan diferentes cantidades de calor en el caso de la misma excitación. De este modo, se pueden detectar numerosos ácidos nucleicos diferentes.

#### *Breve descripción de los dibujos*

A continuación se elucidará el invento con mayor detalle y más información basándose en dibujos esquemáticos relativos a realizaciones ejemplares.

Se muestran:

- Figura 1: esquemáticamente, una realización del invento en que se excitan las nanopartículas para generar calor al ser irradiadas con luz láser y en que se obtiene información acerca del grado de hibridación en la muestra midiendo una transmisión de luz a través de la muestra;
- 5 Figura 2: esquemáticamente, una realización del invento en que se mide el grado de hibridación midiendo la fluorescencia (fotoluminiscencia) de un colorante en la muestra;
- Figura 3: esquemáticamente, una realización del invento en que se infiere el grado de hibridación midiendo la intensidad de luz dispersada;
- 10 Figura 4: esquemáticamente, un agregado de nanopartículas de oro funcionalizadas, conectadas por medio de ácidos nucleicos que se van a detectar;
- Figura 5: curvas de extinción de nanopartículas de oro aisladas y de nanopartículas de oro conectadas para formar agregados;
- 15 Figura 6: curvas de fusión de agregados de oro-nanopartícula que están conectados a ácidos nucleicos totalmente complementarios o a ácidos nucleicos que son totalmente complementarios con la excepción de una base;
- 20 Figura 7: esquemáticamente, agregados de oro-nanopartícula que se difunden libremente en una disolución;
- Figura 9: un ejemplo del cambio en la extinción de una muestra con agregados de oro-nanopartícula después de que estos hayan sido excitados para generar calor al ser irradiados con luz;
- 25 Figura 10: un ejemplo del cambio en la extinción después de que los agregados de nanopartículas hayan sido repetidamente irradiados;
- Figura 11: un ejemplo de una curva de señales de fusión con un umbral de fusión;
- 30 Figura 12: un ejemplo de una curva de umbrales de fusión sin histéresis;
- Figura 13: un ejemplo de una curva de umbrales de fusión con histéresis;
- 35 Figura 14: comparación de dos curvas de umbrales de fusión que tienen el mismo gradiente, en que el punto cero del umbral de fusión ha sido determinado por extrapolación;
- Figura 15: un ejemplo de la determinación de dos ácidos nucleicos diferentes en la misma muestra al medir dos señales de fusión a diferentes temperaturas iniciales;
- 40 Figura 16: un ejemplo de la determinación de dos ácidos nucleicos diferentes por medio de dos fracciones de nanopartículas que difieren en el tamaño de las nanopartículas.

45 En la Figura 1 se puede ver un ejemplo del invento en que, en una cubeta 1 a modo de recipiente para muestras, está contenida una muestra en que están suspendidas y pueden difundirse libremente unas nanopartículas 5 funcionalizadas con oligonucleótidos 3, 4 (véase la Figura 16). Más exactamente, la muestra contiene nanopartículas 5 de oro 6 nM que han sido funcionalizadas con un primer oligonucleótido 3 que es capaz de hibridarse con un primer segmento del ácido nucleico que se va a detectar, y partículas de oro 6 nM que han sido funcionalizadas con un segundo oligonucleótido 4 que es capaz de hibridarse con un segundo segmento del ácido nucleico que se va a detectar. La muestra contiene además 240 nM de la molécula de ácido nucleico que se va a detectar y NaCl 300 nM. Las nanopartículas 5 de oro pueden ser excitadas para generar calor con una fuente 6 de luz láser pulsada de Nd:YLF, por medio de pulsos de 300 ns de duración que tienen una longitud de onda de 527 nm. Un diodo láser 7 que tiene una longitud de onda de 650 nm, que transirradia la muestra 2 y cuya luz cae posteriormente sobre un rápido fotodiodo 8, sirve para medir una extinción de la muestra 2 a esta longitud de onda. Además, la cubeta 1 para muestras se encuentra en un baño 9 de agua con el que se puede ajustar la temperatura inicial  $T_B$  de la muestra 2.

50 En la Figura 2 se muestra una modificación del ejemplo de la Figura 1, en que, con la finalidad de detectar la hibridación, se mide la fluorescencia de un colorante fluorescente en la muestra 2 en lugar de la extinción o la transmisión. Con este fin se proporcionan una fuente 10 de luz, que es capaz de excitar los colorantes fluorescentes de la muestra 2, y un detector 11 de fotoluminiscencia para medir la intensidad de la luz fluorescente.

55 En la Figura 3 se puede ver otra realización ejemplar, en que se mide la intensidad de la luz dispersada por la muestra 2 en lugar de la extinción de luz o la fluorescencia. Con esta finalidad se proporcionan una fuente lumínica 12 de barrido, cuyos haces lumínicos inciden en la muestra, y un detector 13 de luz dispersada, que mide la intensidad de luz dispersada que sale de la muestra 2. Una ventaja de esta realización es el hecho de que no se necesita un reci-

piente para muestras que sea transparente a la luz por dos caras.

En la Figura 4 se reproduce esquemáticamente el modo en que las nanopartículas 5 de los ácidos nucleicos 15 que se van a detectar, funcionalizadas con varios oligonucleótidos 3, 4 en cada caso, pueden estar conectadas con objeto de formar los agregados 20. En el ejemplo ampliado, en la parte inferior derecha de la Figura, dos nanopartículas 5 están conectadas por medio de tres híbridos en una configuración de cola a cola. Con este fin, el ácido nucleico 15 presenta dos segmentos, uno de los cuales es al menos parcialmente complementario de un oligonucleótido 3 fijado a una primera partícula 5 de oro, y el otro es al menos parcialmente complementario de un oligonucleótido 4 fijado a una segunda partícula 5 de oro. La separación entre las nanopartículas asciende a aproximadamente 20 nm.

En la Figura 5 se muestra el resultado de una medición de la densidad óptica (OD; del inglés, *optical density*) como una medida de la extinción de las nanopartículas 5 de oro en la muestra 2 a dos diferentes temperaturas iniciales, 25 °C 16 y 60 °C 17, que fueron ajustadas mediante el baño 9 de agua. Las nanopartículas de oro tienen un diámetro de 10 nm y han sido funcionalizadas con tiol-oligonucleótidos que tienen una longitud de 30 pares de bases. Se puede discernir que, en el caso de un aumento de temperatura, el espectro de extinción se desplaza hacia longitudes de onda más cortas y se vuelve más estrecho. Esto se atribuye en la bibliografía a una disolución al menos parcial de los agregados 20 de partículas de oro y a un cambio asociado en la resonancia de plasmones de partícula de las nanopartículas 5 de oro. A su vez, la disolución es consecuencia de la fusión de los híbridos.

A partir de la extinción es posible, como se representa más exactamente en la Figura 6, inferir la temperatura de fusión. En la Figura 6 se muestra la extinción normalizada, a una longitud de onda de 650 nm, de la fuente lumínica 7 en función de la temperatura inicial, ajustada mediante el baño 9 de agua, para dos ácidos nucleicos 15 diferentes, habiendo sido funcionalizadas las nanopartículas 5 de oro con los mismos oligonucleótidos 3, 4. Los ácidos nucleicos 15 difieren en virtud del hecho de que los segmentos de ácido nucleico de la primera curva 18 de fusión son totalmente complementarios de los oligonucleótidos 3, 4 de las nanopartículas 5, mientras que un segmento de ácido nucleico de la segunda curva 19 de fusión no es complementario en una base.

Las curvas 18 y 19 muestran, para ambos ácidos nucleicos 15, una abrupta disminución de la extinción a la temperatura de fusión. Sin embargo, el ácido nucleico 15 que no es complementario en una base tiene una temperatura de fusión notablemente menor (aproximadamente 50,5 °C) que el ácido nucleico totalmente complementario (54 °C).

En los ejemplos anteriormente descritos, los agregados 20 han sido suspendidos en la muestra 2 y son capaces de difundirse libremente en ella, como se representa en la Figura 7.

En la Figura 9 se muestra, en unidades relativas, el cambio en la extinción de la muestra 2 del ejemplo de la Figura 1 a una longitud de onda de 650 nm, una vez que dicha muestra ha sido irradiada por el láser 6 con un pulso de luz láser que tiene una potencia máxima de 3,8 kW/mm<sup>2</sup>, y a una temperatura inicial, ajustada con el baño 9 de agua, de 25 °C. La extinción se midió a una longitud de onda de 650 nm. Al principio la extinción disminuye considerablemente, siendo esto estimado por los inventores como una consecuencia de un ensanchamiento térmicamente inducido de la resonancia de plasmones de partícula de las nanopartículas 5 de oro. Esta señal se debilita con una constante de tiempo de 11 μs. Queda una señal muy persistente que apunta a una disolución al menos parcial de los agregados 20, causada por la fusión. La diferencia de la extinción antes y después de la excitación de las nanopartículas 5 es la señal 23 de fusión.

En la Figura 10 se muestra, en unidades relativas, el cambio en la extinción, a una longitud de onda de 650 nm, en el caso de una cadena de cinco agregados de las nanopartículas 5 a una velocidad de repetición de 5 Hz (advértase el factor de ampliación de 1000 en la escala de tiempo en comparación con la Figura 9). La disminución gradual de la extinción es la consecuencia de una acumulación de agregados 20 disociados en la muestra 2. Presumiblemente, la disminución de la extinción que viene a continuación es parcialmente el resultado de una rehibridación y parcialmente el resultado de una difusión de agregados 20 no disociados fuera de la muestra 2, en la región en que la muestra 2 es transirradiada por la fuente lumínica 7.

La curva de señales de fusión representada en la Figura 11 ha surgido en virtud del hecho de que se ha representado gráficamente un cambio de la extinción, medida en cada caso 550 μs después de la excitación de las nanopartículas 5, en unidades relativas, frente a la densidad de potencia de pulsos del láser 6 que se empleó. Por debajo de un umbral de aproximadamente 2 kW/mm<sup>2</sup> de densidad de potencia de pulsos del láser 6, no se puede observar señal 23 de fusión mensurable alguna. Después de esto, se puede discernir una disminución sustancialmente lineal de la señal de fusión en función de la potencia. Se puede averiguar el umbral 24 de fusión determinando un punto de intersección 25 de los ajustes lineales en la región sin señal 26 mensurable y en la región 27 que decae de forma sustancialmente lineal.

En la Figura 12 se muestra la dependencia del umbral de fusión con la temperatura inicial, que es ajustada mediante el baño 9 de agua. El umbral de fusión disminuye al aumentar la temperatura inicial. Cuanto más próxima es la temperatura inicial a la temperatura de fusión, menores son los incrementos de temperatura que han de ser inducidos por medio de nanopartículas 5 excitadas con objeto de desencadenar la fusión. Con objeto de excluir efectos de



pendientes del tamaño sobre el umbral de fusión en virtud de que el tamaño de los agregados crece con el tiempo, se midieron los umbrales de fusión una vez con temperatura creciente 28 y una vez con temperatura decreciente 29. El ácido nucleico 15 totalmente complementario fue situado en la muestra 2 a modo del ácido nucleico que se va a detectar. La medición bidireccional mostró resultados idénticos, dentro de los errores de la medición.

5 En la Figura 13 se muestra la misma medición con un ácido nucleico 15 que no es complementario por una base (M en la Figura). En este caso, a diferencia de la Figura 12, el umbral de fusión decae mucho a una temperatura de 45 °C y se hace evidente una histéresis si la temperatura es reducida de nuevo 29. La histéresis se atribuye a un apareamiento a una temperatura de apareamiento de 45 °C. El aumento del tamaño de los agregados 20, causado por el apareamiento, reduce el umbral de fusión porque las nanopartículas de oro ocasionan un mayor aumento de temperatura con una excitación idéntica a causa de, *inter alia*, una relación decreciente de superficie/volumen de los agregados. Por lo tanto, con la ayuda del efecto de apareamiento, diferentes ácidos nucleicos 15 pueden ser distinguidos uno de otro.

10 15 En la Figura 14, se han extrapolado (30, 31) porciones de las curvas de umbrales de fusión para el ácido nucleico totalmente complementario 28 y para el ácido nucleico que difiere en una base, después del apareamiento 29. Los puntos cero 32, 33 de los umbrales de fusión, determinados mediante la extrapolación, son diferentes y se pueden trazar con el fin de detección o con el fin de distinguir los ácidos nucleicos 15.

20 En la Figura 15 se aclara la manera en que se pueden detectar dos ácidos nucleicos 15 en la misma muestra 2 con sólo dos excitaciones de las nanopartículas 5 a dos temperaturas iniciales diferentes. Con este fin se reproducen la curva 34 de umbrales de fusión de una muestra 2 que contiene exclusivamente moléculas de ácido nucleico totalmente complementarias, la curva 35 de umbrales de fusión de una muestra 2 que contiene exclusivamente moléculas de ácido nucleico que difieren en una base, y la curva 36 de umbrales de fusión de una muestra que contiene una mezcla 1:1 de ambos ácidos nucleicos. Tanto la curva 35 de umbrales de fusión como la curva 36 de umbrales de fusión presentan un llamativo declive en el umbral de fusión a 45 °C, la temperatura de apareamiento del ácido nucleico 15 que difiere en una base. Por otro lado, en el caso de la mezcla, también es detectable otro umbral de fusión a 53 °C, mientras que éste no es el caso con la muestra 2 que contiene ácidos nucleicos que sólo difieren en una base porque, en este caso, todos los agregados ya están disociados. De este modo, con sólo dos excitaciones a dos temperaturas diferentes se pueden distinguir las tres muestras 2 de la manera siguiente: las dos parejas constituidas por la potencia de excitación y la temperatura inicial se han representado en la Figura 15 como puntos 37 y 38 (densidad de potencia del láser de 1,4 kW/mm<sup>2</sup>, temperaturas de 45 °C y 53 °C, respectivamente). Los resultados se presentan en la tabla proporcionada bajo la Figura. En el caso A de la muestra 2 que sólo contiene ácidos nucleicos totalmente complementarios, no se mide a 45 °C una señal de fusión que indique una fusión porque la densidad de potencia de la excitación se encuentra por debajo del umbral de fusión. Sin embargo, se observa una fusión a 53 °C ya que aquí el umbral de fusión es menor. En el caso B de la muestra 2 que contiene ácidos nucleicos que sólo difieren en una base, el desplazamiento del umbral de fusión a 45 °C es lo suficientemente grande para que se obtenga ya allí una señal de fusión. Por otro lado, a 53 °C ya no se establece una señal de fusión porque esta temperatura se encuentra por encima de la temperatura de fusión y, por lo tanto, todos los agregados 20 están ya disociados incluso sin excitación. En el caso C de la muestra mixta 2, ambas mediciones dan lugar a una señal de fusión: a la temperatura baja en virtud del umbral de fusión, que está reducido por el apareamiento, del ácido nucleico que difiere en una base; y a la temperatura elevada en virtud de los agregados hasta ahora no totalmente disociados del ácido nucleico totalmente complementario. En consecuencia, el registro permite que las tres muestras sean claramente distinguidas, sin que sean necesarios aumentos graduales de la temperatura inicial que llevan mucho tiempo.

45 En principio, el método se puede ampliar de manera apropiada a la detección de más de dos ácidos nucleicos diferentes.

50 En la Figura 16 se aclara el modo en que se pueden distinguir ácidos nucleicos diferentes mediante el uso de nanopartículas 5, 39 de diferente tamaño. Una primera fracción de nanopartículas 5 es funcionalizada con oligonucleótidos 3, 4 para un primer ácido nucleico 15. Una segunda fracción de nanopartículas 39 es funcionalizada con otros oligonucleótidos 40, 41 para otro ácido nucleico 42. Puesto que las diferentes nanopartículas 5, 39 generan diferentes cantidades de calor en el caso de una excitación idéntica, el umbral de fusión es claramente diferente en las dos fracciones. En principio, este procedimiento puede ser también ampliado por medio de más fracciones de nanopartículas para un número mayor de ácidos nucleicos a detectar. También es concebible combinar el procedimiento representado de modo ejemplar en la Figura 16 con el procedimiento representado de modo ejemplar en la Figura 15, con objeto de detectar un número aún mayor de ácidos nucleicos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para detectar ácidos nucleicos, que tiene las operaciones siguientes:
- 5           – proporcionar al menos una nanopartícula que está funcionalizada por medio de al menos un oligonucleótido que está unido a ella y que es capaz de hibridarse con al menos un segmento de un ácido nucleico que se va a detectar;
- 10          – poner la nanopartícula funcionalizada en contacto con una muestra en que se va a detectar el ácido nucleico, estando el ácido nucleico que se va a detectar y la nanopartícula disueltos o suspendidos en un medio acuoso; y
- 15          – medir una propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación del al menos un oligonucleótido con el ácido nucleico que se va a detectar,
- caracterizado por que**
- las nanopartículas tienen un diámetro de entre 5 nm y 80 nm; y
- 20          el procedimiento se desarrolla por medio de al menos las operaciones siguientes:
- a) medir la propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación del ácido nucleico con el oligonucleótido a una temperatura inicial predeterminada;
- 25          b) excitar la nanopartícula para generar calor; y
- c) medir de nuevo la propiedad que proporciona información acerca del grado de hibridación del ácido nucleico con el oligonucleótido, y comparar los resultados de las mediciones antes y después de la excitación de las nanopartículas para generar calor, con objeto de determinar una señal de fusión que sea una medida del cambio en el grado de hibridación en virtud del calentamiento local sin que se caliente la muestra entera.
- 30
2. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1,
- 35          **caracterizado por que**
- se aplica radiación electromagnética para excitar la nanopartícula para generar calor.
- 40          3. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1 ó 2,
- caracterizado por que**
- la nanopartícula incluye un metal noble.
- 45          4. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,
- caracterizado por que**
- la propiedad es una propiedad óptica de la nanopartícula.
- 50          5. Un procedimiento de acuerdo con una de las Reivindicaciones 1 a 3,
- caracterizado por que,**
- 55          en el curso del proceso, se proporciona además al menos un marcador coloreado, y la propiedad es una propiedad óptica del marcador coloreado.
- 60          6. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,
- caracterizado por que**
- el ácido nucleico que se va a detectar comprende al menos dos segmentos, y se proporcionan al menos dos nanopartículas, estando al menos una de las nanopartículas funcionalizada con un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con el primer segmento del ácido nucleico, y estando al menos una de las nanopartículas funcionalizada con un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con el segundo segmento del ácido nucleico.
- 65

7. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1,  
**caracterizado por que**
- 5 se llevan a cabo las operaciones a) a c) al menos una primera vez y una segunda vez, siendo excitada la nanopartícula de un modo variablemente intenso para generar calor en el curso de las pasadas.
8. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 7,  
**caracterizado por que,**
- 10 en el curso de cada pasada, se determina una señal de fusión a partir de una comparación de la propiedad antes y después de la excitación de la nanopartícula, y se determina un umbral de fusión a partir de la comparación de las señales de fusión.
- 15 9. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 8,  
**caracterizado por que**
- 20 el ácido nucleico se detecta basándose en un umbral de fusión que es específico del ácido nucleico a una temperatura inicial dada.
10. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 8,  
**caracterizado por que**
- 25 se determina el umbral de fusión para varias temperaturas iniciales con objeto de determinar una curva de umbrales de fusión.
- 30 11. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 10,  
**caracterizado por que**
- 35 se determina el gradiente de la curva de umbrales de fusión.
12. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 10  
**caracterizado por que**
- 40 se extrapola linealmente la curva de umbrales de fusión hasta un punto cero del umbral de fusión.
13. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,  
**caracterizado por que**
- 45 el primer ácido nucleico se detecta basándose en una temperatura de apareamiento que es específica del ácido nucleico.
14. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 13,  
**caracterizado por que** el ácido nucleico se detecta en virtud del hecho de que un umbral de fusión se encuentra por debajo de un cierto valor a una temperatura inicial que es sustancialmente mayor o igual que la temperatura de apareamiento.
- 50 15. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 13 ó 14,  
**caracterizado por que**
- 55 se desarrolla a través de al menos las operaciones siguientes:
- 60 – determinar al menos un umbral de fusión a al menos una temperatura inicial por debajo de la temperatura de apareamiento;
- 65 – elevar temporalmente la temperatura inicial hasta la temperatura de apareamiento o por encima de ella;

- determinar al menos un umbral de fusión a al menos una temperatura inicial por debajo de la temperatura de apareamiento; y
- comparar los umbrales de fusión determinados antes y después de la elevación temporal de la temperatura inicial por encima de la temperatura de apareamiento.

5

16. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 6 ó 7,

10

**caracterizado por que**

se llevan a cabo las operaciones a) a c) al menos una primera vez y una segunda vez, siendo variable en el curso de las pasadas la temperatura inicial predeterminada, se determina con cada pasada una señal de fusión a partir de una comparación de la propiedad antes y después de la excitación de la nanopartícula, y se comparan las señales de fusión de las pasadas.

15

17. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes,

20

**caracterizado por que**

se proporcionan varias fracciones de nanopartículas que tienen diferentes propiedades de excitación, se funcionalizan las nanopartículas de una primera fracción para un primer ácido nucleico que se va a detectar, y se funcionalizan las nanopartículas de una segunda fracción para un segundo ácido nucleico que se va a detectar, que es diferente del primer ácido nucleico.

Fig. 1

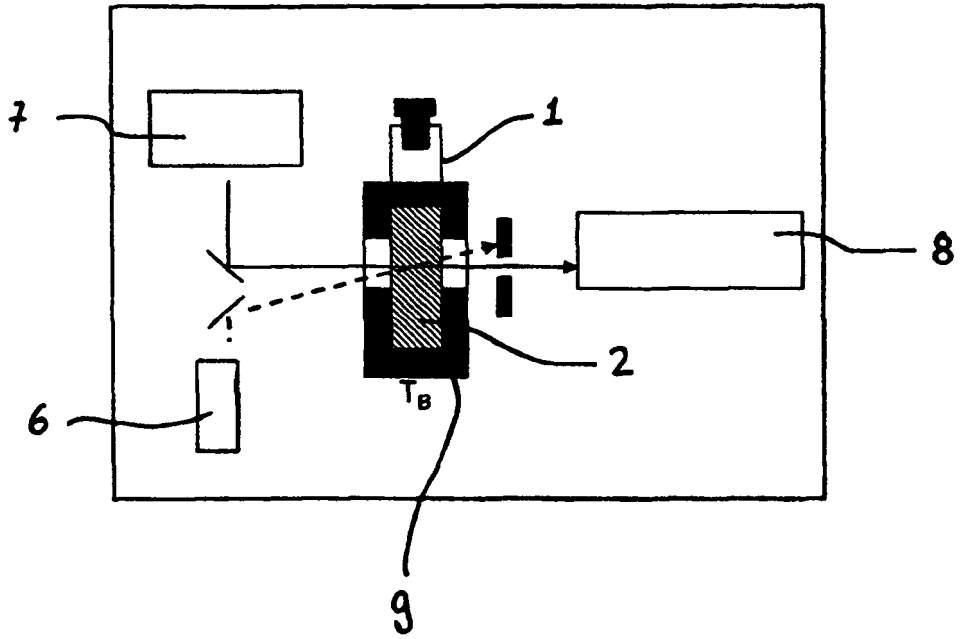


Fig. 2

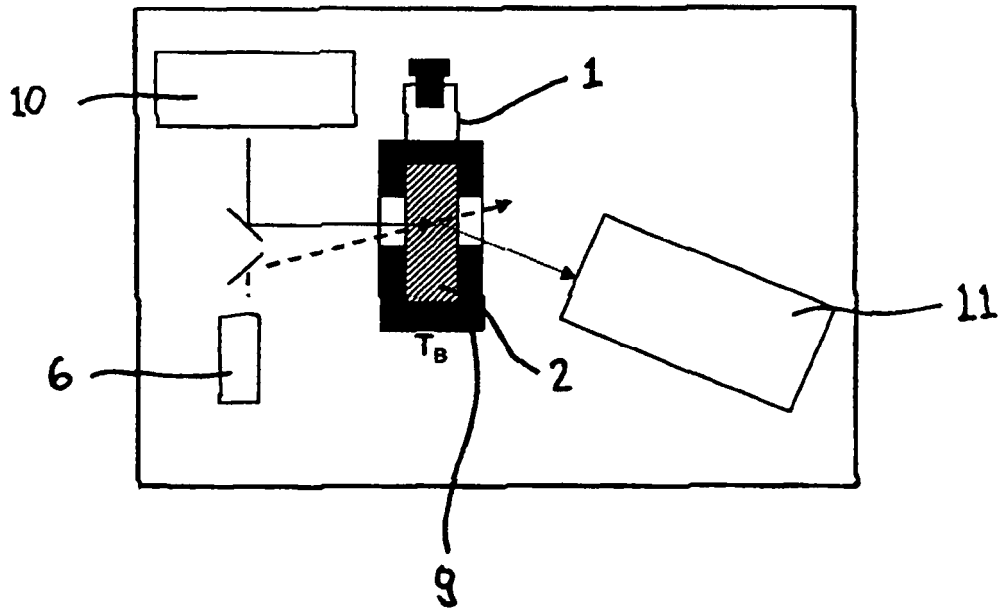


Fig. 3

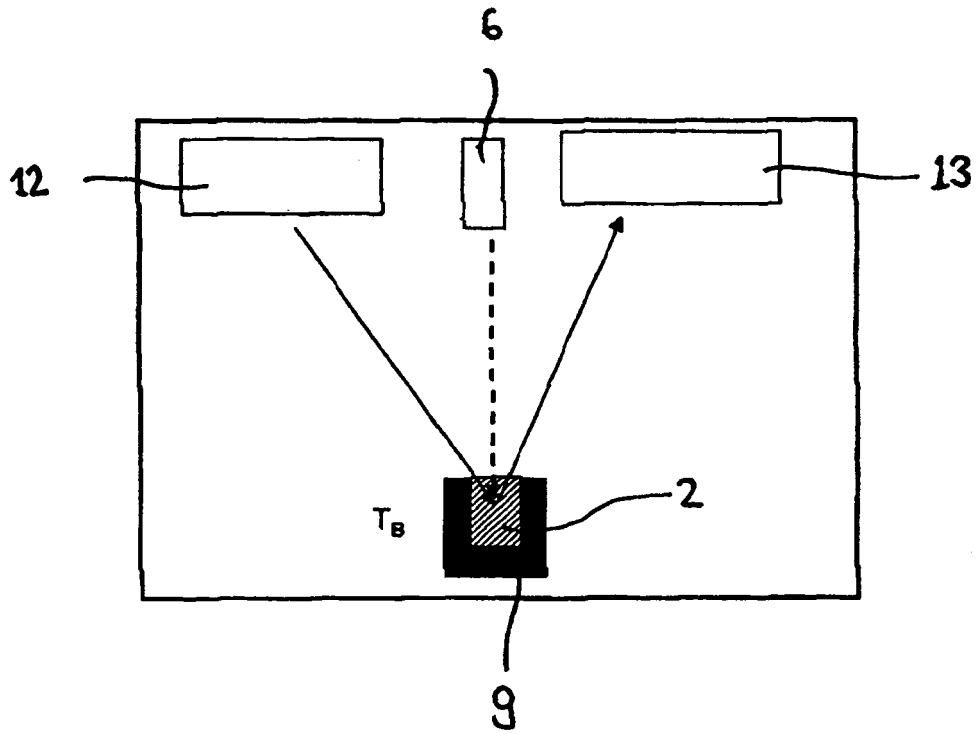


Fig. 4

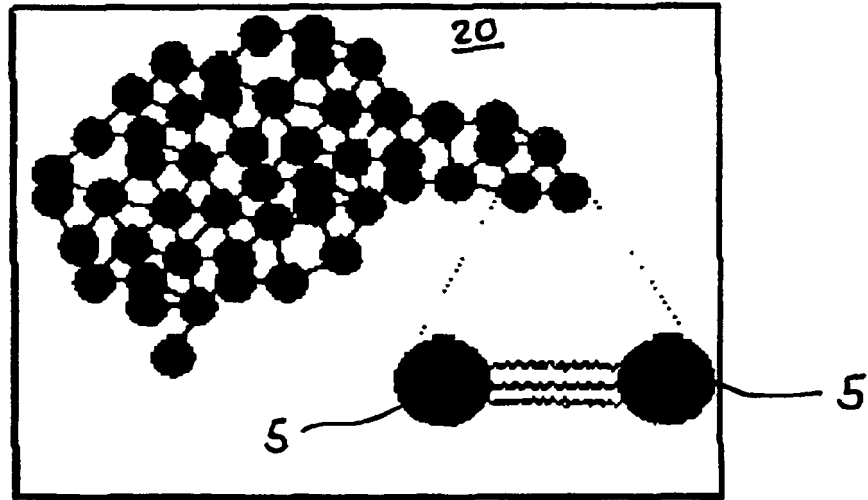




Fig. 5

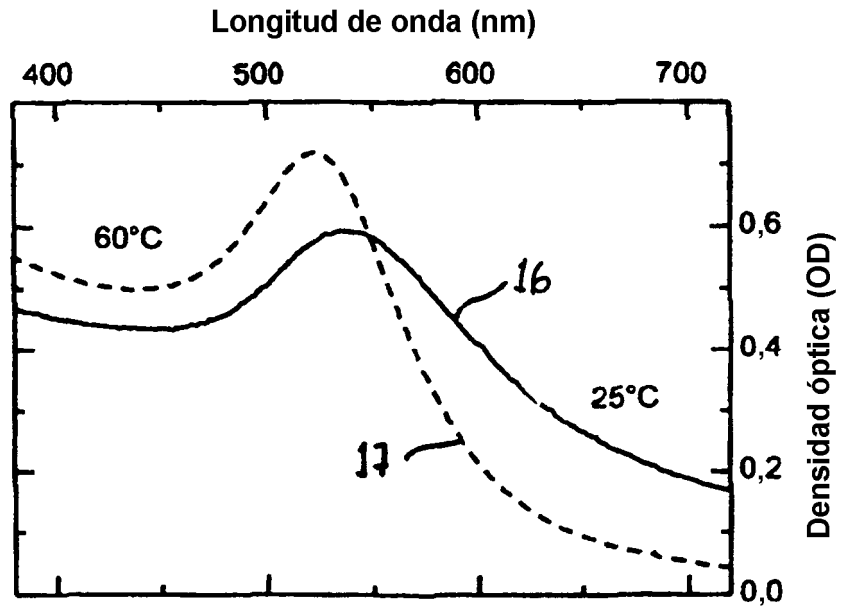


Fig. 6

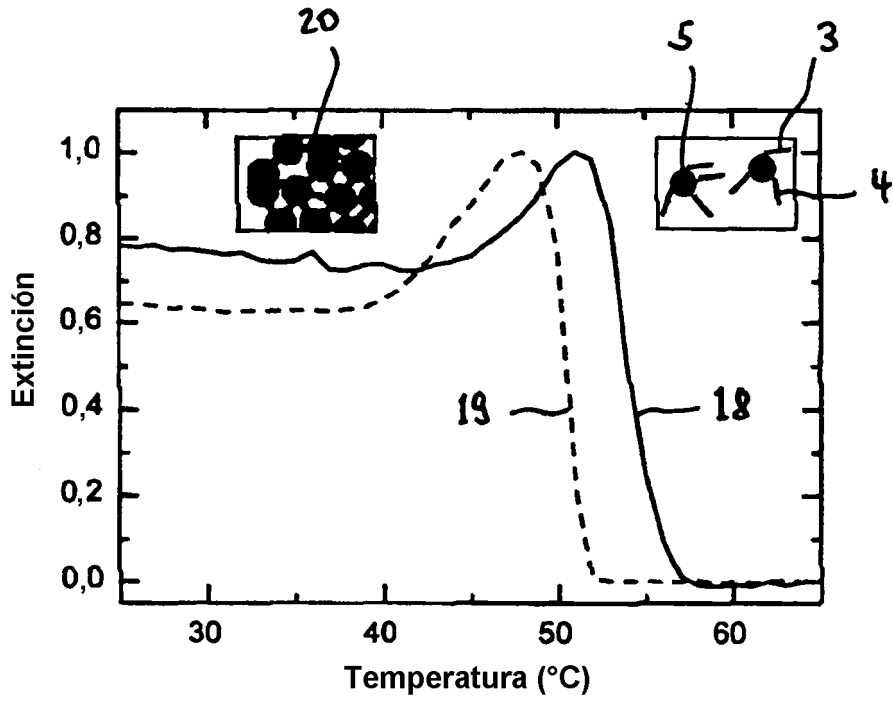


Fig. 7

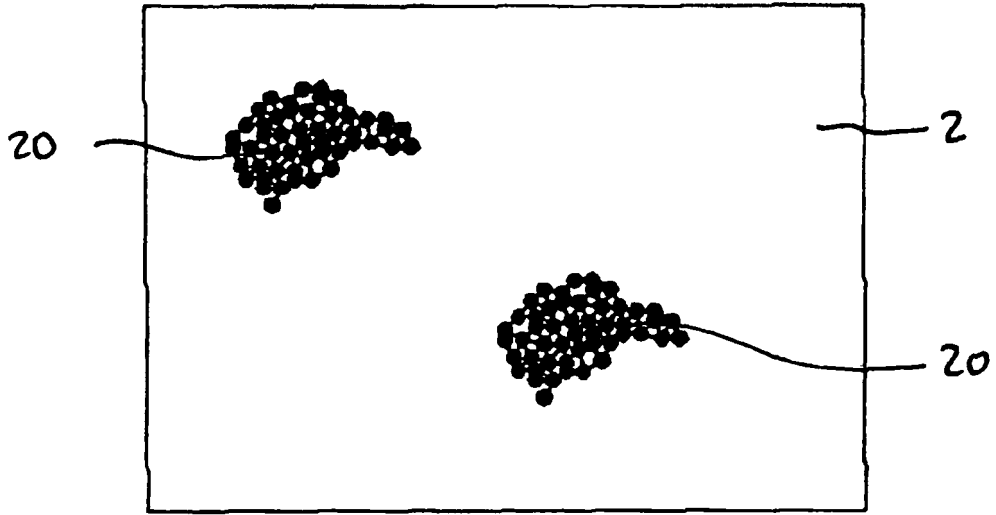


Fig. 8

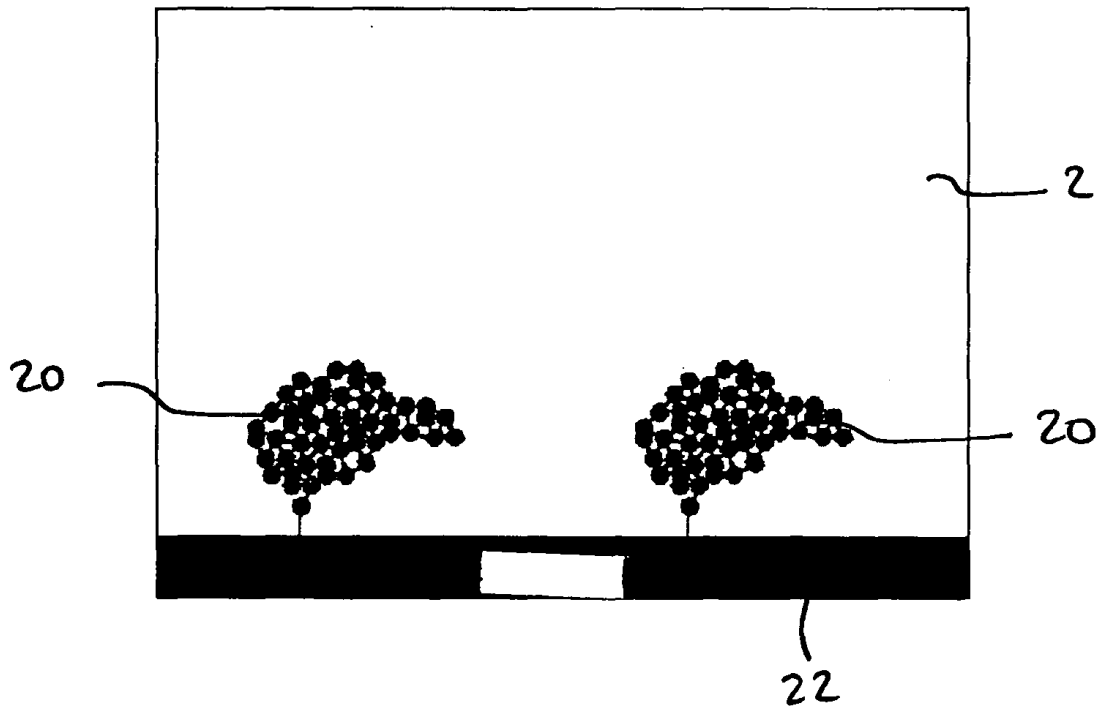


Fig. 9

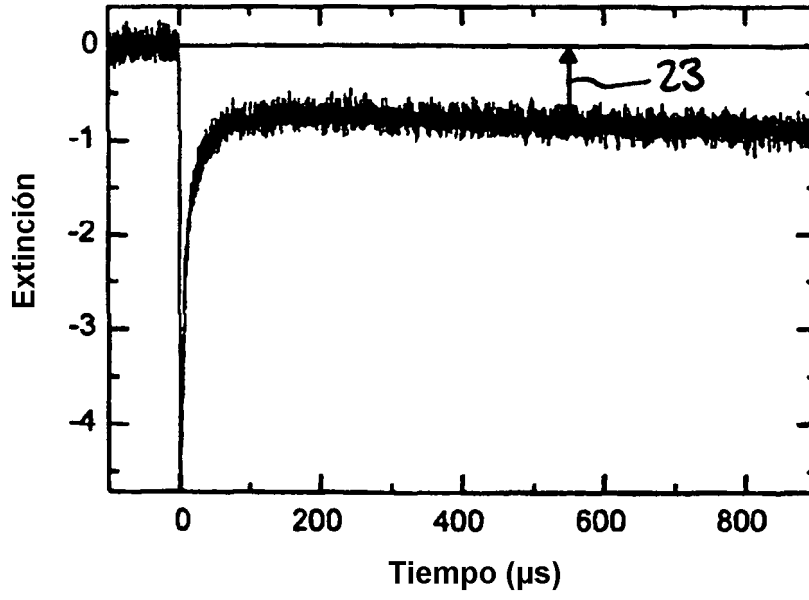


Fig. 10

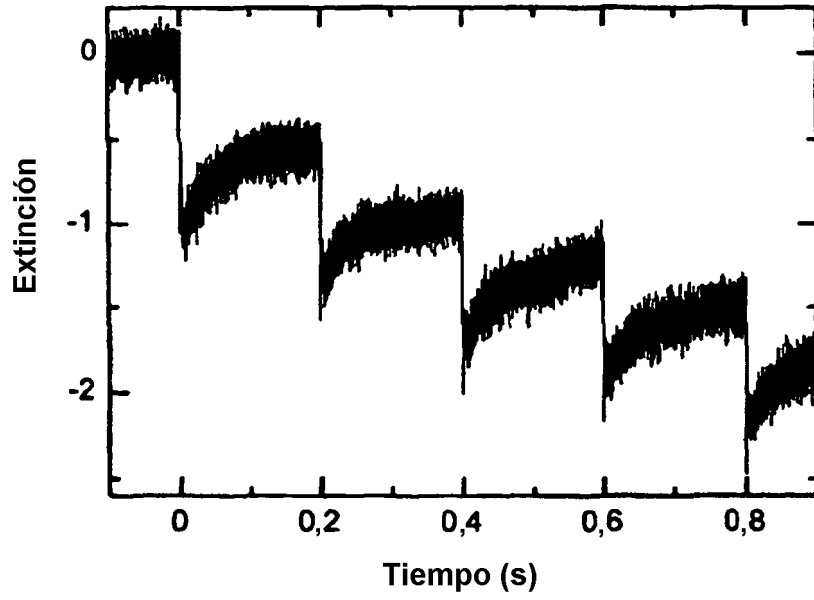


Fig. 11

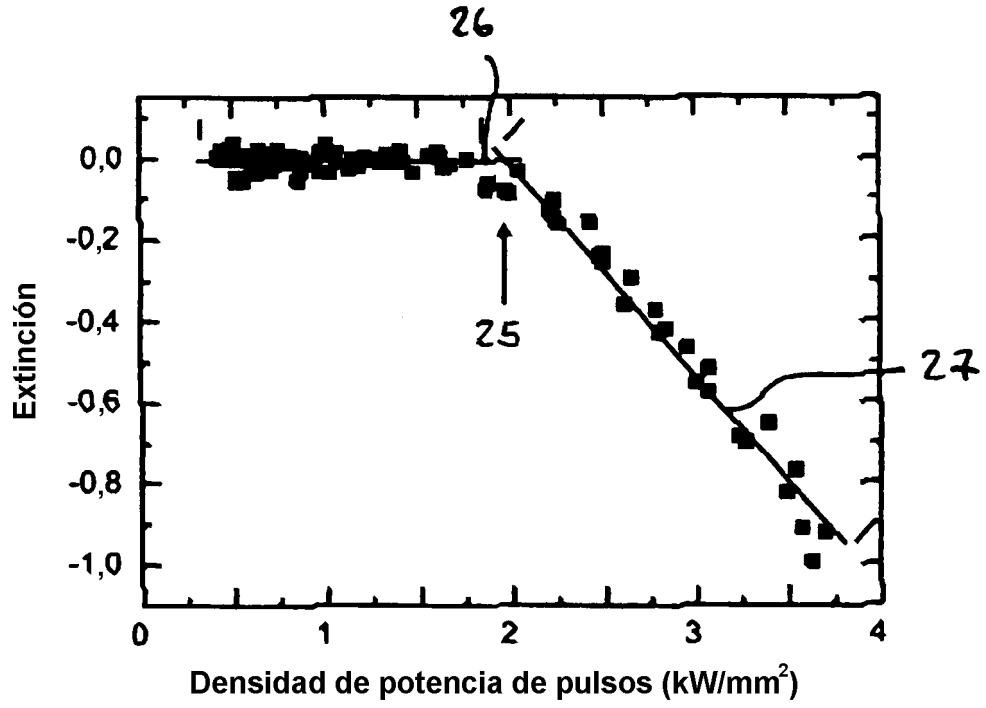


Fig.12

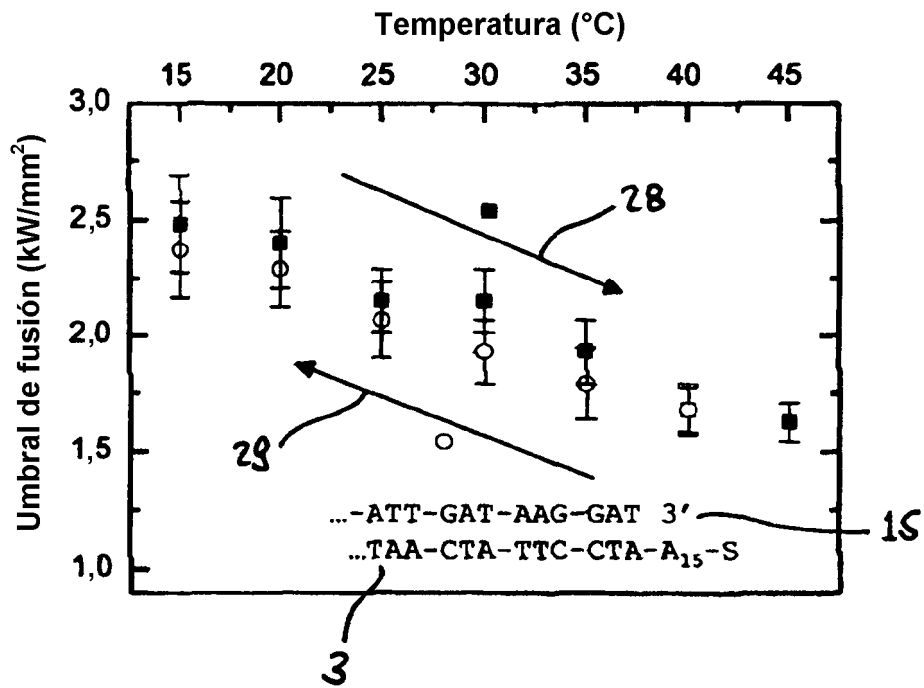




Fig. 13

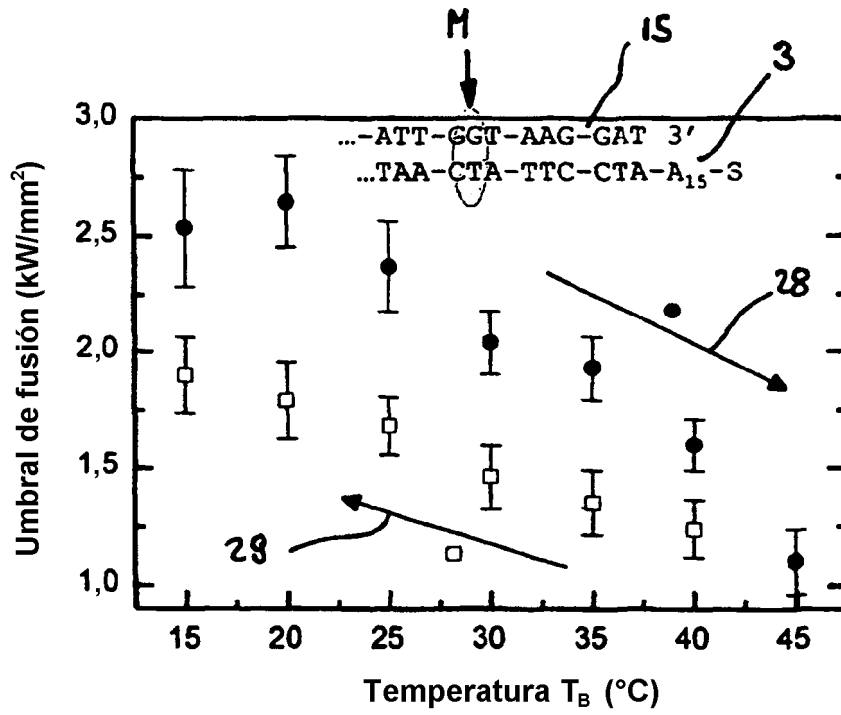


Fig. 14

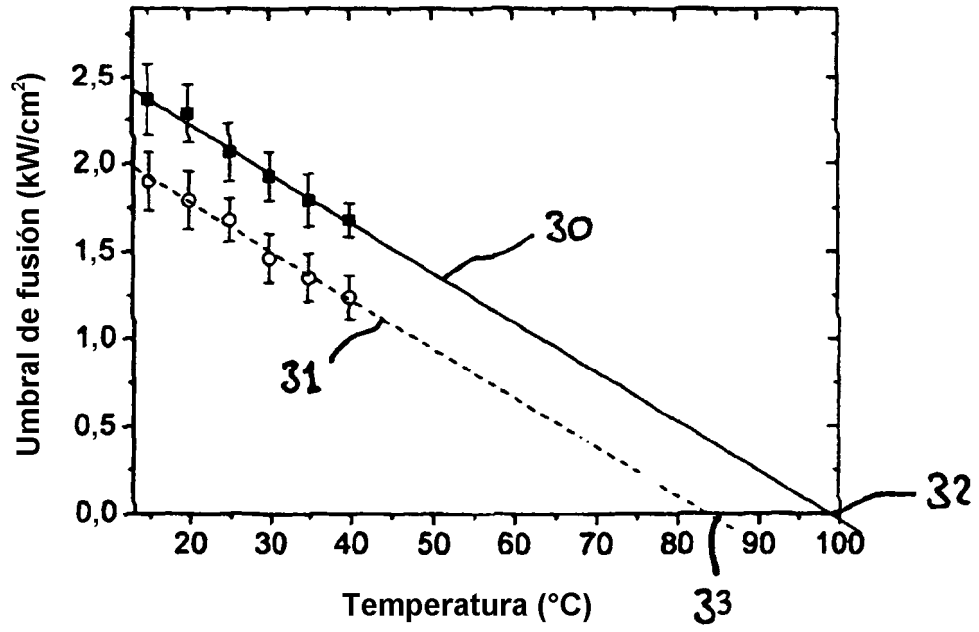
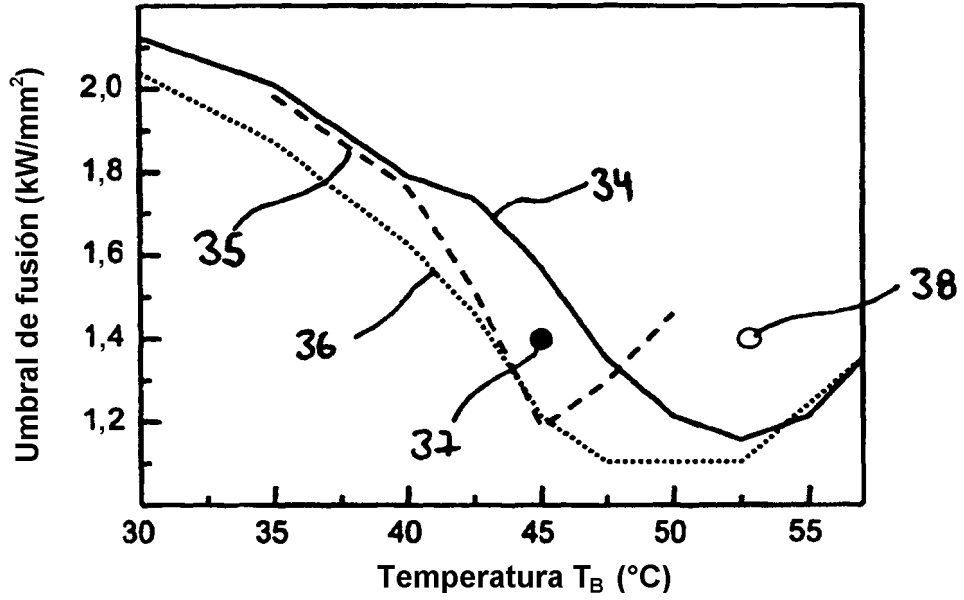


Fig. 15



	● 45°C	○ 53°C
A —————	señal nula	señal
B - - - - -	señal	señal nula
C .....	señal	señal

Fig. 16

