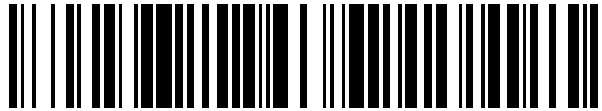


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 783**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09005451 .1**

96 Fecha de presentación: **17.04.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2112230**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2009**

54

Título: **Detección de ácidos nucleicos con ribonucleótidos marcados con etiquetas**

30

Prioridad:

21.04.2008 US 46720 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

13.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

13.12.2012

73

Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

GRENZACHERSTRASSE 124

4070 BASEL, CH y

CENTRE NATIONAL DE GENOTYPAGE (50.0%)

72

Inventor/es:

BAUER, KEITH A.;

GELFAND, DAVID H.;

GUT, IVO GLYNNE y

MAUGER, FLORENCE

74

Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 392 783 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de ácidos nucleicos con ribonucleótidos marcados con etiquetas

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la detección de ácidos nucleicos. En particular, la presente invención proporciona polinucleótidos que poseen múltiples segmentos de secuencia contiguos, en el que la base de nucleótido del extremo 5' de cada segmento de secuencia es único dentro del segmento de secuencia y es el mismo en cada segmento de secuencia, y los métodos para su utilización en la detección de ácidos nucleicos diana.

Antecedentes de la invención

Se conocen muchos métodos para la detección de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, genotipaje de SNP). Los ensayos homogéneos actualmente disponibles para el genotipaje de SNP incluye los ensayos de cebador TASMAN®, AMPLIFLUOR®, unión de colorantes, PCR cinética selectiva de alelo, y SCORPION®. Estos ensayos proporcionan uno, o como máximo dos (si se utilizan cuatro tinciones fluorescentes diferentes) SNP por pocillo de reacción (por ejemplo la PCR cinética de unión a colorantes requiere dos pocillos por cada SNP). Los métodos disponibles para el genotipaje de SNP están en el rango de aquellos que permiten el genotipaje de un único SNP en un pocillo de reacción hasta los métodos que permiten el genotipaje de varios miles de SNP en un único pocillo (por ejemplo, ensayo GOLDEN GATE®, Illumina). Los presentes procedimientos de ensayo de genotipaje no se pueden multiplexar fácilmente debido a que requieren de una tinción diferente por cada tipo de alelo, y por lo tanto está limitado en su potencial para mejorar. El ensayo GOLDEN GATE® requiere de dispositivos de análisis complejos como un lector de fibra óptica. Los analizadores para la lectura de genotipaje de SNP están en el rango de lectores de placas (opcionalmente, con una máquina de PCR incluida), hasta secuenciadores (por ejemplo, secuenciadores capilares), lectores de matrices y espectrómetros de masas. Además, aunque los espectrómetros de masas se han utilizado para el genotipaje, el procedimiento actualmente disponible no permite el verdadero multiplexado.

30 Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona polinucleótidos para la eficiente y simultánea detección altamente sensible de uno o más ácidos nucleicos diana. Los polinucleótidos están diseñados con una porción 5' que comprende uno, dos o más segmentos de secuencias contiguos, de tal manera que la masa de un segmento de secuencia, o complemento de la misma, identifica un ácido nucleico diana o un nucleótido diana dentro de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el segmento de secuencia son de la misma masa. Los segmentos de secuencias de igual masa puede, pero no necesita tener la misma secuencia. El segmento de secuencia se escinde del complemento del polinucleótido y su masa se mide o detecta para identificar la presencia, ausencia o nivel de presencia de un ácido nucleico diana.

40 En consecuencia, la presente Invención está relacionada con un polinucleótido que comprende uno, dos o más segmentos de secuencias. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende una porción 5' y una porción 3', en la que

45 a) la porción 5' comprende al menos uno o dos segmentos de secuencias contiguos, en el que cada segmento de secuencia comprende al menos tres bases de nucleótido, es de igual masa, y el extremo 5' de la base de nucleótido de cada segmento de secuencia es único dentro de un segmento de secuencia y es el mismo en cada segmento de secuencia; y

50 b) la porción 3' comprende al menos 5 nucleótidos, en el que el polinucleótido tiene menos de aproximadamente 100 bases de nucleótido de longitud. En algunas realizaciones, el polinucleótido es menor de aproximadamente 75, 50 o 25 nucleótidos de longitud.

En realizaciones preferibles, cada segmento de secuencia posee la misma secuencia de nucleótido.

55 En otras realizaciones preferibles, la porción 5' comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7 o 8 segmentos de secuencias contiguos. En algunas realizaciones preferibles, cada segmento de secuencia comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7 o 8 nucleótidos.

60 En también realizaciones preferibles, el extremo 3' comprende una porción de bloqueo extraíble que previene sustancialmente la extensión del polinucleótido. En realizaciones especialmente preferibles, el extremo 3' comprende una porción terminadora 2'.

La invención proporciona métodos para detectar un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, los métodos comprenden:

65 (a) poner en contacto el ácido nucleico diana con un polinucleótido, un grupo de nucleótidos y un nucleótido que

incorpora un componente biocatalítico, en el que;

- 5 (i) el polinucleótido comprende una porción 5' y una porción 3', la porción 5' comprende al menos uno o al menos dos segmentos de secuencias contiguos, en el que cada segmento de secuencia comprende al menos tres bases de nucleótido, y la base de nucleótido del extremo 5' de cada segmento de secuencia es único dentro de un segmento de secuencia y es el mismo en cada segmento de secuencia; y la porción 3' comprende un segmento de secuencia que es sustancialmente complementario y suficiente para hibridar con el ácido nucleico diana y extenderse bajo condiciones de amplificación;
- 10 (ii) el grupo de nucleótidos comprende al menos dos bases de nucleótido en forma de desoxiribonucleótidos (dNTP), y la mayoría de al menos una base de nucleótido en forma de un ribonucleótido (rNTP), en el que la base del ribonucleótido es complementaria a la base de nucleótido 5' única de cada segmento de secuencia del polinucleótido; y
- 15 (iii) el nucleótido que incorpora un componente biocatalítico comprende un desoxiribonucleótido y un ribonucleótido que incorporan actividades;
- (b) amplificar el ácido nucleico diana bajo condiciones de amplificación en presencia de uno o más pares de cebadores para producir un amplicón que comprende un segmento de secuencia 3' (es decir una porción 3') complementaria a la porción 5' del polinucleótido, en el que el segmento de secuencia 3' comprende al menos uno o al menos dos segmentos de secuencias, en el que la base de nucleótido del extremo 3' de cada segmento de secuencia es un nucleósido monofosfato (NMP) que posee la misma base que el NTP en el grupo de nucleótidos;
- 20 (c) escindir el amplicón 3' de cada NMP en fragmentos, en la que la escisión libera el segmento de secuencia como fragmentos individuales; y
- 25 (d) detectar los fragmentos de amplicón, en el que los fragmentos del segmento de secuencia detectados indican la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, detectando por lo tanto la secuencia de ácido nucleico diana.
- 30 En realizaciones preferibles, el segmento de secuencia de la porción 5' es de la misma masa.
- En otras realizaciones preferibles, al menos el 80% de al menos una base de nucleótido está en forma de un ribonucleótido (rNTP).
- 35 En otras realizaciones preferibles, la escisión se realiza sometiendo al amplicón a una solución alcalina.
- En realizaciones preferibles, la solución alcalina comprende al menos una de las siguientes: NaOH, KOH, RbOH, Mg(OH)₂, Ca(OH)₂, o NH₄OH. En más realizaciones preferibles, la solución alcalina comprende al menos una de las siguientes: NaOH, KOH o NH₄OH.
- 40 En otras realizaciones preferibles, los métodos comprenden además el paso de poner en contacto la secuencia del ácido nucleico diana con una pareja de polinucleótidos, en el que cada polinucleótido en la pareja de polinucleótidos comprende el segmento de secuencia de la porción 5' de la misma masa.
- 45 En otras realizaciones preferibles, los métodos comprenden además el paso de poner en contacto el ácido nucleico diana con al menos un polinucleótido, en el que la detección de los fragmentos del segmento de secuencia del polinucleótido, o su complementario, indica la presencia de un alelo de un nucleótido polimórfico en la secuencia de ácido nucleico diana.
- 50 En otras realizaciones preferibles, los métodos comprenden además el paso de poner en contacto el ácido nucleico diana con al menos dos polinucleótidos diferentes, en el que los polinucleótidos difieren solo en la base de nucleótido del extremo 3', en el que la base de nucleótido del extremo 3' de cada polinucleótido corresponde con un segmento de secuencia de masa única, y la detección de los fragmentos del segmento de secuencia de al menos uno de los polinucleótidos, o su complementario, indica la presencia de un alelo de un nucleótido polimórfico en la
- 55 secuencia de ácido nucleico diana.
- En otras realizaciones preferibles, un grupo de diferentes secuencias de ácido nucleico diana se pone en contacto con un grupo de polinucleótidos diferentes, cada de los polinucleótidos diferentes comprende un segmento de secuencia de masa única, en el que el segmento de secuencia de polinucleótidos son identificadores de un grupo de
- 60 secuencias de ácido nucleico diana diferentes, mientras que la detección de los fragmentos del segmento de secuencia de al menos uno de los polinucleótidos, o su complementario, indica la presencia de al menos uno del grupo de secuencias de ácido nucleico diana diferentes.
- 65 En otras realizaciones preferibles, el nucleótido que incorpora un componente biocatalítico comprende un dominio catalítico único que comprende un desoxiribonucleótido y un ribonucleótido que incorpora actividades. Es además preferible de acuerdo con la invención que el nucleótido que incorpora un componente biocatalítico comprende un

primer y un segundo dominio catalítico, en el que el primer dominio catalítico comprende un desoxiribonucleótido que incorpora actividad y el segundo dominio catalítico comprende un ribonucleótido que incorpora actividad.

5 En realizaciones preferibles, la detección se realiza mediante espectrometría de masas. En algunas realizaciones preferibles, la detección es mediante espectrometría de masas iónica de fase gaseosa o, alternativamente, la detección es mediante espectrometría de masas con ionización/desorción por láser.

10 En otras realizaciones preferibles, el polinucleótido comprende una porción de bloqueo que previene sustancialmente la extensión del polinucleótido, y en el que el método comprende además el paso de eliminar la porción de bloqueo del polinucleótido antes de amplificar.

La invención está relacionada también con mezclas de reacción, por ejemplo para realizar el método de detección de la invención descrito anteriormente. En realizaciones preferibles, las mezclas de reacción comprenden:

15 a) un primer polinucleótido que comprende una porción 5' y una porción 3', en el que la porción 5' comprende al menos uno o al menos dos segmentos de secuencias contiguos, en el que cada segmento de secuencia comprende al menos tres bases de nucleótido, y la base de nucleótido del extremo 5' de cada segmento de secuencia es único dentro de un segmento de secuencia y es el mismo en cada segmento de secuencia; y la porción 3' comprende un segmento de secuencia que es sustancialmente complementario y suficiente para hibridar con un ácido nucleico diana y extenderse bajo condiciones de amplificación;

20

b) un grupo de nucleótidos comprende al menos dos bases de nucleótido en forma de desoxiribonucleótidos (dNTPs), y la mayoría de al menos una base de nucleótido en forma de un ribonucleótido (rNTP), en el que la base de nucleótido proporcionada como un ribonucleótido es complementaria a la base de nucleótido 5' única de cada segmento de secuencia; y

25

c) un nucleótido que incorpora un componente biocatalítico que comprende un desoxiribonucleótido y un ribonucleótido que incorpora actividades.

30 En realizaciones preferibles, la mezcla de reacción comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico diana.

La invención también está relacionada con equipos. En realizaciones preferibles, los equipos comprenden:

35 a) un primer polinucleótido que comprende una porción 5' y una porción 3', en la que la porción 5' comprende al menos uno o al menos dos segmentos de secuencias contiguos, en el que cada segmento de secuencia comprende al menos tres bases de nucleótido, y la base de nucleótido del extremo 5' de cada segmento de secuencia es único dentro de un segmento de secuencia y es el mismo en cada segmento de secuencia; y la porción 3' comprende un segmento de secuencia que es sustancialmente complementario y suficiente para hibridar con un ácido nucleico diana y extenderse bajo condiciones de amplificación;

40

b) un grupo de nucleótidos comprende al menos dos bases de nucleótido en forma de desoxiribonucleótidos (dNTPs), y la mayoría sustancial de al menos una base de nucleótido en forma de un ribonucleótido (rNTP), en el que la base de nucleótido proporcionada como un ribonucleótido es complementaria a la única base de nucleótido 5' de cada segmento de secuencia; y

45

c) un nucleótido que incorpora un componente biocatalítico que comprende un desoxiribonucleótido y un ribonucleótido que incorpora actividades.

50 Las realizaciones de las mezclas de reacción y equipos son como se ha descrito anteriormente para los polinucleótidos y los métodos, y en este documento. Un equipo preferible para utilizar por la invención es, por ejemplo, un equipo en el que cada posición 5' del segmento de secuencia es de la misma masa y la posición 5' del segmento de secuencia del polinucleótido comprende al menos tres segmentos de secuencias, más preferible al menos cuatro bases de nucleótido y lo más preferible al menos siete bases de nucleótido. En otras realizaciones preferibles de los equipos el extremo 3' comprende una porción de bloqueo escindible que previene sustancialmente la extensión del polinucleótido, más preferible el extremo 3' del polinucleótido comprende una porción 2' terminadora.

55

60 En otro aspecto, el método de la invención proporciona amplicones. En algunas realizaciones, los amplicones comprenden un polinucleótido de doble cadena que comprende:

a) una primera cadena que comprende una porción 5' y una porción 3', en el que la porción 5' comprende al menos uno o al menos dos segmentos de secuencias contiguos, en el que cada segmento de secuencia comprende al menos tres bases de nucleótido, es de la misma masa, y la base de nucleótido del extremo 5' de cada segmento de secuencia es único dentro de un segmento de secuencia y es el mismo en cada segmento de secuencia; y la porción 3' comprende al menos 5 nucleótidos; y

65

b) un segunda cadena complementaria a la primera cadena y que comprende una porción 3' que comprende un segmento de secuencia que comprende al menos uno o al menos dos segmentos de secuencias contiguos, en el que la base de nucleótido del extremo 3' de cada segmento de secuencia es un NMP.

5 En otro aspecto, la invención está relacionada con sistemas. En algunas realizaciones, los sistemas comprenden al menos un contenedor o soporte que comprende:

a) una composición que comprende un amplicón de la invención;

10 b) al menos un modulador térmico configurado para comunicarse térmicamente con el contenedor o el soporte para modular la temperatura en el contenedor o en el soporte;

c) al menos un componente de transferencia de reactivos que transfiere los reactivos a y/o hacia el contenedor o el soporte; y,

15 d) al menos un detector configurado para detectar masas de uno o más segmentos de secuencias producidas en el contenedor o en el soporte.

En realizaciones preferibles, el detector comprende un espectrómetro iónico de fase gaseosa.

20 En realizaciones preferibles, los sistemas comprenden al menos un controlador conectado de forma operativa con:

- el modulador térmico para modular la temperatura en el contenedor o en el soporte,

25 - el componente de transferencia de reactivos para efectuar la transferencia de los reactivos a y/o hacia el contenedor o en el soporte, y/o,

- el detector para efectuar la detección de las masas del segmento de secuencia producido en el contenedor o en el soporte.

30 Definiciones

Los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido" se aplican de forma intercambiable con un polímero que se corresponde con un polímero de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxiribonucleico (DNA), o un análogo de los mismos. Esto incluye polímeros de nucleótidos como RNA y DNA, así como a formas modificadas de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA™), y similares. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómero, por ejemplo, ambas subunidades de RNA y DNA. Un ácido nucleico puede ser o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de DNA o RNA desnudo, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda, un cebador, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de cadena única, de doble cadena, de triple cadena, etc y no está limitado a ninguna longitud concreta. A no ser que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia explícitamente indicada.

Los ácidos nucleicos no se limitan a moléculas que poseen secuencias o estructuras de polinucleótido que aparecen de forma natural, cadenas principales que ocurren naturalmente, y/o enlaces internucleótido que ocurren de forma natural. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos dentro de esta definición (Jenkins et al. (1995) Chem. Soc. Rev. pp 169-176). Para ilustrar en profundidad, aunque un ácido nucleico contendrá en general enlaces fosfodiéster, en algunos casos se incluyen análogos de ácido nucleico que poseen cadenas principales alternativas. Estas incluyen, sin limitación, fosforamida (Beaucage et al. (1993) Tetrahedron 49(10):1925 y las referencias incluidas; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35:3800; Sprinzl et al. (1977) Eur. J. Biochem. 81:579; Letsinger et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487; Sawai et al. (1984) Chem. Lett. 805; Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470; y Pauwels et al. (1986) Chemica Scripta 26:1419), fosforotioato (Mag et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:1437 y Patente EE.UU. N° 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:2321), enlaces O-metilfosforoamidita (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992)), y cadenas principales y enlaces de ácido nucleico peptídico (Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:1895; Meier et al. (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008; Nielsen (1993) Nature 365:566; y Carlsson et al. (1996) Nature 380:207).

Otros análogos de ácidos nucleicos incluye aquellos con cadenas principales cargadas positivamente (Denpcy et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097); cadenas principales no iónicas (Patentes EE.UU. N° 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Angew (1991) Chem. Intl. Ed. English 30: 423; Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470; Letsinger et al. (1994) Nucleoside & Nucleotide 13:1597; Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994) Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395; Jeffs et al. (1994) J. Biomolecular NMR 34:17;

Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) y cadenas principales no ribosa, que incluye aquellas descritas en las Patentes EE.UU. Nº 5.235.033 y 5.034.506, y capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghvi y P. Dan Cook. También se describen varios análogos de ácido nucleico en, por ejemplo, Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 página 35. Las modificaciones de esta ribosa-fosfato cadena principal puede realizarse para facilitar la adición de porciones adicionales, como porciones de marcaje, o para alterar la estabilidad y vida media de dichas moléculas en ambientes fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas que aparecen de forma natural que se encuentran normalmente en los ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina, y uracilo), los análogos de ácido nucleico también incluyen aquellos que poseen bases heterocíclicas u otras bases modificadas que no aparecen de forma natural. Para ilustrar, ciertas bases utilizadas en los nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m) se incluyen de forma opcional. Por ejemplo, algunos de estos incluye 7-deazapurinas (por ejemplo, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.), y similares. Véase, por ejemplo, la Patente EE.UU. Nº 5.990.303. Otras bases heterocíclica representativa incluye, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina; 8-aza derivados de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 7-deaza- 8-aza derivados de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-yodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-yodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, y similares. Muchas bases que no aparecen de forma natural se describen también en, por ejemplo, Seela et al. (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1790, Grein et al. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, y Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640. Ejemplos adicionales de bases y nucleótidos modificados se describen también en, por ejemplo, las Patentes EE.UU. Nº 5.484.908; 5.645.985; 5.830.653; 6.639.059; 6.303.315; y solicitud de publ. de patente EE.UU. Nº 2003/0092905.

Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo, un éster fosfato de un nucleósido. Para ilustrar, un nucleótido puede incluir 1, 2, 3, o más grupos fosfato unidos de forma covalente a una porción de azúcar del nucleósido (por ejemplo, en la posición 5', posición 3', posición 2', etc.).

Un "nucleótido que incorpora un biocatalizador" se refiere a un catalizador que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Un nucleótido que incorpora un biocatalizador es normalmente una enzima. Una "enzima" es un catalizador basado en una proteína que actúa para reducir la energía de activación de una reacción química que implica a otros compuestos o "sustratos." Un "nucleótido que incorpora una enzima" se refiere a una enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Ejemplos de nucleótidos que incorporan enzimas incluye, por ejemplo, polimerasas de DNA, polimerasas de RNA, transferasas terminales, transcriptasas reversas, telomerasas, fosforilasas de polinucleótido, y similares. Otros biocatalizadores pueden estar basados en DNA ("DNAzimas") o basados en RNA ("ribozimas"). Una "enzima termoestable" se refiere a una enzima que es estable al calor, es resistente al calor y retiene suficiente actividad catalítica cuando se somete a elevadas temperaturas para periodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una polimerasa termoestable retiene suficiente actividad para efectuar posteriores reacciones de extensión de cebadores cuando se somete a elevadas temperaturas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de los ácido nucleicos de doble cadena. Las condiciones de calor necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos son bien conocidas en la materia y se ejemplifican en la Patente EE.UU. Nº 4.683.202, titulada "PROCESO PARA AMPLIFICAR SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS" depositada el 28 Jul., 1987 en Mullis y la Patente EE.UU. Nº 4.683.195, titulada " PROCESO PARA AMPLIFICAR, DETECTAR, Y/O CLONAR SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS" depositada el 28 Jul., 1987 en Mullis et al.. Tal como se utiliza aquí, una polimerasa termoestable es normalmente adecuada para utilizar en una reacción de ciclación por temperatura como PCR o reacción de nucleasa 5'. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la polimerización de los nucleótidos de la forma adecuada para formar productos de extensión de cebadores que son complementarios a un molde de ácido nucleico.

Ejemplos de nucleótidos que incorporan biocatalizadores incluye, por ejemplo, una polimerasa de DNA G46E E678G CS5, una polimerasa de DNA G46E L329A E678G CS5, una polimerasa de DNA G46E L329A D640G S671F CS5, una polimerasa de DNA G46E L329A D640G S671 F E678G CS5, una polimerasa de DNA G46E E678G CS6, una polimerasa @Z05R, una polimerasa de DNA Taq E615G, una polimerasa de *Thermus flavus*, una polimerasa TMA-25, una polimerasa E678G TMA-25, una polimerasa TMA-30, una polimerasa E678G TMA-30, una polimerasa de DNA Tth, una polimerasa de la especie *Thermus* SPS-17, una polimerasa Taq E615G, una polimerasa *Thermus* Z05R, una polimerasa de DNA T7, una polimerasa de DNA I Kornberg, una polimerasa de DNA Klenow, una polimerasa de DNA Taq, una polimerasa de DNA *Micrococcal*, una polimerasa de DNA alfa, una transcriptasa reversa, una transcriptasa reversa AMV, una transcriptasa reversa M-MuLV, una polimerasa de DNA, una polimerasa de RNA, una polimerasa de RNA de *E. coli*, una polimerasa de RNA SP6, una polimerasa de RNA T3, una polimerasa de DNA T4, una polimerasa de RNA T7, una polimerasa de RNA II, una transferasa terminal, una fosforilasa de polinucleótido, un ribonucleótido que incorpora una polimerasa de DNA, y similares.

El término "segmento de secuencia" se refiere a una subsecuencia de polinucleótido de la porción 5' (es decir, cola 5') del polinucleótido de la invención. Las porciones 5' contienen uno, dos o más segmentos de secuencias, cada

segmento de secuencia posee una única base posicionada en el extremo 5' que es la misma para todos los segmentos de secuencias en una cola 5' de un polinucleótido. El segmento de secuencia puede tener entre alrededor de 3 a 10 o más bases de longitud, por ejemplo, alrededor de 3-8, 3-6, 4-6, 4-8 o 7-8 bases de longitud, y una porción 5' puede contener entre 2 y alrededor de 10 o más segmentos de secuencias. Los segmentos de secuencias pueden, pero no necesitan tener la misma masa. Los segmentos de secuencias de la misma masa pueden, pero no necesitan tener la misma secuencia. Los segmentos de secuencias en una cola 5' que comparte una secuencia de ácido nucleico idéntica son repeticiones.

Los términos "extremo 5'" y "extremo 3'" intercambiamente se refieren a una posición de nucleótido sobre un polinucleótido que está en el extremo 5' o 3' (es decir, la base terminal 5' o 3'), o 1 o 2 posiciones de base de nucleótido del extremo (es decir, en la posición (-1) o (-2) desde el extremo 5' o 3') de un ácido nucleico o subsecuencia de la misma.

El término "porción de bloqueo" o "grupo de bloqueo" se refiere a un grupo químico o porción unida al extremo 3' de un polinucleótido que previene la extensión de un ácido nucleico, por ejemplo, en al menos un nucleótido que incorpora un biocatalizador. Ejemplos de porciones de bloqueo incluye sustituyentes en la posición 2' de la base de nucleótido del extremo 3', es decir, un nucleótido terminador 2'.

Un "nucleótido terminador 2'" se refiere a un análogo de nucleótido que comprende un grupo de bloqueo (BG) en la posición 2' de la porción de azúcar del nucleótido. Un nucleótido terminador 2' puede ser no extendible por uno o más nucleótidos que incorporan biocatalizadores. Es decir, una vez un nucleótido terminador 2' se incorpora en un ácido nucleico (por ejemplo, en el extremo 3' terminal del ácido nucleico), el grupo de bloqueo previene la extensión de un ácido nucleico en al menos un nucleótido que incorpora biocatalizador. Un ejemplo de grupo de bloqueo es un grupo fosfato. Ejemplos de nucleótidos terminadores 2' incluye nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-trifosfato y nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-difosfato. Los nucleótidos terminadores 2' se describen en detalle, por ejemplo, en la publicación de patente EE.UU. N° 2007/0219361 y 2007/0154914.

El término "ácido nucleico diana" se refiere a cualquier ácido nucleico que comprende una subsecuencia a detectar. El ácido nucleico diana puede ser DNA o RNA. Un ácido nucleico puede venir de cualquier fuente, que incluye DNA genómico, mRNA, cDNA. El ácido nucleico diana puede aparecer de forma natural o ser sintético (por ejemplo, un amplicón, un vector, etc). Un ácido nucleico diana, puede ser, pero no necesita estar purificado o aislado. Dependiendo de la naturaleza del ensayo de detección, el ácido nucleico diana puede ser de una planta o tejido animal, o se toma de una mezcla de reacción. No existe límite en la longitud del ácido nucleico diana, aunque un ácido nucleico diana puede exponerse a endonucleasas de restricción antes de someterse a la detección o identificación mediante los presentes métodos. Para los propósitos de los presentes métodos, se prepara un ácido nucleico diana utilizando los métodos conocidos en la materia.

El término "condiciones de amplificación" se refiere a las condiciones en una reacción de amplificación (por ejemplo, una amplificación de PCR, una amplificación de RT-PCR) que permite la hibridación de un polinucleótido extendible (por ejemplo, un cebador) con un nucleótido diana, y la extensión dependiente de molde del polinucleótido extendible. Tal como se utiliza aquí, las "condiciones de amplificación" o condiciones suficientes para amplificar un ácido nucleico diana son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, PCR Primer: A Laboratory Manual, por Dieffenbach y Dveksler, eds., 2003, Cold Spring Harbor Press; y PCR Protocols, Bartlett y Stirling, eds., 2003, Humana Press.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra una representación esquemática de los polinucleótidos y métodos de la invención. En esta realización ejemplar, el polinucleótido contiene una porción 5' o cola 5' con 3 segmentos de secuencias idénticos (es decir, "repeticiones") (5'-NTAATAATAAT-3'; Id. de sec. N°:1). El polinucleótido se utiliza para detectar un nucleótido polimórfico en un ácido nucleico diana. El grupo de nucleótidos puede contener entre alrededor de 50% a 100% de un ribonucleótido que es complementario al nucleótido que está en la posición del extremo 5' de cada segmento de secuencia (por ejemplo, rATP = \hat{A}). Los ribonucleótidos se incorporan en una cadena de amplicón que es complementaria con el polinucleótido. El amplicón se somete a fragmentación, liberando el segmento de secuencia. La masa del segmento de secuencia liberado se detecta entonces. Los ribonucleótidos también se incorporarán en la cadena complementaria del ácido nucleico diana (3'-NÁTTÁTTÁTTÁ- 5'; Id. de sec. N°:2). Por lo tanto, las cadenas amplificadas del ácido nucleico diana también se someterán a la escisión en la que se incorporan los ribonucleótidos.

La Figura 2 ilustra el éxito de genotipaje del alelo C en un SNP dentro del gen H 19 utilizando las metodologías descritas aquí y en el Ejemplo 1. "GCTCTA" se refiere a la secuencia complementaria reversa de ácido nucleico del hexámero repetitivo en el cebador de interrogación. "Ruido" indica que no se ha detectado una señal discernible.

La Figura 3 ilustra el éxito de genotipaje del alelo T en un SNP dentro del gen H 19 utilizando las metodologías descritas aquí y en el Ejemplo 1. "GCTCTA" se refiere a la secuencia complementaria reversa de ácido nucleico del hexámero repetitivo en el cebador de interrogación. "Ruido" indica que no se ha detectado una señal discernible.

La Figura 4 ilustra el éxito de genotipaje simultáneo de los alelos C y T en un SNP dentro del gen H 19 utilizando las metodologías descritas aquí y en el Ejemplo 1, más adelante. "Ruido" indica que no se ha detectado una señal discernible.

5 La Figura 5 ilustra el éxito de identificación del transcrito de VIH utilizando 80% o 90% de ribonucleótido (aquí, rATP) y desoxiribonucleótidos dU y dC. No se obtuvo señal de las muestras sin molde. Véase, Ejemplo 2. "CCUA" se refiere a la secuencia complementaria reversa de ácido nucleico del tetrámero repetitivo en el cebador corriente arriba (4 x CCUA = Id. de sec. N°:6). "GUGA" se refiere a la secuencia complementaria reversa de ácido nucleico del tetrámero repetitivo en el cebador corriente abajo (4 x GUGA = Id. de sec. N°:7). "Ruido" indica que no se ha detectado una señal discernible.

10 La Figura 6 ilustra el éxito de identificación del transcrito de VIH utilizando 80% o 90% de ribonucleótido (aquí, rATP) y desoxiribonucleótidos dU y 5-Me-dC (4 x CmeCmeUA = Id. de sec. N°:8; 4 x GUGA = Id. de sec. N°:7). No se obtuvo señal de las muestras sin molde. Véase, Ejemplo 2. "Ruido" indica que no se ha detectado una señal discernible.

15 La Figura 7 resume los resultados de las muestras prueba ilustradas en las Figuras 5 y 6 (4 x CmeCmeUA = Id. de sec. N°:8; 4 x CCUA = Id. de sec. N°:6).

20 La Figura 8A-C ilustra un espectro de masas de la región 7-mero del ATP ribo-PCR del SNP R de NOS1_361. A. Tres fragmentos GTTTCTA (3 x GTTTCTA = Id. de sec. N°:9) que corresponden con un homocigoto A. B. Tres fragmentos GTTTCTA y GTTTTTA (3 x GTTTCTA = Id. de sec. N°:10) que corresponden con un heterocigoto AG. C. Tres fragmentos GTTTTTA que corresponden con un homocigoto G.

25 Descripción detallada

1. Introducción

30 La presente invención proporciona un procedimiento para la detección múltiple que requiere un número mínimo de pasos de reacción y permite un multiplexado conveniente y verdadero. El procedimiento utiliza reacciones que incorporan bases de ribonucleótido (por ejemplo, una reacción de amplificación en que al menos uno de los cuatro nucleótidos (A, C, G, T) está incluido, completamente o parcialmente, como una base ribo (rNTP)). Se utilizan los cebadores específicos con un ácido nucleico diana. Uno o ambos cebadores poseen una cola 5' con uno, dos o más segmentos de secuencias de alrededor de 3 a 10, o más, bases, y con una base complementaria a la base ribo localizada en el extremo 5' de cada segmento de secuencia. El segmento de secuencia puede, pero no necesita ser de la misma masa. La amplificación resulta en la inclusión de las secuencias cebador, incluyendo su porción 5', en un amplicón (es decir, producto de amplificación). El amplicón también contendrá incorporado bases ribo. Para el análisis mediante espectrometría de masas, el producto de amplificaciones se sometió a fragmentación, por ejemplo, mediante exposición a álcali. La base escinde selectivamente la cadena principal de DNA inmediatamente 3' a las bases ribo incorporadas. Así, la incorporación de las secuencias cebador, y el segmento de secuencia, en el producto de amplificación permite la detección de la presencia del producto mediante la detección la distinta masa del segmento de secuencia. La utilización de un cebador traduce la presencia de un producto de la masa del segmento de secuencia copiado y amplificado.

45 Para multiplexar, los cebadores con múltiples ácidos nucleicos diana (por ejemplo, diferentes alelos) se marcan en la cola con diferentes segmentos de secuencias en la porción 5' que generan productos de distinta masa tras la escisión. Todos los DNA neosintéticos contienen incorporados bases ribo y proporciona así fragmentos cuando se someten a álcali. Para facilitar la interpretación, el sistema entero puede calcularse de forma que en general las señales de masa que aparecen en la porción que hibrida del cebador y de otros ácidos nucleicos son diferentes de las masas del segmento de secuencia de la cola 5', o los complementarios de la misma. El segmento de secuencia en una cola única puede ser de la misma masa y puede ser una secuencia idéntica (es decir, repeticiones). La reiteración de segmentos de secuencias repetidos resulta en una señal clara sobre las señales derivadas de las secuencia(s) de porciones de los cebadores que hibridan con una copia de un ácido nucleico diana. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada segmento de secuencia de la porción 5' es de la misma masa es, por lo tanto, una realización preferible de la invención.

60 El procedimiento permite un genotipaje eficiente múltiple para 10 o más muestras en un único pocillo con un número mínimo de pasos de reacción. Los pasos generalmente requieren la mezcla de un molde de DNA y una mezcla maestra. Tras la termociclación, se añade una solución de álcali y la masa del segmento de secuencia fragmentado se mide, por ejemplo, mediante espectrometría de masas. Puede utilizarse cualquier método de medición de masas conocido. Cuando se emplea espectrometría de masas, cualquier tipo de espectrómetro de masas es adecuado para el análisis.

65 Los cebadores pueden opcionalmente contener un agente de bloqueo escindible en el extremo 3' (es decir, "inicio caliente") para permitir que la misma polimerasa de DNA termoestable efectúe el "inicio caliente," mejorando así la

especificidad y permitiendo un mayor grado de multiplexado.

En un ejemplo para realizar los presentes métodos, la PCR ribo puede llevarse a cabo con una muestra de DNA, para cada ácido nucleico diana (por ejemplo, cada SNP, cada alelo), dos cebadores directos y un cebador reverso. Los cebadores directos se diseñan para ser específicos de un ácido nucleico diana (por ejemplo, un SNP, un alelo), con la base del extremo 3' o la penúltima base del extremo 3' específicamente complementaria a una base que identifique el ácido nucleico diana. Cada cebador directo posee una cola 5' específica que comprende uno, dos o más segmentos de secuencias de masa idéntica, en el que la base del extremo 5' de cada segmento de secuencia es complementaria al ribonucleótido (NTP) en la mezcla de amplificación de PCR. Las masas del segmento de secuencia se diseñan para ser diferente y distinguible entre diferentes alelos, SNP, y otros ácidos nucleicos diana detectables.

Para generar un segmento de secuencia de masa distinguible, la cola 5' de un cebador puede contener, por ejemplo, alrededor de 2 a 10 segmentos de secuencias que tienen alrededor de 3-10 bases de longitud; o alrededor de 4-7 segmentos de secuencias de alrededor de 4-6 bases de longitud; o alrededor de 2-3 segmentos de secuencias de alrededor de 7-8 bases de longitud.

La PCR ribo o ribo-amplificación es una PCR o reacción de amplificación con una mezcla de desoxinucleótidos y al menos un nucleótido (ribonucleótido o rNTP). Un ejemplo de esto es una mezcla de PCR que comprende dGTP, el ribonucleótido rTTP (es decir, 5-metil-UTP), dCTP y dATP, y una polimerasa de DNA que incorpora de forma eficiente y extiende ribonucleótidos en un tampón adecuado. La reacción puede llevarse a cabo mediante cualquier reacción de extensión, que incluye reacciones de termociclación. Tras la termociclación, la mezcla de reacción puede tratarse con álcali. El álcali puede ser una base fuerte, por ejemplo, NaOH o KOH. El álcali escinde la cadena principal de DNA inmediatamente 3' a las bases incorporadas y resulta en la generación de fragmentos. La presencia del ácido nucleico diana resulta en la utilización del cebador directo específico para el ácido nucleico diana y así la presencia de la secuencia 5' de la cola amplificada. El complemento copiado y escindido de la cola posee una masa única. Esta masa se utiliza para determinar la presencia de un ácido nucleico diana en la muestra analizada. La presencia de una señal de masa que corresponde con la secuencia complementaria a la cola escindida se utiliza para identificar la presencia del ácido nucleico diana en la muestra analizada. Para el multiplexado, se utiliza un grupo de secuencias de cola diferentes, cada una con una composición de bases que proporciona una masa específica del DNA tras la escisión.

2. Polinucleótidos

Los polinucleótidos de la invención comprenden una porción 5' o cola 5' que comprende uno, dos o más segmentos de secuencias en tándem y una porción 3' diseñada para ser suficientemente complementaria para hibridar con un ácido nucleico diana que permite la extensión basada en un molde de nucleótido.

a. porción 5'

La porción 5' o cola 5' comprende uno, dos o más segmentos de secuencias en tándem (es decir, contiguas), cada segmento de secuencia contiene una base de nucleótido única (es decir, se utiliza una sola vez en el segmento) que se posiciona en el extremo 5' de cada segmento de secuencia. En realizaciones preferibles, cada segmento de secuencia en una porción 5' o cola 5' es de la misma masa. En otras realizaciones preferibles, cada segmento de secuencia en una porción 5' o cola 5' posee una secuencia idéntica, esto es la misma secuencia de nucleótidos. Los segmentos de secuencias en tándem con secuencias de nucleótido idénticas se refieren a repeticiones. La base de nucleótido única puede seguir al último (2º, o 3º, o 4º, etc) segmentos de secuencia en tándem. Por ejemplo, la secuencia de una porción 5' o cola 5' con 3 segmentos de secuencias de masa idéntica, cada 4 nucleótidos de longitud puede ser: 5'-TAGCTAGCTAGCT-3' (Id. de sec. N°:3), en el que la base de nucleótido "T" es complementaria a la base ribo en la mezcla de reacción.

Como en los ejemplos anteriores, en algunas realizaciones, la base de nucleótido del extremo 3' de la porción 5' o cola 5' es complementaria a la base ribo en la mezcla de reacción. Ya que una solución alcalina rompe el enlace inmediatamente 3' de una base ribo incorporada, que incluye el extremo 3' de la porción 5' una base de nucleótido que es complementaria a la base ribo en la mezcla de reacción permite la liberación de todo el segmento de secuencia. Lo que permanece en el extremo 3' del amplicón escindido es una base ribo incorporada con un fosfato 2' o 3'. Véase la Figura 1. Una base de nucleótido que es complementaria a la base ribo en la mezcla de reacción posicionada en el extremo 3' de la porción 5' es necesaria si la porción 5' contiene solo un segmento de secuencia. Una base de nucleótido que es complementaria a la base ribo en la mezcla de reacción posicionada en el extremo 3' de la porción 5' también es necesaria si dos o más segmentos de secuencias son de masa diferente. No obstante, una base de nucleótido que es complementaria a la base ribo en la mezcla de reacción posicionada en el extremo 3' de la porción 5' es opcional si el nucleótido 5' terminal de la porción complementaria a la diana es también la misma base de nucleótido "única" o si la porción 5' contiene dos o más segmentos de secuencias de la misma masa.

En realizaciones preferibles, se incluye una base de nucleótido adicional en el extremo 5' de la porción 5'. La base de nucleótido adicional en el extremo 5' puede ser cualquier base. Un ejemplo de porción 5' con una base de

nucleótido adicional en el extremo 5' puede ser: 5'-NTAGCTAGCTAGCT-3' (Id. de sec. N°:4). Si se incluye una base de nucleótido adicional en el extremo 5' aumenta la uniformidad y exactitud de masa de los fragmentos liberados. Esto es debido a que cuando la solución alcalina escinde el enlace inmediatamente 3' a una base ribo incorporada una porción fosfato 2' o 3' permanece unida a la base ribo. Véase la Figura 1. Una base de nucleótido adicional incluida en el extremo 5' de la porción 5' tiene utilidad cuando se utiliza un nucleótido que incorpora un biocatalizador que no lleva a cabo una extensión independiente de molde.

En otras realizaciones preferibles, el segmento de secuencia en una porción 5' o cola 5' posee una masa idéntica pero diferentes secuencias. Por ejemplo, la secuencia de una porción 5' o cola 5' con 3 segmentos de secuencias de masa idéntica, cada 4 nucleótidos de longitud puede ser: 5'-TAGCTCAGTGCAT-3' (Id. de sec. N°:5), en el que la base de nucleótido "T" es complementaria a la base ribo en la mezcla de reacción.

En otras realizaciones preferibles, el segmento de secuencia en una porción 5' o cola 5' puede ser de diferentes longitudes (por ejemplo, 3, 4 y/o 5 bases de nucleótido) y diferentes masas, pero el total de la porción 5' o cola 5' produce un patrón de "firma" distinguible que puede identificarse, por ejemplo, mediante espectrometría de masas, cuando el amplicón se somete a escisión.

La porción 5' o cola 5' puede contener entre 2 a alrededor de 10 segmentos de secuencias, o más, como se desee, por ejemplo, alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más segmentos de secuencias en tándem. Cada segmento de secuencia puede ser de alrededor de 3 a alrededor de 10 bases de nucleótido de longitud, o más largo, por ejemplo, alrededor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más bases de nucleótido de longitud. En general, cuanto más largo el segmento de secuencia, menor la necesidad de estar contenido en una cola 5'. A la inversa, cuanto más corto el segmento de secuencia, mayor la necesidad de estar contenido en una cola 5'. Por ejemplo, una cola 5' puede comprender alrededor de 2-4 segmentos de secuencias que tienen alrededor de 7-8 bases de nucleótido de longitud, o alrededor de 4-6 segmentos de secuencias que tienen alrededor de 4-6 bases de nucleótido de longitud, o alrededor de 5-8 segmentos de secuencias que tienen alrededor de 3-5 bases de nucleótido de longitud.

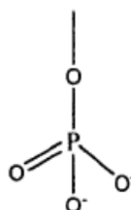
Los polinucleótidos son útiles como cebadores en la extensión de ácido nucleico diana y las reacciones de amplificación. La base de nucleótido única localizada en el extremo 5' de cada segmento de secuencia en la cola 5' es complementaria a la base ribo de nucleótido incluida en una mezcla de reacción para la extensión o amplificación de un ácido nucleico diana hibridado mediante los polinucleótidos de la invención.

b. porción 3'

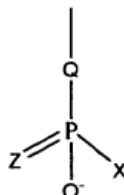
La porción 3' del polinucleótido se diseña para tener una secuencia de ácido nucleico suficientemente complementaria para hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana y extenderse. La porción 3' tiene al menos 5 bases de nucleótido de longitud, y puede ser más larga, como se desee, por ejemplo, alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 bases de nucleótido de longitud. El extremo 3' o (-1) o (-2) a la base de nucleótido del extremo 3' de la porción 3' puede utilizarse para distinguir entre alelos específicos o SNP en un ácido nucleico diana, de acuerdo con los métodos conocidos en la materia. Ejemplos de condiciones de reacción, por ejemplo, para la extensión de cebadores o termociclación incluye alrededor de Tricina-KOH 50 mM, pH 7.5, KOAc 100 mM, Mg(OAc)₂ 3.0 mM y 200 μM de cada dNTP; las temperaturas de hibridación pueden estar entre alrededor de 50°C y 70°C, por ejemplo entre alrededor de 60-65°C.

En realizaciones preferibles, el extremo 3' de la porción 3' opcionalmente posee un grupo de bloqueo o una porción de bloqueo que reversiblemente previene la extensión del polinucleótido. Ejemplos de porciones de bloqueo reversibles incluyen los sustituyentes unidos a la posición 2' del extremo 3' del nucleótido (es decir, terminadores 2'). En realizaciones especialmente preferibles, la porción terminadora 2' es un fosfato o análogo de fosfato, por ejemplo, un metil amino fosfato.

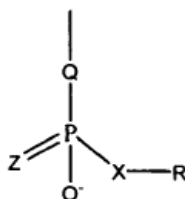
En general, los grupos de bloqueo (BG) utilizados en la posición 2' de la porción de azúcar pueden incluir varias realizaciones. Es preferible, por ejemplo, que el BG sea un grupo cargado negativamente y/o un grupo de relleno. Para ilustrar mejor, el BG se selecciona opcionalmente de, por ejemplo, CN, NO₂, N₃, un grupo halo, un grupo éter, un grupo aldehído, un grupo de ácido carboxílico, un grupo éster, un grupo amino, OCH₃, OCH₂COOH, un grupo O-sililéter, un grupo ceto, un grupo O-lactona, un grupo O-alquilo, un grupo alquilo O-cíclico, un grupo O-alqueno, un grupo O-alquino, un grupo carbamato, un grupo imida, un grupo amida, y combinaciones de los mismos. Más específicamente, BG comprende opcionalmente la fórmula (I):



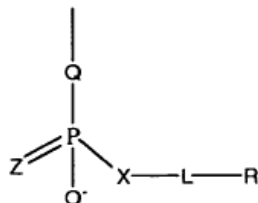
En otras realizaciones preferibles, BG comprende la fórmula (II):



5 en la que Q es O, S, o NH; X es H, OH, CH₃, BH₃, F, o SeH; y Z es O, S, o Se. Para ilustrar mejor, BG opcionalmente comprende la fórmula (III):



10 en la que Q es O, S, o NH; X es O, S, o NH; Z es O, S, o Se; y R es un grupo alquilo, un grupo alquenilo, o un grupo alquinilo. En otra realización ejemplar preferible, BG comprende la fórmula (IV):



15 en la que Q es O, S, o NH; X es O, S, o NH; Z es O, S, o Se; L es --CONH(CH₂)_nNH--, --CO(CH₂)_nNH-, o --CONH(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂NH--; n es un número entero mayor de 0; y R es NH₂, SH, COOH, una porción apantalladora, una porción marcadora, biotina, o una porción de afinidad.

Ejemplos de nucleótidos terminadores 2' que tienen utilidad incluye nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-trifosfato y nucleósidos 2'-monofosfato-3'-hidroxil-5'-difosfato. Las porciones terminadoras reversibles 2' se describen en detalle, por ejemplo en la Publicación de Patente EE.UU. Nº 2007/0219361 y 2007/0154914.

20 Los polinucleótidos a utilizar de acuerdo con la invención pueden opcionalmente contener enlaces de cadena principal de nucleótidos que no aparecen de forma natural, bases de nucleótido y análogos de bases de nucleótido, tal como se describe aquí. Los polinucleótidos pueden ser de cadena única o de doble cadena. En realizaciones preferibles, los polinucleótidos son de cadena única en toda su longitud. Los polinucleótidos pueden contener, pero a veces no, cualquier marcaje, por ejemplo, fluoróforos unidos, radioisótopos, enzimas u otros identificadores. Los polinucleótidos pueden aislarse, sintetizarse o ser recombinantes. Los polinucleótidos, incluso las porciones 5' y 3', pueden ser de cualquier longitud y son generalmente de alrededor de 200 nucleótidos o menos, por ejemplo, alrededor de 150, 125, 100, 75, 50 o 25, o menos nucleótidos de longitud.

30 3. Métodos de Detección

a. Poner en contacto un ácido nucleico diana con un polinucleótido de la invención

35 El primer paso en la realización de los métodos de detección implica poner en contacto un ácido nucleico diana con un polinucleótido de la invención, un grupo de nucleótidos, y un nucleótido que incorpora un componente biocatalítico.

i. Grupo de nucleótidos

40 El grupo de nucleótidos utilizado en los presentes métodos contienen al menos una base en forma de una base de ribonucleótido (por ejemplo, A, U, G o C u otro ribonucleótido, rNTP). En algunas realizaciones, el grupo de nucleótidos contiene al menos dos bases en forma de una base de ribonucleótido. Las bases incluidas como base de ribonucleótido pueden incluirse en su totalidad (por ejemplo, 100% ribonucleótido) o parcialmente (por ejemplo,

menos del 100% de ribonucleótido, por ejemplo, cuando el resto de la base es un desoxinucleótido o dNTP) como una base de ribonucleótido en el grupo de nucleótidos. En realizaciones preferibles, las bases de nucleótido están presentes en una porción mayoritaria, es decir, más del 50%, por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, como un ribonucleótido (rNTP) y en una porción minoritaria (es decir, menos del 50%) como un desoxiribonucleótido (dNTP). En realizaciones especialmente preferibles, al menos un 80% de al menos una base de nucleótido está en forma de un ribonucleótido. Uno o más ribonucleótidos están incluidos con los desoxiribonucleótidos para completar una serie completa de nucleótidos (están presentes los nucleótidos A, T, C y G).

ii. Componente biocatalítico

El nucleótido que incorpora componentes biocatalíticos utilizados en los presentes métodos comprenden ambos desoxiribonucleótidos y ribonucleótidos que incorporan actividades. En realizaciones preferibles, el mismo dominio catalítico puede catalizar ambos desoxiribonucleótidos y ribonucleótidos que incorporan actividades. En otras realizaciones preferibles, los componentes biocatalíticos comprenden al menos dos dominios catalíticos, uno que posee un desoxiribonucleótido que incorpora actividad, el otro que posee un ribonucleótido que incorpora actividad.

Ejemplos de componentes biocatalíticos adecuados para utilizar en los presentes métodos incluye, sin limitación, polimerasas que están modificadas polimerasas Z05, CS5, CS6 o polimerasas Taq. Las polimerasas quiméricas CS5 y CS6 se describen en, por ejemplo, Solicitud de Publicación de Patente EE.UU. N° 2004/0005599. Las especies de *Thermus* Z05 se han publicado en Publicación de Patente Internacional PCT N° WO 92/06200. Ejemplo de enzimas modificadas incluye, por ejemplo, una polimerasa de DNA G46E E678G CS5, una polimerasa de DNA G46E L329A E678G CS5, una polimerasa de DNA G46E L329A D640G S671F E678G CS5, una polimerasa de DNA G46E L329A T606S D640G S671F E678G CS5, una polimerasa de DNA G46E E678G CS6, una polimerasa de DNA E615G Taq, y similares. Estas enzimas modificadas comprenden mutaciones que permiten la incorporación de ribonucleótidos, y permiten la incorporación de análogos de ribonucleótidos modificados en 2', y/o que reducen o eliminan la actividad exonucleasa 5'-3', por ejemplo, en relación con una enzima que carece de una o más de estas mutaciones.

Se proporcionan también detalles adicionales relacionados con nucleótidos útiles que incorporan biocatalizadores en, por ejemplo, Solicitud de Patente EE.UU. N° 11/873,896 y Patentes EE.UU. N° 5.939.292; 4.889.818; 5.374.553; 5.420.029; 5.455.170; 5.466.591; 5.618.711; 5.624.833; 5.674.738; 5.789.224; 5.795.762; 7.148.049 y 7.179.590.

La producción de enzimas modificadas con, por ejemplo, aumento de la eficiencia para incorporar ribonucleótidos y nucleótidos terminadores 2' u otras propiedades deseadas pueden lograrse mediante varios procesos que incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, modificación química, etc. Más específicamente, la mutagénesis dirigida al sitio se logra generalmente mediante mutagénesis dirigida al cebador específico del sitio. Esta técnica puede llevarse a cabo utilizando un cebador de oligonucleótido sintético complementario a un fago de DNA de cadena sencilla a mutageneizar excepto para un desemparejamiento limitado que representa la mutación deseada. Brevemente, el oligonucleótido sintético se utiliza como cebador para la síntesis directa de una cadena complementaria al plásmido o fago, y el DNA de doble cadena resultante se transforma en una bacteria huésped que soporte a fagos. La bacteria resultante puede analizarse mediante, por ejemplo, análisis de secuencia de DNA o hibridación de sondas para identificar aquellas placas portadoras de la secuencia génica mutada deseada. Para ilustrar mejor, también pueden utilizarse muchas otras aproximaciones para modificar ácido nucleicos, como métodos de "PCR recombinante".

En la práctica de los aspectos de la presente invención (por ejemplo, producir enzimas modificadas, realizar reacciones de secuenciación, etc.), se utilizan opcionalmente muchas técnicas convencionales en biología molecular y DNA recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1997-2007 (F. M. Ausubel ed.), Wiley Interscience; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Annual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology* volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II, 1985 (D. N. Glover ed.); *Oligonucleotide Synthesis*, 1984 (M. L. Gait ed.); *Nucleic Acid Hybridization*, 1985, (Hames y Higgins); *Transcription and Translation*, 1984 (Hames y Higgins eds.); *Animal Cell Culture*, 1986 (R. I. Freshney ed.); *Immobilized Cells and Enzymes*, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, *A Practical Guide to Molecular Cloning*; las series, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, 1987 (J. H. Miller y M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in Enzymology* Vol. 154 y Vol. 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds., respectivamente).

iii. Polinucleótidos

Los polinucleótidos de cola en 5' utilizados en los métodos tal como se ha descrito anteriormente y en este documento. En realizaciones preferibles, un ácido nucleico diana se pone en contacto con un grupo (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos de cola en 5'. En otras realizaciones preferibles, cada polinucleótido en un grupo es identificable de forma separada por tener una porción 5' que comprende uno, dos o más segmentos de secuencias de masa única. En este caso, al fragmentar el amplicón o los complementos de cada polinucleótido de cola en 5' produce una señal de masa diferente o firma de perfil de masa. En otras realizaciones preferibles, los polinucleótidos

se ponen en contacto con un ácido nucleico diana como uno o más pares de cebadores. Uno o ambos polinucleótidos en una pareja de cebadores puede incluir una cola 5' que comprende segmentos de secuencias en tándem. Múltiples polinucleótidos en contacto con el ácido nucleico diana como uno o más pares de cebadores pueden también proporcionarse en el que cada cebador en la pareja comprende una porción 5' que comprende segmentos de secuencias en tándem de masa idéntica. En este caso, la fragmentación de los complementos de las porciones 5' de cada cebador en la pareja que se utiliza para generar un amplicón produce una intensidad de señal de masa única o mayor (por ejemplo, alrededor del doble). Alternativamente, cada cebador en una pareja de cebadores puede contener un segmento de secuencia, siendo el segmento de secuencia en cada cebador de la pareja de masa idéntica.

En realizaciones preferibles de los métodos, los polinucleótidos de cola en 5' pueden comprender un segmento de secuencia de masa distinta para producir un producto de escisión detectable.

iv. Ácido nucleico diana

Un ácido nucleico diana puede ser de cualquier fuente, por ejemplo, una muestra de tejido de un animal, una planta, una bacteria o un virus, o puede ser sintética, por ejemplo, a partir de una mezcla de reacción. El ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, DNA genómico, un cromosoma o segmento cromosómico, mRNA, cDNA, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un DNA desnudo o polímero de RNA, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda, un cebador, etc. Un ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, de cadena sencilla, de doble cadena, de triple cadena, etc y no se limita a ninguna longitud particular. Los ácidos nucleicos diana utilizados en los presentes métodos a menudo contendrá uno o más polimorfismos de nucleótido únicos (SNP), inserciones, deleciones, sustituciones u otras características distinguibles. Los ácidos nucleicos diana se proporcionan en general en una muestra.

En realizaciones preferibles, el ácido nucleico diana se pone en contacto (es decir, los métodos se realizan) con el propósito de distinguir uno o más SNP. En dicha aplicación, al menos dos polinucleótidos de cola en 5' distintivos de alelo diferentes se utilizan para diferenciar en su porción 3' de forma que hibridan específicamente con un alelo particular, y también difieren en su porción 5' de forma que uno o más segmentos de secuencias son de una masa que corresponde a y únicamente identifica la unión de alelo en la porción 3'.

En otras realizaciones preferibles, el ácido nucleico diana se pone en contacto con el propósito de detectar una o más mutaciones raras en el ácido nucleico diana. En dicha solicitud, están presentes uno o más polinucleótidos con una porción 3' que hibrida específicamente con una mutación en una posición particular en el ácido nucleico diana (un polinucleótido con una porción 3' que hibrida específicamente con el tipo salvaje en la misma posición puede opcionalmente estar presente en la misma reacción o en una reacción a parte). Cuando se está analizando una mutación en la secuencia de ácido nucleico diana, uno, dos o más polinucleótidos de cola en 5' distintivos de mutación diferentes pueden utilizarse que difieren en su porción 3' de forma que hibridan específicamente con el tipo salvaje o con una o más tipos de mutación, y también difieren en su porción 5' de forma que uno o más segmentos de secuencias son de una masa que corresponde con y solamente identifica el alelo unido por la porción 3'. En aplicaciones en las que se analizan dos o más mutaciones en un ácido nucleico diana, los polinucleótidos con porciones 3' que específicamente detectan una mutación en la primera posición del ácido nucleico diana pueden tener segmentos de secuencias en la porción 5' de una primera masa; los polinucleótidos con porciones 3' que específicamente detectan una mutación en una segunda posición en el ácido nucleico diana pueden tener segmentos de secuencias en la porción 5' de una segunda masa. Alternativamente, las masas del segmento de secuencia en las porciones 5' de los polinucleótidos puede cada una ser diferente, operando como identificadores únicos.

En otras realizaciones preferibles, por ejemplo, aquellas que involucran amplificaciones o extensiones múltiples, se proporcionan polinucleótidos como dos o más parejas de cebadores. En la primera pareja de cebadores, la porción 5' de cada cebador en la pareja contiene segmentos de secuencias de una primera masa; la segunda pareja de cebadores posee porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una segunda masa, detectablemente distinta de la primera masa; la tercera pareja de cebadores posee porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una tercera masa, detectablemente distinta de la masa del primer y segundo segmentos de secuencias; las posteriores parejas de cebadores poseen porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una masa detectablemente distinta de todas las anteriores u otras parejas de cebadores. El número de parejas de cebadores y reacciones de amplificación o extensión está limitado por la disponibilidad de las bases de nucleótido libres en la mezcla de reacción. En algunas realizaciones preferibles, una mezcla de reacción pueden contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más parejas de cebadores. Esta estrategia permite la detección simultánea de múltiples ácidos nucleicos diana o múltiples dianas en un ácido nucleico diana único.

b. Amplificar el ácido nucleico diana para producir un amplicón

i. Métodos de amplificación

El ácido nucleico diana puede amplificarse utilizando dos o más polinucleótidos de la invención utilizando cualquier método de extensión o amplificación de polinucleótidos conocido en la materia. La amplificación que utiliza cualquier variación conocida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que incluye RT-PCR, PCR cuantitativa, PCR múltiple y a tiempo real, encuentra su uso en los presentes métodos. La amplificación también incluye los métodos de amplificación isotérmicos y los métodos de extensión de polinucleótidos conocidos en la materia. Los protocolos para llevar a cabo la PCR son bien conocidos en la materia, y se describen, por ejemplo, en PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach y Dveksler, eds., 2003, Cold Spring Harbor Laboratory Press; A-Z of Quantitative PCR, Bustin, ed., 2004, International University Line; Edwards, Real-Time PCR: An Essential Guide, 2004, Taylor & Francis; Real Time PCR, Dorak, ed., 2006, Taylor & Francis; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, et al., eds., 1990, Academic Press, San Diego; PCR Strategies, Innis, et al., eds, 1995, Academic Press, San Diego; y PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Innis, et al., eds., 1999, Academic Press, San Diego. El ácido nucleico diana se amplifica o extiende durante la cantidad de tiempo suficiente, o durante un número de ciclos suficiente para producir una cantidad detectable de amplicón.

Tal como se ha descrito anteriormente, uno o más ácidos nucleicos diana pueden amplificarse o una o más posiciones diana en un ácido nucleico diana único puede amplificarse. Ya que no existe esencialmente un límite sobre el número de diferentes porciones 5' con un segmento de secuencia de una masa distinguible, los métodos son particularmente adecuados a los ensayos de amplificación múltiple. Uno o más polinucleótidos utilizados para amplificar un ácido nucleico diana o una localización específica en un ácido nucleico diana puede tener diferentes porciones 5' con segmentos de secuencias de una masa identificable única. Los pares de polinucleótidos utilizados como parejas de cebadores pueden tener porciones 5' con segmentos de secuencias de masa idéntica. En realizaciones particulares, los segmentos de secuencias comparten secuencias idénticas. Los ensayos de amplificación múltiple pueden determinar simultáneamente la presencia (o ausencia) de al menos 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más ácidos nucleicos o posiciones diana diferentes dentro de un ácido nucleico diana, como se desee.

Las reacciones de amplificación y extensión de polinucleótidos de la presente invención emplean una unidad biocatalítica (por ejemplo, polimerasa) que comprende una actividad enzimática para incorporar ribonucleótidos en la cadena de ácido nucleico a extender (por ejemplo, "ribo-PCR," o "ribo-amplificación," o "ribo-extensión"). Ejemplos de unidades biocatalíticas con ribonucleótidos que incorporan actividades incluye la polimerasa de DNA G46E CS6R y la polimerasa de DNA KB17, disponibles de Roche Molecular Systems, y descritas en, por ejemplo, Mauger, et al., Nucleic Acids Research (2007) 35(8):e62 y Mauger, et al., Nucleic Acids Research (2006) 34(3):e18. Componentes biocatalíticos adicionales que encuentran uso se han descrito anteriormente y en este documento. Véase también, Patente EE.UU. N° 5.939.292.

ii. Amplicón producido

Amplificar la secuencia del ácido nucleico diana proporcionará amplicones de doble cadena, en el que la cadena del amplicón complementaria a la porción 5' del polinucleótido comprenderá una porción 3' que contiene uno o más segmentos de secuencias, en el que la base de nucleótido del extremo 3' del segmento de secuencia contiene un ribonucleósido monofosfato incorporado (rNMP).

c. Escindir el amplicón

El segmento de secuencia de los amplicones puede escindirse utilizando cualquier método conocido en la materia. En realizaciones preferibles de acuerdo con la presente invención, los amplicones se escinden en el enlace 3' en un NMP incorporado sometiendo al amplicón a un alcalino (es decir, solución básica). Los amplicones se exponen preferiblemente a la solución alcalina para escindir, especialmente durante un periodo de tiempo y suficiente temperatura para efectuar la escisión de los enlaces 3' a un NMP incorporado. En general, cuanto mayor la temperatura, más corto el periodo de tiempo necesario para el tratamiento alcalino. Por ejemplo, el paso de escisión o fragmentación puede llevarse a cabo durante alrededor de 1,5 horas a 70°C o durante alrededor de 8 horas (es decir, durante la noche) a alrededor de 55°C. Las temperaturas de tratamiento alcalino pueden ser tan bajas como temperaturas de refrigeración (por ejemplo, 4°C) y tan altas como cerca de la temperatura de ebullición (por ejemplo, alrededor de 95°C). En realizaciones preferibles, la solución alcalina puede ser cualquier solución con un pH superior a alrededor de 8,5, por ejemplo, con un pH de al menos alrededor de 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0 o superior. En algunas realizaciones, la solución alcalina contendrá al menos alrededor de 0,2M, 0,3M, 0,5M, 0,8M, 1,0M o más de un compuesto básico.

La solución alcalina contendrá en general al menos una base fuerte. En algunas realizaciones, una base débil puede utilizarse, por ejemplo, si se contiene en la solución alcalina a una concentración superior. Generalmente, las soluciones alcalinas contendrán al menos un compuesto básico con un pK_b de alrededor de 5,0 o menos, por ejemplo un pK_b de alrededor de 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, 0,5 o menos. Ejemplos de compuestos básicos para utilizar en la fragmentación de los amplicones en los enlaces 3' a un NMP incorporado incluye, por ejemplo, NaOH, KOH, RbOH y NH₄OH, preferiblemente NaOH, KOH o NH₄OH. También son útiles otras bases o compuestos básicos. Véase, por ejemplo, Mauger, et al., Nucleic Acids Research (2007) 35(8):e62 y Mauger, et al., Nucleic Acids Research (2007) 34(3):e18 para el procedimiento de tratamiento alcalino.

d. Detectar los fragmentos de amplicón

5 Los fragmentos de amplicón o los segmentos de secuencias escindidos y liberados pueden detectarse utilizando cualquier método conocido en la materia. En realizaciones preferibles, los fragmentos escindidos se detectan mediante identificación de la masa. El segmento de secuencia puede también marcarse de forma detectable antes o después de la escisión, por ejemplo, con un fluoróforo o un radioisótopo. Los fragmentos pueden marcarse en los extremos 5' o 3', o sobre cualquier base de nucleótido a lo largo. Ejemplos de métodos de detección incluye, sin limitación, espectrometría de masas, separación electroforética, detección de fluorescencia resuelta en el tiempo, 10 detección de resonancia de espín e hibridación en fase sólida (por ejemplo, una matriz) con detección posterior.

15 En realizaciones preferibles, el segmento de secuencia escindido liberado del amplicón se detecta utilizando espectrometría de masas. Los métodos de espectrometría de masas son conocidos en la materia. Cualquier técnica de espectrometría de masas será de utilidad, incluyendo por ejemplo, espectrometría de masas con ionización/desorción por láser (por ejemplo, espectrometría de masas asistida por matriz con ionización/desorción por láser (MALDI) y espectrometría de masas aumentada en superficie con ionización/desorción por láser SELDI), espectrometría iónica de fase gaseosa, espectrometría de masas con cromatografía gaseosa, espectrometría de masas en tándem, y otras técnicas de espectrometría de masas. Los métodos de espectrometría de masas son bien conocidos en la materia, y se describen por ejemplo, en Gross, Mass Spectrometry: A Textbook, 2006, Springer Verlag; y Dass, Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry, 2007, Wiley Interscience.

25 Los fragmentos de amplicón que se detectan pueden ser segmentos de secuencias escindidos del amplicón que son complementarios a o amplificados a partir de la porción 5' del polinucleótido. Por supuesto, se apreciará que los segmentos de secuencias escindibles pueden crearse a lo largo de la longitud del amplicón. Bajo condiciones alcalinas, los enlaces inmediatamente en 3' a los que los ribonucleótidos se han incorporado se someten a escisión. En realizaciones preferibles, los fragmentos de amplicón pueden detectarse a partir del ácido nucleico diana amplificado (por ejemplo, a partir de los segmentos de secuencias complementarias a la porción 3' del polinucleótido). Como se desee, los segmentos de secuencias escindidos de la porción 5' y/o la porción 3' del polinucleótido, o los complementos de los mismos, puede detectarse. Las señales de los fragmentos de amplicón detectados producen una firma de picos indicativos del ácido nucleico diana a identificar.

4. Mezclas de reacción

35 También se describen las mezclas de reacción involucradas en los métodos de la invención. Cualquier mezcla de reacción como la descrita anteriormente puede generarse. Un ejemplo de mezcla de reacción comprende, por ejemplo, uno o más polinucleótidos de la invención que comprende una porción 5' o cola 5' que comprende uno, dos o más segmentos de secuencias en tándem y una porción 3' diseñada para ser suficientemente complementaria para hibridar con un ácido nucleico diana; un grupo de nucleótidos que comprende dNTP y en el que la mayoría de al menos una base es un ribonucleótido; y a un componente biocatalítico que posee un ribonucleótido que incorpora actividad. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden uno o más secuencias de ácidos nucleicos diana. Las mezclas de reacción de la invención pueden también comprender amplicones producidos por los presentes métodos, el amplicón que comprende una porción 3' que posee segmentos de secuencias complementarias a la porción 5' del polinucleótidos de la invención, en el que la base de nucleótido del extremo 3' de cada segmento de secuencia es un nucleósido monofosfato (NMP). La mezcla de reacción de la invención 40 preferiblemente comprende un amplicón que comprende una posición 5' idéntica al polinucleótido. Un grupo de polinucleótidos en las mezclas de reacción puede proporcionar parejas de polinucleótido, por ejemplo, como parejas de cebadores, en el que cada polinucleótido en cada pareja de polinucleótido preferiblemente comprende en la posición 5' segmentos de secuencias de la misma masa. Las realizaciones de los componentes en las mezclas de reacción son como se ha descrito anteriormente y en este documento.

50 En realizaciones preferibles, las mezclas de reacción comprenden dos o más parejas de cebadores. En la primera pareja de cebadores, la porción 5' de cada cebador en la pareja contiene segmentos de secuencias de una primera masa; la segunda pareja de cebadores posee porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una segunda masa, detectablemente distinta de la primera masa; la tercera pareja de cebadores posee porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una tercera masa, detectablemente distinta de la masa del primer y segundo segmentos de secuencias; las posteriores parejas de cebadores poseen porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una masa detectablemente distinta de todas las precedentes o otras parejas de cebadores. En realizaciones preferibles particulares, una mezcla de reacción puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más parejas de cebadores.

60 En otras realizaciones preferibles, las mezclas de reacción comprenden grupos de nucleótidos que comprenden bases de nucleótido o bases de nucleótido marcadas no convencionales o que no aparecen en la naturaleza, por ejemplo, con un fluoróforo o un radioisótopo. Las mezclas de reacción pueden también contener componentes tamponadores y sales, como sea necesario. En otras realizaciones preferibles, las mezclas de reacción comprenden un componente alcalino, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, NaOH o KOH. De acuerdo con los métodos descritos aquí, las mezclas de reacción que contienen una alta concentración de un componente alcalino 65

(por ejemplo, alrededor de 0,1 M – 0,2 M, o superior) normalmente ya se han sometido a amplificación.

Es también preferible que las mezclas de reacción comprendan amplicones producidos por los presentes métodos y un componente alcalino, tal como se describe aquí.

5

5. Equipos

La presente invención también está relacionada con equipos para utilizar en los métodos de la invención. Normalmente, el equipo está compartimentalizado para facilitar el uso y contiene contenedores que proporcionan componentes para realizar el presente método, por ejemplo, uno o más polinucleótidos de la invención que comprenden una porción 5' o cola 5' que comprende uno, dos o más segmentos de secuencias en tándem y una porción 3' diseñada para ser suficientemente complementaria para hibridar con un ácido nucleico diana; un grupo de nucleótidos que comprende dNTP y en el que la mayoría de al menos una base es un ribonucleótido; y a un componente biocatalítico que posee un ribonucleótido que incorpora actividad. En realizaciones preferibles, los equipos comprenden una o más secuencias de ácidos nucleico diana, que incluye secuencias de ácido nucleico control (para controles positivos y/o negativos). Los equipos pueden proporcionar reactivos para realizar una reacción de control separada, que incluye polinucleótidos de control y secuencias de ácido nucleico diana control. Un grupo de polinucleótidos en los equipos puede proporcionarse en parejas de polinucleótido, por ejemplo, como parejas de cebadores. Las realizaciones de los componentes en los equipos son como se ha descrito anteriormente y en este documento.

10

15

20

25

30

En realizaciones preferibles, los equipos comprenden dos o más parejas de cebadores. En la primera pareja de cebadores, la porción 5' de cada cebador en la pareja contiene segmentos de secuencias de una primera masa; la segunda pareja de cebadores posee porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una segunda masa, detectablemente distinta de la primera masa; la tercera pareja de cebadores posee porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una tercera masa, detectablemente distinta de la masa del primer y segundo segmentos de secuencias; las posteriores parejas de cebadores poseen porciones 5' de cada cebador en la pareja que contiene segmentos de secuencias de una masa detectablemente distinta de todas las precedentes u otras parejas de cebadores. En realizaciones particulares preferibles, un equipo puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más parejas de cebadores.

35

40

Pueden también incluirse uno o más contenedores adicionales que proporcionan reactivos adicionales. Dichos contenedores adicionales pueden incluir cualquier reactivo u otros elementos reconocidos por los expertos en la materia para utilizar en la extensión de cebadores o procedimientos de amplificación de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, que incluye reactivos para utilizar en, por ejemplo, procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR, RT-PCR), procedimientos de secuenciación de DNA, o procedimientos de marcaje de DNA. En otras, variaciones no mutuamente exclusivas, el equipo incluye uno o más contenedores que proporcionan nucleótidos libres (convencionales y/o no convencionales). En realizaciones específicas, el equipo incluye dNTP alfa-fosforotioato, dUTP, dITP, y/o dNTP marcados como, por ejemplo, dNTP de la familia de tinciones de fluoresceína o cianina. En aún otra, realización no mutuamente exclusiva, el equipo incluye uno o más contenedores que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de extensión de cebadores. En realizaciones preferibles, los equipos comprenden un componente alcalino, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, NaOH o KOH.

45

6. Amplicones

50

Los amplicones producidos por los presentes métodos también se describen. Los amplicones de PCR, por ejemplo, son normalmente de doble cadena y comprenden una cadena que es complementaria a los polinucleótidos de la invención. Los amplicones comprenden un segmento de secuencia 3' complementaria a la porción 5' de los polinucleótidos de la invención, en el que el segmento de secuencia 3' del amplicón comprende al menos 1, 2 o más segmentos de secuencias, en el que la base de nucleótido del extremo 3' de los segmentos de secuencias es un nucleósido monofosfato (NMP) que posee la misma base que el NTP en el grupo de nucleótidos utilizados para producir el amplicón.

55

7. Sistemas

60

65

La invención además está relacionada con sistemas para automatizar los presentes métodos. Los sistemas comprenden al menos un contenedor o soporte que comprende una composición que comprende un polinucleótido o un amplicón o una mezcla de reacción de la invención; un modulador térmico configurado para comunicarse térmicamente a una o varias temperaturas con la composición que comprende el polinucleótido o amplicón (por ejemplo, una máquina termocicladora de ácido nucleico; un incubador); al menos un mecanismo de transferencia de reactivos que transfiere reactivos a o desde el contenedor o soporte; y al menos un detector configurado para detectar masa (por ejemplo, un espectrómetro de masas, un fluorómetro) del segmento de secuencia fragmentado. En realizaciones preferibles, los sistemas comprenden al menos un controlador en comunicación operativa con al menos uno de los moduladores térmicos, el mecanismo de transferencia de reactivos y el detector configurado para detectar la masa.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención sin limitación.

Ejemplo 1 - Flag-Tag para genotipaje de SNP de alto rendimiento

El amplicón que contiene un SNP en el gen humano H19 se preparó para análisis. La secuencia diana fue gtaggagtgtaggtaggyGCCAGGCATCGTGCagacagggcgacatcagc (Id. de sec. N°: 11) (las letras en minúscula indican secuencias que hibridan con los cebadores, "y" indica la posición de SNP, C o T). La PCR se realizó en un volumen total de 20 µl, con 2 µl de muestras de DNA genómica diluidos a 10 ng/µl. Las amplificaciones de PCR contenían los siguientes componentes: Tricina 50 mM pH 7,5, KOAc 100 mM, Mg(OAc)₂ 2.75 mM, y Tampón de almacenaje al 1,6%, que a su vez contenía el 50% v/v de glicerol, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, Tris 20 mM pH 8,0, DTT 1 mM, y Tween 20 al 0,5%. También se incluye en la PCR 0,2 mM de cada 5-metil-dCTP y dGTP, 0,4 mM de dUTP, 0,18 mM de rATP, 0,02 mM de dATP, y 0,1 mM de pirofosfato. La mezcla de base de nucleótidos contenía 90% de rATP y dATP al 10%. Las enzimas utilizadas en las amplificaciones de PCR fueron Uracilo-DNA glucosilasa 0,02 U/µl (UNG) y polimerasa de DNA GLTDSE 20 nM. Véase, por ejemplo, la Publicación de PCT N° WO 2008/046612 y WO 2009/010251. Las reservas de enzima de alta concentración (8 U/µl y 5 µM, respectivamente) se utilizaron para minimizar el arrastre de glicerol y Tween. Los cebadores se añadieron 0,2 µM de cada. Un cebador en común con todas las reacciones poseen la secuencia 5'-GCTGATGTCGCCCTGTC-2'-PO₄-U-3' (Id. de sec. N°:12). El cebador de interrogación de SNP fue de 5'-CCTAAGACTAAGACTAAGACTCGTGAGGAGTGTGGAGTAGG-2'-PO₄-C-3' (Id. de sec. N°:13) para detectar el alelo H19C (véase, la Figura 2) o - 5'-CCTAGAGCTAGAGCTAGAGCTCGTGAGGAGTGTGGAGTAGG-2'-PO₄-U-3' (Id. de sec. N°: 14) para detectar el alelo H19T (véase, Figura 3), o una mezcla 50/50 de los dos. La porción del cebador corresponde con la secuencia diana subrayada. Estos cebadores incluyen en sus extremos 5' diferentes hexámeros repetitivos flanqueados por residuos T: (3 x TAAGAC = Id. de sec. N°: 15) en el cebador para detectar el alelo H19C o (3 x TAGAGC = Id. de sec. N°: 16) en el cebador para detectar el alelo H19T (un hexámero único está en negrita en la secuencia de cebador). Los hexámeros repetitivos no son complementarios con las dianas genómicas pero, cuando se incorpora en el amplicón, resulta en la liberación de un hexámero "flagtag" tras la digestión de la base.

Las condiciones de termociclado fueron de: 50°C durante 10 minutos (esterilización UNG); 95°C durante 1 minuto (desnaturalización UNG); después 99 ciclos entre 92°C durante 15 segundos (desnaturalización) y 60 °C durante 2 minutos (hibridación/extensión). Esto fue seguido por un mantenimiento de 5 minutos a 60°C. El termociclado se llevó a cabo en un ABI 9800.

Seis muestras de DNA genómicas diferentes se analizaron frente a las tres parejas de cebadores, por duplicado. Además, se utilizaron 4 controles "sin molde" para cada pareja de cebadores.

Tras el termociclado, se juntaron las reacciones replicadas. Se añadió una base y los amplicones se trataron con calor. Para poder desalinizar la muestra, se añadió un agente quelante y las soluciones se centrifugaron. Se aplicó sobrenadante a la matriz y se analizó en el espectrómetro de masas. Mediante el análisis de los datos y observando la aparición de las marcas de las secuencias, se determinó el genotipo de cada una de las 6 muestras en la posición de SNP. Los resultados se describen en las Figuras 2, 3 y 4.

Ejemplo 2 - Flag-Tag para cribaje de agentes infecciosos de alto rendimiento

La aplicación de la tecnología flag-tag al cribaje de agentes infecciosos se analizó utilizando transcritos de RNA que codifican una secuencia derivada de VIH. El transcrito de estos experimentos se generó mediante el clonaje de la región gag de la cepa HXB2 del virus VIH en un vector de expresión. Tras linearizar, el transcrito se construyó utilizando la polimerasa de RNA de T7. El transcrito se purificó entonces sobre una columna poli-dT. La secuencia diana fue catgcaggcattgacaccaGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGgaagtgcacatgacaggaactactagtagcccttcagga (Id. de sec. N°: 17) (las secuencias del cebador están en minúscula).

La RT-PCR utilizando este transcrito se realizó por duplicado, con un volumen total de 50 µl por reacción. Las reacciones se realizaron con y sin 10⁶ copias de transcrito por reacción. Las reacciones contenían los siguientes componentes: Tricina 100 mM pH 7,3, KOAc 120 mM, Mn(OAc)₂ 1 mM, dGTP 0,2 mM, dUTP 0,4 mM, una mezcla de rATP y dATP de forma que el total fue de 0,2 mM con un 80% o 90% de rATP, ya sea dCTP 0,2 mM o 5-metil-dCTP 0,2 mM, y pirofosfato 0,15 mM. Las enzimas utilizadas en las reacciones fueron de 0,02 U/µl UNG y polimerasa de DNA GLDSE 25 nM. Véase, Publicación PCT N° WO 2008/046612. Las reservas de enzima a alta concentración (2 U/µl y 2.5 µM, respectivamente) se utilizaron para minimizar el arrastre de glicerol y Tween. Los cebadores se añadieron a 0,2 µM cada uno. El cebador corriente arriba posee la secuencia 5'-ATAGGTAGGTAGGTAGGTCATGCAGGGCCTATTGCACC-2'-PO₄-A-3' (Id. de sec. N°: 18). El cebador corriente abajo posee la secuencia 5'-ATCACTCACTCACTCACTCTGAAGGGTACTAGTAGTTCTCTGCTATGTCACT- 2'-PO₄-U-3' (Id. de sec. N°: 19). La porción del cebador que hibrida con la secuencia diana está subrayado. Estos

cebadores incluyen en su extremo 5' diferentes tetrámeros repetitivos flanqueados por residuos de T: TCAC y TAGG (un tetrámero sencillo está en negrita en las secuencias de cebador). Los tetrámeros repetitivos no son complementarios al transcrito diana pero, cuando se incorpora en el amplicón, resulta en la liberación de un tetrámero "flag-tag" tras la digestión de la base. En este ejemplo, ambos cebadores contienen marcas "tag". No obstante, tal como se muestra en el Ejemplo 1, no es necesario marcar ambos cebadores para detectar el amplicón. El uso de 5-metil-dCTP proporciona una diferencia de masa superior entre marcas que contienen residuos C y U. Debido a que dCTP y dUTP difieren tan solo por 1 amu, es difícil de distinguir entre ellos sobre una base de masa. Por contra dUTP y 5-metil dCTP son fácilmente distinguibles al determinar la masa (es decir, difieren en más de 1 amu).

Las condiciones de termociclado fueron: 50°C durante 2 minutos (esterilización UNG); 60°C durante 60 minutos (paso de transcripción reversa); 93 °C durante 1 minuto (desnaturalización UNG); después 60 ciclos entre 92°C durante 15 segundos (desnaturalización) y 60 °C durante 4 minutos (hibridación/extensión). El termociclado se llevó a cabo en un ABI 9700.

El amplicón se generó a partir de reacciones que contienen un 80% o 90% de rATP y dCTP o 5-metil-dCTP. Se realizaron también las reacciones de molde negativo para estas cuatro condiciones. Las reacciones por duplicado de las ocho condiciones se juntaron y se prepararon para su análisis. Se añadieron las bases y los amplicones se trataron con calor. Para poder desalinizar la muestra, se añadió un agente quelante y las soluciones se centrifugaron. Se aplicó sobrenadante a la matriz y se analizó en el espectrómetro de masas. Para todas las muestras que contienen transcrito se identificó la secuencia tag mediante espectrometría de masas, pero no en las muestras control sin el molde. Los resultados se describen en las Figuras 5, 6 y 7.

Ejemplo 3 - Detección de alelos A/G de SNP R en NOS1_361

PCR específica de alelo:

Las amplificaciones Ribo-PCR en 20 µl con 1 ng/µl de DNA genómico humano, 0,4 µM de cada cebador (Tabla 1), pirofosfato sódico 0,15 mM, Tricina/KOH 100 mM a pH 7,3, KCOO 100 mM a pH 7,5, Mg(COO)₂ 3 mM, 0,2 mM de cada (rATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 0,25 U/µl de polimerasa de DNA FP-1 (es decir, polimerasa de DNA GLTDSE). El perfil de termociclación para la PCR fue de 4 min a 92°C seguido de 60 ciclos de 15 s a 92°C, 4 min a 63°C. Esta siempre finalizó a 4°C. Se colocaron 5 µl de PCR en un gel de agarosa al 2 % para el control de la PCR.

La Tabla 1 proporciona secuencias de los cebadores utilizados en este ejemplo. El símbolo * indica un residuo que contiene 2'-PO₄. El símbolo (C) indica una base de citidina 2'OMe. Las secuencias subrayadas representan la parte Flag del cebador y un heptámero sencillo en negrita en las secuencias de cebador.

Tabla 1

Cebador	Secuencia	
Directa 1	<u>CCTAGAAACTAGAAACTAGAACTCTGATGGCTCACCATTGAAAA*</u>	Id. de sec. N°:20
Directa 2	<u>CCTAAAAACTAAAAACTAAAACTCTGATGGCTCACCATTGAAAG*</u>	Id. de sec. N°:21
Reversa	<u>GTCAATGAAGGAAGGTAG(C)A</u>	Id. de sec. N°:22

Escisión alcalina:

Para la escisión alcalina (Tabla 2) se añadió 5,0 µl de hidróxido sódico 1,2 M a los restantes 15 µl de reacción de amplificación para una concentración final de 0,3 M y se incubó a 70°C durante 1,5 horas.

La Tabla 2 muestra las masas predichas del fragmento de la escisión de ATP ribo-PCR del SNP R de NOSI_361. La secuencia subrayada representa la parte Flag del cebador y un heptámero sencillo en negrita en las secuencias de cebador.

Tabla 2

SNP	Secuencia	Id. de sec. N°:	Masa	Inicio	Fin	Sentido
	<u>tca</u>		940,6	28	26	REVERSA
	<u>gcca</u>		1254,8	32	29	REVERSA
	<u>ttga</u>		1284,8	69	72	DIRECTA
	<u>tggtga</u>		1943,2	38	33	REVERSA
Flag A	<u>gtttcta</u>		2182,4	23 16 9	17 10 3	REVERSA REVERSA REVERSA
Flag G			16	23 10	17 REVERSA	REVERSA

	gttttta		2197,4	9	3	REVERSA
	ccttcctca	23	3009,9	59	68	DIRECTA
	gggggctgcta	24	3509,2	48	58	DIRECTA
G	gtcaatgaaggaaggtagcagcccccttcttca	25	10522,8	73	40	REVERSA
A	gtcaatgaaggaaggtagcagccccctttttca	26	10537,8	73	40	REVERSA
A	cctagaaaactaaaaactagaactctgatggctcaccattgaaaa	27	13919	1	46	DIRECTA
G	cctaaaaactaaaaactaaaaactctgatggctcaccattgaaaa	28	14230,3	1	46	DIRECTA

Purificación:

5 Las muestras se desalinizaron mediante la adición de una resina de intercambio de cationes cargada con H⁺. 6 mg de resina se añadieron a la reacción con el equipo MassArray® Clean Resin Tool Kit y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente bajo agitación. Tras esto, la muestra se centrifugó durante 2 min a 134 x g para sedimentar la resina.

EM MALDI-TOF:

10 Se utilizó como matriz trihidroxiacetofenona (THAP). Para la preparación se depositaron 0,5 µl de 0,2 M de 2,4,6 y 2,3,4 THAP en acetonitrilo al 50 % y 0,3 M de citrato de amonio en agua en 6/3/2 (v/v) sobre una posición anclada de placa diana MALDI (AnchorChip™ Target con un tamaño de poro de 400 µm, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Tras añadir 0,5 µl del sobrenadante se secó a temperatura ambiente.

15 La diana se introdujo en el espectrómetro de masas MALDI-TOF (Autoflex, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) para su análisis. El análisis por espectrometría de masas (Figura 8) se llevó a cabo en modo iónico negativo, con una aceleración de voltaje de 20 kV utilizando un retraso de extracción iónica pulsada de 100 ns en línea y con calibración externa. Cada espectro obtenido fue la suma de 200 disparos láser.

20 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas aquí tienen propósito ilustrativo solo y que varios cambios o modificaciones de los mismos podrán ser sugeridos por expertos en la materia. El alcance se identifica en las reivindicaciones anexadas.

Listado de secuencias

[0111]

30 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
Roche Diagnostics GmbH
Centre National de Génotypage (CNG)

<120> Detección de ácidos nucleicos con ribonucleótidos marcados con etiquetas

35 <130> 23855 EP-KOE

<150> US 61/046,720

40 <151> 2008-04-21

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

45 <210> 1
<211> 11
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: porción 5' de polinucleótido del ácido nucleico diana con 3 repeticiones de segmentos de secuencias

55 <220>
<221> base modificada
<222> (1)
<223> n = cualquier nucleótido

- <400> 1
ntaataataa t 11
- 5 <210> 2
<211> 11
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: cadena complementaria a la porción 5' de polinucleótido del ácido nucleico diana con 3 repeticiones de segmentos de secuencias que contienen ribonucleótidos incorporados
- 15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena complementaria a la porción 5' de polinucleótido del ácido nucleico diana con 3 repeticiones de segmentos de secuencias que contienen ribonucleótidos incorporados
- 20 <220>
<221> base modificada
<222> (1)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 25 <220>
<221> base modificada
<222> (4)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 30 <220>
<221> base modificada
<222> (7)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 35 <220>
<221> base modificada
<222> (10)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 40 <220>
<221> base modificada
<222> (11)
<223> n = cualquier nucleótido complementario a la posición 1 de Id. de sec. N°:1
- <400> 2
attattatta n 11
- 45 <210> 3
<211> 13
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: porción 5' o cola 5' del polinucleótido con repeticiones de segmentos de secuencias de repetición en tándem
- 55 <400> 3
tagctagcta gct 13
- 60 <210> 4
<211> 14
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: porción 5' o cola 5' del polinucleótido con repeticiones de segmentos de secuencias de repetición en tándem y base de nucleótido adicional en el extremo 5'
- <220>

- <221> base modificada
 <222> (1)
 <223> n = cualquier nucleótido
- 5 <400> 4
 ntagctagct agct 14
- <210> 5
 <211> 13
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: porción 5' o cola 5' del polinucleótido con diferente segmentos de secuencias en tándem
- <400> 5
 tagctcagtg cat 13
- 20 <210> 6
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada :Complementario reverso de tetrámero repetitivo en cebador corriente arriba
- 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: complementario reverso de tetrámero repetitivo en cebador corriente arriba (4 CUA)
- <220>
 35 <221> base modificada
 <222> (3)
 <223> n = desoxiuridina (dU)
- <220>
 40 <221> base modificada
 <222> (4)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- <220>
 45 <221> base modificada
 <222> (7)
 <223> n = desoxiuridina (dU)
- <220>
 50 <221> base modificada
 <222> (8)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- <220>
 55 <221> base modificada
 <222> (11)
 <223> n = desoxiuridina (dU)
- <220>
 60 <221> base modificada
 <222> (12)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- <220>
 65 <221> base modificada
 <222> (15)

- <223> n = desoxiuridina (dU)
- <220>
- 5 <221> base modificada
<222> (16)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- <400> 6
ccnaccnacc naccna 16
- 10 <210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>
<223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: Complementario reverso de tetrámero repetitivo en cebador corriente abajo (4 GUGA)
- 20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Complementario reverso de tetrámero repetitivo en cebador corriente abajo (4 GUGA)
- 25 <220>
<221> base modificada
<222> (2)
<223> n = desoxiuridina (dU)
- 30 <220>
<221> base modificada
<222> (4)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- 35 <220>
<221> base modificada
<222> (6)
<223> n = desoxiuridina (dU)
- 40 <220>
<221> base modificada
<222> (8)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- 45 <220>
<221> base modificada
<222> (10)
<223> n = desoxiuridina (dU)
- 50 <220>
<221> base modificada
<222> (12)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- 55 <220>
<221> base modificada
<222> (14)
<223> n = desoxiuridina (dU)
- 60 <220>
<221> base modificada
<222> (16)
<223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- 65 <400> 7
gngagngagn gagnga 16

- <210> 8
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 5
- <220>
 <223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: Complementario reverso de tetrámero repetitivo en cebador corriente arriba (4 CmeCmeUA)
- 10
- <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Complementario reverso de tetrámero repetitivo en cebador corriente arriba (4 CmeCmeUA)
- 15
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(2)
 <223> c = cm
- 20
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (3)
 <223> n = desoxiuridina (dU)
- 25
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (4)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- 30
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (5)..(6)
 <223> c = cm
- 35
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)
 <223> n = desoxiuridina (dU)
- 40
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (8)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- 45
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (9)..(10)
 <223> c = cm
- 50
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (11)
 <223> n = desoxiuridina (dU)
- 55
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (12)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- 60
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (13)..(14)
 <223> c = cm
- 65
- <220>
 <221> base modificada
 <222> (15)

- <223> n = desoxiuridina (dU)
- <220>
 <221> base modificada
 5 <222> (16)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina) o desoxiadenosina
- <400> 8
 ccnaccnacc naccna 16
 10 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: Complementario reverso de heptámero repetitivo en cebador corriente arriba (3 GTTTCTA)
- 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Complementario reverso de heptámero repetitivo en cebador corriente arriba (3 GTTTCTA)
- 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 35 <220>
 <221> base modificada
 <222> (21)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 40 <400> 9
 gtttctagtt tctagttct a 21
- <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: Complementario reverso de heptámero repetitivo en cebador corriente abajo (3 GTTTTTA)
- 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: complementario reverso de heptámero repetitivo en cebador corriente abajo (3 GTTTTTA)
- 55 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 60 <220>
 <221> base modificada
 <222> (14)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)
- 65 <220>
 <221> base modificada

<222> (21)
 <223> a = adenosina (ribonucleótido adenina)

5 <400> 10
 gtttttagtt tttagtttt a 21

<210> 11
 <211> 53
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia diana SNP del gen humano H19

15 <400> 11
 gtgaggagtg tggagtaggy gcccaggcat cgtgcagaca gggcgacatc agc 53

<210> 12
 <211> 18
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: cebador de amplificación de PCR común a todas las reacciones SNP del gen humano H19

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de amplificación de PCR común a todas las reacciones SNP del gen humano H19

30 <220>
 <221> base modificada
 <222> (17)
 <223> n = c modificada por 2'-fosfato

35 <400> 12
 gctgatgctg ccctgtnu 18

<210> 13
 <211> 42
 40 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de interrogación de SNP de amplificación de PCR de SNP del gen humano H19 para detectar el alelo H19C

50 <220>
 <221> base modificada
 <222> (41)
 <223> n = g modificada por 2'-fosfato

55 <400> 13
 cctaagacta agactaagac tcgtgaggag tgtggagtag nc 42

<210> 14
 <211> 42
 60 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: cebador de interrogación de SNP de amplificación de PCR de SNP del gen humano H19 para detectar el alelo H19T

65

- <220>
- 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de interrogación de SNP de amplificación de PCR de SNP del gen humano H19 para detectar el alelo H19T
- <220>
<221> base modificada
<222> (41)
10 <223> n = g modificada por 2'-fosfato
- <400> 14
cctagagcta gagctagagc tcgtgaggag tgggagtag nu 42
- 15 <210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: hexámeros repetitivos del extremo 5' en el cebador para detectar el alelo H19C
- 25 <400> 15
taagactaag actaagac 18
- <210> 16
<211> 18
<212> DNA
30 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: hexámeros repetitivos del extremo 5' en el cebador para detectar el alelo H19T
- 35 <400> 16
tagagctaga gctagagc 18
- 40 <210> 17
<211> 80
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia diana de la región gag de la cepa HXB2 del VIH
- <400> 17
- catgcagggc ctattgcacc aggccagatg agagaaccaa ggggaagtga catagcagga 60
actactagta cccttcagga 80
- 50 <210> 18
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador corriente arriba para RT-PCR de la región gag de la cepa HXB2 del VIH
- 60 <220>
<221> base modificada
<222> (38)
<223> n = c modificada por 2'-fosfato

- <400> 18
ataggtaggt aggtaggtca tgcagggcct attgcacna 39
- 5 <210> 19
<211> 53
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de molécula de DNA/RNA combinada: cebador corriente abajo para RT-PCR de la región gag de la cepa HXB2 del VIH
- 15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador corriente abajo para RT-PCR de la región gag de la cepa HXB2 del VIH
- 20 <220>
<221> base modificada
<222> (52)
<223> n = t modificada por 2'-fosfato
- <400> 19
atcactcact cactcactcc tgaagggtac tagtagttcc tgctatgtca cnu 53
- 25 <210> 20
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador directo 1 para la amplificación ribo-PCR de SNP R en NOS1_361 ATP
- 35 <220>
<221> base modificada
<222> (45)
<223> n = a modificada por 2'-fosfato
- 40 <400> 20
cctagaaact agaaactaga aactctgatg gctcaccatt gaaan 45
- 45 <210> 21
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador directo 2 para la amplificación ribo-PCR de SNP R en NOS1_361 ATP
- 55 <220>
<221> base modificada
<222> (45)
<223> n = g modificada por 2'-fosfato
- <400> 21
cctaaaaact aaaaactaaa aactctgatg gctcaccatt gaaan 45
- 60 <210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador reverso para la amplificación ribo-PCR de SNP R en NOS1_361 ATP

<220>
 <221> base modificada
 <222> (19)
 5 <223> c = cm

 <400> 22
 gtcaatgaag gaaggtagca 20

 10 <210> 23
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de escisión alcalina de sentido directo de ATP ribo-PCR de
 SNP R de NOS1_361

 20 <400> 23
 ccttcctca 10

 <210> 24
 <211> 11
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de escisión alcalina de sentido directo de ATP ribo-PCR de
 SNP R de NOS1_361
 30 <400> 24
 gggggctgct a 11

 <210> 25
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de escisión alcalina de sentido reverso de ATP ribo-PCR de
 SNP R de NOS1_361

 <400> 25
 45 gtcaatgaag gaaggtagca gcccccttct ttca 34

 <210> 26
 <211> 34
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: fragmento de escisión alcalina de sentido reverso de ATP ribo-PCR de
 SNP R de NOS1_361
 55 <400> 26
 gtcaatgaag gaaggtagca gccccctttt ttca 34

 <210> 27
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido directo para amplificación ribo-PCR de SNP R en
 NOS1_361 ATP

ES 2 392 783 T3

<400> 27
cctagaaact agaaactaga aactctgatg gctcaccatt gaaaa 45

5 <210> 28
<211> 46
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido directo para amplificación ribo-PCR de SNP R en NOS1_361 ATP

15 <400> 28
cctaaaaact aaaaactaaa aactctgatg gctcaccatt gaaaga 46

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un ácido nucleico diana, el método comprende:

- 5 (a) poner en contacto el ácido nucleico diana con un polinucleótido, un grupo de nucleótidos y un nucleótido que incorpora un componente biocatalítico, en el que;
- 10 (i) el polinucleótido comprende una porción 5' y una porción 3', la porción 5' comprende al menos uno o al menos dos segmentos de secuencias contiguos, en el que cada segmento de secuencia comprende al menos tres bases de nucleótido, y la base de nucleótido del extremo 5' de cada segmento de secuencia es único dentro de un segmento de secuencia y es el mismo en cada segmento de secuencia; y la porción 3' comprende un segmento de secuencia que es sustancialmente complementario y suficiente para hibridar con el ácido nucleico diana y extenderse bajo condiciones de amplificación;
- 15 (ii) el grupo de nucleótidos comprende al menos dos bases de nucleótido en forma de desoxiribonucleótidos (dNTP), y la mayoría de al menos una base de nucleótido en forma de un ribonucleótido (rNTP), en el que la base del ribonucleótido es complementaria a la base de nucleótido 5' única de cada segmento de secuencia del polinucleótido; y
- 20 (iii) el nucleótido que incorpora un componente biocatalítico comprende un desoxiribonucleótido y un ribonucleótido que incorpora actividades;
- (b) amplificar el ácido nucleico diana bajo condiciones de amplificación en presencia de uno o más pares de cebadores para producir un amplicón que comprende un segmento de secuencia 3' complementaria a la porción 5' del polinucleótido, en el que el segmento de secuencia 3' comprende uno o más segmentos de secuencias contiguos, en el que la base de nucleótido del extremo 3' de cada segmento de secuencia es un nucleósido monofosfato (rNMP) que posee la misma base que el rNTP en el grupo de nucleótidos, en el que al menos uno de los cebadores de dicha pareja de cebadores comprende el polinucleótido de acuerdo con (i) de la reivindicación 1;
- 25 (c) escindir el amplicón 3' de cada NMP en fragmentos, en el que la escisión libera los segmentos de secuencias como fragmentos individuales ; y
- (d) detectar los fragmentos de amplicón, en el que los fragmentos de los segmentos de secuencias detectados indican la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, detectando por lo tanto la secuencia de ácido nucleico diana.
- 35
2. El método de la reivindicación 1, que comprende poner en contacto la secuencia del ácido nucleico diana con dos polinucleótidos de acuerdo con (i) de la reivindicación 1, en el que cada polinucleótido en la pareja de polinucleótidos comprenden segmentos de secuencias de la porción 5' de la misma masa.
- 40
3. El método de la reivindicación 1, que comprende poner en contacto el ácido nucleico diana con al menos un polinucleótido de acuerdo con (i) de la reivindicación 1, en el que la detección de los fragmentos del segmento de secuencia del complemento del polinucleótido indica la presencia de un alelo de un nucleótido polimórfico en la secuencia del ácido nucleico diana.
- 45
4. El método de la reivindicación 1, que comprende poner en contacto el ácido nucleico diana con al menos dos polinucleótidos diferentes de acuerdo con (i) de la reivindicación 1, en el que la porción 3' de los polinucleótidos difiere solo en la base de nucleótido del extremo 3', en el que la base de nucleótido del extremo 3' de cada polinucleótido corresponde con segmentos de secuencia de masa única, y la detección de los fragmentos del segmento de secuencia del complemento de al menos uno de los polinucleótidos indica la presencia de un alelo de un nucleótido polimórfico en la secuencia del ácido nucleico diana.
- 50
5. El método de la reivindicación 1, en el que un grupo de diferentes secuencias de ácido nucleico diana se pone en contacto con un grupo de polinucleótidos diferentes de acuerdo con (i) de la reivindicación 1, cada uno de los polinucleótidos diferentes comprende un segmento de secuencia de masa única, en el que los segmentos de secuencias de polinucleótidos son identificadores de uno del grupo de secuencias de ácido nucleico diana diferentes, mientras que la detección de los fragmentos del segmento de secuencia del complementario de al menos un de los polinucleótidos indica la presencia de al menos uno del grupo de secuencias de ácido nucleico diana diferentes.
- 55
- 60 6. El método de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido de acuerdo con (i) de la reivindicación 1 comprende una porción de bloqueo que previene sustancialmente la extensión del polinucleótido, y en el que el método comprende además el paso de eliminar la porción de bloqueo del polinucleótido antes de amplificar.

FIGURA 1

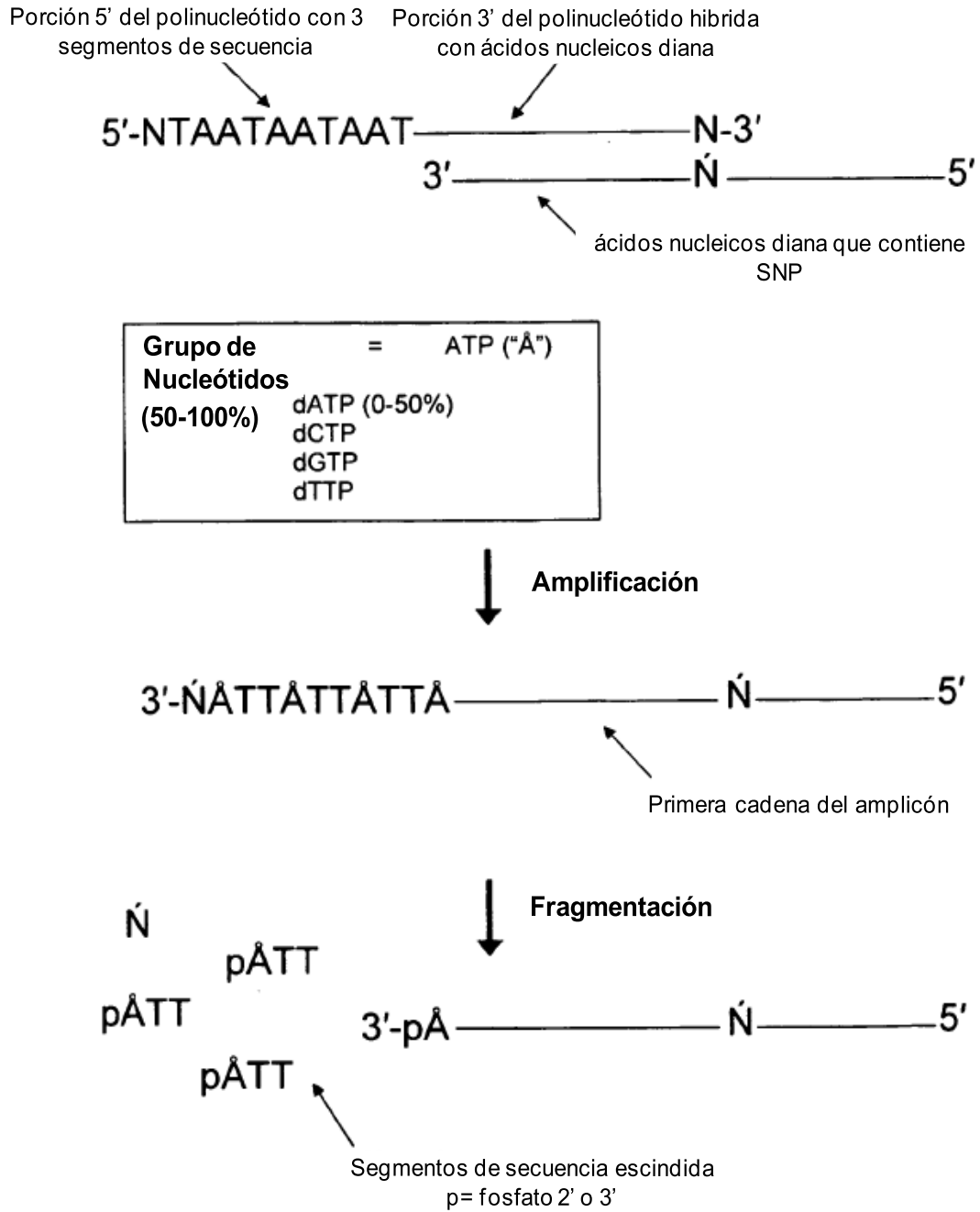


Figura 2
Especificidad de alelo de H19C

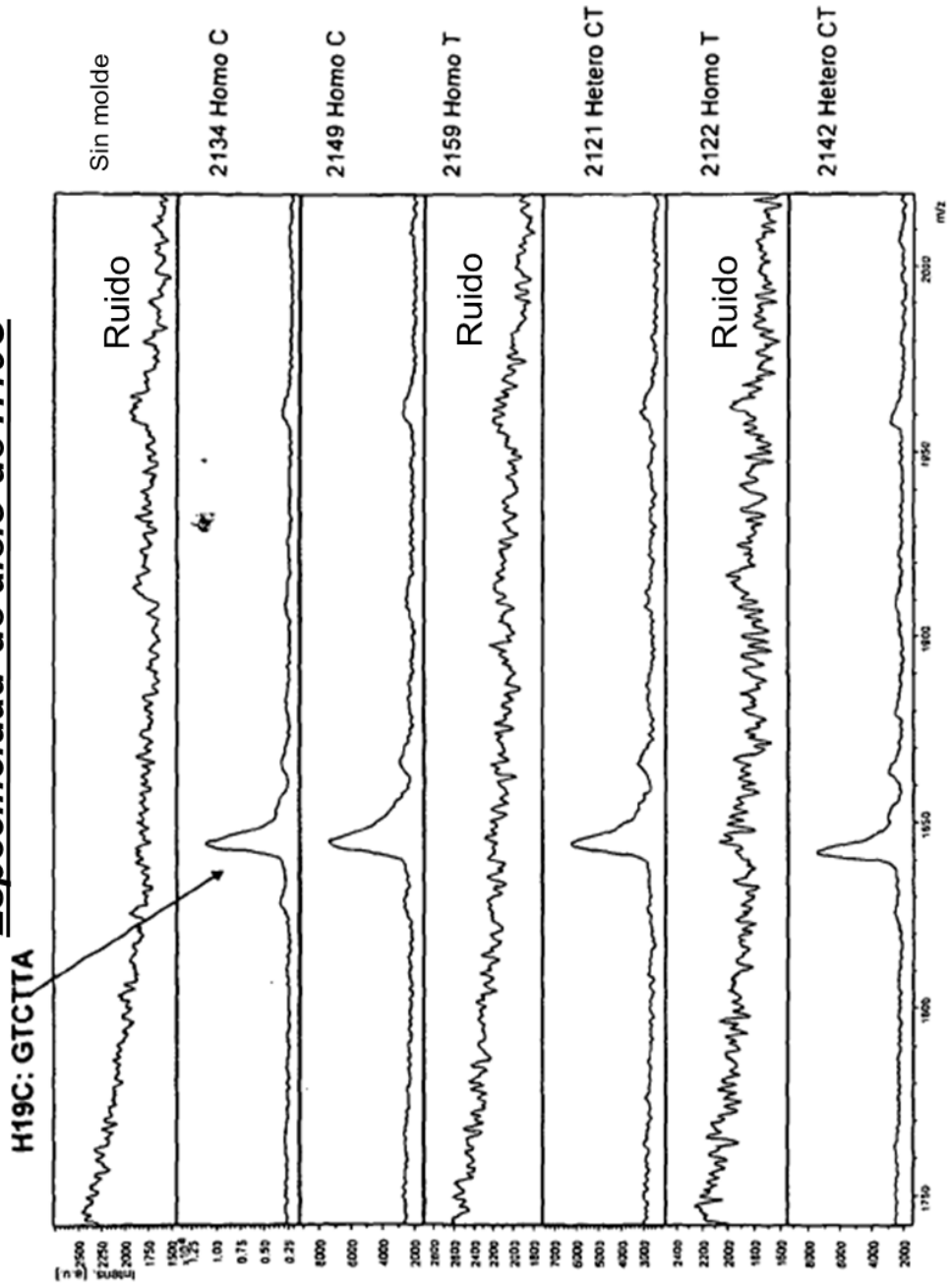


Figura 3
Especificidad de alelo de H19T

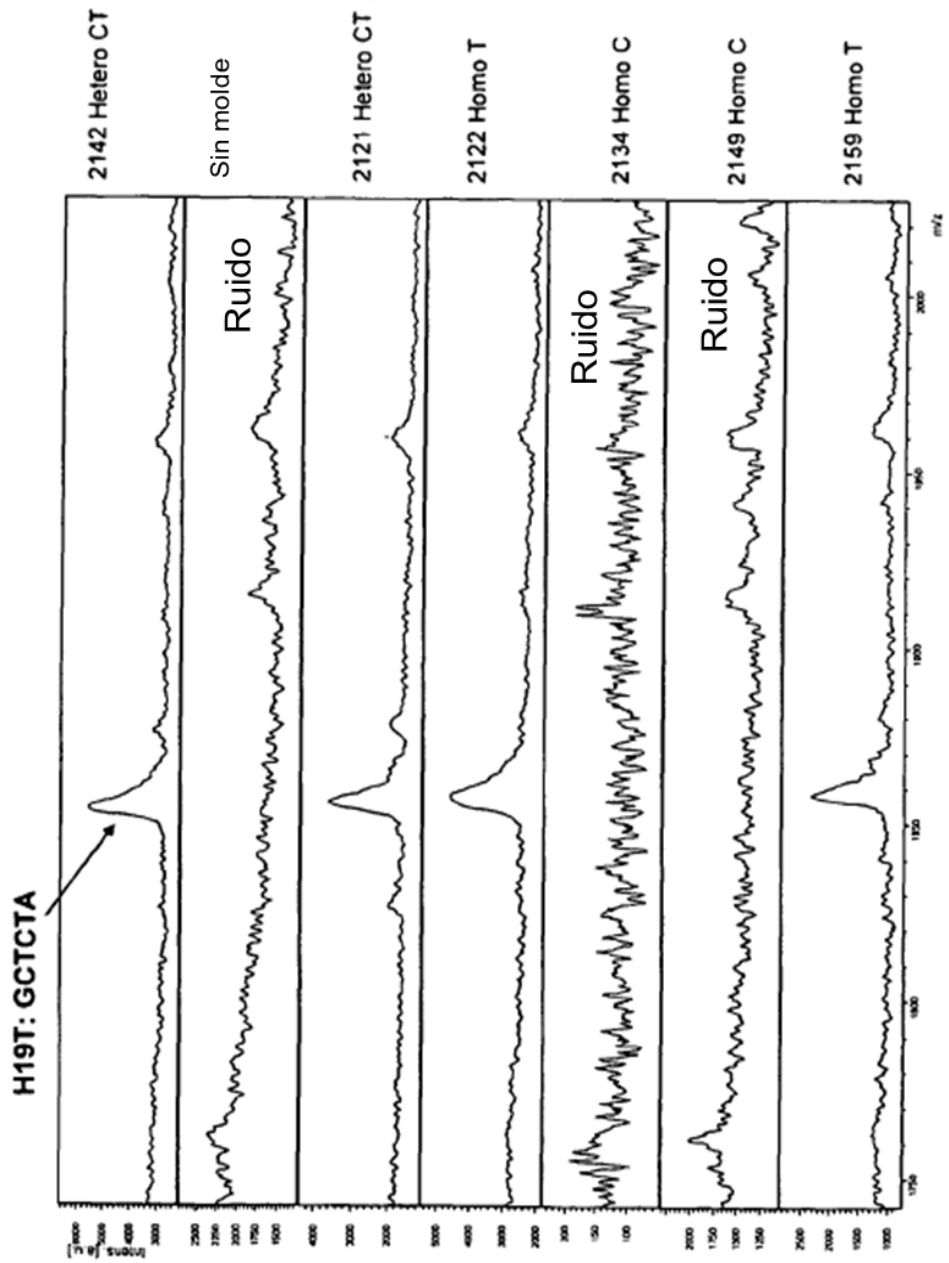


Figura 4
Especificidad de alelo de H19C y H19T

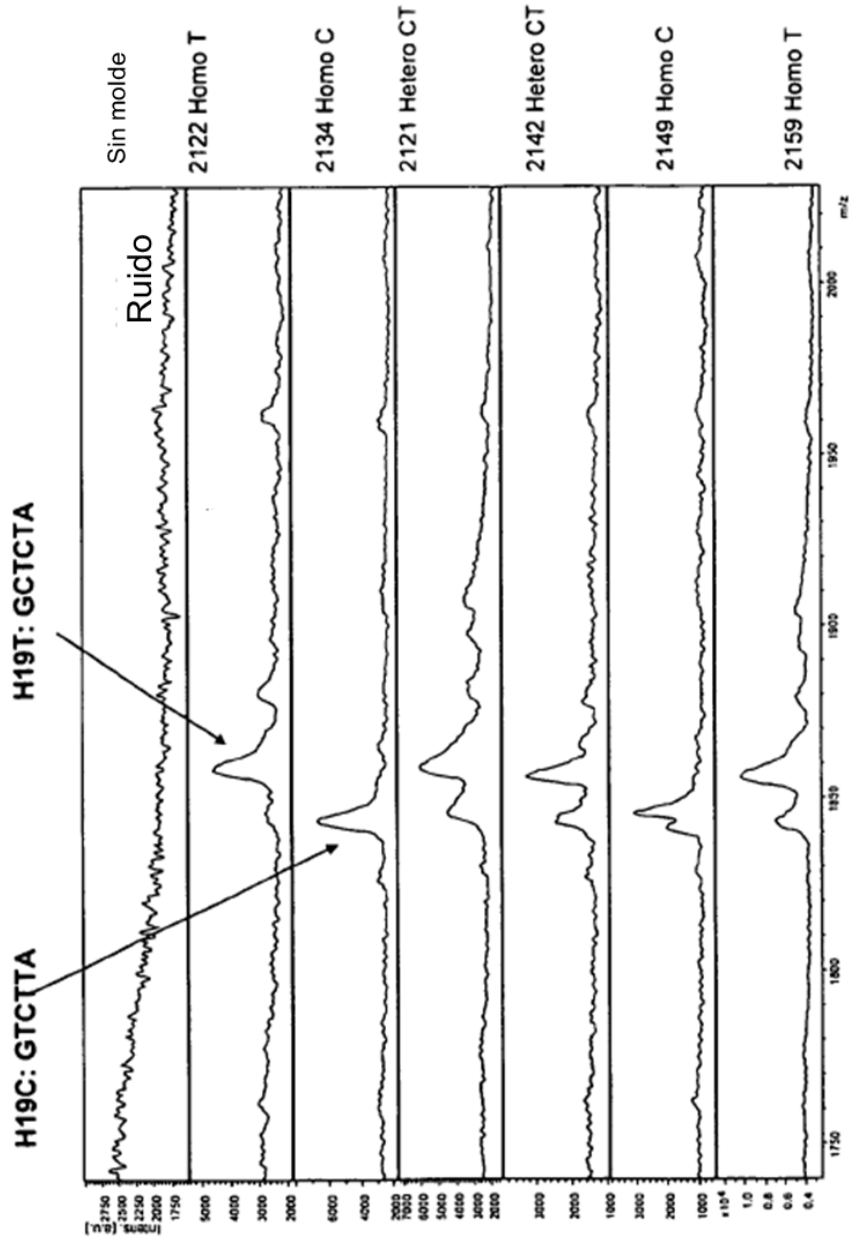


Figura 5
Marca de 80 o 90% de rATP con dU y dC

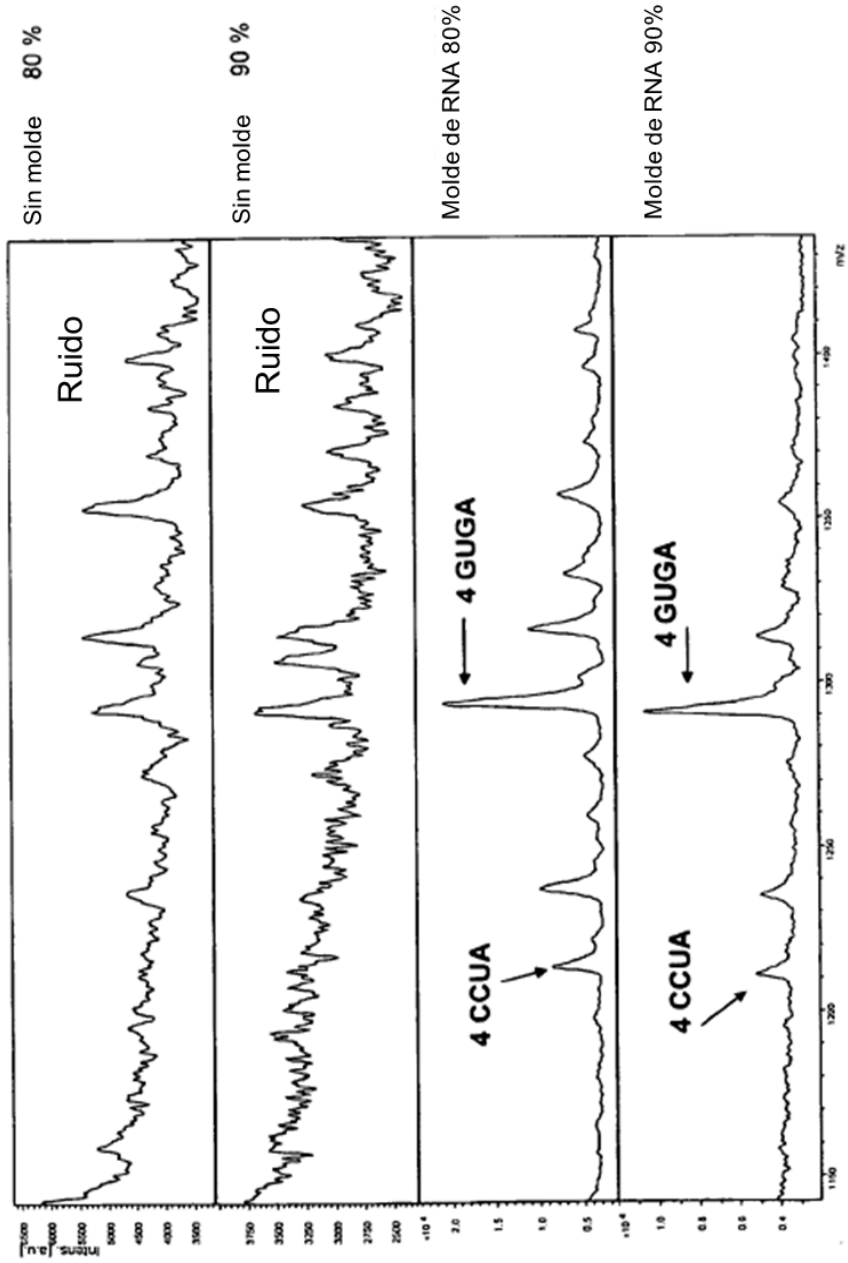


Figura 6
Marca de 80 o 90% de rATP con dU y 5-Me-dC

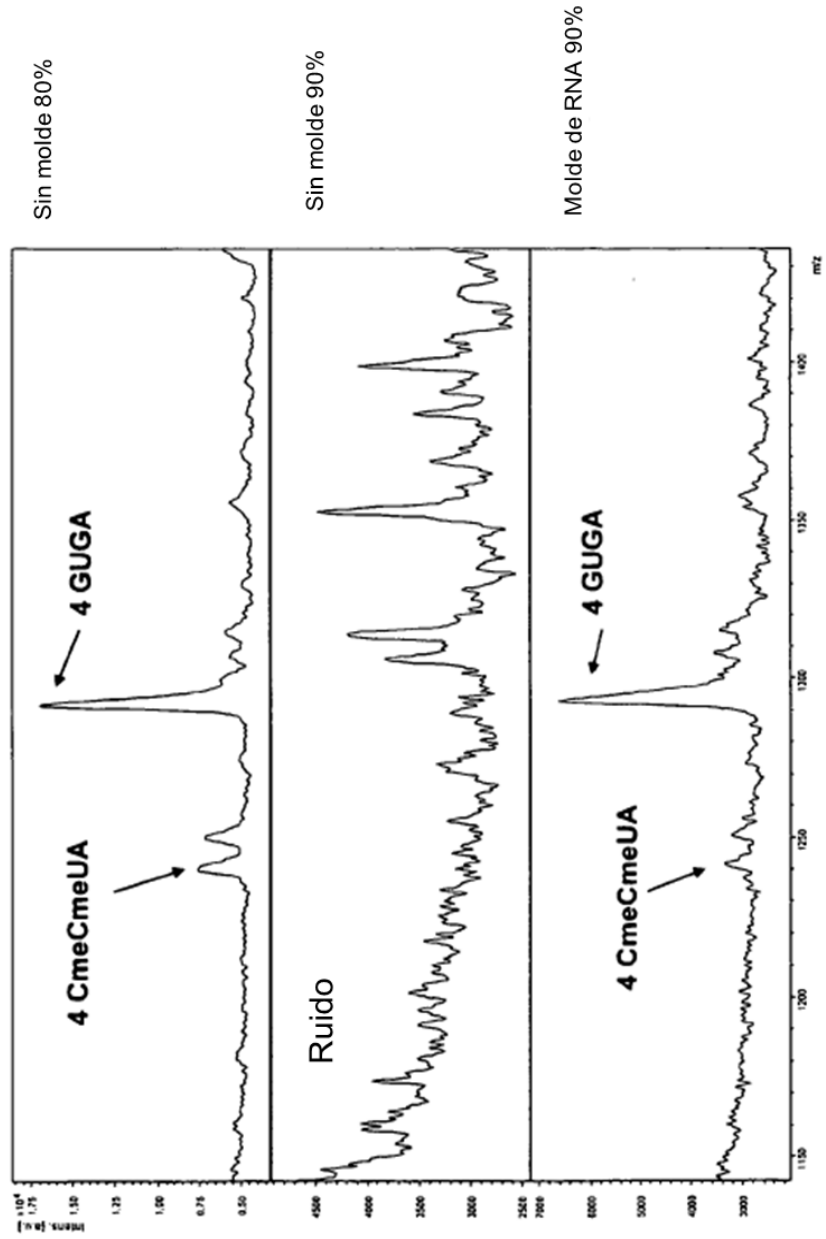


Figura 7

Marca de molde de RNA de muestras de VIH

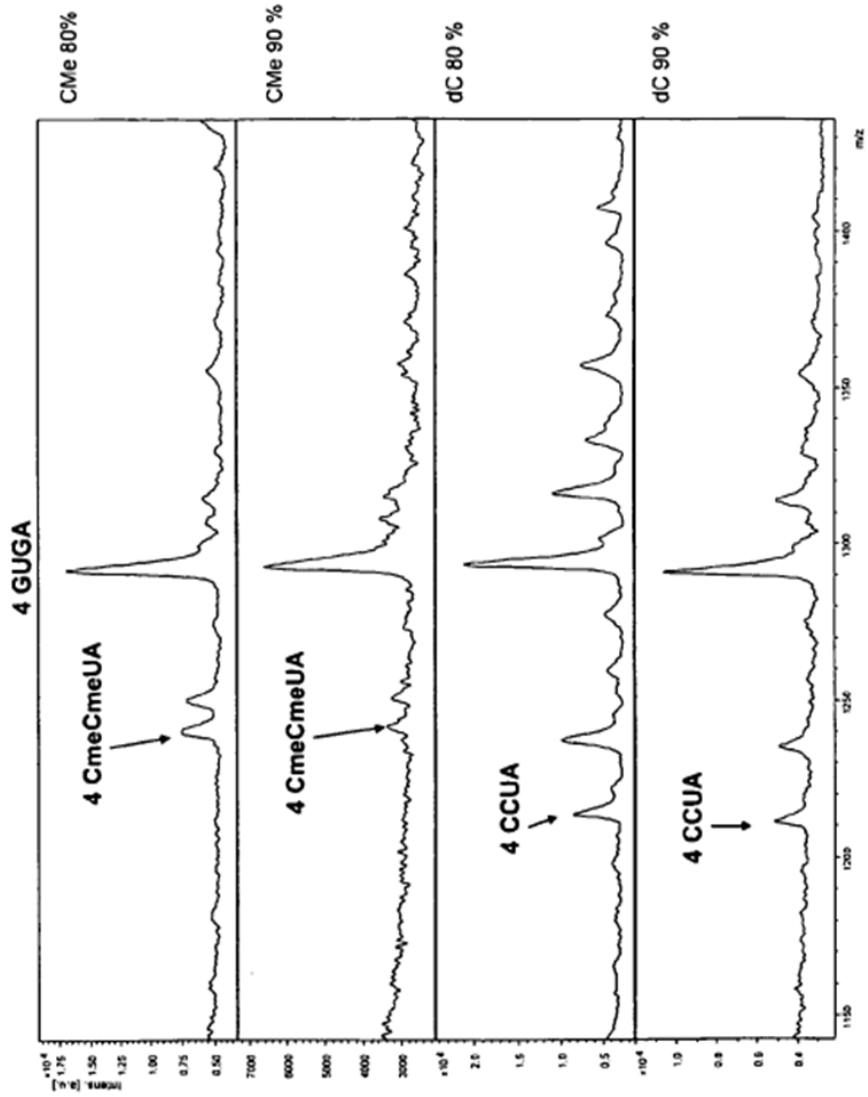


Figura 8

