

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 044**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09784846 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2307574**

54 Título: **Amplificación y detección de múltiplex**

30 Prioridad:

31.07.2008 GB 0814002

26.09.2008 GB 0817706

01.06.2009 GB 0909333

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.02.2013

73 Titular/es:

OXITEC LIMITED (100.0%)

71 Milton Park,

Abingdon / Oxfordshire OX14 4RX

72 Inventor/es:

FU, GUOLIANG

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 396 044 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

Amplificación y detección de múltiplex

5 La presente invención se refiere al campo de la detección de múltiplex. En particular, la invención se refiere a procedimientos para ensayar una muestra para una o más dianas de ácido nucleico en una única reacción basada en las distintas temperaturas de fusión o perfiles de fusión de sondas. La invención también proporciona sondas y kits para su uso en tales procedimientos.

10 La PCR de múltiplex, que usa múltiples pares de cebadores para amplificar simultáneamente múltiples secuencias diana en una única reacción de PCR, es un enfoque más eficiente para la PCR que la PCR de pares de cebadores individuales convencional. La amplificación simultánea de diversas dianas reduce tanto el coste como el tiempo de devolución del análisis por PCR, minimiza variaciones experimentales y el riesgo de contaminación cruzada y aumenta la fiabilidad de resultados finales. La PCR de múltiplex se ha usado en muchas áreas de ensayo de ADN que incluyen identificación de microorganismos, análisis de expresión génica, análisis de mutación y polimorfismo, genotipado y análisis de matrices de ADN y detección de ARN.

La PCR en tiempo real ha sido desarrollada para cuantificar productos amplificados durante reacciones de PCR. La PCR en tiempo real se basa en los principios de que la emisión de fluorescencia de colorantes directa o indirectamente asociados a la formación de amplicones recientemente sintetizados o la hibridación de cebadores con moldes de ADN puede detectarse y es proporcional a la cantidad de amplicones en cada ciclo de PCR. La PCR en tiempo real se lleva a cabo en un formato de tubo cerrado y es cuantitativa. Actualmente están disponibles varios procedimientos para realizar la PCR en tiempo real, tales como utilizar sondas TaqMan (patentes de EE.UU. nº 5.210.015 y 5.487.972, y Lee y col., Nucleic Acids Res. 21:3761-6, 1993), balizas moleculares (patentes de EE.UU. nº 5.925.517 y 6.103.476, y Tyagi y Kramer, Nat. Biotechnol. 14:303-8, 1996), amplicones auto-sondantes (escorpiones) (patente de EE.UU. nº 6.326.145, y Whitcombe y col., Nat. Biotechnol. 17:804-7, 1999), Amplisensor (Chen y col., Appl. Environ. Microbiol. 64:4210-6, 1998), Amplifluor (patente de EE.UU. nº 6.117.635 y Nazarenko y col., Nucleic Acids Res. 25:2516-21, 1997, sondas de hibridación de desplazamiento (Li y col., Nucleic Acids Res. 30:E5, 2002); DzyNA-PCR (Todd y col., Clin. Chem. 46:625-30, 2000), detección de enzimas de restricción fluorescentes (Cairns y col. Biochem. Biophys. Res. Commun. 318:684-90, 2004) y sondas de hibridación adyacentes (patente de EE.UU. nº 6.174.670 y Wittwer y col., Biotechniques 22:130-1, 134-8, 1997). La mayoría de estas sondas consisten en un par de colorantes (un colorante indicador y un colorante aceptor) que participan en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por lo cual el colorante aceptor extingue la emisión del colorante indicador. En general, las sondas marcadas con fluorescencia aumentan la especificidad de la cuantificación de amplicones.

Otra forma de sonda usada en PCR es una sonda lineal bicatenaria que tiene dos oligonucleótidos complementarios. Las sondas descritas en la técnica anterior han sido de igual longitud, actuando al menos uno de los oligonucleótidos de sonda para una secuencia diana en una conformación monocatenaria. El extremo 5' de uno de los oligonucleótidos se marca con un fluoróforo y el extremo 3' del otro oligonucleótido se marca con un extintor, por ejemplo, un fluoróforo aceptor, o viceversa. Cuando estos dos oligonucleótidos se hibridan entre sí, las dos marcas están próximas la una a la otra, extinguiendo así la fluorescencia. Sin embargo, los ácidos nucleicos diana compiten por la unión a la sonda, produciendo un aumento inferior al proporcional de la fluorescencia de la sonda con concentración de ácido nucleico diana creciente (Morrison L. y col., Anal. Biochem., vol. 183, páginas 231-244 (1989); documento US 5.928.862).

Las sondas lineales bicatenarias modificadas por acortamiento de uno de los dos oligonucleótidos complementarios por algunas bases para preparar una sonda lineal parcialmente bicatenaria también se conocen en la técnica. En tales sondas lineales bicatenarias en la técnica anterior, el oligonucleótido más largo se ha marcado en el extremo con un fluoróforo y el oligonucleótido ligeramente más corto se ha marcado en el extremo con un extintor. En la forma bicatenaria, la sonda es menos fluorescente debido a la estrecha proximidad del fluoróforo y el extintor. Sin embargo, en presencia de una diana, el oligonucleótido del extintor más corto es desplazado por la diana. Como resultado, el oligonucleótido más largo (en forma de híbrido de sonda-diana) se vuelve sustancialmente más fluorescente (Li y col., Nucleic Acids Research, vol. 30, nº 2, e5 (2002)).

El documento US 2005/0227257 describe una sonda de ácido nucleico lineal bicatenaria ligeramente modificada. La sonda descrita en la presente solicitud de patente se modifica acortando uno de los dos oligonucleótidos complementarios por más bases, en comparación con el anterior, para preparar una sonda lineal parcialmente bicatenaria.

Las sondas de hibridación fluorescentes también se han usado en otros campos. Por ejemplo, se han descrito procedimientos para el genotipado de múltiplex usando sondas de hibridación fluorescentes (por ejemplo, documento US 6.140.054) que usan la temperatura de fusión de sondas de hibridación fluorescentes que se hibridan con una región elegida como diana amplificada por PCR de secuencia de genoma/ácidos nucleicos para identificar mutaciones y polimorfismos.

Luk y col. (Journal of Virological Methods 144:1-11, 2007) describe sondas de ADN lineales parcialmente bicatenarias para la detección de dianas genéticamente polimórficas.

5 Huang y col. (Nucleic Acids Res. 35(16):E101, 2007) describe sondas de ADN lineales parcialmente bicatenarias termodinámicamente moduladas para PCR en tiempo real homólogo.

10 La aparición de pruebas genéticas de alta resolución ha necesitado análisis tanto cualitativo como cuantitativo de múltiples genes y ha conducido a la convergencia de la PCR de múltiplex y PCR en tiempo real en la PCR de múltiplex en tiempo real. Como los colorantes intercalantes de ADN bicatenario no son adecuados para la multiplexación debido a su no especificidad, las sondas marcadas con fluorescencia han hecho que sea posible la PCR de múltiplex en tiempo real. Sin embargo, la PCR de múltiplex en tiempo real está limitada por la disponibilidad de combinaciones de colorantes de fluorescencia. Actualmente, sólo pueden detectarse y cuantificarse hasta cuatro o cinco colorantes de fluorescencia simultáneamente en PCR en tiempo real.

15 El documento US2005/0053950 describe un protocolo para cuantificar reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real de múltiplex. Los procedimientos cuantifican múltiples productos de PCR o amplicones en una única reacción de PCR en tiempo real basándose en las diferentes temperaturas de fusión (T_m) de cada amplicón y los cambios de emisión de colorantes de ADN bicatenarios tales como SYBR Green I cuando los amplicones están en dúplex o en separación. Para un amplicón específico con una T_m , la diferencia de emisión entre la lectura de emisión tomada a una temperatura por debajo de T_m y la lectura de emisión a una temperatura por encima de T_m se corresponde con el valor de emisión del amplicón en el dúplex. Por consiguiente, la diferencia de emisión de cada amplicón en una única reacción de PCR puede usarse para cuantificar cada amplicón. Sin embargo, la multiplexidad y sensibilidad de tales procedimientos puede ser relativamente baja. Por ejemplo, la diferencia en las temperaturas de fusión entre amplicones del orden de 100-150 nucleótidos de longitud es pequeña. Por tanto, estas técnicas requieren el uso de amplicones con grandes diferencias en sus tamaños con el fin de poder distinguir entre ellas.

20 Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar otros procedimientos de amplificación y cuantificación de múltiples secuencias diana en una única reacción de PCR para PCR en tiempo real de múltiplex con mayores niveles de multiplexidad y sensibilidad.

30 El procedimiento de la presente invención se diferencia de las tecnologías de la técnica anterior. En primer lugar, el procedimiento se basa en las diferentes propiedades de fusión (T_m o perfil de fusión) de cada sonda y los cambios de emisión de marcas con respecto a la sonda cuando las porciones bicatenarias internas de la sonda están en dúplex o en separación. La sonda usada en la presente invención comprende una porción bicatenaria que puede formarse por un primer oligonucleótido y un segundo oligonucleótido; la porción bicatenaria tiene una T_m distinta para cada sonda que distingue diferentes sondas dentro de un conjunto de sondas que comprenden las mismas marcas o similares. En segundo lugar, el primer oligonucleótido puede o puede no comprender una o más marcas y es el primer oligonucleótido que es consumido durante la reacción de amplificación. La diferencia de emisión entre las lecturas de emisión a dos temperaturas diferentes se corresponde con el valor de emisión de la sonda después de consumirse algunas sondas. En tercer lugar, el medir perfiles de fusión de sondas sin consumir proporciona una indicación de la presencia o cantidad de ácidos nucleicos diana presentados en una muestra.

Para facilitar el entendimiento de la invención, varios términos se definen a continuación.

45 Un "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, es una secuencia covalentemente unida de nucleótidos en la que la posición 3' de la pentosa de un nucleótido está unida por un grupo fosfodiéster a la posición 5' de la pentosa del siguiente, y en el que los residuos de nucleótidos (bases) están unidos en secuencia específica; es decir, un orden lineal de nucleótidos. Un "polinucleótido", como se usa en el presente documento, es un ácido nucleico que contiene una secuencia que es mayor de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Un "oligonucleótido", como se usa en el presente documento, es un polinucleótido corto o una parte de un polinucleótido. Un oligonucleótido normalmente contiene una secuencia de aproximadamente dos a aproximadamente cien bases. "Ácido nucleico", "ADN" y términos similares también incluyen análogos de ácido nucleico, es decir, análogos que tienen esqueleto distinto de un fosfodiéster. Por ejemplo, los llamados "ácidos nucleicos peptídicos", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

60 Como se usa en el presente documento, los términos "secuencia diana", "ácido nucleico diana", "secuencia de ácidos nucleicos diana" y "ácidos nucleicos de interés" se usan indistintamente y se refieren a una región deseada que va tanto a amplificarse, detectarse como ambos. La secuencia diana, que es el objeto de la amplificación y detección, puede ser cualquier ácido nucleico. La secuencia diana puede ser ARN, ADNc, ADN genómico, o ADN o ARN, por ejemplo, de un microorganismo o virus causante de enfermedad. La secuencia diana también puede ser ADN tratado por reactivos químicos, diversas enzimas y exposición física. Una secuencia de ácidos nucleicos diana de interés en una muestra puede aparecer como ADN o ARN monocatenario tal como ADNc, ARNm, otro ARN o como cadenas complementarias separadas. La separación de cadenas complementarias de ácido nucleico diana puede llevarse a cabo por medios físicos, químicos o enzimáticos. Para facilidad de descripción y entendimiento, referencias a ácidos nucleicos de interés o dianas se refieren tanto a estos restos como se encuentran en una

muestra de prueba como a copias amplificadas de porciones de estos ácidos nucleicos, a menos que se observe específicamente de otro modo.

5 “Cebador” como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, tanto si se produce naturalmente como si se produce sintéticamente, que puede actuar de punto de iniciación de la síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un primer producto de extensión que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa y a una temperatura adecuada y tampón. Los cebadores en el presente documento están seleccionados para ser sustancialmente complementarios a las diferentes cadenas de cada secuencia específica que va a amplificarse. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridarse con sus cadenas respectivas. Un fragmento de nucleótido no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementario a la sección de diagnóstico de la secuencia de bases diana. Comúnmente, los cebadores son complementarios, excepto cuando nucleótidos no complementarios puedan estar presentes en un extremo del cebador predeterminado como se ha descrito.

15 El término “complementario a” se usa en el presente documento en relación con un nucleótido que apareará bases con otro nucleótido específico. Por tanto, la adenosina es complementaria a uridina o timidina y la guanosina es complementaria a citidina. Se aprecia que mientras que la timidina y la guanosina puedan aparear bases en ciertas circunstancias no se consideran complementarias para los fines de esta memoria descriptiva. Para los fines de la presente invención, el término “sustancialmente complementario” significa que igual o superior al 70%, preferentemente superior al 80%, más preferentemente superior al 90% y lo más preferentemente superior al 95% o al 99% de nucleobases en una cadena de la sonda encuentra su componente de unión de Watson-Crick en la otra cadena de la sonda (o en el ácido nucleico de interés) en un alineamiento de forma que los nucleótidos correspondientes puedan hibridarse entre sí. Los procedimientos para determinar identidad y similitud están codificados en programas informáticos públicamente disponibles. Procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a: el programa GCG Pileup encontrado en el paquete de programa GCG usando el algoritmo de Needleman y Wunsch con sus valores por defecto convencionales de penalización por creación de hueco = 12 y penalización por extensión de hueco = 4 (Devereux y col., Nucleic Acids Res. 12: 387-395 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Pearson y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988)). El programa BLASTX está públicamente disponible de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y col., Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Library Med. (NCBI NLM) NIH, Bethesda, MD; Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990); Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)).

35 Los términos “dúplex” y “bicatenario” son intercambiables, significan una cadena de oligo-poli-nucleótidos que se hibrida con los oligo-poli-nucleótidos complementarios.

El término “idéntico” significa que dos secuencias de ácidos nucleicos tienen la misma secuencia o una secuencia complementaria.

40 El término “homólogo” significa que una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria puede hibridarse con una secuencia de ácidos nucleicos monocatenaria complementaria. El grado de hibridación puede depender de varios factores que incluyen la cantidad de identidad entre las secuencias y las condiciones de hibridación tales como temperatura y concentración de sales. Preferentemente, la región de identidad es mayor de aproximadamente 5 pb, más preferentemente la región de identidad es mayor de 10 pb.

Como se usa en el presente documento, “monitorización continua” y términos similares se refieren a monitorizar múltiples veces durante un ciclo de PCR, preferentemente durante transiciones de temperatura, y más preferentemente obtener al menos un punto de datos en cada transición de temperatura.

50 Como se usa en el presente documento, monitorización “ciclo por ciclo” significa monitorizar la reacción de PCR una vez cada ciclo.

El término “cantidad consumida real” (CCR) significa la cantidad de sonda que se consume en una reacción como se refleja por medición de la fluorescencia.

“Amplificación” como se usa en el presente documento denota el uso de cualquier procedimiento de amplificación para aumentar la concentración de una secuencia de ácidos nucleicos particular dentro de una mezcla de secuencias de ácidos nucleicos.

60 El término “muestra” como se usa en el presente documento se usa en su sentido más amplio. Una muestra biológica de la que se sospecha que contiene ácido nucleico puede comprender, pero no se limita a, ADN genómico, ADNc (en disolución o unido a un soporte sólido), y similares.

65 El término “marca” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier átomo o molécula que pueda usarse para proporcionar o ayudar a proporcionar una señal detectable (preferentemente cuantificable) y que pueda

unirse a un ácido nucleico o proteína. Las marcas pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, magnetismo, actividad enzimática y similares.

5 El término “adyacente” o “sustancialmente adyacente” como se usa en el presente documento se refiere al posicionamiento de dos oligonucleótidos sobre su cadena complementaria del molde ácido nucleico. Las dos regiones de molde hibridadas por oligonucleótidos pueden ser contiguas, es decir, no hay hueco entre las dos regiones de molde. Alternativamente, las dos regiones de molde hibridadas por los oligonucleótidos pueden separarse 1 a aproximadamente 40 nucleótidos, más preferentemente aproximadamente 1 a 10 nucleótidos.

10 El término “ciclar térmicamente”, “ciclado térmico”, “ciclos térmicos” o “ciclo térmico” se refiere a ciclos repetidos de cambios de temperatura de una temperatura de desnaturalización total a una temperatura de hibridación, a una temperatura de extensión y de nuevo a la temperatura de desnaturalización total. Los términos también se refieren a ciclos repetidos de una temperatura de desnaturalización y una temperatura de extensión, en los que las temperaturas de hibridación y de extensión se combinan en una temperatura. Una temperatura de desnaturalización total desenrolla todos los fragmentos bicatenarios en cadenas individuales. Una temperatura de hibridación permite que un cebador se hibride con la secuencia complementaria de una cadena separada de un molde de ácido nucleico. La temperatura de extensión permite la síntesis de una cadena de ADN naciente del amplícón.

20 El término “reacción” como se usa en el presente documento se refiere a una reacción de hibridación, reacción de extensión o reacción de amplificación u otras reacciones biológicas, químicas.

25 Los términos “mezcla de amplificación” o “mezcla de PCR” como se usan en el presente documento se refieren a una mezcla de componentes necesarios para detectar ácido nucleico diana de moldes de ácido nucleico. La mezcla puede comprender nucleótidos (dNTP), sondas, una polimerasa termoestable, cebadores y una pluralidad de moldes de ácido nucleico. La mezcla puede comprender adicionalmente un tampón Tris, una sal monovalente y Mg^{2+} . La concentración de cada componente es muy conocida en la técnica y puede optimizarse adicionalmente por un experto habitual en la materia.

30 Los términos “producto amplificado” o “amplícón” se refieren a un fragmento de ADN amplificado por una polimerasa usando un par de cebadores en un procedimiento de amplificación tal como PCR

35 El término “perfil de fusión” se refiere a una colección de mediciones de un oligo (o poli)nucleótido y su complemento que indican la transición de moléculas del oligo (o poli)nucleótido de ácido nucleico bicatenario a monocatenario (o viceversa). La transición de un ácido nucleico de la forma bicatenaria a monocatenaria se describe frecuentemente en la materia como la “fusión” de esa molécula de ácido nucleico. La transición también puede describirse como la “desnaturalización” o “disociación” del ácido nucleico. Por consiguiente, un perfil de fusión de la presente invención también puede denominarse un “perfil de disociación”, un “perfil de desnaturalización”, una “curva de fusión”, una “curva de disociación”, un “perfil de hibridación/disociación”, etc.

40 La “temperatura de fusión” o “ T_m ” de una molécula de ácido nucleico generalmente se refiere a la temperatura a la que un polinucleótido se disocia de su secuencia complementaria. Generalmente, la T_m puede definirse como la temperatura a la que la mitad de los pares de bases de Watson-Crick en moléculas de ácidos nucleicos de dúplex se rompen o disocian (es decir, se “funden”), mientras que la otra mitad de los pares de bases de Watson-Crick permanecen intactos en una conformación bicatenaria. En realizaciones preferidas en las que las moléculas de ácidos nucleicos de dúplex son oligonucleótidos y en otras realizaciones en las que los ácidos nucleicos de dúplex se disocian en un modo de dos estados, la T_m de un ácido nucleico también puede definirse como la temperatura a la que la mitad de las moléculas de ácidos nucleicos en una muestra están en una conformación monocatenaria mientras que la otra mitad de las moléculas de ácidos nucleicos en esa muestra están en una conformación bicatenaria. Por tanto, T_m define un punto intermedio en la transición de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios a monocatenarios (o, en cambio, en la transición de moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios a bicatenarios). Es bien apreciado en la materia que la transición de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios a monocatenarios no se producen a una única temperatura sino, más bien, durante un intervalo de temperaturas. Sin embargo, la T_m proporciona una medición conveniente para aproximar si las moléculas de ácidos nucleicos en una muestra existen en una conformación monocatenaria o bicatenaria. Como tal, la temperatura de fusión de una muestra de ácido nucleico puede obtenerse fácilmente evaluando simplemente un perfil de fusión para esa muestra.

60 El término “consumido” o “consumo” significa que la cantidad de sondas marcadas libres disminuye a una temperatura a la que la sonda marcada está normalmente intacta, en otras palabras, a temperaturas particulares la porción bicatenaria de la sonda sigue siendo bicatenaria. En particular, la disminución de la cantidad de sonda marcada libre puede ser el resultado de la falta de disponibilidad de al menos una cadena de la sonda, que es tanto el primer oligonucleótido de la sonda como el segundo oligonucleótido de la sonda o ambos. La falta de disponibilidad de al menos una cadena de la sonda significa que el primer oligonucleótido de la sonda, el segundo oligonucleótido de la sonda o ambos oligonucleótidos de la sonda se hibridan con ácido nucleico diana. La hibridación del primer oligonucleótido de la sonda, el segundo oligonucleótido de la sonda o ambos oligonucleótidos de la sonda con el ácido nucleico diana puede ir seguida de extensión de los oligonucleótidos de la sonda que actúan de cebador, o de degradación de los oligonucleótidos de la sonda.

La presente invención describe procedimientos que permiten la amplificación y detección esencialmente simultánea de un gran número de diferentes secuencias de ácidos nucleicos diana.

5 En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción que comprende:

10 dos o más sondas, en el que cada sonda comprende

un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y
15 segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y
20

en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión (temperatura de fusión T_m) de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes, y son distinguibles en un análisis de perfiles de fusión;
25

(b) realizar la reacción en la muestra/mezcla de reacción, en el que la reacción es una reacción de extensión de cebador bajo condiciones de extensión, en el que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de la sonda correspondiente que son cebadores extensibles se hibridan con la secuencia diana, por tanto son consumidos durante la reacción de extensión de cebador, en el que los oligonucleótidos consumidos de sondas ya no están disponibles para participar en la formación de la porción bicatenaria (el dúplex) de la sonda; y
30

(c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de las sondas sin consumir en la mezcla de reacción detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,
35

en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana está presente o no en dicha muestra.

En esta realización, los primeros oligonucleótidos de sondas actúan de cebadores. En una reacción de extensión de cebador, una mezcla de sondas se añade a la mezcla de reacción que contiene todos los componentes para la extensión bajo condiciones de extensión. Si un ácido nucleico diana particular está presente en la reacción, los oligonucleótidos de la sonda correspondiente se hibridan con la secuencia diana, seguido de extensión e incorporación en el producto de extensión de cebador, por tanto son consumidos. Los oligonucleótidos consumidos ya no están disponibles para participar en la formación de la porción bicatenaria de la sonda. En el análisis de perfiles de fusión, la sonda consumida puede verse como un pico reducido o ausente.
40
45

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:

50 (a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción de hibridación que comprende:

dos o más sondas, en el que cada sonda comprende

55 un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

60 en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y

65 en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes y son distinguibles en un análisis de

perfiles de fusión;

5 (b) realizar la reacción de hibridación en la muestra/mezcla de reacción bajo condiciones de hibridación, en el que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de sondas que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana se hibridan con la secuencia diana, por tanto son consumidos durante la reacción, en el que los oligonucleótidos consumidos de sondas ya no están disponibles para participar en la formación de la porción bicatenaria (el dúplex) de la sonda; y

10 (c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de sondas sin consumir en la mezcla de reacción detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,

en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana está presente o no en dicha muestra.

15 En esta realización, los primeros oligonucleótidos de sondas pueden actuar de sonda de hibridación. En una reacción de hibridación, una mezcla de sondas se añade a la mezcla de reacción que contiene todos los componentes de hibridación bajo condiciones de hibridación. Si un ácido nucleico diana particular está presente en la reacción, los oligonucleótidos de la sonda correspondiente se hibridan con la secuencia diana, por tanto son consumidos. Los oligonucleótidos consumidos ya no están disponibles para participar en la formación de la porción bicatenaria de la sonda. En el análisis de perfiles de fusión, la sonda consumida puede verse como un pico reducido o ausente.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:

25 (a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción de amplificación que comprende:

30 (i) uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos directos/inversos, en el que los pares de cebadores pueden amplificar uno o más ácidos nucleicos diana, si están presentes en la muestra,

(ii) dos o más sondas, en el que cada sonda comprende:

35 un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y

40 al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

45 en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y

en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles,

50 en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes, y son distinguibles en un análisis de perfiles de fusión;

55 (b) realizar una reacción de amplificación en la muestra/mezcla de reacción de amplificación en la que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana se hibridan con la secuencia diana, por tanto son consumidos durante la reacción de amplificación;

60 (c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de sondas sin consumir detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,

en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana ha sido amplificado o no en dicha muestra/mezcla de reacción de amplificación,

65 en el que una primera sonda de dichas al menos dos de las sondas tiene una temperatura de fusión T_{m1} en términos de su porción bicatenaria,

en el que una segunda sonda de dichas al menos dos de las sondas tiene una temperatura de fusión T_{m2} en términos de su porción bicatenaria,

en el que $T_{m1} > T_{m2}$,

en el que las mismas marcas están independientemente unidas a la primera y segunda sondas, en el que una reducción de cualquier pico de fusión en T_{m1} y/o T_{m2} proporciona indicación de consumo de la primera y/o segunda sonda(s).

Preferentemente, el procedimiento anterior incluye la etapa (d):

(i) comparar al menos dos perfiles de fusión obtenidos en (c)

y/o

(ii) comparar un perfil de fusión obtenido en la etapa (c)

con un perfil de fusión previamente obtenido de las mismas sondas o

con un perfil de fusión de las mismas sondas obtenido en paralelo al mismo tiempo en reacciones de control, o

con un perfil de fusión teórico de las mismas sondas

en el que un cambio en el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana ha sido amplificado o no en dicha muestra/mezcla de reacción de amplificación.

La reacción de amplificación puede ser cualquier procedimiento de amplificación tal como PCR, SDA, NASBA, LAMP, 3SR, ICAN, TMA, amplificación isotérmica de ADN dependiente de helicasa y similares. La PCR es un procedimiento de amplificación preferido.

La mezcla de reacción de amplificación comprenderá reactivos de amplificación convencionales. Los reactivos de amplificación pueden clasificarse convenientemente en cuatro clases de componentes: (i) un tampón acuoso, que frecuentemente incluye sin limitación una sal de magnesio, (ii) sustratos de amplificación tales como ADN o ARN, (iii) uno o más cebadores de oligonucleótidos (normalmente dos cebadores para cada secuencia diana, definiendo las secuencias los extremos 5' de las dos cadenas complementarias de la secuencia diana bicatenaria cuando se emplea PCR), y (iv) una enzima de amplificación tal como una polimerasa de polinucleótido (por ejemplo, Taq polimerasa para PCR o ARN polimerasa para TMA), o una ligasa. Generalmente también se requerirán trifosfatos de nucleósido apropiados. Reactivos o aditivos adicionales también pueden incluirse a discreción del experto, y la selección de estos reactivos está dentro de la experiencia del experto habitual. Por supuesto, cuando los reactivos de amplificación se usan para producir tanto transcripción inversa como amplificación, entonces los reactivos de transcripción inversa también están incluidos en los reactivos de amplificación. La selección de reactivos de amplificación, según el procedimiento de reacción de amplificación usado, está dentro de la experiencia del experto habitual.

En los procedimientos descritos en el presente documento se proporciona una muestra de la que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana o la variante de nucleótido de interés. El ácido nucleico diana contenido en la muestra puede ser ADN genómico bicatenario o ADNc, si fuera necesario, que luego se desnaturaliza usando cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado que incluye medios físicos, químicos o enzimáticos que son conocidos para aquellos expertos en la materia. Un medio físico preferido para la separación de cadenas implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturalice completamente (>99%). La desnaturalización por calor típica implica temperaturas que oscilan de aproximadamente 80°C a aproximadamente 105°C, durante tiempos que oscilan de algunos segundos a minutos. Como una alternativa a la desnaturalización, el ácido nucleico diana puede existir en una forma monocatenaria en la muestra, tal como ARN monocatenario o virus de ADN.

Entonces, las cadenas de ácido nucleico desnaturalizadas se incuban con cebadores de oligonucleótidos y sondas bajo condiciones de hibridación, es decir, condiciones que permiten la unión de los cebadores o sondas a las cadenas de un único ácido nucleico. En algunas realizaciones de la invención, los cebadores y/o sondas hibridados se extienden por un agente de polimerización. La extensión dependiente del molde del (de los) cebador(es) de oligonucleótidos se cataliza por un agente de polimerización en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), o análogos de éstos, como se trata anteriormente, en un medio de reacción que comprende sales apropiadas, cationes metálicos y sistema de tamponamiento del pH. Agentes de polimerización adecuados son enzimas que se sabe que catalizan la síntesis de ADN dependiente de cebadores y molde. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con estas ADN polimerasas son muy conocidas en la técnica. Las sondas son consumidas durante la amplificación.

Un cebador de amplificación puede ser un cebador específico de diana que comprende una porción de cebador de 3'

- que es complementaria a una región deseada de ácido nucleico diana. Un cebador de amplificación también puede ser un cebador universal que tiene una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una porción universal de 5' de cebadores específicos de diana. Una reacción puede contener múltiples cebadores para la amplificación de múltiples secuencias diana. Las porciones universales de 5' de los múltiples cebadores pueden tener esencialmente la misma composición de secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a la porción de cebado de 3' del cebador de amplificación universal. Preferentemente, los cebadores son cebadores de ADN, particularmente aquellos adecuados para amplificación por PCR.
- Para genotipar SNP o detectar nucleótidos variantes, el cebador de amplificación puede ser un cebador específico de alelo, en el que un nucleótido terminal del cebador está seleccionado para ser tanto complementario con el nucleótido de variante sospechoso como con el nucleótido normal correspondiente de forma que se sintetice un producto de extensión de cebador cuando el cebador se hibrida con la región de diagnóstico que contiene un nucleótido particular, pero tal producto de extensión no se sintetiza cuando el cebador se hibrida con la región de diagnóstico que no contiene nucleótido particular de la secuencia de ácidos nucleicos diana.
- Pares de cebadores de cebadores directos e inversos están incluidos en la mezcla de reacción de amplificación de forma que, si un ácido nucleico diana está presente en la muestra, los pares de cebadores pueden amplificar ese ácido nucleico diana, preferentemente de un modo exponencial.
- En algunas realizaciones habrá 1-50, 1-25, 1-20 ó 1-10 pares de cebadores en la mezcla de reacción. En otras realizaciones habrá 5-50, 5-25, 5-20 ó 5-10 pares de cebadores en la mezcla de reacción. Como se ha mencionado anteriormente, el cebador directo o inverso en un par de cebadores particular podría ser un cebador universal que es común a más de un par de cebadores.
- La mezcla de reacción de amplificación comprende dos o más sondas. Cada sonda comprende un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria.
- El primer oligonucleótido debe poder unirse, bajo condiciones de hibridación apropiadas, a parte de al menos uno de los ácidos nucleicos diana. Preferentemente, cada primer oligonucleótido es específico a parte de sólo uno de los ácidos nucleicos diana. El primer oligonucleótido tendrá una primera región cuya secuencia de nucleótidos es complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos de parte de uno de los ácidos nucleicos diana. La longitud de esta primera región complementaria tiene preferentemente 6-100 nucleótidos, más preferentemente 15-30 nucleótidos.
- La longitud global del primer oligonucleótido tiene preferentemente 15-150 nucleótidos, más preferentemente 17 a 100 nucleótidos, y lo más preferentemente 20-80 nucleótidos.
- En algunas realizaciones, cuando la reacción implica la extensión o amplificación de cebadores, la parte del ácido nucleico diana con la que el primer oligonucleótido es complementario debe encontrarse dentro de o solaparse con la secuencia que va a amplificarse por los cebadores directos e inversos. Alternativamente, el primer oligonucleótido puede ser uno de los cebadores de amplificación, por ejemplo, tanto el cebador directo como el inverso. En algunas realizaciones, el primer y/o segundo oligonucleótido no es un cebador directo o inverso.
- El segundo oligonucleótido comprende una región que es sustancialmente complementaria a una segunda región del primer oligonucleótido. La longitud de esta segunda región tiene preferentemente 4-100 nucleótidos, más preferentemente 15-30 nucleótidos. La segunda región del primer oligonucleótido puede o puede no solaparse con la primera región del primer oligonucleótido.
- La longitud global del segundo oligonucleótido es preferentemente 6-150 nucleótidos, más preferentemente 10 a 100 nucleótidos, y lo más preferentemente 12-80 nucleótidos.
- El primer y segundo oligonucleótidos pueden comprender 1-5 ó 1-10 o más nucleótidos que no son complementarios al ácido nucleico diana o al primer oligonucleótido, respectivamente, en el extremo 5' o 3'.
- La sonda de oligonucleótidos puede comprender nucleótidos, derivados de nucleótidos, análogos de nucleótidos y/o restos químicos de no nucleótido. Las modificaciones de la sonda que pueden facilitar la unión a sonda incluyen, pero no se limitan a, la incorporación de enlaces fosfodiéster positivamente cargados o neutros en la sonda para reducir la repulsión de los esqueletos polianiónicos de la sonda y diana (véase Letsinger y col., 1988, J. Amer. Chem. Soc. 110:4470); la incorporación de bases alquiladas o halogenadas tales como 5-bromouridina en la sonda para aumentar el apilamiento de bases; la incorporación de ribonucleótidos en la sonda para forzar al dúplex de sonda:diana a una estructura "A" que ha aumentado el apilamiento de bases; y la sustitución de 2,6-diaminopurina

(aminoadenosina) para algunas o todas las adenosinas en la sonda; la incorporación de derivados de nucleótidos tales como LNA (ácido nucleico bloqueado), PNA (ácido nucleico peptídico) o similares.

5 Generalmente, el extremo 3' de la sonda estará "bloqueado" para prohibir la incorporación de la sonda en un producto de extensión de cebador. Pero en algunas realizaciones preferidas de la presente invención, algunas sondas también están trabajando de cebadores y, por tanto, no están bloqueadas en el extremo 3'. El "bloqueo" puede lograrse usando bases no complementarias o añadiendo un resto químico tal como biotina o un grupo fosfato al hidroxilo de 3' del último nucleótido que puede, dependiendo del resto seleccionado, servir a un fin doble actuando también de marca para la posterior detección o captura del ácido nucleico unido a la marca. El bloqueo también puede lograrse eliminando 3'-OH o usando un nucleótido que carece de 3'-OH tal como un didesoxinucleótido.

Será fácilmente entendido que el término "sonda" se refiere a una pluralidad de ese tipo de sondas, es decir, la mezcla de reacción no comprende simplemente una única molécula de esa sonda.

15 En algunas realizaciones de la invención, la primera región de dicho primer oligonucleótido no se solapa ni se solapa sustancialmente con la segunda región de dicho primer oligonucleótido.

En otras realizaciones de la invención, la primera región del primer oligonucleótido está solapándose sustancialmente con la segunda región de dicho primer oligonucleótido o la segunda región está incorporada dentro de la primera región. En tales realizaciones, la T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con la secuencia diana es preferentemente superior a la T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con el segundo oligonucleótido de forma que si una diana está presente, el primer oligonucleótido forma híbridos más fuertes con la diana y, por consiguiente, funde a una mayor temperatura que el dúplex del primer/segundo oligonucleótido.

25 Preferentemente, dicha T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con la secuencia diana es al menos 2 grados o al menos 5 grados superior a la T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con el segundo oligonucleótido.

30 En otras realizaciones, el primer oligonucleótido puede comprender una tercera región que es idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia de un cebador que se usa en la amplificación.

La sonda usada en la presente invención puede formar una porción bicatenaria. Debido a esta porción bicatenaria, la sonda tiene una temperatura de fusión T_m y un perfil de fusión firma. En particular, una mezcla de múltiples sondas de la presente invención también tiene un perfil de fusión firma.

35 La temperatura de fusión (T_m) está afectada por varios factores que incluyen, pero no se limitan a, concentración de sales, concentración de ADN y la presencia de desnaturizantes, secuencia de ácidos nucleicos, contenido de GC y longitud. Normalmente, cada sonda de ácidos nucleicos bicatenarios tiene una T_m única. A una temperatura inferior a una T_m dada, al menos el 50% del dúplex de ácido nucleico sigue en forma de dúplex. Por el contrario, a una temperatura superior a una T_m dada, se espera que más del 50% de los dúplex de ácido nucleico se desenrollen en dos cadenas de oligonucleótido monocatenarias.

40 La T_m de cualquier fragmento de ADN dado puede determinarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento en la materia para determinar una T_m de un fragmento de ADN es usar una celda termostática en un espectrofotómetro ultravioleta y medir la absorbancia a 268 nm a medida que la temperatura aumenta lentamente. Se representa la absorbancia frente a la temperatura, presentando una curva con forma de S con dos mesetas (véase la figura 1, por ejemplo). La lectura de absorbancia a la mitad de camino entre las dos mesetas se corresponde con la T_m del fragmento. Alternativamente se representa la primera derivada negativa de la absorbancia frente a la temperatura, presentando una curva de distribución normal. El pico de la curva normal se corresponde con la T_m del fragmento.

45 La T_m de una sonda o T_m de una mezcla de múltiples sondas también puede determinarse por el procedimiento del vecino más próximo y determinarse de forma ajustada o con exactitud en presencia de un colorante de ADN bicatenario o marcas sobre la sonda en una única reacción. Por ejemplo, una mezcla de reacción que contiene una sonda y tampón apropiado se calienta desde una temperatura de hibridación hasta la temperatura de desnaturalización total a una tasa de 0,01°C a 3°C por segundo. Al mismo tiempo, la mezcla es iluminada con luz a una longitud de onda absorbida por el colorante (marca) y la emisión del colorante (marca) se detecta y se registra como una lectura de emisión. La primera derivada negativa de la lectura de emisión con respecto a la temperatura se representa contra la temperatura para formar varias curvas normales, y cada pico de la curva se corresponde con la T_m real de la sonda. La curva también se muestra como "perfil de fusión" o "perfil de hibridación/disociación". La T_m o perfil de fusión de una sonda también puede estimarse por un programa informático basado en teoría muy conocido en la técnica.

60 Para una detección de múltiplex, los conjuntos de múltiples sondas para múltiples secuencias diana están incluidas en una reacción. En una realización, las diferentes sondas en un conjunto de sondas pueden comprender las

mismas marcas o marcas con espectros de emisión indistinguibles. Cada sonda en un conjunto tal debe tener diferentes T_m , permitiendo así que los perfiles de fusión individuales se distingan entre sí. Mientras que la sonda individual tiene un perfil de fusión, la mezcla de las sondas múltiples en el conjunto tiene el perfil de fusión que es característico para el conjunto de las sondas.

5 Según la presente invención, múltiples loci de una secuencia de ácidos nucleicos diana pueden analizarse en un único recipiente diseñando conjuntos de sondas que se hibridan con diferentes loci genéticos y las sondas tienen diferentes temperaturas de fusión en términos de los dúplex internos de la sonda. Si una secuencia diana está presente, su sonda correspondiente es consumida. La secuencia del loci diana puede luego determinarse basándose en la comparación del perfil de fusión de las sondas restantes con el perfil de fusión de sondas antes de la reacción. Ventajosamente, las diferentes sondas en un conjunto pueden unirse a la misma marca, permitiendo monitorizar a una única longitud de onda de emisión. En una realización, cada sonda en el conjunto está unida a las mismas marcas, por ejemplo, un par de transferencia de energía fluorescente o par de extinción por contacto y, más particularmente, una primera marca que es un fluoróforo y una segunda marca que es un extintor. Por otra parte, los múltiples conjuntos de sondas pueden unirse a diferentes pares de marcas de manera que los conjuntos de sondas puedan distinguirse entre sí basándose en espectros de emisión distinguibles.

20 Según una realización, el procedimiento de analizar múltiples dianas usa una mezcla de sondas que están unidas con diferentes marcas que tienen espectros de emisión distinguibles, además de sondas que están unidas a marcas que tienen espectros de emisión solapantes, pero son distinguibles basándose en diferencias en temperaturas de fusión de las porciones bicatenarias internas de las sondas.

25 La sonda comprende un primer oligonucleótido, en el que dicho primer oligonucleótido comprende una primera región sustancialmente complementaria a un ácido nucleico diana (véase, por ejemplo, la figura 4). En una realización, la sonda comprende un primer oligonucleótido y al menos un segundo oligonucleótido (véanse, por ejemplo, las figuras 4A-J). El primer oligonucleótido comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a un ácido nucleico diana, y una segunda región que es sustancialmente complementaria a un segundo(s) oligonucleótido(s) de forma que el primer oligonucleótido y el (los) segundo(s) oligonucleótido(s) pueden unirse juntos para formar una porción bicatenaria. La primera región y la segunda región pueden disponerse en cualquier orden, tal como 5' a 3' o 3' a 5' (véase, por ejemplo, la figura 4A) o uno expresarse dentro de otro (véase, por ejemplo, la figura 4B). Se prefiere que si el primer oligonucleótido sirve de cebador, la primera región y segunda región estén dispuestas en un orden como 3' a 5' (véase, por ejemplo, la figura 4A).

35 En un aspecto, la primera región de dicho primer oligonucleótido no es solapante o no es sustancialmente solapante con la segunda región de dicho primer oligonucleótido (véase, por ejemplo, la figura 4A). En otras palabras, la primera región es complementaria a una secuencia diana, mientras que la segunda región puede no ser complementaria a la secuencia diana. Cuando la segunda región no es complementaria a la secuencia diana, diferentes sondas pueden tener la secuencia de la segunda región idéntica o sustancialmente idéntica y el mismo segundo oligonucleótido puede compartirse entre diferentes sondas en el conjunto de sondas. Mientras que los segundos oligonucleótidos pueden ser iguales entre el conjunto de sondas, las segundas regiones de los primeros oligonucleótidos de diferentes sondas en el conjunto pueden tener la diferencia de longitud y/o de secuencia de nucleótidos de forma que la T_m y el perfil de fusión de las sondas sean diferentes.

45 En otro aspecto, la primera región de dicho primer oligonucleótido está solapándose sustancialmente con la segunda región de dicho primer oligonucleótido, o la segunda región está incorporada en la primera región (véase, por ejemplo, la figura 4B), en la que T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con la secuencia diana es superior a la T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con el segundo oligonucleótido de forma que si una diana está presente, la diana forma híbridos más fuertes con el primer oligonucleótido de la sonda y, por consiguiente, el dúplex de la diana/primer oligonucleótido funde a una mayor temperatura que el dúplex del segundo oligonucleótido/primer oligonucleótido. En este aspecto, la primera región puede ser más larga que la segunda región o la segunda región puede comprender nucleótidos de desapareamiento cuando se hibridan con el segundo oligonucleótido. La unión del primer oligonucleótido al ácido nucleico diana previene que el segundo oligonucleótido se una al primer oligonucleótido de la sonda. Se prefiere que la T_m del híbrido de dicho primer oligonucleótido y la secuencia diana sea al menos 2 grados superior a la T_m del híbrido de dicho primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido. Es más preferido que la T_m del híbrido del dicho primer oligonucleótido y la secuencia diana sea al menos 5 grados superior a la T_m del híbrido de dicho primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido.

60 En otro aspecto más, el primer oligonucleótido comprende una tercera región que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia del cebador (véanse, por ejemplo, las figuras 4C y E). La tercera región puede ser complementaria o no complementaria a la secuencia diana. Múltiples sondas en un conjunto de sondas pueden comprender la misma secuencia de la tercera región. La secuencia de la primera región idéntica a la tercera región puede actuar de cebador de amplificación universal. Cuando va quedando poca sonda específica de diana (que actúa de cebador) en varios ciclos de amplificación, el cebador universal puede relevarse y pasar a los siguientes ciclos de amplificación.

65 En algunas realizaciones de la invención, el primer y segundo oligonucleótidos están ligados por un resto de ligador.

- Este resto de ligador puede comprender nucleótidos, derivados de nucleótidos, análogos de nucleótidos o un enlace químico no nucleotídico, es decir, el primer y segundo oligonucleótidos podrían ser un único estiramiento de oligonucleótidos contiguos (figura 4K). En esta realización, la sonda puede entenderse que comprende un primer oligonucleótido sólo (véase, por ejemplo, la figura 4K) que comprende regiones auto-complementarias que pueden formar estructura de tallo-bucle, en la que dichas regiones auto-complementarias son sustancialmente complementarias entre sí que forman la porción bicatenaria de la sonda. La parte de tallo puede localizarse en cualquier parte del oligonucleótido y tiene una longitud de 4 a 20 nucleótidos. La parte de 3' del oligonucleótido es preferentemente complementaria a la secuencia diana. Puede tener un extremo romo, o extremo que sobresale por 3' o extremo que sobresale por 5'. El extremo romo, o extremo que sobresale por 3', es la forma preferida.
- El primer oligonucleótido de la sonda puede consumirse durante la amplificación. Alternativamente, tanto el primer como segundo oligonucleótidos pueden consumirse durante la amplificación. Se prefiere que el primer oligonucleótido se diseñe para ser consumido, mientras que el segundo oligonucleótido pueda permanecer invariable en una reacción.
- El primer oligonucleótido de la sonda puede ser extensible, haciendo así de cebador. Alternativamente, el primer oligonucleótido se bloquea en el extremo 3' y el segundo oligonucleótido se bloquea en el extremo 3', siendo así no extensible.
- Cada sonda comprende una marca detectable que puede producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda.
- Además, al menos dos de las sondas comprenden la(s) misma(s) marca(s) detectable(s) o diferente(s) marca(s) detectable(s) con espectros de emisión indistinguibles.
- La marca sobre la sonda puede ser un fluoróforo, o la sonda puede comprender un par interactivo de marcas, por ejemplo, colorantes fluoróforos y/o no fluoróforos. Un ejemplo de tales marcas interactivas es un par de fluoróforo-extintor. La marca sobre la sonda puede localizarse en cualquier parte en tanto que interaccione con otras marcas u otras entidades tales como nucleótidos G.
- En algunas realizaciones, el primer oligonucleótido comprende una primera marca y el segundo oligonucleótido comprende una segunda marca. Preferentemente, la primera marca es un fluoróforo y la segunda marca es un extintor, o viceversa.
- En otras realizaciones, la sonda comprende dos marcas, siendo las marcas un par de FRET. Preferentemente, una marca está sobre el primer oligonucleótido y la segunda marca está sobre el segundo oligonucleótido.
- Adicionalmente, tanto el primer como el segundo oligonucleótidos también pueden comprender una pluralidad de restos de marca. Por ejemplo, tanto el primer oligonucleótido como el segundo oligonucleótido pueden comprender tanto un fluoróforo como un extintor.
- Normalmente, el fluoróforo y el extintor están unidos a los oligonucleótidos de forma que cuando el primer oligonucleótido está unido a una secuencia de molde sin marca (por ejemplo, una diana), el fluoróforo y el extintor se separan.
- Alternativamente, el fluoróforo y el extintor están unidos a los oligonucleótidos de forma que cuando el primer oligonucleótido está unido a una secuencia de molde sin marcar (por ejemplo, una diana), el fluoróforo y el extintor se ponen en estrecha proximidad y de ahí que se active el fluoróforo.
- “Fluoróforo” como se usa en el presente documento se refiere a un resto que absorbe energía de la luz a una longitud de onda de excitación definida y emite energía de luz a una longitud de onda definida diferente.
- Ejemplos de marcas de fluorescencia incluyen, pero no se limitan a: colorantes Alexa Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660 y Alexa Fluor 680), colorantes AMCA, AMCA-S, BODIPY (BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665), carboxirodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), Cascade Blue, Cascade Yellow, colorantes de cianina (Cy3, Cy5, Cy3.5, Cy5.5), dansilo, dapoxilo, dialquilaminocumarina, 4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína, DM-NERF, eosina, eritrosina, fluoresceína, FAM, hidroxycumarina, IRDyes (IRD40, IRD 700, IRD 800), JOE, lisamina rodamina B, azul marino, metoxicumarina, naftofluoresceína, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, PyMPO, pireno, rodamina 6G, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Rhodol Green, 2',4',5',7'-tetrabromosulfona-fluoresceína, tetrametil-rodamina (TMR), carboxitetrametilrodamina (TAMRA), Texas Red y Texas Red-X.
- Como se usa en el presente documento, el término “extintor” incluye cualquier resto que pueda absorber la energía de una marca fluorescente excitada cuando se localiza en estrecha proximidad a la marca fluorescente y que puede

disipar esa energía. Un extintor puede ser un extintor fluorescente o un extintor no fluorescente, que también se denomina un extintor oscuro. Los fluoróforos enumerados anteriormente pueden desempeñar una función de extintor si se ponen en proximidad a otro fluoróforo, pudiendo producirse tanto la extinción de FRET como la extinción por contacto. Se prefiere que se use un extintor oscuro que no emite ninguna luz visible. Ejemplos de extintores oscuros incluyen, pero no se limitan a, DABCYL (éster succinimidílico de ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico), ácido diarilrodaminacarboxílico, éster succinimidílico (QSY-7) y ácido 4',5'-dinitrofluoresceincarboxílico, éster succinimidílico (QSY-33), extintor, o "extintores de agujero negro" ("Black hole quenchers") (BHQ-1, BHQ-2 y BHQ-3), análogos de nucleótidos, residuos de nucleótidos G, nanopartículas y partículas de oro.

El par de marcado interactivo puede formar tanto una relación de FRET como de extinción por contacto. Se prefiere que para la extinción de contacto eficaz los fluoróforos y el extintor estén a una distancia de aproximadamente 0-10 nucleótidos. Es más preferido que los fluoróforos y el extintor estén a una distancia de aproximadamente 0-5 nucleótidos. Es más preferido que los fluoróforos y el extintor estén a una distancia de aproximadamente 0-2 nucleótidos. El extintor es preferentemente una entidad no fluorescente. El extintor puede ser una nanopartícula. Una nanopartícula puede ser una nanopartícula de oro. También es posible que el extintor sea un residuo de G o múltiples residuos de G.

La marca o combinación de marcas sobre cada sonda pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda. Por tanto, puede observarse que la función de la marca sea facilitar la determinación de si el primer oligonucleótido está unido al segundo oligonucleótido o al ácido nucleico diana, y en particular si el primer oligonucleótido está unido o no al segundo oligonucleótido.

Al menos una marca está unida al primer oligonucleótido o al segundo oligonucleótido. La marca tanto aumenta como disminuye la emisión de fluorescencia cuando el primer oligonucleótido está unido al segundo oligonucleótido.

Preferentemente, la sonda comprende una primera marca y una segunda marca, en el que al menos una marca puede producir una señal detectable y en el que la intensidad de la señal está afectada por la proximidad de las dos marcas.

En algunas realizaciones de la invención, la primera marca está unida a una cadena de la porción bicatenaria y la segunda marca está unida a la cadena opuesta de la porción bicatenaria de la sonda de forma que dicha primera marca y segunda marca están en estrecha proximidad cuando se forma el dúplex interno de la sonda.

En otras realizaciones, la primera marca está unida al primer oligonucleótido y la segunda marca está unida al segundo oligonucleótido de forma que dicha primera marca y segunda marca están en estrecha proximidad cuando se forma el dúplex interno de la sonda.

En algunas realizaciones de la invención, el primer oligonucleótido no comprende una marca. En otras realizaciones, el segundo oligonucleótido comprende una única marca que puede cambiar la emisión de fluorescencia cuando se hibrida con el primer oligonucleótido.

En algunas realizaciones, la primera marca está unida al primer oligonucleótido y la segunda marca está unida al segundo oligonucleótido de forma que dicha primera marca y segunda marca están en estrecha proximidad cuando se forma el dúplex interno de la sonda. Preferentemente, la primera marca está unida a la segunda región del primer oligonucleótido y la segunda marca está unida a la región del segundo oligonucleótido que es complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido de forma que la primera y segunda marcas se ponen en estrecha proximidad tras la formación del dúplex interno de la sonda. Ejemplos de tales realizaciones se muestran en las figuras 4A, 4B y 4C.

En algunos aspectos de la invención, el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca, pero el segundo oligonucleótido de la sonda comprende al menos una, preferentemente dos, marcas.

En una realización de este aspecto, el segundo oligonucleótido comprende una primera marca y una segunda marca. La primera marca está unida en o próxima a un extremo del segundo oligonucleótido y la segunda marca está unida en o próxima al otro extremo del segundo oligonucleótido, por lo que cuando el segundo oligonucleótido no se hibrida con el primer oligonucleótido, el segundo oligonucleótido está en una estructura de espiral al azar o de tallo-bucle que pone la primera marca y la segunda marca en estrecha proximidad. Cuando el segundo oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido, las dos marcas se mantienen alejadas entre sí. Ejemplos de tales realizaciones se muestran en las figuras 4D, 4E y 4F.

Como se conoce en la técnica anterior, un oligonucleótido doblemente marcado (equivalente al segundo oligonucleótido en la presente invención) puede formar una estructura de espiral al azar cuando está en forma monocatenaria y a ciertas temperaturas permisibles. Este tipo de sondas de oligonucleótidos lineales en disolución se comporta como una espiral al azar: sus dos extremos se aproximan ocasionalmente, produciendo un cambio medible en la transferencia de energía. Sin embargo, cuando la sonda se une a su molde, el híbrido sonda-molde

obliga a los dos extremos de la sonda a separarse, rompiendo la interacción entre los dos restos terminales y, por tanto, produciendo un cambio de emisión de fluorescencia.

5 Un oligonucleótido doblemente marcado también puede formar una estructura de tallo-bucle conocida como baliza molecular. Las sondas de baliza molecular son sondas de ácido oligonucleico monocatenarias que pueden formar una estructura de horquilla en la que un fluoróforo y un extintor están normalmente dispuestos en los extremos opuestos del oligonucleótido. En cualquier extremo de la sonda, secuencias complementarias cortas permiten la formación de un tallo intramolecular, que permite que el fluoróforo y el extintor se pongan en estrecha proximidad. La porción de bucle de la baliza molecular es complementaria a un ácido nucleico diana de interés. La unión de esta
10 sonda a su ácido nucleico diana de interés forma un híbrido que obliga al tallo a separarse. Esto produce un cambio de conformación que separa el fluoróforo y el extintor entre sí y conduce a una señal de fluorescencia más intensa (Tyagi S. y Kramer F. R., Nature Biotechnology, vol. 14, páginas 303-308 (1996); Tyagi y col., Nature Biotechnology, vol. 16, páginas 49-53(1998); Piatek y col., Nature Biotechnology, vol. 16, páginas 359-363 (1998); Marras S. y col., Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, vol. 14, páginas 151-156 (1999); Tpp I. y col., BioTechniques, vol 28, páginas 732-738 (2000)).
15

En la presente invención, un tipo de los segundos oligonucleótidos, que puede ser un oligonucleótido similar a baliza molecular, es parte de una porción bicatenaria de una sonda. Las diferencias de la presente invención de las tecnologías de la técnica anterior son que el segundo oligonucleótido puede no hibridarse con la secuencia diana, pero sí con la segunda región del primer oligonucleótido que puede estar sin relacionar con la secuencia diana. El segundo oligonucleótido puede hibridarse con la secuencia diana, pero está diseñado de forma que no pueda hibridarse con la secuencia diana en una reacción de amplificación real. El segundo oligonucleótido puede contener la secuencia que es incapaz de unirse a una secuencia diana fuertemente. Durante una etapa de amplificación por extensión e hibridación, la temperatura puede ser demasiado alta para que el segundo oligonucleótido se hibride con la secuencia diana. Aunque durante la etapa de recogida de señales, que frecuentemente se lleva a cabo después de una etapa de extensión, la temperatura puede ser baja, pero la secuencia diana puede no estar disponible para hibridarse con el segundo oligonucleótido, ya que la secuencia diana que va a amplificarse puede volverse bicatenaria debido a que ya ha tenido lugar la extensión del cebador de amplificación. Por tanto, durante la etapa de recogida de señales, el segundo oligonucleótido puede sólo poder hibridarse con el primer oligonucleótido sin consumir de la sonda.
20
25
30

En otro aspecto, el primer oligonucleótido no comprende una marca y el segundo oligonucleótido comprende una marca. Cuando el segundo oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido para formar la porción bicatenaria de la sonda, la marca cambia su emisión de señales detectables con respecto a la emisión de la marca cuando está en la forma monocatenaria del segundo oligonucleótido. Esto puede ser debido tanto a que la marca se pone en estrecha proximidad con un nucleótido o nucleótidos en el primer oligonucleótido como a que la marca se mantiene alejada de un nucleótido o nucleótidos en el segundo oligonucleótido.
35

Se conoce en la técnica anterior que la emisión de un colorante de fluorescencia puede cambiarse cuando está en estrecha proximidad a ciertos nucleótidos, por ejemplo, un nucleótido G.
40

En otras realizaciones, el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca y la sonda comprende dos segundos oligonucleótidos que pueden hibridarse adyacentemente o sustancialmente adyacentemente con diferentes partes de la segunda región del primer oligonucleótido, en el que uno de los segundos oligonucleótidos está unido a una primera marca y el otro segundo oligonucleótido está unido a una segunda marca, de forma que cuando los dos segundos oligonucleótidos se hibridan con el primer oligonucleótido, las dos marcas se ponen en estrecha proximidad y una marca afecta a la señal de la otra.
45

Esta estrecha proximidad puede producir, por ejemplo, tanto relación de FRET como de extinción por contacto. Los dos segundos oligonucleótidos que se hibridan con el primer oligonucleótido son parte de la sonda. Los dos segundos oligonucleótidos marcados se diseñan para no hibridarse con la secuencia diana amplificada, pero para hibridarse con el primer oligonucleótido sin consumir. Ejemplos de tales realizaciones se facilitan en las figuras 4I y 4J.
50

En aún otras realizaciones, el primer y segundo oligonucleótidos de una sonda están unidos por un resto de ligador que comprende nucleótidos o un ligador químico de no nucleótidos, permitiendo que el primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido formen una estructura de tallo-bucle, en el que el primer y segundo oligonucleótidos están cada uno marcados de forma que, cuando la sonda forma una estructura de tallo-bucle interno, las marcas se pongan en estrecha proximidad y una marca afecte la señal de la otra.
55

El ligador puede ser, por ejemplo, un simple resto de fórmula $(CH_2)_n$ o un ligador que es funcionalmente equivalente al mismo (n es preferentemente 1-100 ó 1-50). Preferentemente, el ligador es un oligonucleótido que es contiguo al primer y segundo oligonucleótidos.
60

Al menos dos de las sondas en la mezcla de reacción de amplificación comprenden la misma marca detectable o una marca detectable diferente con espectros de emisión indistinguibles.
65

- En las reacciones de múltiplex, dos o más sondas se usan para ensayar la presencia de dos o más ácidos nucleicos diana. Sin embargo, esto no significa necesariamente que diferentes marcas distinguibles sean necesarias para cada una de las diferentes sondas. Cada sonda tendrá un perfil de fusión característico que dependerá de las características de su dúplex interno. Por tanto, siempre que dos o más sondas tengan características de fusión distinguibles, la(s) misma(s) marca(s) puede(n) usarse para aquellas sondas. En otras palabras, diferentes sondas que se marcan con las mismas marcas o marcas que tienen espectros de emisión indistinguibles deben tener características de fusión diferentes, preferentemente temperaturas de fusión (T_m) diferentes. Estas características de fusión diferentes permitirán identificar y/o cuantificar las sondas individuales en la etapa (c).
- Como se usa en el presente documento, el término "características de fusión" incluye el perfil de fusión de una sonda (preferentemente medida detectando la señal de la(s) marca(s) sobre esa sonda en función de la temperatura) y/o la temperatura de fusión (T_m) de una sonda.
- Cuando las características de fusión de las sondas se dice que son "diferentes", se entenderá que las diferencias deben medirse bajo las mismas condiciones o condiciones de control.
- En algunas realizaciones de la invención, dos o más sondas se marcan con la misma marca detectable. Por ejemplo, los primeros oligonucleótidos de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 ó 30 o más sondas diferentes pueden todos marcarse con la misma marca y/o los segundos oligonucleótidos de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 ó 30 o más sondas diferentes pueden todos marcarse con la misma marca.
- En la etapa (b) se realiza una reacción de amplificación en la muestra/mezcla de reacción de amplificación en la que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana son consumidos durante la reacción de amplificación.
- La reacción de amplificación puede llevarse a cabo en condiciones conocidas en la técnica de forma que sean consumidos los primeros oligonucleótidos que son sustancialmente complementarios a parte del ácido nucleico diana.
- Preferentemente, la amplificación comprende al menos una etapa de desnaturalización, al menos una etapa de hibridación y al menos una etapa de extensión de cebador.
- Más preferentemente, la amplificación es una amplificación por ciclado térmico que comprende dos o más etapas de desnaturalización, hibridación y extensión de cebador.
- Reacciones de amplificación preferidas incluyen PCR, SDA, NASBA, LAMP, 3SR, ICAN, TMA, amplificación isotérmica de ADN dependiente de helicasa y similares. La PCR es un procedimiento de amplificación preferido. Si la amplificación es PCR, las condiciones comprenden ciclar térmicamente la reacción.
- Cuando un ácido nucleico diana está presente en la muestra, al menos algunos de los primeros oligonucleótidos que son complementarios a parte de los ácidos nucleicos diana se hibridarán con los mismos bajo condiciones de reacción apropiadas. Por tanto, se consumirán los primeros oligonucleótidos.
- El consumo de las sondas se logra por hibridación de la sonda con la secuencia diana, que puede ir seguido de incorporación de la sonda en el producto amplificado o/y degradación de la sonda durante la etapa de amplificación. En otras palabras, después del consumo, el primer oligonucleótido ya no puede reconstituir la sonda de la que previamente formó una parte.
- En una reacción de amplificación, la sonda usada en la presente invención puede reconstituirse añadiendo el primer y segundo oligonucleótidos en la reacción a cualquier relación del segundo oligonucleótido con respecto al primer oligonucleótido, por ejemplo, preferentemente superior a 1, o puede ser superior a 0,1 e inferior a 1. Por tanto, el primer y segundo oligonucleótidos pueden añadirse a la mezcla de reacción de amplificación independientemente.
- Dependiendo del tipo de ensayo y el tipo de marca que se use en realidad, la señal de la sonda (por ejemplo, emisión de fluorescencia) puede tanto aumentar como disminuir cuando se consume el primer oligonucleótido. Se hace referencia, por ejemplo, a las realizaciones mostradas en la figura 4. En las figuras 4A-4C, el consumo de la sonda conduce a un aumento en la fluorescencia debido a que se consume el extintor unido al primer oligonucleótido, permitiendo así que el fluoróforo que está unido al segundo oligonucleótido emita su señal. Por el contrario, en las figuras 4D-4F, el consumo del primer oligonucleótido libera el segundo oligonucleótido marcado en el extremo doble permitiendo que el fluoróforo y extintor se yuxtapongan entre sí, conduciendo así a una reducción en la señal del fluoróforo.
- En una realización, el primer oligonucleótido de la sonda es extensible y actúa de cebador directo o inverso. El primer oligonucleótido de la sonda puede ser uno de los cebadores de amplificación, que puede incorporarse en un producto amplificado, consumiéndose así (véase, por ejemplo, la figura 6). En una PCR, el primer oligonucleótido de la sonda se aparea con otro cebador de amplificación para la cadena opuesta para realizar la amplificación. Durante

la etapa de recogida de señales, o la etapa de medir el perfil de fusión de la sonda, el primer oligonucleótido incorporado de la sonda no está disponible para formar el dúplex de la porción bicatenaria interna de la sonda. La cantidad de primer oligonucleótido sin consumir de la sonda que puede formar el dúplex de sonda puede medirse y determinarse, y la señal puede transformarse en la cantidad del primer oligonucleótido que se consume, determinándose así cual o cuánto de la secuencia diana está presente en una muestra. Cuando el primer oligonucleótido actúa de cebador, el segundo oligonucleótido no actúa preferentemente de cebador.

En otra realización de la presente invención, el primer oligonucleótido de la sonda se degrada durante la amplificación. El primer oligonucleótido puede comprender, por ejemplo, nucleótidos o productos químicos de no nucleótido que son sensibles a un agente de digestión. En otro ejemplo, tras la hibridación con la secuencia diana, el primer oligonucleótido puede degradarse por el agente de digestión. Por ejemplo, el primer oligonucleótido puede comprender nucleótidos de ARN. Cuando el primer oligonucleótido se hibrida con la secuencia diana, puede degradarse por enzimas con actividad de RNasa H. Puede diseñarse de forma que el primer oligonucleótido no pueda degradarse cuando hibrida con el segundo oligonucleótido para formar la porción bicatenaria de la sonda. El primer oligonucleótido también puede degradarse por una exonucleasa. Por ejemplo, el nucleótido de 3' del primer oligonucleótido puede degradarse por la actividad de 3' exonucleasa de una polimerasa. El primer oligonucleótido también puede degradarse por una endonucleasa, por ejemplo, por una enzima de restricción tras la hibridación con un ácido nucleico diana.

Se prefiere que el primer oligonucleótido de la sonda se degrade por la actividad de 5' exonucleasa de una ADN polimerasa, tal como ADN polimerasa Taq. En esta realización, el primer oligonucleótido de la sonda puede bloquearse en el extremo 3' y, por tanto, no es extensible. El primer oligonucleótido se hibrida con la secuencia diana en la región unida por los cebadores directos e inversos y puede degradarse por una actividad de nucleasa tal como actividad de 5' exonucleasa de Taq polimerasa durante la amplificación por PCR (véase, por ejemplo, la figura 8). Alternativamente, el primer oligonucleótido de la sonda no se bloquea en el extremo de 3' y de ahí que, por tanto, sea extensible. El primer oligonucleótido se hibrida con la secuencia diana y puede extenderse por una polimerasa. También se extiende un cebador de amplificación en la dirección 5' del primer oligonucleótido. Cuando la extensión del cebador de amplificación encuentra la cadena de extensión del primer oligonucleótido, la cadena de extensión completa del primer oligonucleótido puede degradarse por una actividad de nucleasa, tal como actividad de 5' exonucleasa de Taq polimerasa durante la amplificación por PCR (véase, por ejemplo, la figura 7).

En otra realización más de la presente invención, el consumo del primer oligonucleótido de la sonda puede ser simplemente la hibridación del primer oligonucleótido con la secuencia diana, por lo que el primer oligonucleótido hibridado no está disponible para formar el dúplex bicatenario de la sonda (véase, por ejemplo, la figura 5). Se prefiere que la amplificación se diseñe para producir un producto monocatenario de manera que el primer oligonucleótido de la sonda pueda hibridarse con la secuencia diana durante la etapa de hibridación y/o después de la etapa de extensión. Los procedimientos para producir productos monocatenarios pueden ser PCR asimétrica, o un procedimiento descrito en PCDR (documento PCT/GB2007/003793). La cadena de amplificación monocatenaria puede formar un híbrido fuerte con el primer oligonucleótido; por tanto, el primer oligonucleótido puede considerarse como consumido, ya que no está fácilmente disponible para formar el híbrido de sonda interno.

En otra realización más de la presente invención, el primer oligonucleótido de la sonda desempeña una función como cebador de amplificación interno anidado. El primer oligonucleótido y un cebador de amplificación externo se hibridan con la misma cadena del ácido nucleico diana. El cebador de amplificación externo y el primer oligonucleótido pueden ambos extenderse tras la hibridación con el ácido nucleico diana. La cadena de extensión del primer oligonucleótido puede desplazarse durante la extensión del cebador externo si la ADN polimerasa comprende una actividad de desplazamiento. La cadena de extensión del primer oligonucleótido puede degradarse durante la extensión del cebador externo si la ADN polimerasa comprende una actividad de 5' exonucleasa.

En algunas realizaciones puede diseñarse una condición de amplificación de forma que en algunas etapas de la amplificación, incluso cuando la diana está presente, la sonda no sea consumida, mientras que en otras etapas de la amplificación la sonda sea consumida. Por ejemplo, si la amplificación es PCR, en algunos ciclos térmicos de amplificación, la sonda puede no ser consumida debido a que la temperatura de hibridación y de extensión están fijadas demasiado altas para que la sonda se una. La condición térmica de amplificación puede diseñarse de forma que las sondas puedan consumirse en algunas etapas, o el último ciclo de la amplificación. Por ejemplo, después del ciclado térmico, los recipientes de PCR se incuban a una temperatura que está fijada por debajo de tanto las temperaturas de hibridación como de extensión del ciclado térmico. Esta baja temperatura permite que la sonda se hibride con los ácidos nucleicos diana, produciendo tanto la extensión como la degradación de la sonda hibridada.

La etapa (b) puede comprender adicionalmente la etapa (b1) de medir las emisiones de fluorescencia (EF) ciclo por ciclo a diversas temperaturas de medición (TM). Temperaturas de medición (TM) se refiere a la temperatura a la que una lectura de emisión de la marca en la sonda se toma ciclo por ciclo para determinar la cantidad de emisión de una sonda.

La emisión de una marca sobre la sonda se obtiene, detecta y/o registra preferentemente en cada ciclo en una reacción después de que la mezcla de reacción se ilumine o excite por luz con una longitud de onda absorbida por la

marca. El término “ciclo por ciclo” se refiere a la medida en cada ciclo. La lectura de emisión a una temperatura de medición se toma para calcular la cantidad de emisión de una sonda restante en un ciclo. La emisión puede detectarse, registrarse u obtenerse continuamente o intermitentemente.

5 En un procedimiento de registro continuo, la emisión de la sonda se monitoriza y se registra, por ejemplo, cada 50 ms, cada 100 ms, cada 200 ms o cada 1 s, en cada ciclo de, por ejemplo, una reacción de PCR. Puede formarse una representación tridimensional del tiempo, temperatura y emisión. En cualquier ciclo dado, la lectura de emisión en un momento de tiempo que se corresponde con una T_M deseada se toma para determinar la cantidad de emisión de la sonda en el ciclo. En un procedimiento de registro intermitente, la lectura de emisión se toma sólo cuando la
10 temperatura de reacción alcanza una T_M deseada en cada ciclo.

Para los primeros oligonucleótidos de la sonda que se consumen incorporándolos en el producto amplificado o que se degradan por un agente de digestión, la obtención de las emisiones de fluorescencia (EF) ciclo por ciclo se realiza preferentemente después de completarse la etapa de extensión en cada ciclo. Para los primeros
15 oligonucleótidos de la sonda que son consumidos hibridándose con la secuencia diana, la obtención de las emisiones de fluorescencia (EF) ciclo por ciclo puede realizarse antes de completarse la etapa de extensión en cada ciclo.

Las emisiones de fluorescencia (EF) se usan en el presente documento para referirse a fluorescencia corregida con el nivel inicial (dR). Normalmente, para cada pocillo (reacción) y cada trayectoria óptica, los datos de fluorescencia brutos se ajustan con el intervalo especificado de ciclos usando un algoritmo de mínimos cuadrados lineales (u otro algoritmo tal) para producir un nivel inicial. El valor de la función del nivel inicial se calcula para cada ciclo y se resta de la fluorescencia bruta para producir la fluorescencia corregida con el nivel inicial (dR).

20 Los datos de intensidad de fluorescencia (representaciones de amplificación) pueden describirse como una función de dos componentes: un componente lineal o referencia y un componente exponencial que contiene la información relevante. Para aislar el componente exponencial, la contribución lineal a la fluorescencia puede estimarse y restarse. Es un procedimiento de tres etapas que se lleva a cabo para cada representación de amplificación (es decir, cada reacción y cada marca):

- 30 1. Identificar el intervalo de ciclos durante el que todas las contribuciones a la fluorescencia son estrictamente lineales (aumento no exponencial en la fluorescencia).
- 35 2. Usar los valores de intensidad de fluorescencia durante los ciclos determinados anteriormente, ajustar los datos a una línea recta (una función que predice la contribución de los componentes lineales durante toda la reacción).
3. Restar la intensidad de fluorescencia de referencia predicha durante cada ciclo. La curva resultante se corresponde con el cambio en la fluorescencia debido a la amplificación de ADN.

40 Cuando la mezcla de reacción de amplificación comprende “n” sondas para la detección del múltiplex de “n” dianas de ácido nucleico, la primera sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m1} , la segunda sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m2} , la tercera sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m3} , la k sonda tiene una temperatura de fusión T_{mk} y la n sonda tiene una temperatura de fusión de T_{mn} , en el que $T_{m1} > T_{m2} > T_{m3} > \dots > T_{mk} > T_{mn}$, en el que n y k son números enteros positivos, $1 \leq k \leq n$ y $n \geq 2$.

45 El porcentaje de una forma bicatenaria de sonda de la cantidad total de sondas a una temperatura particular o a series de temperaturas puede determinarse experimentalmente o predecirse, que puede hacerse por un programa informático. Como la primera derivada negativa de una emisión de fusión de sonda con respecto a la temperatura se representa para formar una curva de distribución normal, un experto habitual en el campo de la estadística podría definir fácilmente una T_M a la que un porcentaje del número total de una sonda dada está en forma de dúplex o en
50 forma monocatenaria (es decir, separada). Por consiguiente, una temperatura de medición es una temperatura a la que no más del 20%, por ejemplo, de una sonda está en forma monocatenaria. Puede crearse una tabla que recoge los porcentajes de forma(s) bicatenaria(s) (ds) y monocatenaria(s) de cada sonda a cada temperatura.

55 Una primera emisión de fluorescencia EFa puede obtenerse a una temperatura de medición T_{Ma} , a la que más del 50% de la primera sonda está en forma de dúplex; la segunda emisión de fluorescencia EFb puede obtenerse a una temperatura de medición T_{Mb} , a la que más del 50% de la segunda sonda está en forma de dúplex; la k emisión de fluorescencia EFk puede obtenerse a una temperatura de medición T_{Mk} , a la que más del 50% de la k sonda está en forma de dúplex; la n-1 emisión de fluorescencia EF(n-1) puede obtenerse a una temperatura de medición $T_{M(n-1)}$, a la que más del 50% de la (n-1) sonda está en forma de dúplex, la n emisión de fluorescencia EFn puede obtenerse a una temperatura de medición T_{Mn} , a la que más del 50% de la n sonda está en forma de dúplex, y
60 opcionalmente una emisión de fluorescencia EF0 puede obtenerse a una temperatura de medición T_{M0} a la que no más del 10% de la primera sonda está en forma de dúplex.

65 Aunque el 50% anteriormente mencionado es una cantidad preferida de sonda en la forma de dúplex, debe apreciarse que puede usarse cualquier porcentaje, tal como 40%, 55%, 70% u 80%. Se prefiere la etapa obtener

ciclo por ciclo una emisión de fluorescencia EF_k a una temperatura de medición TM_k, a la que no más del 30% de la (k-1) sonda está en la forma de dúplex interno de la sonda. Es incluso preferido la etapa obtener ciclo por ciclo una emisión de fluorescencia EF_k a una temperatura de medición TM_k a la que no más del 20% de la (k-1) sonda está en la forma de dúplex interno de la sonda.

5 La etapa (b) puede comprender adicionalmente la etapa (b2) determinar ciclo por ciclo la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia a partir de la sonda consumida para cada sonda, en la que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia t de la k sonda se representa CCR_k. A una temperatura de medición particular (TM_a), cuando una sonda tiene cierto porcentaje (ds_k)% en la forma ds (bicatenaria), la emisión de fluorescencia EF a esta temperatura de medición TM_a contribuida por la primera sonda será (ds_{1a})% * (CCR₁), la contribuida por la segunda sonda será (ds_{2a})% * (CCR₂), la contribuida por la k sonda será (ds_{ka})% * (CCR_k). Por ejemplo, a 60°C, el 70% de la sonda 1 está en forma ds; a 50°C, el 80% en ds. La EF contribuida por la sonda 1 a 60°C será el 70% * (CCR₁); la EF contribuida por la sonda 1 a 50°C será el 80% * (CCR₁). Si están presentes múltiples sondas, la EF será la cantidad total contribuida por las sondas consumidas de todas las sondas. El cálculo de la cantidad consumida real (CCR) puede usar la siguiente fórmula: A temperatura a, la emisión de fluorescencia total será

$$EF_a = (CCR_1) \cdot (ds_{1a})\% + (CCR_2) \cdot (ds_{2a})\% + (CCR_3) \cdot (ds_{3a})\% \dots + (CCR_n) \cdot (ds_{na})\%$$

A temperatura b, la emisión de fluorescencia total será

$$EF_b = (CCR_1) \cdot (ds_{1b})\% + (CCR_2) \cdot (ds_{2b})\% + (CCR_3) \cdot (ds_{3b})\% \dots + (CCR_n) \cdot (ds_{nb})\%$$

A temperatura c, la emisión de fluorescencia total será

$$EF_c = (CCR_1) \cdot (ds_{1c})\% + (CCR_2) \cdot (ds_{2c})\% + (CCR_3) \cdot (ds_{3c})\% \dots + (CCR_n) \cdot (ds_{nc})\%$$

Y así sucesivamente. La CCR individual puede calcularse a partir de las fórmulas anteriores.

“*” denota “multiplicar por”.

Se prefiere que la cantidad consumida real de cada sonda se obtenga por un programa informático que realiza el cálculo anterior. Alternativamente, el cálculo puede hacerse manualmente.

Por ejemplo, en una reacción de amplificación, hay tres sondas para tres secuencias diana. A temperatura de 65°C, el 5% de la primera sonda está en forma de dúplex, el 0% de la segunda sonda y el 0% de la tercera sonda están en forma de dúplex. A 60°C, el 60% de la primera sonda está en forma de dúplex, el 5% de la segunda sonda está en forma de dúplex, el 0% de la tercera sonda está en forma de dúplex. A 55°C, el 90% de la primera sonda está en forma de dúplex, el 55% de la segunda sonda está en forma de dúplex, el 5% de la tercera sonda está en forma de dúplex. A 45°C, más del 95% de todas las sondas están en forma de dúplex. La primera emisión de fluorescencia se recoge a 60°C, que es EF₆₀, la segunda emisión de fluorescencia se recoge a 55°C, que es EF₅₅, la tercera emisión de fluorescencia se recoge a 45°C, que es EF₄₅. Opcionalmente, antes de recogerse la primera emisión de fluorescencia, una emisión de fluorescencia se recoge a 65°C o por encima, que es EF₆₅. La EF contribuida por la cantidad consumida real CCR de la sonda individual se calcula como ds%*(CCR). Véase la tabla a continuación:

	Sonda 1		Sonda 2		Sonda 3		Emisión de fluorescencia
	ds%	ACA1	ds%	CCR2	ds%	CCR3	
65°C	5	5% de CCR1	0	0% de CCR2	0	0% de CCR3	EF65
60°C	60	60% de CCR1	5	5% de CCR2	0	0% de CCR3	EF60
55°C	90	90% de CCR1	55	55% de CCR2	5	5% de CCR3	EF55
45°C	95	95% de CCR1	95	95% de CCR2	95	95% de CCR3	EF45

$$EF_{65} = 5\% \cdot CCR_1 + 0\% \cdot CCR_2 + 0\% \cdot CCR_3 \approx 0$$

$$EF_{60} = 60\% \cdot CCR_1 + 5\% \cdot CCR_2 + 0\% \cdot CCR_3 \tag{1}$$

$$EF_{55} = 90\% \cdot CCR_1 + 55\% \cdot CCR_2 + 5\% \cdot CCR_3 \tag{2}$$

$$EF_{45} = 95\% \cdot CCR_1 + 95\% \cdot CCR_2 + 95\% \cdot CCR_3 \tag{3}$$

La CCR individual puede calcularse a partir de las fórmulas anteriores. Si los inventores asumen 5%*CCR, puede despreciarse. La CCR aproximada puede calcularse a partir de (1), (2) y (3), en las que:

$$\text{CCR1} = (\text{EF60})/0,6$$

$$\text{CCR2} = ((\text{EF55})-0,9/0,6*(\text{EF60}))/0,55$$

$$5 \quad \text{CCR3} = (\text{EF45})/0,95 - (\text{EF60})/0,6 - (\text{EF55}-(0,9/0,6)*(\text{EF60}))/0,55$$

10 Cuando la mezcla de PCR se somete a ciclado térmico, la emisión de fluorescencia y la cantidad consumida real (CCR) se registran (calculan) y se representan con respecto al número de ciclos para formar una representación de emisión frente a los ciclos. En los ciclos iniciales hay poco cambio en la cantidad de emisión que aparece como nivel inicial o una meseta en la representación. A medida que continúa el ciclado térmico puede esperar observarse un aumento en la cantidad de emisión por encima del nivel inicial, que indica que el producto amplificado (o sondas consumidas) se han acumulado hasta el punto de que la emisión de fluorescencia de una sonda en presencia del producto amplificado (o sonda consumida) supera el umbral de detección de un instrumento de PCR. Un aumento exponencial en la cantidad de emisión inicia la fase exponencial y eventualmente alcanza otra meseta cuando uno de los componentes en la mezcla de PCR se vuelve limitante. La representación normalmente produce una curva con forma de S con dos mesetas en ambos extremos y una fase exponencial en el centro. En la fase exponencial, la cantidad de emisión de la sonda está aumentando (1+E) veces con respecto a la cantidad previa de cada ciclo, siendo E la eficiencia de amplificación, que idealmente debe ser del 100% o 1. Se sabe comúnmente que cuanto mayor sea la cantidad de partida del molde de ácido nucleico a partir del cual se amplifica un producto, más pronto se observará un aumento con respecto al nivel inicial. Como es muy conocido en la técnica, la representación de la emisión frente a los ciclos proporciona información significativa para obtener el número de copias inicial o cantidad de molde de ácido nucleico.

25 Como se conoce en el campo de PCR en tiempo real, la cantidad desconocida de un molde de ácido nucleico puede cuantificarse comparando la representación de la emisión frente a los ciclos del molde con representaciones normalizadas.

30 En una realización de la presente invención, cuando una pluralidad de moldes de ácido nucleico se amplifica para formar una pluralidad de productos amplificados, cada producto se compara preferentemente con una curva patrón formada por el mismo producto. Un único producto por dilución por mezcla de PCR puede usarse para formar la curva patrón. Preferentemente, a cada dilución, una pluralidad de productos se disponen en una única mezcla de PCR y las lecturas de emisión de cada sonda pueden medirse y representarse para formar una curva patrón basándose en los procedimientos descritos en la presente invención.

35 La cantidad inicial de un molde de ácido nucleico en una muestra también puede determinarse normalizando el molde a un gen de mantenimiento o un normalizador en relación relativa con un calibrador sin usar una curva patrón. Por ejemplo, GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y β -actina se consideran comúnmente un molde de ácido nucleico de mantenimiento adecuado o moldes normalizadores debido a su abundancia y niveles constantes de expresión en células. El calibrador puede ser una muestra sin tratar o una célula, tejido u órgano específico usado para la normalización de muestras tratadas o células elegidas como diana.

45 En una realización de la presente invención, una pluralidad de moldes de ácido nucleico de interés se amplifica y se cuantifica en una única mezcla de PCR. La cantidad inicial de cada molde de ácido nucleico puede calcularse y normalizarse simultáneamente a un normalizador. También se contempla que una pluralidad de moldes de ácido nucleico y un molde de normalizador puedan monitorizarse y amplificarse en la misma reacción de PCR. Se contempla adicionalmente que más de un molde de mantenimiento o normalizador pueda amplificarse junto con múltiples moldes de ácido nucleico en una única reacción de PCR. Se contempla adicionalmente que la cantidad relativa entre estos moldes o las relaciones entre o entre estos moldes puedan determinarse a partir de una única mezcla de PCR.

50 La etapa (c) comprende medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de sondas sin consumir detectando las señales de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura, en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana ha sido amplificado o no en dicha muestra/mezcla de reacción de amplificación.

55 Para determinar la curva de fusión (perfil) para cada sonda o cada conjunto de sondas, la mezcla de reacción que se ilumina con luz es absorbida por las marcas de las sondas y la fluorescencia de la reacción se monitoriza en función de la temperatura. Más particularmente, la fluorescencia de las marcas se mide a medida que la temperatura de la muestra aumenta (o disminuye) hasta que se logra un nivel inicial de fluorescencia.

60 Los datos pueden presentarse como representaciones de fluorescencia frente a temperatura o, por ejemplo, como representaciones de la primera derivada de la fluorescencia frente a la temperatura. Las dos representaciones son intercambiables, pero cada una se basa en la atención del espectador en diferentes aspectos de los datos. El pico de fusión (o T_m) se visualiza mejor en representaciones de derivadas. Sin embargo, el ensanchamiento de la transición y aspecto de las transiciones de bajo punto de fusión es más fácil de observar en las representaciones de fluorescencia frente a temperatura. El punto en el que hay un desplazamiento en la tasa de disminución o aumento

de la fluorescencia puede identificarse más fácilmente visualizando una representación de la primera derivada de la fluorescencia frente a la temperatura. El punto de tasa máxima de cambio se considera la temperatura de fusión del dúplex de la sonda. Si una sonda tiene una T_m mayor, forma un dúplex de sonda más fuerte y, por consiguiente, fundirá a una temperatura mayor que otra sonda. Temperaturas de fusión perfectamente diferentes de diferentes sondas permiten la identificación de que la sonda es consumida durante la amplificación (si las sondas tienen la misma marca).

En algunos procedimientos de la presente invención, la fluorescencia se monitoriza en función de un gradiente de desnaturalización. Sin embargo, independientemente del tipo de gradiente, lo que se monitoriza en realidad es el cambio en la fluorescencia producida por la disociación de las dos cadenas de la porción bicatenaria de la sonda. El gradiente de desnaturalización puede ser un gradiente térmico. En otras palabras, la invención se dirige ilustrativamente a un procedimiento, caracterizado porque la fluorescencia dependiente de la temperatura se monitoriza durante o posterior a la amplificación (preferentemente PCR). Sin embargo, es frecuentemente deseable si la monitorización de fluorescencia dependiente de la temperatura es parte de un formato de ensayo homogéneo de forma que la amplificación (PCR) y monitorización de fluorescencia dependiente de la temperatura dependiente se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción de reacción sin apertura intermedia de la cámara de reacción.

El análisis de perfiles de fusión puede obtenerse monitorizando fluorescencia dependiente de la temperatura durante la fusión o hibridación. Normalmente, los análisis de la curva de fusión se realizan tan lentamente como sea posible con el fin de generar datos precisos y altamente reproducibles con el fin de obtener una determinación exacta del punto de fusión, que se define como el máximo de la primera derivada de una representación de la temperatura frente a la fluorescencia. Sin embargo, si los parámetros de tiempo seleccionados son comparativamente cortos, pueden observarse ciertas ventajas.

Un perfil de fusión puede medirse después de completarse la amplificación (perfil de fusión de post-amplificación), y/o puede medirse durante la amplificación en cada ciclo o en ciclos seleccionados (perfil de fusión de semi-amplificación).

En una realización, la fluorescencia dependiente de la temperatura se monitoriza después de completarse una reacción de PCR. En una realización alternativa, la fluorescencia dependiente de la temperatura se monitoriza en tiempo real durante una reacción de PCR.

En una realización durante dicha medición, el producto amplificado (amplicón) sigue siendo bicatenario, implicando poco, si lo hay, o ningún cambio detectable de señales. Mientras que en otra realización la medición del perfil de fusión puede realizarse cuando algo del producto amplificado está en forma monocatenaria.

El experto podrá determinar, simplemente a partir del perfil de fusión después de la amplificación (y sin comparar el perfil de fusión con ningún otro perfil de fusión) si al menos un ácido nucleico diana ha sido amplificado o no. Por ejemplo, las figuras 1 y 2 ilustran las curvas "más planas" obtenidas después de la amplificación, con respecto a las curvas con más forma de "S" que son características de sondas sin consumir.

El procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente una etapa (d):

(i) comparar al menos dos perfiles de fusión obtenidos en (c)

y/o

(ii) comparar un perfil de fusión obtenido en la etapa (c)

con un perfil de fusión previamente obtenido de las mismas sondas o

con un perfil de fusión de las mismas sondas obtenido en paralelo al mismo tiempo en reacciones de control, o

con un perfil de fusión teórico de las mismas sondas,

en el que un cambio en el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana ha sido amplificado o no en dicha muestra/mezcla de reacción de amplificación.

El perfil de fusión puede medirse antes de que tenga lugar la amplificación (perfil de fusión de pre-amplificación) y/o se mide después de completarse la amplificación (perfil de fusión de post-amplificación), y/o se mide durante la amplificación en cada ciclo o ciclos seleccionados (perfil de fusión de semi-amplificación).

Un perfil de fusión de pre-amplificación de las sondas pueden medirse en el mismo recipiente de reacción antes del inicio de la amplificación o puede medirse en un recipiente de reacción separado cuando no tenga lugar la amplificación debido a que la mezcla de reacción carece de uno o más componentes necesarios para la amplificación. Ejemplos de tales componentes incluyen un dNTP, una polimerasa o un ácido nucleico diana.

5 Debe observarse que el procedimiento de la invención no requiere necesariamente el perfil de fusión de pre-amplificación para medirse como parte del procedimiento de la invención. Este perfil podría ser uno que es característico de la sonda o combinación de sondas en cuestión y que podría haber sido medido previamente y/o guardado en una forma recuperable, por ejemplo, en un formato legible por ordenador.

10 Cada sonda en la mezcla de reacción será específica para un ácido nucleico diana particular. Se usan diferentes sondas que se marcan con la misma marca o marcas que tienen espectros de emisión indistinguibles, y las sondas están seleccionadas de manera que tengan características de fusión diferentes, por ejemplo, diferentes perfiles de fusión o diferentes temperaturas de fusión (T_m).

15 El perfil de fusión que se obtiene en la etapa (c) será una combinación de los perfiles de fusión de las sondas que están presentes en la mezcla de reacción de amplificación. Debido al hecho de que diferentes sondas están seleccionadas de manera que tengan diferentes perfiles de fusión, las contribuciones individuales hechas por cada sonda al perfil de fusión combinado serán separables por aquellos expertos en la materia, tanto manualmente como preferentemente por medios implementados por ordenador. De esta forma, la presencia o ausencia de sondas particulares y, por tanto, la presencia o ausencia de ácidos nucleicos diana particulares en la muestra, pueden distinguirse entre sí.

20 La comparación de los perfiles de fusión de pre- y post-amplificación de cada sonda puede identificar qué característica de la curva que es una firma para una sonda particular ha desaparecido o ha sido reducida, indicando así que esa sonda particular es consumida durante la amplificación e indicando adicionalmente que la diana correspondiente está presente en la muestra.

25 Se prefiere que la comparación de los perfiles de fusión de sondas antes de que tenga lugar la amplificación y después de completarse la amplificación o después de algunos ciclos de amplificación se haga por un programa informático. El programa informático determina qué sonda o cuánto de la sonda es consumido, que es indicativo de qué diana o cuánto de la diana correspondiente está presente en una muestra.

30 Las temperaturas de fusión (T_m) de sondas con la(s) misma(s) marca(s) o marca(s) diferente(s) con espectros de emisión indistinguibles serán generalmente diferentes de las temperaturas de fusión de cada otra sonda marcada similarmente. En una realización, múltiples sondas en un conjunto son cada una marcada con la misma marca (o diferente(s) marca(s) con espectros de emisión indistinguibles) y cada sonda tiene un intervalo de temperatura de fusión distinto. En un ensayo de múltiplex, cuando una temperatura de reacción sube de la temperatura de hibridación a una temperatura de desnaturalización, el dúplex de la sonda con la menor T_m se desenrolla primero, el dúplex de la sonda con la siguiente mayor T_m se separa a continuación y el dúplex de la sonda con la mayor T_m se desnaturaliza el último. Simultáneamente, la emisión fluorescente de la marca unida a la sonda cambia en proporción con la temperatura de reacción creciente debido a la fusión gradual del dúplex de la sonda, permitiéndose así que cada sonda se distinga en el perfil de fusión combinado. La forma y posición de una curva de fusión es una función de la relación de GC/AT, longitud y la secuencia de la porción bicatenaria de la sonda.

40 Preferentemente, las T_m de sondas con la(s) misma(s) marca(s) o marca(s) diferente(s) con espectros de emisión indistinguibles son al menos 2°C, preferentemente al menos 3°C, 4°C o 5°C diferentes de otras sondas similarmente marcadas.

45 En un aspecto de la presente invención, la monitorización de la fluorescencia en tiempo real de una reacción de PCR se usa para adquirir una curva de fusión de la sonda durante la reacción de PCR. Los ciclos de temperatura de PCR que accionan la amplificación desnaturalizan alternativamente el producto en acumulación y las sondas marcadas a una alta temperatura, e hibridan los cebadores y al menos una cadena de la sonda con el producto a una menor temperatura, consumiendo así algunas sondas. La representación de la fluorescencia en función de la temperatura a medida que la muestra se calienta mediante la temperatura de disociación de la porción bicatenaria interna de la sonda de la sonda restante (sin consumir) da una curva de fusión de la sonda. Por tanto, la monitorización continua de la fluorescencia durante una reacción de PCR proporciona un sistema para detectar cambios de concentraciones de sonda por perfiles de fusión de sondas. Un sistema tal, particularmente un sistema de HRM-PCR, puede usarse para diferenciar las sondas restantes separadas menos de 2°C en la temperatura de fusión.

60 La invención también proporciona un procedimiento para monitorizar una amplificación por PCR de al menos dos dianas de ácido nucleico, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción de amplificación que comprende:

65 (i) uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos directos/inversos, en el que los pares de cebadores pueden amplificar uno o más ácidos nucleicos diana, si están presentes en la muestra, y preferentemente una polimerasa de ácido nucleico,

(ii) dos o más sondas, en el que cada sonda comprende

5 un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y

10 al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a una segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

15 en el que cada sonda comprende una marca fluorescente o par de marca fluorescente/extintor que puede producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y en el que las al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles

en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes;

20 (b) realizar una reacción de amplificación que comprende el ciclado térmico de la muestra/mezcla de reacción de amplificación en el que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana son consumidos durante la reacción de amplificación; y

25 en el que la etapa (b) comprende además la etapa (b1) obtener emisiones de fluorescencia (EF) ciclo por ciclo a diversas temperaturas de medición (TM), en el que dichas emisiones de fluorescencia (EF) son fluorescencia corregida con el nivel inicial (dR),

30 en el que cuando dicha mezcla de reacción de amplificación comprende "n" sondas para la detección de múltiplex de "n" dianas de ácido nucleico, en el que la primera sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m1} , la segunda sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m2} , la tercera sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m3} , la n sonda tiene una temperatura de fusión de T_{mn} , en el que $T_{m1} > T_{m2} > T_{m3} \dots > T_{mn}$, en el que los porcentajes de la forma bicatenaria de cada sonda a una temperatura particular o temperaturas diferentes se determinan experimentalmente o se calculan en teoría por un programa informático, en el que una primera emisión de fluorescencia EFa se obtiene a una temperatura de medición TMa, a la que más del 50% de la primera sonda está en forma de dúplex, la segunda emisión de fluorescencia EFb se obtiene a una temperatura de medición TMb, a la que más del 50% de la segunda sonda está en forma de dúplex, la n-1 emisión de fluorescencia EF(n-1) se obtiene a una temperatura de medición TM(n-1), a la que más del 50% de la (n-1) sonda está en forma de dúplex, la n emisión de fluorescencia EFn se obtiene a una temperatura de medición TMn, a la que más del 80% de la n sonda está en forma de dúplex, y opcionalmente una emisión de fluorescencia EF0 se obtiene a una temperatura de medición TM0, a la que no más del 10% de la primera sonda está en forma de dúplex, en el que n es un número entero positivo y $n \geq 2$,

40 en el que la etapa (b) comprende además la etapa (b2) determinar la cantidad consumida real ciclo por ciclo de la emisión de fluorescencia para cada sonda,

45 en el que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de la k sonda se representa CCR_k en el que a una temperatura de medición particular (TMa), en el que una sonda tiene cierto porcentaje (dska)% en forma ds (bicatenaria), la emisión de fluorescencia EF a esta temperatura de medición TM contribuida por la primera sonda será el (ds1)% * (CCR_k), la contribuida por la segunda sonda será el (ds2a)% * (CCR_2), la contribuida por la k sonda será el (dska)% * (CCR_k). Por ejemplo, a 60°C, el 70% de la sonda 1 está en forma ds; a 50°C, el 80% en forma ds. A 60°C, la EF contribuida por la sonda 1 será el 70% * (CCR_1); a 50°C, la EF contribuida por la sonda 1 será el 80% * (CCR_1). Si están presentes múltiples sondas, la EF será la cantidad total contribuida por las sondas consumidas de todas las sondas. El cálculo de la cantidad consumida real (CCR) usa la siguiente fórmula:

55 A temperatura "a", la emisión de fluorescencia total será
 $EFa = (CCR_1) * (ds1a)\% + (CCR_2) * (ds2a)\% + (CCR_3) * (ds3a)\% \dots + (CCR_n) * (dsna)\%$

A temperatura "b", la emisión de fluorescencia total será
 60 $EFb = (CCR_1) * (ds1b)\% + (CCR_2) * (ds2b)\% + (CCR_3) * (ds3b)\% \dots + (CCR_n) * (dsna)\%$

A temperatura "c", la emisión de fluorescencia total será
 $EFc = (CCR_1) * (ds1c)\% + (CCR_2) * (ds2c)\% + (CCR_3) * (ds3c)\% \dots + (CCR_n) * (dsna)\%$,

65 Y así sucesivamente. La CCR individual puede calcularse a partir de las fórmulas anteriores, en las que "*" denota

“multiplicar por”, “k” es un número entero positivo, $1 \leq k \leq n$ y “n” es el número de sondas; en las que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de cada sonda se obtiene por un programa informático que realiza el cálculo a cada temperatura de medición en cada ciclo; y en las que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de cada sonda está relacionada con el grado de amplificación del ácido nucleico diana con el que se une el primer oligonucleótido de esa sonda.

Un producto de software informático para su uso con el procedimiento de la invención puede adaptarse, cuando se ejecuta en medios de procesamiento de datos adecuados, para comparar perfiles de fusión de sondas y/o cuantificar una amplificación por PCR tiempo real de dianas de múltiplex que realiza el cálculo de la emisión de fluorescencia y la cantidad consumida real (CCR).

Generalmente, la CCR puede calcularse manualmente una vez los valores de emisión son adquiridos por un instrumento de PCR y se conocen los porcentajes de la forma bicatenaria de cada sonda a cada temperatura. Sin embargo, es frecuentemente deseable automatizar el cálculo mediante el uso de un sistema informático.

Puede usarse un sistema informático que comprende una memoria informática que tiene un programa de software informático almacenado en su interior, en el que el programa de software informático, cuando se ejecuta por un procesador o en un ordenador, realiza procedimientos según la presente invención. Por ejemplo, puede proporcionarse un producto de programa informático que comprende una memoria informática que tiene un programa de software informático guardado en su interior, en el que el programa de software informático realiza un procedimiento que comprende la etapa de calcular la CCR y/o determinación de características de perfiles de fusión durante la amplificación o en la amplificación final.

Como será apreciado por aquellos expertos en la materia, un producto de programa informático o un programa de software informático puede almacenarse en y/o ejecutarse en un instrumento de PCR y usarse para calcular la cantidad de cada sonda.

La invención proporciona además un kit para ensayar una o más dianas de ácido nucleico como se reivindica en el presente documento.

La invención también proporciona el uso de una sonda como se reivindica en el presente documento.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más nucleótidos de variante en los ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra que comprende ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción de amplificación que comprende:

(i) uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos directos/inversos, en el que los pares de cebadores pueden amplificar uno o más ácidos nucleicos diana, si están presentes en la muestra,

(ii) al menos un par de sondas, en el que la primera sonda en el par comprende la secuencia complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana natural (la secuencia normal), la segunda sonda en el par comprende la secuencia complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene nucleótidos de variante (por ejemplo, SNP, nucleótidos mutados, etc.), en el que cada sonda en el par comprende

un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

en el que cada sonda en el par comprende el mismo segundo oligonucleótido,

en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y

en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes;

(b) realizar una reacción de amplificación en la muestra/mezcla de reacción de amplificación en la que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de sondas que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana son consumidos durante la reacción de amplificación; y

(c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de cualquier porción bicatenaria entre el primer y segundo

oligonucleótidos de cualquier sonda sin consumir detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,

5 en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana ha sido amplificado o no en dicha muestra/mezcla de reacción de amplificación.

10 El mismo segundo oligonucleótido en el par de la sonda puede comprender base universal o inosina que se corresponde con el nucleótido de variante en la secuencia de ácidos nucleicos diana. La base universal puede ser 2'-desoxinucleósido de 3-nitropirrol, 5-nitroindol, análogo de pirimidina o análogo de purina. La inosina se produce naturalmente en la posición de titubeo del anticodón de algunos ARN de transferencia y se sabe que forma pares de bases con A, C y U durante el procedimiento de traducción (figura 17).

15 Para escanear múltiples mutaciones o SNP en una secuencia diana, múltiples primeros oligonucleótidos de diferentes sondas que se hibridan con diferentes sitios del mismo producto amplificado pueden incluirse en una reacción. Las sondas pueden contener un par de sondas de competencia, la primera sonda en el par se hibrida con la secuencia natural (nucleótido normal); la segunda sonda en el par se hibrida con la secuencia diana que contiene los nucleótidos de variante (mutados). Cuando la secuencia diana natural está presente, la sonda complementaria a la secuencia diana natural se consume. Cuando la secuencia diana que tiene el nucleótido de variante está presente, la sonda complementaria a la secuencia diana de variante se consume. Los múltiples primeros oligonucleótidos pueden hibridarse con la misma cadena de la secuencia de ácidos nucleicos diana adyacente entre sí o con alguna región de solapamiento entre los primeros oligonucleótidos adyacentes (figura 17).

20 Puede usarse una combinación de cebadores/sondas para monitorizar, detectar o cuantificar una pluralidad de moldes de ácido nucleico en una única reacción de amplificación basándose en las propiedades del perfil de fusión del cebador o sonda hibridada con el producto de extensión del cebador que se amplifican a partir de los moldes de ácido nucleico (figura 14).

25 La combinación de cebadores y sondas puede comprender: primeros cebadores, segundos cebadores y primeras sondas (figura 14A),

30 en el que dicho segundo cebador comprende, en el orden de 3' a 5', una porción de cebado específica para diana de 3' sustancialmente complementaria a una secuencia de un ácido nucleico diana, una porción complementaria a la sonda que comprende una secuencia que puede hibridarse con la primera sonda y porción universal de 5' que comprende la secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del primer cebador,

35 en el que la primera sonda que puede hibridarse con el segundo cebador comprende una primera marca, el primer cebador comprende una segunda marca de forma que la primera marca y segunda marca pueden interactuar cuando las dos marcas se ponen en proximidad,

40 en el que el primer cebador puede extenderse sobre el molde complementario a la cadena de extensión del segundo cebador,

45 en el que tras la hibridación de la primera sonda con el primer producto de extensión de cebador, las dos marcas se ponen en proximidad, generando así señal detectable.

50 En un ejemplo en la combinación de cebadores y sondas, el primer cebador es un cebador universal, la primera sonda es una sonda universal, los segundos cebadores constituyen un conjunto de cebadores en los que cada segundo cebador está unido a la misma marca o marcas con espectros de emisión indistinguibles. En el conjunto de segundos cebadores, la porción de cebado específica para diana de 3' de cada segundo cebador puede hibridarse con cada diana específicamente, en el que la primera sonda se hibrida con cada segundo cebador o las cadenas de extensión del primer cebador con diferentes T_m o perfil de fusión específico para cada diana. Las diferentes T_m o diferentes perfiles de fusión de la primera sonda para cada diana son distinguibles entre sí de forma que las distintas T_m o perfil de fusión proporcionarán la información de si una diana está presente en una muestra (figura 14B).

55 En otro ejemplo, la porción complementaria a la sonda y la porción de cebado específica para diana de 3' del segundo cebador no son sustancialmente solapantes, en el que la porción complementaria a la sonda comprende la secuencia que puede no estar relacionada con la secuencia diana.

60 En otro ejemplo, la porción complementaria a la sonda está solapándose sustancialmente con la porción de cebado específica para diana de 3' del segundo cebador, o la porción complementaria a la sonda está incorporada en la porción de cebado específica para diana de 3' del segundo cebador (figura 14A), en el que T_m del dúplex de dicho segundo cebador hibridado con la secuencia diana es superior a T_m del dúplex de dicho segundo cebador hibridado con la primera sonda de forma que si una diana está presente, el segundo cebador forma híbridos más fuertes con la diana.

65 Una de las marcas puede ser un extintor como un fluoróforo. La hibridación de la primera sonda con la cadena de

extensión del primer cebador pone dos marcas en relación de extintor por contacto o relación de FRET.

También se contempla un procedimiento para monitorizar, detectar o cuantificar una pluralidad de moldes de ácido nucleico en una única reacción de amplificación.

5 El procedimiento para detectar/cuantificar un ácido nucleico diana o múltiples ácidos nucleicos diana en una población de ácidos nucleicos comprende:

10 (a) tratar la población de ácidos nucleicos con una combinación de cebadores y sondas, o un conjunto de combinaciones de cebadores y sondas, como se ha descrito anteriormente, bajo condiciones de amplificación, en el que el segundo cebador se hibrida con el ácido nucleico diana, y se extiende, la cadena de extensión del segundo cebador se separa del molde y participa en el otro ciclo de hibridación del cebador, y extensión,

15 en el que la concentración del segundo cebador es inferior a la concentración del primer cebador en la mezcla de reacción, el primer cebador participa en la amplificación cuando va quedando poco del segundo cebador o está agotándose, por lo que el primer cebador se incorpora en el producto de amplificación;

20 (b) detectar emisiones de señal de la hibridación de la primera sonda con el producto de extensión de los primeros cebadores en cada ciclo;

(c) medir el perfil de fusión del dúplex de la primera sonda y el producto de extensión del primer cebador, en el que dicho perfil de fusión se mide iluminando la mezcla de reacción y monitorizando la fluorescencia en función de la temperatura, en el que una T_m firma o perfil de fusión es un indicativo de la presencia de una secuencia diana.

25 Se prefiere que la amplificación sea una amplificación asimétrica, en el que las cadenas de extensión del primer cebador monocatenarias se acumulan durante la amplificación. Esto puede lograrse usando diferentes relaciones de cebador directo y cebador inverso.

30 Un kit para monitorizar, detectar o cuantificar una pluralidad de moldes de ácido nucleico en una única reacción de amplificación también se contempla cuantificando una pluralidad de moldes de ácido nucleico en una única reacción de amplificación.

35 El kit para detectar/cuantificar un ácido nucleico diana o múltiples ácidos nucleicos diana en un población de ácidos nucleicos comprende: una combinación de cebadores y sondas, o un conjunto de combinaciones de cebadores y sondas, como se ha descrito anteriormente, en el que dicha combinación de cebadores y sondas comprende: primeros cebadores, segundos cebadores y primeras sondas,

40 en el que dicho segundo cebador comprende, en el orden de 3' a 5', una porción de cebado específica para diana de 3' sustancialmente complementaria a una secuencia de un ácido nucleico diana, una porción complementaria a la sonda que comprende una secuencia que puede hibridarse con la primera sonda, y porción universal de 5' que comprende la secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del primer cebador,

45 en el que la primera sonda que puede hibridarse con el segundo cebador comprende una primera marca, el primer cebador comprende una segunda marca de forma que la primera marca y segunda marca pueden interactuar cuando las dos marcas se ponen en proximidad,

en el que el primer cebador puede extenderse sobre el molde complementario a la cadena de extensión del segundo cebador,

50 en el que tras la hibridación de la primera sonda con el primer producto de extensión de cebador, las dos marcas se ponen en proximidad, generando así señal detectable.

55 La primera sonda que puede hibridarse con la cadena de extensión del primer cebador puede contener secuencia específica para diana o secuencia arbitraria y puede tener cualquier longitud. Generalmente, puede tener 4 a 60 nucleótidos de longitud, preferentemente 5 a 25 nucleótidos de longitud.

60 La porción complementaria a la sonda del segundo cebador comprende la secuencia que puede hibridarse con la primera sonda. Se diseña que el dúplex de porción complementaria a la sonda y la primera sonda tengan T_m o perfil de fusión distintos para cada secuencia diana.

65 La porción universal de 5' del segundo cebador comprende la secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a la porción de cebado de 3' del primer cebador o la secuencia completa del primer cebador. Se diseña de forma que el primer cebador pueda hibridarse con el molde generado por el producto de replicación del segundo cebador e iniciar la extensión del cebador.

En un ejemplo, el primer cebador es un cebador específico para diana que comprende la porción de cebado de 3'

que es complementaria a una región de ácido nucleico diana. En esta realización, la primera sonda incluida en una reacción comprende la secuencia que puede hibridarse con la cadena de extensión del primer cebador y que es adyacente al primer cebador.

5 Preferentemente, el primer cebador es un cebador universal, la primera sonda es una sonda universal, los segundos cebadores constituyen un conjunto de múltiples cebadores, en los que la porción de cebado específica para diana de 3' de cada segundo cebador puede hibridarse con cada diana específicamente y cebar la amplificación de cada diana, en el que la porción complementaria a la sonda de cada segundo cebador comprende la secuencia que puede hibridarse con la primera sonda con distinta propiedad de hibridación/disociación para cada segundo cebador.

10 Para genotipar SNP o detectar nucleótido de variante, el segundo cebador puede ser cebador específico para alelo, en el que un nucleótido terminal del segundo cebador está seleccionado para ser tanto complementario al nucleótido de variante sospechoso como al nucleótido normal correspondiente de forma que un producto de extensión del segundo cebador se sintetiza cuando el segundo cebador se hibrida con la región de diagnóstico que contiene un nucleótido particular, pero tal producto de extensión no se sintetiza cuando el segundo cebador se hibrida con la región de diagnóstico que no contiene nucleótido particular de la secuencia de ácidos nucleicos diana. Los segundos cebadores específicos para alelo pueden diferenciarse por las porciones complementarias a sonda de manera que los perfiles de hibridación/disociación pueden distinguirse entre diferentes alelos.

20 Alternativamente, el primer cebador y la primera sonda pueden ligarse por un ligador (figura 16). El primer cebador/sonda ligado puede disponerse como, en el orden de 5' a 3', primera sonda - ligador - primer cebador, en el que la primera parte de la sonda puede denominarse la porción de cola de 5' del primer cebador. El ligador puede ser nucleótidos naturales o cualquier otro resto químico. El ligador puede contener resto de bloqueo. Si el resto de bloqueo está presente, la replicación de la parte de la primera sonda se bloquea. El resto de bloqueo puede ser
25 brazo de hidrocarburo, un HEG, enlace no nucleotídico, ribosa abásica, derivados de nucleótidos o un colorante.

En algunas realizaciones de la invención, el conjunto de múltiples segundos cebadores usado en la amplificación puede ser cebadores anidados. Los cebadores anidados para su uso en la amplificación son oligonucleótidos que tienen secuencia complementaria a una región sobre una secuencia diana entre los sitios de cebado del par de
30 cebadores exterior.

La primera sonda puede unirse con la primera marca. Cuando la primera sonda se hibrida con la parte extendida del primer producto de extensión de cebador, la hibridación/disociación de la primera sonda genera señal detectable y/o perfil de fusión distinto. Más preferentemente, la porción de cebado de 3' del primer cebador puede unirse con la
35 segunda marca. La primera marca y la segunda marca son un par de marcas interactivo. Cuando la primera sonda se hibrida con la parte extendida del primer producto de extensión de cebador, la hibridación pone las dos marcas en estrecha proximidad, por lo que el perfil de fusión de la primera sonda es indicativo de la presencia o cantidad de ácido nucleico diana en una muestra (figura 15 y 16).

40 Tras la hibridación de cebador/sonda marcado con el primer producto de extensión de cebador, las dos marcas están en relación de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o relación de extinción por contacto. La marca sobre el cebador (o sonda) puede localizarse en cualquier parte en tanto que interaccione con la marca sobre la otra sonda (o cebador).

45 Un procedimiento a modo de ejemplo para ensayar una muestra para un ácido nucleico diana o múltiples ácidos nucleicos diana en una población de ácidos nucleicos comprende:

(a) proporcionar ácidos nucleicos molde que se derivan de ácidos nucleicos diana en una población de ácidos nucleicos, en el que dichos ácidos nucleicos molde pueden hibridarse con primeros cebadores;
50

(b) tratar los ácidos nucleicos molde con un primer cebador o múltiples primeros cebadores, en el que cada primer cebador se hibrida con su molde de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación, en el que cada primer cebador comprende una porción de cebado de 3' sustancialmente complementaria a la primera región del molde ácido nucleico y la porción de cola de 5' que puede hibridarse con una parte extendida de un producto de extensión del primer cebador,
55

alternativamente, tratar los ácidos nucleicos molde con un primer cebador o múltiples primeros cebadores, y primera(s) sonda(s), en el que cada primer cebador se hibrida con su molde de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación, en el que cada primer cebador comprende una porción de cebado de 3' sustancialmente complementaria a la primera región del molde ácido nucleico, en el que la primera sonda puede hibridarse con una parte extendida del producto de extensión del primer cebador adyacente al primer cebador;
60

(c) mantener la mezcla de la etapa (a) bajo condiciones de extensión, que comprende trifosfatos de nucleósido apropiados y una polimerasa de ácido nucleico para extender los primeros cebadores hibridados para sintetizar productos de extensión de los primeros cebadores;
65

(d) separar los productos de extensión de los moldes; y

(e) mantener la mezcla de la etapa (c) bajo condiciones apropiadas que comprenden tampón y una temperatura apropiada o un intervalo de temperaturas, en el que la primera sonda o la porción de cola de 5' del primer cebador se hibridan con o se disocian de la parte extendida del primer producto de extensión de cebador, en el que el procedimiento de hibridación y/o disociación de la porción de cola de 5' o la primera sonda generan señal detectable o perfil de fusión distinto.

El procedimiento puede comprender adicionalmente repetir las etapas (a) y (e) en un procedimiento de amplificación. Puede usarse cualquier sistema de amplificación para incluir estas etapas, tales como PCR, SDA, LAMP, 3SR y similares. La PCR es un procedimiento de amplificación preferido para incorporar estas etapas.

En el procedimiento descrito en el presente documento se proporciona una muestra de la que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana o la variante de nucleótido de interés. El ácido nucleico diana contenido en la muestra puede ser ADN genómico bicatenario o ADNc, si fuera necesario, que luego se desnaturaliza usando cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado que incluye medios físicos, químicos o enzimáticos que son conocidos para aquellos expertos en la materia. Un medio físico preferido para la separación de cadenas implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturalice completamente (>99%). La desnaturalización por calor típica implica temperaturas que oscilan de aproximadamente 80°C a aproximadamente 105°C, durante tiempos que oscilan de algunos segundos a minutos. Como una alternativa a la desnaturalización, el ácido nucleico diana puede existir en una forma monocatenaria en la muestra, tal como ARN monocatenario o virus de ADN.

Entonces, las cadenas de ácido nucleico desnaturalizadas se incuban con cebadores de oligonucleótidos bajo condiciones de hibridación; condiciones que permiten la unión de los cebadores a las cadenas individuales de ácidos nucleicos. En una realización, el ácido nucleico molde se proporciona como ácidos nucleicos diana desnaturalizados que pueden hibridarse con los primeros cebadores. En esta realización, los primeros cebadores son cebadores específicos para diana, en el que cada primer cebador en un conjunto de múltiples cebadores comprende una porción de cebado de 3' que puede hibridarse con cada diana específicamente y cebar la extensión. En un caso, cada primer cebador comprende una porción de cola de 5' que puede hibridarse con una parte extendida del producto de extensión del primer cebador. En otro caso, el primer cebador no comprende una porción de cola de 5', pero la reacción comprende una primera sonda que puede hibridarse con una parte extendida del producto de extensión del primer cebador adyacente al primer cebador.

Los primeros cebadores hibridados se extienden por un agente de polimerización. La extensión dependiente del molde del (de los) cebador(es) de oligonucleótidos(s) está catalizada por un agente de polimerización en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), o análogos de éstos como se trata anteriormente, en un medio de reacción que comprende las sales apropiadas, metales catiónicos y sistema de tamponamiento de pH. Agentes de polimerización adecuados son enzimas conocidas por catalizar la síntesis de ADN dependiente de cebador y de molde. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con estas ADN polimerasas son muy conocidas en la técnica.

La separación de los productos de extensión de los moldes puede llevarse a cabo mediante calentamiento. Por ejemplo, los productos de extensión pueden separarse mediante calentamiento a 95°C. Alternativamente, los productos de extensión pueden separarse de su molde respectivo por desplazamiento de cadenas.

Después de separarse el primer producto de extensión de los moldes, la mezcla de reacción se mantiene bajo condiciones apropiadas, que comprenden tampón y una temperatura apropiada o un intervalo de temperaturas, en el que la primera sonda o la porción de cola de 5' del primer cebador se hibridan con o se disocian de la parte extendida del primer producto de extensión de cebador, en el que el procedimiento de hibridación y/o disociación de la primera sonda o la porción de cola de 5' generan señal detectable o perfil distinto.

La medición de T_m o monitorización del perfil de la curva de fusión del amplicón o dúplex de sonda se conocen en la técnica. En la presente invención, la detección de múltiples dianas puede lograrse usando análisis de pares de marcas y del perfil de hibridación/disociación de la primera sonda que se hibrida con la parte extendida del primer producto de extensión de cebador.

En otra realización, el primer cebador es un cebador universal; la primera sonda es una sonda universal. Pueden detectarse múltiples dianas mediante el análisis de perfiles de fusión de una primera sonda universal hibridada con múltiples dianas diferentes mediante un único canal de detección de fluorescencia.

En esta realización, la etapa (a) que proporciona ácidos nucleicos molde comprende: i) tratar la población de ácidos nucleicos con segundos cebadores, que son un conjunto de cebadores específicos diana, bajo condiciones de hibridación, en el que cada segundo cebador se hibrida con su ácido nucleico diana, en el que un segundo cebador comprende, en el orden de 3' a 5', una porción específica para diana de 3' sustancialmente complementaria a una región del ácido nucleico diana; una porción complementaria a la sonda de la cola que puede hibridarse con la primera sonda o la secuencia de cola de 5' del primer cebador, y porción universal de 5' que comprende la

5 secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a la porción de cebado de 3' del primer cebador; ii) mantener la mezcla anterior bajo condiciones de extensión, que comprenden trifosfatos de nucleósido apropiados y una polimerasa de ácido nucleico para extender los segundos cebadores hibridados para sintetizar productos de extensión; iii) separar los productos de extensión de los moldes; iv) hibridar otro cebador de amplificación (tercer primer) o un conjunto de terceros cebadores de amplificación con los productos de extensión monocatenarios anteriores y extender los terceros cebadores hibridados; y v) separar los productos de extensión bicatenarios a la forma monocatenaria que incluye ácidos nucleicos molde, por lo que los ácidos nucleicos molde monocatenarios pueden hibridarse con el primer cebador (figura 15).

10 El tercer cebador puede ser uno de los cebadores de amplificación. Los cebadores de amplificación están seleccionados de manera que sus posiciones relativas a lo largo de una secuencia de dúplex sean de forma que un producto de extensión sintetizado a partir de un cebador de amplificación, cuando el producto de extensión se separa de su molde (complemento), sirva de molde para la extensión del otro cebador de amplificación.

15 El primer cebador universal puede estar presente en la reacción a una concentración de al menos 3 veces superior a la concentración de los segundos cebadores. Preferentemente, el primer cebador puede estar presente en la reacción a una concentración de al menos 6 veces superior a la concentración de los segundos cebadores.

20 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 presenta gráficamente el perfil de fusión de una sonda de ácido nucleico usada en la presente invención antes de la amplificación y después de la amplificación en el que la sonda se consume.

25 La figura 2 presenta gráficamente un perfil de fusión de una mezcla de sondas de ácido nucleico (sonda 1 y 2) usada en la presente invención antes de la amplificación y después de la amplificación en el que una o ambas de las sondas son consumidas.

La figura 3 presenta gráficamente una medición en tiempo real de una síntesis de amplicón a diferentes temperaturas.

30 La figura 4 ilustra ejemplos de diferentes sondas que pueden usarse en la presente invención.

La figura 5 ilustra un ejemplo de un procedimiento de la presente invención, cuando el primer oligonucleótido de la sonda se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos diana.

35 La figura 6 ilustra un ejemplo de un procedimiento de la presente invención, cuando el primer oligonucleótido de la sonda se incorpora en el producto amplificado.

La figura 7 ilustra un ejemplo de un procedimiento de la presente invención, cuando el primer oligonucleótido de la sonda es extendido y degradado durante la amplificación.

La figura 8 ilustra un ejemplo de un procedimiento de la presente invención, cuando el primer oligonucleótido de la sonda es degradado durante la amplificación.

45 La figura 9A presenta gráficamente un perfil de fusión de la sonda 1 y 2 de la presente invención antes de la amplificación. La figura 9B presenta un perfil de fusión de una mezcla de sondas 1 y 2 a diferentes relaciones.

La figura 10 presenta gráficamente un perfil de fusión de la mezcla de sondas 1 y 2 en las 4 reacciones antes de la amplificación.

50 La figura 11 presenta gráficamente una medición en tiempo real de la síntesis de amplicones a diferentes temperaturas en el ejemplo.

La figura 12 presenta gráficamente un perfil de fusión de una mezcla de sondas 1 y 2 en las 4 reacciones después de amplificación.

La figura 13 ilustra la representación de la amplificación en la que la cantidad de emisión de la primera sonda (K10) está dibujada como EF1. La representación de EF1xP calculada está dibujada como EF1xP. La representación de la amplificación para la cantidad de emisión de la segunda sonda (SV40) se muestra como EF2-(EF1 x P).

60 La figura 14 ilustra una combinación de cebadores y sondas (A) y un conjunto de combinaciones de cebadores y sondas (B).

La figura 15 ilustra un procedimiento para detectar y cuantificar 3 ácidos nucleicos diana usando un conjunto de combinaciones de cebadores y sondas.

65

La figura 16 ilustra una forma modificada de la combinación de cebadores y sondas, en la que el primer cebador y sonda están unidos juntos.

5 La figura 17 Un conjunto de sondas marcada con Fam contiene secuencias complementarias a la secuencia natural, que tiene una T_m diferente; otro conjunto de sondas marcado con Hex contiene secuencias complementarias a la secuencia de variante de la misma secuencia de ácidos nucleicos diana.

La figura 18 ilustra un procedimiento usando el conjunto de sondas descrito en la figura 17.

10 La figura 19 muestra los resultados de un ejemplo de amplificación de tríplex. Tres sondas con diferentes T_m se marcan con colorante Fam. (A) muestra un perfil de fusión generado en un tubo sin añadir ADN diana. Las siguientes figuras muestran la comparación del perfil de fusión generado en un tubo sin añadir ADN diana y el perfil de fusión generado en un tubo añadiendo ADN diana. (B) perfiles de fusión generados en un tubo con la diana 2 presente en la muestra. (C) perfil de fusión generado en un tubo con la diana 3 presente en la muestra. (D) perfil de fusión generado en un tubo con las dianas 2 y 3 presentes en la muestra. (E) perfil de fusión generado en un tubo con la diana 1 presente en la muestra. (F) perfil de fusión generado en un tubo con las dianas 1 y 2 presentes en la muestra. (G) perfil de fusión generado en un tubo con la diana 1 y 3 presentes en la muestra. (H) perfil de fusión generado en un tubo con las dianas 1, 2 y 3 presentes en la muestra.

20 La figura 20 (A) muestra la temperatura de fusión y perfil de organización de la recogida. (B) es perfiles de fusión de la sonda 1, 2 y la mezcla de la sonda 1 y 2. (C) es la vista multicomponente de la curva de disociación que muestra cómo estimar el porcentaje de la forma bicatenaria de una sonda.

25 La figura 21 son las presentaciones gráficas de la representación de las amplificaciones para cantidad consumida real y patrones de curva (Ejemplo 4).

30 La figura 22 resulta de un ejemplo de amplificación de cuádruplex. Se usaron diversas combinaciones de dianas presentes en la reacción: la reacción (A) no contiene molde; la reacción (B) contiene el molde de la diana 3; la reacción (C) contiene el molde de la diana 2; la reacción (D) contiene la diana 4; la reacción (E) contiene la diana 1 y 3; la reacción (F) contiene las dianas 1, 3 y 4.

Ejemplos

35 La presente invención se ilustra en los siguientes ejemplos, en los que las partes y los porcentajes son en peso y los grados son Celsius, a menos que se establezca de otro modo. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, sólo se facilitan a modo de ilustración.

EJEMPLO 1

40 Todos los cebadores usados en los posteriores experimentos se sintetizaron por EUROGENTEC. Los cebadores de amplificación y la sonda son:

K10R266Fam	GttcaATTGGGTTTCACCGCGCTTAGTTACA (SEQ ID NO: 1);
K10R266Dab	GCGCGGTGAAACCCAATTGAAC (SEQ ID NO: 2);
SV40R1F3FAM	ATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC (SEQ ID NO: 3);
SV40R1F3Dab	CAATGTGGTATGGCTGAT (SEQ ID NO: 4);
K10F155	CTCTGCTGACTTCAAACGAGAAGAG (SEQ ID NO: 5);
SV40RealR	CCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTAACAAC (SEQ ID NO: 6)

45 El cebador/sonda K10R266Fam (el primer oligonucleótido) está marcado en el extremo 5' con FAM. K10R266Dab (el segundo oligonucleótido) contiene DABCYL en el extremo 3'. K10R266Fam y K10R266Dab pueden formar la porción bicatenaria como:

Fam-	5'GTTCAATTGGGTTTCACCGCGCTTAGTTACA3' (SEQ ID NO: 1)
DABCYL-	3' CAAGTTAACCCAAGTGGCGCG5' (SEQ ID NO: 2)

50 El híbrido anterior se denomina la sonda K10R266. El cebador/sonda SV40R1F3FAM (el primer oligonucleótido) está marcado en el extremo 5' con FAM. SV40R1F3Dab (el segundo oligonucleótido) contiene DABCYL en el extremo 3'. SV40R1F3FAM y SV40R1F3Dab pueden formar la porción bicatenaria como:

Fam-	5'ATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC3' (SEQ ID NO: 3)
------	--

DABCYL- 3'TAGTCGGTATGGTGTAAAC5' (SEQ ID NO: 4)

Este híbrido se denomina sonda SV40R1F3.

5 El primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido se combinaron en diversas relaciones, normalmente 1:3, para formar una sonda de ADN lineal parcialmente bicatenaria. En ausencia de diana, la formación de los híbridos del primer y el segundo oligonucleótido pone el extintor y el fluoróforo en estrecha proximidad, extinguiéndose eficientemente la señal fluorescente. En presencia de la diana, el primer oligonucleótido se hibrida preferentemente con la secuencia diana y se incorpora en el amplicón. Como resultado, el extintor se separa del fluoróforo, produciendo un aumento en la emisión de fluorescencia.

10 El par de cebadores K10R266Fam y K10F155 amplifica un producto de 110 pb en presencia de una secuencia diana K10. SV40R1F3FAM y SV40Rea1R amplifican un producto de 125 pb en presencia de una secuencia diana SV40.

15 EJEMPLO 2

Los experimentos del perfil de fusión se realizaron del siguiente modo: la estabilidad térmica de las sondas se caracterizó en experimentos del perfil de fusión cuando la emisión de fluorescencia se midió a temperaturas que oscilan de 40 a 90°C. La temperatura de fusión T_m se define como la temperatura característica cuando se disocian el primer y el segundo dúplex de oligonucleótido.

20 Cada perfil de fusión se midió en un tubo en una reacción de 20 μ l que contenía tampón de PCR (1 x tampón de reacción ThermoPol, New England BioLabs). El ciclado térmico se realizó en un sistema de PCR cuantitativa Mx3005p (Stratagene) con las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo de desnaturalización a 90°C durante 3 min; 50 ciclos de mantenimiento de 30 segundos a un intervalo de temperaturas de 40 a 90°C con un incremento de 1°C por ciclo. Las medidas de la fluorescencia se registraron durante cada mantenimiento de 30 segundos de los 50 ciclos.

25 Los perfiles de fusión se determinaron para la sonda K10R266 (sonda 1) y la sonda SV40R1F3 (sonda 2) monitorizando la fluorescencia a temperaturas que oscilan de 90 a 40°C. K10R266 tiene una T_m de 72°C; SV40R1F3 tiene una T_m de 62°C (figura 9A).

Los perfiles de fusión se determinaron para una serie de mezclas de sonda K10R266 y sonda SV40R1F3:

30 La muestra 1 contiene 0,5 μ M de K10R266 y 0,5 μ M de SV40R1F3.

35 La muestra 2 contiene 0,5 μ M de K10R266 y 0,25 μ M de SV40R1F3.

La muestra 3 contiene 0,5 μ M de K10R266 y 0,125 μ M de SV40R1F3.

40 La muestra 4 contiene 0,5 μ M de K10R266 y 0,0625 μ M de SV40R1F3.

La muestra 5 contiene 0,5 μ M de K10R266 y 0,003125 μ M de SV40R1F3.

45 Los perfiles se muestran en la figura 9B.

Se probaron una combinación de sondas K10R266 y SV40R1F3 en ensayos de PCR en tiempo real usando ADN de plásmido que contenía la secuencia K10 y SV40 como moldes. Se preparó una mezcla de reacción madre que contenía 0,5 μ M de K10R266 y 0,5 μ M de SV40R1F3 (combinación de primer oligonucleótido y segundo nucleótido en la mezcla de relación 1:3) y componentes de PCR convencionales (NEB). Las reacciones de amplificación se realizaron en el sistema de PCR en tiempo real Stratagene Mx3005 con las siguientes condiciones de ciclado:

50 1. Antes de la amplificación, perfil de fusión: 50 ciclos de mantenimiento de 30 segundos a un intervalo de temperaturas de 90 a 40°C con un decremento de 1°C por ciclo, las mediciones de fluorescencia se registraron durante cada mantenimiento de 30 segundos de los 50 ciclos.

55 2. Amplificación: 30 ciclos de 94°C 20 s; 63°C 30 s; 51°C 30 s; 72°C 30 s; las mediciones de fluorescencia se registraron durante las etapas de lectura 63°C, 51°C y 72°C.

60 3. Perfil de fusión de post-amplificación: 50 ciclos de mantenimiento de 30 segundos a un intervalo de temperaturas de 40 a 90°C con un decremento de 1°C por ciclo, las mediciones de fluorescencia se registraron durante cada mantenimiento de 30 segundos de los 50 ciclos.

Se establecieron cuatro reacciones: la reacción 1 contiene el molde de K10; la reacción 2 contiene el molde de SV40; la reacción 3 contiene moldes tanto de K10 como de SV40; la reacción 4 no contiene molde.

Los perfiles de fusión de pre-amplificación para cuatro reacciones se muestran en la figura 10. La emisión de fluorescencia se recogió a 63°C durante la amplificación, se muestra en la figura 11A. La emisión de fluorescencia se recogió a 51°C durante la amplificación, se muestra en la figura 11 B. La emisión de fluorescencia se recogió a 72°C durante la amplificación, se muestra en la figura 11C. Los perfiles de fusión de post-amplificación para cuatro reacciones se muestran en la figura 12.

La comparación de los perfiles de fusión de pre-amplificación y post-amplificación indicó lo siguiente:

En la reacción 1, la sonda K10R266 es consumida y el perfil es la firma de la sonda de SV40R1F3.

En la reacción 2, la sonda SV40R1F3 es consumida.

En la reacción 3, tanto la sonda K10R266 como SV40R1F3 son consumidas.

En la reacción 4, no se consume sonda y los perfiles de pre- y post-amplificación son similares.

Las emisiones de fluorescencia EF ciclo por ciclo se obtuvieron a tres temperaturas de medición: TM 72°C, 63°C y 51°C.

Una primera emisión de fluorescencia EF1 se obtiene a una temperatura de medición 63°C, a la que no más del 10% de la segunda sonda (SV40R1F3) está en forma de dúplex (la forma bicatenaria interna de la sonda); la segunda emisión de fluorescencia EF2 se obtiene a una temperatura de medición 51°C, a la que más del 95% de las dos sondas están en forma de dúplex, y opcionalmente una emisión de fluorescencia EF0 se obtiene a una temperatura de medición 72°C, a la que no más del 10% de la primera sonda (K10R266) está en forma de dúplex.

En las reacciones de amplificación hay dos sondas para dos secuencias diana K10 y SV40. A temperatura 72°C, el 10% de la sonda K10R266 está en forma de dúplex, el 0% de la sonda SV40R1F3 está en forma de dúplex. A 63°C, el 90% de la sonda K10R266 está en forma de dúplex, el 5% de la sonda SV40R1F3 está en forma de dúplex. A 51°C, más del 98% de todas las sondas están en forma de dúplex.

La primera emisión de fluorescencia se recoge a 63°C, que es EF1; la segunda emisión de fluorescencia se recoge a 51°C, que es EF2.

	Sonda 1 (K10)		Sonda 2 (SV40)		Emisión de fluorescencia
	ds%	CCR1	ds%	CCR2	
72°C	10	10% de CCR1	0	0% de CCR2	
63°C	90	90% de CCR1	5	5% de CCR2	EF1
51°C	98	98% de CCR1	98	98% de CCR2	EF2
EF1 = 90% * CCR1 + 5% * CCR2 EF2 = 98% * CCR1 + 98% * CCR2					

Suponiendo que el 5%*CCR2 es despreciable, CCR1=EF1/90%; CCR2= EF2/98%-EF1/90%. CCR1 es la cantidad consumida real de la sonda 1; CCR2 es la cantidad consumida real de la sonda 2.

La representación de la amplificación para la cantidad consumida real de la primera sonda (K10) está dibujada como CCR1. La representación de la amplificación para la cantidad consumida real de la segunda sonda (SV40R1F3) se muestra como CCR2 (figura 13).

El cálculo de la cantidad consumida real puede realizarse manualmente. El cálculo también puede realizarse mediante un programa informático o software. Para acelerar la cuantificación, el software se diseñó para gestionar los datos de la PCR de múltiplex en tiempo real y realizar cálculos apropiados. El software tuvo otras funciones tales como selección manual de Ct y resta de los blancos.

El software se implementó en Visual Basic para aplicaciones (VBA) como un complemento para Microsoft Excel. El código fuente se organizó en dos módulos principales. Un módulo contuvo todas las funciones de "utilidad" tales como funciones matemáticas, funciones para generar matrices de datos de emisión presentes en las hojas de Excel, funciones para imprimir los datos de resultado y etiquetas, funciones para manipular errores o plantilla y funciones para generar gráficos de ciertos tipos. El segundo módulo contuvo las funciones para controlar el flujo del programa. Este módulo contuvo todas las funciones que hacían posible la interacción con el usuario, tal como selecciones de menú, rebanado de barras, inclusión/exclusión de datos en la curva patrón.

EJEMPLO 3

Los cebadores de amplificación y sonda son:

Para la diana 1 (K10)

K10R266Fam GttcaATTGGGTTTCACCGCGCTTAGTTACA (SEQ ID NO: 1);
 K10R266Dab GCGCGGTGAAACCCAATTGAAC (SEQ ID NO: 2);
 K10F155 CTCTGCTGACTTCAAACGAGAAGAG (SEQ ID NO: 5);

Para la diana 2 (SV40)

SV40R1F3FAM ATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC (SEQ ID NO: 3);
 SV40R1F3Dab CAAATGTGGTATGGCTGAT (SEQ ID NO: 4);
 SV40Rea1R CCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAAC (SEQ ID NO: 6);

Para la diana 3 (Jak2)

JKR3Fam AACAGATGCTCTGAGAAAGGCATTAGA (SEQ ID NO: 11);
 JKR3 FDabF CTCAGAGCATCTGTT (SEQ ID NO: 12);
 JKF2 GCATCTTTATTATGGCAGAGAGAA (SEQ ID NO: 13).

5 El oligonucleótido K10R266Fam es un cebador de amplificación, en el mismo tiempo el oligonucleótido K10R266Fam es el primer oligonucleótido de la sonda 1. K10R266Fam (el primer oligonucleótido) está marcado en el extremo 5' con FAM. K10R266Dab (el segundo oligonucleótido) contiene DABCYL en el extremo 3'. K10R266Fam y K10R266Dab pueden formar la porción bicatenaria. El híbrido de K10R266Fam y K10R266Dab se denomina la sonda 1.

15 El oligonucleótido SV40R1F3FAM es un cebador de amplificación, en el mismo tiempo el oligonucleótido SV40R1F3FAM es el primer oligonucleótido de la sonda 2. SV40R1F3FAM (el primer oligonucleótido) está marcado en el extremo 5' con FAM. SV40R1F3Dab (el segundo oligonucleótido) contiene DABCYL en el extremo 3'. SV40R1F3FAM y SV40R1F3Dab pueden formar la porción bicatenaria. El híbrido de SV40R1F3FAM y SV40R1F3Dab se denomina la sonda 2.

20 El oligonucleótido JKR3Fam es un cebador de amplificación, en el mismo tiempo el oligonucleótido JKR3Fam es el primer oligonucleótido de la sonda 3. JKR3Fam (el primer oligonucleótido) está marcado en el extremo 5' con FAM. JKR3FDabF (el segundo oligonucleótido) contiene DABCYL en el extremo 3'. JKR3Fam y JKR3FDabF pueden formar la porción bicatenaria. El híbrido de JKR3Fam y JKR3FDabF se denomina la sonda 3.

25 El primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido se combinaron a diversas relaciones, normalmente 1:2-1:4, para formar una sonda de ADN lineal parcialmente bicatenaria. En ausencia de diana, la formación del híbrido del primer y el segundo oligonucleótido pone el extintor y el fluoróforo en estrecha proximidad, extinguiendo eficientemente la señal fluorescente. En presencia de la diana, el primer oligonucleótido se hibrida preferentemente con la secuencia diana y se incorpora en el amplicón. Como resultado, el extintor se separa del fluoróforo produciendo un aumento en la emisión de fluorescencia.

30 El par de cebadores K10R266Fam y K10F155 amplifica un producto de 110 pb en presencia de una secuencia diana K10. SV40R1F3FAM y SV40RealR amplifican un producto de 125 pb en presencia de una secuencia diana SV40. Los cebadores JKR3Fam y JKF2 amplifican un producto de 222 pb en presencia de la secuencia diana Jak2.

35 El análisis de perfiles de fusión de la sonda 1, la sonda 2, la sonda 3 y la sonda mixta 1, 2 y 3 se realizaron usando la máquina de PRC en tiempo real Stratagene Mx3005 (figura 19). El perfil térmico se basó en los parámetros del software del análisis de la curva de disociación: calentar a 70°C durante 30 s, enfriar a 40°C, mantener durante 30 segundos, y luego aumentar lentamente la temperatura a 94°C, los datos de emisión de fluorescencia se recogen continuamente durante las temperaturas crecientes. La primera derivada negativa de la lectura de emisión con respecto a la temperatura se representa contra la temperatura para formar curvas, y cada pico de la curva se corresponde con la T_m real de la sonda.

Las amplificaciones simplex, dúplex y tríplex se realizaron usando la misma mezcla madre de reacción, pero en presencia de una diana, o dos dianas o las tres dianas.

45 Se preparó una mezcla de reacción madre que contenía 0,1 μM de primeros oligonucleótidos de cada una de las tres sondas, 0,4 μM de segundos oligonucleótidos de cada una de las tres sondas, 0,2 μM de cebadores (no el primer oligonucleótido de sonda) de cada diana y componentes de PCR convencionales (NEB). Las reacciones de

amplificación se realizaron en el sistema de PCR en tiempo real Stratagene Mx3005 con las siguientes condiciones de ciclado:

5 1. Amplificación: 40 ciclos de 94°C 15 s; 63°C 20 s; 50°C 20 s; 55°C 20 s 63°C 20 s; 68°C 20 s; 72°C 20 s; las mediciones de fluorescencia se registraron durante las etapas de lectura 50°C, 55°C, 63°C, 68°C y 72°C.

3. Perfil de fusión de post-amplificación: después del último ciclo a 72°C durante 20 s, enfriar a 40°C, mantener durante 30 segundos, y luego aumentar lentamente la temperatura a 78°C, los datos de emisión de fluorescencia se recogen continuamente durante las temperaturas crecientes.

10 Se establecieron ocho reacciones: la reacción (A) no contiene molde; la reacción (B) contiene el molde de la diana 2; la reacción (C) contiene el molde de la diana 3; la reacción (D) contiene la diana 2 y 3; la reacción (E) contiene la diana 1; la reacción (F) contiene las dianas 1 y 2; la reacción (G) contiene las dianas 1 y 3; la reacción (H) contiene las dianas 1, 2 y 3. Los perfiles de fusión de post-amplificación para ocho reacciones se muestran en la figura 19.

15 La comparación de los perfiles de fusión de post-amplificación en presencia de dianas y sin diana indicaron lo siguiente (figura 19):

20 En la reacción A, la no sonda es consumida y el perfil de fusión es la firma de la mezcla de las tres sondas.

En la reacción B, la sonda 2 es consumida.

En la reacción C, la sonda 3 es consumida.

25 En la reacción D, las sondas 2 y 3 son consumidas.

En la reacción E, la sonda 1 es consumida.

30 En la reacción F, las sondas 1 y 2 son consumidas.

En la reacción G, las sondas 1 y 3 son consumidas.

En la reacción D, las sondas 1, 2 y 3 son consumidas.

35 Las emisiones de fluorescencia EF ciclo por ciclo se obtuvieron a cinco mediciones de temperatura: TM 50°C, 55°C, 63°C, 68°C y 72°C. La cantidad consumida real para cada sonda puede calcularse por la fórmula $E_{Fa} = (CCR1)*(ds1a)\% + (CCR2)*(ds2a)\% + (CCR3)*(ds3a)\% \dots + (CCRN)*(dsna)\%$.

40 EJEMPLO 4

Cebadores de amplificación para la diana 1 (K10):

K10F155 CTCTGCTGACTTCAAACGAGAAGAG (SEQ ID NO: 5);

K10R14 CCTGAGGGTTAAATCTTCCCATTGA (SEQ ID NO: 21)

45 La sonda para la diana 1 (denominada sonda 1) incluye: primer oligonucleótido K10R266Famph GTTCAATTGGGTTTCACCGCGCTTAGTTACA (SEQ ID NO: 7), cuyo extremo 5' está unido a Fam; el extremo 3' está unido con un grupo fosfato en lugar de 3'-OH; y segundo oligonucleótido K10R266Dab GCGCGGTGAAACCAATTGAAC (SEQ ID NO: 2), cuyo extremo 3' está unido con DABCYL.

50 Cebadores de amplificación para la diana 2 (SV40):

dsredendF2 GTAAGATCCACCGGATCTAGATAAC (SEQ ID NO: 8);

sv40testR GGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAG (SEQ ID NO: 9).

55 La sonda para la diana 2 (denominada sonda 2) incluye: primer oligonucleótido SV40R1F3FAPh ATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC (SEQ ID NO: 10), cuyo extremo 5' está unido a Fam; el extremo 3' está unido con un grupo fosfato en lugar de 3'-OH; y segundo oligonucleótido SV40R1F3Dab CAAATGTGGTATGGCTGAT (SEQ ID NO: 4), cuyo extremo 3' está unido con DABCYL.

60 El primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido se combinaron a diversas relaciones, normalmente 1:2-1:4, para formar una sonda de ADN lineal parcialmente bicatenaria. En ausencia de diana, la formación del híbrido del primer y el segundo oligonucleótido pone el extintor y el fluoróforo en estrecha proximidad, extinguiendo eficientemente la señal fluorescente. En presencia de la diana, el primer oligonucleótido se hibrida preferentemente

con la secuencia diana. Como resultado, el extintor se separa del fluoróforo produciendo un aumento en la emisión de fluorescencia.

5 Los primeros oligonucleótidos en la sonda 1 y 2 se modifican para contener el extremo 3' bloqueado, de manera que no puede extenderse. Sin embargo, cuando el primer oligonucleótido se une a la secuencia diana, puede degradarse por la actividad de 5' nucleasa de una polimerasa. La degradación del primer oligonucleótido de la sonda (las sondas consumidas) produce la disminución del número de primer oligonucleótido disponible para unirse a los segundos oligonucleótidos de sonda, aumentando así la señal de fluorescencia cuando se mide a temperatura apropiada.

10 El análisis de perfiles de fusión de la sonda 1, la sonda 2 y la sonda mixta 1 y 2 se realizó usando la máquina de PRC en tiempo real Stratagene Mx3005 (figura 20). El perfil térmico se basó en los parámetros del software del análisis de la curva de disociación (figura 20A): calentar a 72°C durante 30 s, enfriar a 40°C, mantener durante 30 segundos, y luego aumentar lentamente la temperatura a 94°C, los datos de emisión de fluorescencia se recogen continuamente durante las temperaturas crecientes. La primera derivada negativa de la lectura de emisión con respecto a la temperatura se representa contra la temperatura para formar curvas, y cada pico de la curva se corresponde con la T_m real de la sonda. La sonda 1 tiene un pico a 67°C como T_m ; la sonda 2 tiene un pico a 59°C como T_m (figura 20B).

15 Los porcentajes de la forma bicatenaria y la forma monocatenaria de cada sonda se estimaron en la siguiente tabla. El cálculo real también puede hacerse por software informático.

	sonda 1		sonda 2	
	ds %	ss %	ds %	ss %
71°C	30	70	0	100
69°C	40	60	0	100
67°C	50	50	1	99
65°C	65	35	3	97
62°C	75	25	5	95
61°C	85	15	25	75
59°C	95	5	50	50
57°C	97	3	65	35
55°C	98	2	75	25
54°C	100	0	85	15
52°C	100	0	100	0

25 La estimación (cálculo) puede hacerse basándose en la vista multicomponente de la curva de disociación (la fluorescencia R frente a la temperatura, figura 20C). La línea de referencia se supuso 100% bicatenaria, que tiene una R como 9000. R a una temperatura (100% monocatenaria) es 24500. A la temperatura 62°C, R es 13000. La diferencia de los valores de fluorescencia entre 62°C y la línea de referencia $dR=13000-9000=4000$. El porcentaje de sonda bicatenaria a 62°C se estima como $4000/(24500-9000)$ que es el 25,8%.

30 PCR de múltiplex en tiempo real y análisis de la curva patrón

La mezcla madre de cebador-sonda se estableció del siguiente modo: los cebadores y las sondas se mezclaron a una concentración final 0,4 μ M de sondas y 0,6 μ M de cebadores, que crea una 2X mezcla madre de cebador-sonda.

35 La mezcla de reacción se creó combinando cantidad igual de 2X mezcla madre de cebador-sonda y 2X mezcla madre de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems, n° cat. 4369514).

Los ADN mensajeros que contenían diana 1, diana 2 y diana mixta 1 y 2 se diluyeron seriadamente del siguiente modo: 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001.

40 Las PCR simplex se realizaron usando muestra de ADN que contenía diana 1 (k10) o diana 2 (SV40). La PCR dúplex se realizó usando muestra de ADN que contenía la mezcla de diana 1 (k10) y diana 2 (SV40).

45 El perfil térmico fue: 95°C durante 8 min 30 s; 40 ciclos de 94°C 10 s; 66°C 20 s; 63°C 20 s; 54°C 30 s; 52°C 20 s; 61°C 20 s; 62°C 20 s; 68°C 20 s; las mediciones de fluorescencia se registraron durante las etapas de lectura 66°C,

ES 2 396 044 T3

63°C; 54°C; 52°C; 61°C; 62°C; 68°C.

La emisión de fluorescencia (dR) a 62°C se eligió como EF1; la emisión de fluorescencia (dR) a 52°C se eligió como EF2. Basándose en la tabla anterior y la fórmula para el cálculo de la cantidad consumida real (CCR) en la descripción y reivindicaciones, se tuvo lo siguiente:

$$\text{A } 62^{\circ}\text{C, EF1} = 0,75 * (\text{CCR1}) + 0,05 * \text{CCR2} \quad (1)$$

$$\text{A } 52^{\circ}\text{C, EF2} = 100\% * \text{CCR1} + 100\% * \text{CCR2} \quad (2)$$

Según (1) y (2):

$$\text{CCR1} = (\text{EF1} - 0,05 * \text{EF2})/0,7$$

$$\text{CCR2} = (0,75 * \text{EF2} - \text{EF1})/0,7$$

Para la reacción de dúplex cuando ambas dianas están presentes, EF1 y EF2 se obtuvieron como viene a continuación:

EF1:

ADN	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001
Ciclos	Fluorescencia (dR)						
1	221,8519	592,1771	466,8143	570,415	633,3002	1036,42	421,2163
2	78,16296	358,3926	225,5527	329,063	377,0944	719,6661	242,6808
3	-92,1926	86,34888	14,51325	45,78511	74,59224	416,5415	-6,11397
4	-50,1037	-12,7813	41,21457	-10,1348	-30,6753	276,2934	-85,6618
5	64,13333	14,05972	-1,8372	-40,602	15,13533	123,0042	-63,1274
6	201,4198	10,22446	-41,4733	-53,2517	82,6387	36,36786	44,4345
7	377,3893	-11,5029	-35,6376	-28,9621	-14,2937	-1,71745	48,67219
8	603,2532	-2,52759	-35,6445	72,64048	-95,038	-19,6191	10,80182
9	937,7486	37,68192	4,40094	56,68076	-41,7196	-22,7929	55,5621
10	1438,121	267,6362	54,46389	-16,4664	-0,047	5,60935	69,53259
11	1912,119	515,172	80,866	-8,3427	25,41037	-23,7965	73,90648
12	2478,326	746,9017	174,0478	-19,1287	-25,8707	-48,8049	9,74818
13	3092,269	1166,696	420,1562	1,78202	-86,7312	9,31902	-13,5875
14	3609,791	1705,178	759,2402	28,25835	-59,7849	10,1538	-2,64903
15	4192,506	2276,224	1071,983	81,25654	5,76368	57,22552	-0,2858
16	4766,951	2836,79	1433,611	167,0954	87,84637	69,04288	-7,78099
17	5317,307	3430,196	1859,535	343,2144	62,77375	-24,8912	-85,5623
18	5864,633	4030,883	2451,891	642,0935	29,9827	-35,4091	-71,1057
19	6371,949	4558,996	3146,391	1035,559	102,6188	4,87837	-54,5698
20	6808,262	5074,252	3798,272	1409,887	256,3974	-15,5657	-64,6741
21	7188,24	5633,888	4425,947	1861,169	432,2234	-59,9202	16,67492
22	7615,441	6064,984	5029,553	2489,103	739,0652	28,08837	39,50831
23	8014,048	6434,568	5640,136	3107,587	1285,579	186,218	25,16984
24	8365,791	6845,646	6207,045	3699,587	1822,317	301,388	61,10741
25	8736,58	7257,224	6784,729	4176,094	2328,129	483,2382	96,137
26	9026,05	7652,967	7387,671	4613,769	2908,966	836,6483	145,8639
27	9241,081	7934,433	7890,366	5104,5	3553,812	1367,912	282,49

ES 2 396 044 T3

28	9454,632	8185,806	8268,313	5596,249	4202,327	1961,793	465,7491
29	9667,69	8492,481	8646,676	6044,339	4731,732	2518,214	688,2191
30	9851,583	8824,257	8953,845	6525,541	5146,767	3114,147	997,4262
31	10081,42	9017,401	9232,615	6913,781	5628,011	3785,585	1400,212
32	10292,91	9159,333	9552,92	7172,034	6098,659	4475,191	1954,525
33	10403,28	9320,528	9898,736	7505,291	6576,109	5118,187	2599,346
34	10514,61	9401,811	10201,06	7778,55	7015,158	5748,646	3245,67
35	10611,93	9523,123	10353,21	7965,142	7308,741	6347,592	3873,495
36	10640,24	9682,444	10468,31	8154,512	7596,835	6862,701	4481,487
37	10704,55	9664,769	10654,39	8367,142	7799,1	7291,197	5006,868
38	10781,86	9608,762	10868,13	8504,858	7997,755	7619,823	5543,046
39	10833,84	9651,977	10982,09	8637,936	8213,206	7987,825	6035,822
40	10911,49	9675,693	11063,72	8819,347	8397,157	8380,493	6459,098

EF2:

ADN	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001
Ciclos	Fluorescencia (dR)						
1	251,4671	205,968	310,1105	43,54564	382,2339	312,4356	256,8311
2	55,8251	87,68861	218,6788	27,16047	275,7769	193,1356	172,3411
3	-49,5206	-4,1834	109,6545	25,47901	225,5422	99,35408	102,8511
4	-68,4342	-5,91962	23,09933	-18,3012	166,0481	38,41212	46,69446
5	62,12963	24,38944	-16,2994	-56,781	108,1344	46,41665	10,31559
6	415,1859	-14,2864	-25,6461	-9,82739	101,7474	35,07002	22,19599
7	903,4063	3,04275	6,69132	35,93742	40,86928	-2,06033	18,49614
8	1567,348	170,0403	13,25673	20,63928	-8,83917	6,54807	-22,3971
9	2529,197	501,5939	-1,10185	-22,6798	7,50892	-11,5973	-44,0215
10	3752,015	982,6662	29,5649	-23,006	-13,4575	-55,6605	15,77702
11	5171,823	1695,911	138,5734	-8,00106	-23,5287	-74,0298	26,04988
12	6558,96	2707,548	399,3626	-8,88584	-13,6349	-86,1676	-25,1858
13	7836,874	3920,648	860,0785	38,26616	-16,4193	-67,5617	-18,591
14	9129,714	5321,902	1511,437	144,7638	-20,7633	-61,3746	-20,3861
15	10335,2	6915,875	2471,009	310,3765	-5,96032	-51,9937	-13,3111
16	11419,56	8566,42	3724,986	633,3611	54,22491	-27,5482	-0,61273
17	12463,55	10027,49	5220,098	1150,136	114,5376	-31,0812	-9,03993
18	13343,41	11328,73	6908,922	1950,175	243,226	-26,9403	-27,509
19	14056,57	12656,7	8570,649	3099,635	520,0398	20,75852	-12,992
20	14700,82	13829,58	10210,68	4441,901	985,5619	84,30999	-1,81296
21	15160,44	14812,09	11791,47	5899,104	1636,987	165,1457	-30,7466
22	15500,18	15700,82	13229,19	7446,952	2533,379	292,7428	-35,3845
23	15882,3	16474,95	14480,55	8935,681	3752,761	531,2603	4,74292
24	16224,54	17109,88	15546,79	10263,7	5190,473	992,7513	27,12541
25	16511,15	17676,08	16537,66	11545,83	6745,627	1711,567	90,59292

ES 2 396 044 T3

26	16779,23	18230,03	17359,4	12765,31	8268,93	2691,491	222,7554
27	16974,12	18690,57	18075,1	13756,26	9666,282	4042,45	514,8163
28	16980,95	19057,31	18772,45	14598,35	11033,65	5713,422	1022,177
29	17028,43	19398,44	19303,02	15325,5	12286,02	7498,065	1731,637
30	17115,79	19590,37	19730,33	15961,32	13248,73	9328,264	2795,13
31	17137,45	19764,9	20228,55	16577,71	14156,22	11036,98	4243,635
32	17161,87	20071,3	20558,75	17061,62	15000,3	12520,54	5867,809
33	17179,21	20321,65	20749,6	17509,04	15713,24	13969,38	7541,208
34	17161,53	20504,66	21095,34	18035,63	16353,48	15241,98	9240,014
35	17091,17	20524,22	21345,03	18399,94	16909,47	16322,83	10855,29
36	17034,91	20487,29	21421,39	18585,82	17293,39	17336,1	12288,72
37	16877,36	20519,2	21450,29	18810,89	17550,28	18050,5	13425,21
38	16677,05	20515,39	21532,38	19083,03	17903,49	18608,29	14431,37
39	16547,15	20532,68	21645,86	19238,86	18119,48	19175,54	15425,44
40	16436,08	20571,96	21712,84	19343,85	18238,97	19721,29	16388,67

Las CCR calculadas para la diana 1 se enumeran en la siguiente tabla:

$$CCR1 = (EF1 - 0,05 * EF2)/0,7$$

ADN	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001
Ciclos	Fluorescencia (dR)						
1	298,9693	831,2553	644,7269	811,7682	877,4121	1458,284	583,3925
2	107,6739	505,726	306,5982	468,15	519,0079	1014,299	334,3768
3	-128,167	123,6544	12,90075	63,58737	90,45019	587,9625	-16,0808
4	-66,6886	-17,8362	57,22801	-13,171	-55,6825	391,9611	-125,709
5	87,18121	18,34321	-1,46033	-53,9471	13,89802	172,4047	-90,9188
6	258,0864	15,62683	-57,4158	-75,3718	110,7876	49,44908	61,89243
7	474,5986	-16,65	-51,3888	-43,9414	-23,3388	-2,30633	68,21055
8	749,8369	-15,7566	-51,8677	102,2979	-135,137	-28,495	17,03097
9	1158,984	18,00318	6,365761	82,5925	-60,1358	-31,7328	82,51882
10	1786,458	312,1469	75,69378	-21,8801	0,894105	11,98911	98,20534
11	2362,183	614,8234	105,6248	-11,3466	37,98115	-28,7071	103,72
12	3071,969	873,6061	220,1138	-26,692	-35,9842	-63,5665	15,72496
13	3857,751	1386,662	538,789	-0,18755	-122,729	18,13872	-18,0828
14	4504,722	2055,833	976,669	30,0288	-83,9239	18,88933	-2,32818
15	5251,066	2757,757	1354,903	93,91102	8,659566	85,46458	0,542506
16	5994,248	3440,67	1781,946	193,4676	121,6216	100,6004	-11,0719
17	6705,9	4184,031	2283,615	408,1537	81,49553	-33,3388	-121,586
18	7424,947	4949,209	3009,207	777,9782	25,45914	-48,6602	-99,6146
19	8098,744	5608,801	3882,655	1257,968	109,4526	5,486349	-77,0288
20	8676,03	6261,104	4696,768	1696,846	295,8847	-28,2588	-92,262
21	9186,026	6990,405	5480,533	2237,449	500,5343	-97,3964	26,0175
22	9772,045	7542,776	6240,133	3023,936	874,8518	19,21605	58,96791

ES 2 396 044 T3

23	10314,19	8015,457	7023,012	3801,147	1568,487	228,0786	35,61813
24	10792,23	8557,361	7756,722	4552,003	2232,562	359,6435	85,35877
25	11301,46	9104,886	8511,208	5141,146	2844,068	568,0855	130,8676
26	11695,84	9630,665	9313,859	5679,29	3565,028	1002,963	192,4659
27	11989,11	9999,863	9980,874	6309,553	4386,426	1665,413	366,7845
28	12293,69	10332,77	10470,99	6951,903	5215,206	2394,46	592,3432
29	12594,67	10746,51	10973,61	7540,091	5882,044	3061,872	859,4819
30	12851,13	11206,77	11381,9	8182,107	6406,186	3782,477	1225,242
31	13177,93	11470,22	11744,55	8692,708	7028,858	4619,623	1697,187
32	13478,31	11651,1	12178,55	9027,076	7640,921	5498,806	2373,049
33	13634,74	11863,49	12658,94	9471,199	8272,066	6313,883	3174,694
34	13795,05	11966,54	13066,13	9823,955	8853,549	7123,638	3976,671
35	13939,1	12138,45	13265,66	10064,49	9233,239	7902,072	4758,187
36	13983,56	12368,69	13424,63	10321,74	9617,38	8565,566	5524,359
37	14086,69	12341,16	13688,39	10609,42	9887,98	9126,674	6193,726
38	14211,44	12261,42	13987,88	10786,72	10146,54	9556,297	6887,825
39	14294,98	12321,92	14142,57	10965,7	10438,9	10041,5	7520,786
40	14413,83	12352,99	14254,4	11217,36	10693,16	10563,47	8056,664

La representación gráfica de las representaciones de amplificación para CCR1 se muestra en la figura 21A. La curva patrón se muestra en la figura 21B.

5 Las CCR calculadas para la diana 2 se enumeran en la siguiente tabla:

$$CCR2 = (0,75 * EF2 - EF1)/0,7$$

ADN	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001
Ciclos	Fluorescencia (dR)						
1	-47,5022	-625,287	-334,616	-768,223	-495,178	-1145,85	-326,561
2	-51,8488	-418,037	-87,9194	-440,99	-243,231	-821,163	-162,036
3	78,64594	-127,838	96,75373	-38,1084	135,092	-488,608	118,9319
4	-1,7456	11,91655	-34,1287	-5,13019	221,7306	-353,549	172,4038
5	-25,0516	6,046229	-14,8391	-2,83399	94,23638	-125,988	101,2344
6	157,0995	-29,9133	31,76967	65,54444	-9,04024	-14,3791	-39,6964
7	428,8077	19,69278	58,0801	79,87884	64,20807	0,246004	-49,7144
8	817,5112	185,7968	65,12441	-81,6586	126,298	35,04308	-39,4281
9	1370,213	483,5907	-7,46761	-105,272	67,64471	20,13557	-126,54
10	1965,557	670,5193	-46,1289	-1,1258	-14,3516	-67,6496	-82,4283
11	2809,639	1081,088	32,94868	3,345579	-61,5099	-45,3226	-77,6701
12	3486,991	1833,942	179,2487	17,8062	22,34935	-22,6011	-40,9108
13	3979,123	2533,985	321,2895	38,45371	106,3096	-85,7005	-0,50822
14	4624,992	3266,069	534,7678	114,7349	63,16068	-80,2639	-18,0579
15	5084,13	4158,117	1116,106	216,4655	-14,6199	-137,458	-13,8536
16	5425,31	5125,75	1943,041	439,8935	-67,3967	-128,149	10,4592
17	5757,647	5843,458	2936,484	741,9825	33,04203	2,257639	112,5462

ES 2 396 044 T3

18	5918,465	6379,525	3899,715	1172,197	217,7669	21,71986	72,10566
19	5957,824	7047,902	4687,995	1841,667	410,5871	15,27217	64,03682
20	6024,792	7568,477	5513,91	2745,055	689,6772	112,5688	90,44904
21	5974,415	7821,69	6310,941	3661,655	1136,453	262,5421	-56,7641
22	5728,138	8158,044	6989,059	4423,016	1658,528	273,5267	-94,3524
23	5568,108	8459,492	7457,54	5134,535	2184,274	303,1817	-30,8752
24	5432,303	8552,52	7790,069	5711,702	2957,911	633,1078	-58,2334
25	5209,693	8571,193	8026,448	6404,68	3901,559	1143,481	-40,2747
26	5083,386	8599,367	8045,539	7086,024	4703,901	1688,528	30,2895
27	4985,012	8690,708	8094,225	7446,704	5279,856	2377,037	148,0318
28	4687,26	8724,533	8301,466	7646,448	5818,443	3318,962	429,8334
29	4433,763	8651,925	8329,415	7785,405	6403,98	4436,192	872,1549
30	4264,659	8383,6	8348,434	7779,217	6842,547	5545,787	1569,888
31	3959,521	8294,68	8484,001	7885,006	7127,362	6417,359	2546,448
32	3683,561	8420,204	8380,202	8034,549	7359,379	7021,734	3494,76
33	3544,47	8458,161	8090,662	8037,842	7441,177	7655,495	4366,514
34	3366,479	8538,121	8029,209	8211,672	7499,927	8118,338	5263,343
35	3152,068	8385,771	8079,379	8335,443	7676,232	8420,755	6097,102
36	3051,351	8118,604	7996,758	8264,075	7676,007	8770,53	6764,362
37	2790,675	8178,046	7761,896	8201,47	7662,296	8923,83	7231,479
38	2465,607	8253,976	7544,503	8296,31	7756,948	9051,994	7543,548
39	2252,171	8210,76	7503,288	8273,155	7680,577	9134,043	7904,65
40	2022,247	8218,972	7458,443	8126,489	7545,813	9157,817	8332,001

La representación gráfica de las representaciones de amplificación para CCR2 se muestra en la figura 21C. La curva patrón se muestra en la figura 21D.

5 Si sólo la diana 1 está presente en la reacción, la presentación gráfica de las representaciones de la amplificación para CCR1 se muestra en la figura 21E, las representaciones de la amplificación para CCR2 se muestran en la figura 21G. Los resultados muestran que, debido a que sólo la diana 1 está presente en la reacción, la CCR1 revela la curva de amplificación normal y la curva patrón normal (figura 21F), mientras que CCR2 revela la curva de referencia que demuestra que no hay señal para la diana 2.

10 Si sólo la diana 2 está presente en la reacción, la presentación gráfica de las representaciones de la amplificación para CCR1 se muestra en la figura 21H, las representaciones de la amplificación para CCR2 se muestran en la figura 21I. Los resultados muestran que, debido a que sólo la diana 2 está presente en la reacción, la CCR2 revela la curva de amplificación normal y la curva patrón normal (figura 21J), mientras que CCR1 revela la curva de referencia que demuestra que no hay señal para la diana 1.

EJEMPLO 5

Cebadores de amplificación para la diana 1 (K10):

K10F155 CTCTGCTGACTTCAAACGAGAAGAG (SEQ ID NO: 5);

K10R14 CCTGAGGGTTAAATCTTCCCCATTGA (SEQ ID NO: 21)

La sonda para la diana 1 (denominada sonda 1) incluye: primer oligonucleótido K10R266Famph GTTCAATTGGGTTTCACCGCGCTTAGTTACA (SEQ ID NO: 7), cuyo extremo 5' está unido a Fam; el extremo 3' está unido a un grupo fosfato en lugar de 3'-OH; y segundo oligonucleótido K10R266Dab GCGCGGTGAAACCAATTGAAC (SEQ ID NO: 2), cuyo extremo 3' está unido a DABCYL.

Cebadores de amplificación para la diana 2 (SV40):

ES 2 396 044 T3

dsredendF2 GTAAGATCCACCGGATCTAGATAAC (SEQ ID NO: 8);
sv40testR GGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAG (SEQ ID NO: 9).

5 La sonda para la diana 2 (denominada sonda 2) incluye: primer oligonucleótido SV40R1F3FAPh ATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC (SEQ ID NO: 10), cuyo extremo 5' está unido a Fam; el extremo 3' está unido a un grupo fosfato en lugar de 3'-OH; y segundo oligonucleótido SV40R1F3Dab CAAATGTGGTATGGCTGAT (SEQ ID NO: 4), cuyo extremo 3' está unido a DABCYL.

Cebadores de amplificación para la diana 3 (Jak2):

JknewF8 GTGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACA (SEQ ID NO: 14);
JKnewR8 CTCCTGTAAATTATAGTTTACTGACA (SEQ ID NO: 15);

10 La sonda para la diana 3 (denominada sonda 3) incluye: primer oligonucleótido JKR3FamPh AACAGATGCTCTGAGAAAGGCATTAGA (SEQ ID NO: 16), cuyo extremo 5' está unido a Fam; el extremo 3' está unido a un grupo fosfato en lugar de 3'-OH; y segundo oligonucleótido JKR3FDabF CTCAGAGCATCTGTT (SEQ ID NO: 12), cuyo extremo 3' está unido a DABCYL.

15 Cebadores de amplificación para la diana 4 (Kras):

KR12GVF1B GTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAGGCCTGC (SEQ ID NO: 17);
KR12GVR12As GATCATATTCGTCCACAAAATGATTC (SEQ ID NO: 18).

20 La sonda para la diana 4 (denominada sonda 4) incluye: primer oligonucleótido KR12GVFamPh GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT (SEQ ID NO: 19), cuyo extremo 5' está unido a Fam; el extremo 3' está unido a un grupo fosfato en lugar de 3'-OH; y segundo oligonucleótido KR12GVFamDab CACAAGTTTATATTC (SEQ ID NO: 20), cuyo extremo 3' está unido a DABCYL.

25 El primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido se combinaron a diversas relaciones, normalmente 1:2-1:4, para formar una sonda de ADN lineal parcialmente bicatenaria. En ausencia de diana, la formación del híbrido del primer y el segundo oligonucleótido pone el extintor y el fluoróforo en estrecha proximidad, extinguiendo eficientemente la señal fluorescente. En presencia de la diana, el primer oligonucleótido se hibrida preferentemente con la secuencia diana. Como resultado, el extintor se separa del fluoróforo produciendo un aumento en la emisión de fluorescencia.

30 Los primeros oligonucleótidos en todas las sondas se modifican para contener el extremo 3' bloqueado, de manera que no puede extenderse. Sin embargo, cuando el primer oligonucleótido se une a la secuencia diana, puede degradarse por la actividad de 5' nucleasa de una polimerasa. La degradación del primer oligonucleótido de la sonda (las sondas consumidas) produce la disminución del número de primer oligonucleótido disponible para unirse a los segundos oligonucleótidos de sonda, aumentando así la señal de fluorescencia cuando se mide a temperatura apropiada.

PCR de múltiple en tiempo real y análisis de la curva patrón

40 La mezcla madre de cebador-sonda se estableció del siguiente modo: los cebadores y las sondas se mezclaron a una concentración final 0,4 μ M de sondas y 0,6 μ M de cebadores, que crea una 2X mezcla madre de cebador-sonda.

45 La mezcla de reacción se creó combinando cantidad igual de 2X mezcla madre de cebador-sonda y 2X mezcla madre de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems, nº cat. 4369514).

50 El perfil térmico fue: 95°C durante 8 min 30 s; 40 ciclos de 94°C 10 s; 66°C 20 s; 63°C 20 s; 54°C 30 s; 49°C 20 s; 55°C 20 s; 61°C 20 s; 68°C 20 s; las mediciones de fluorescencia se registraron durante las etapas de lectura 66°C, 63°C, 54°C; 49°C; 55°C; 61°C; 68°C.

55 Se usaron diversas combinaciones de dianas presentes en la reacción. La figura 22 muestran algunos de los resultados: la reacción (A) no contiene molde; la reacción (B) contiene el molde de la diana 3; la reacción (C) contiene el molde de la diana 2; la reacción (D) contiene la diana 4; la reacción (E) contiene la diana 1 y 3; la reacción (F) contiene las dianas 1, 3 y 4.

Texto libre de listado de secuencias

SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 7 y 21 <223> Cebador de PCR derivado de K10
 SEQ ID NOs: 3, 4, 6 y 8-10 <223> Cebador de PCR derivado de SV40
 SEQ ID NOs: 11-16 <223> Cebador de PCR derivado de Jak2
 SEQ ID NOs: 17-20 <223> Cebador de PCR derivado de Kras

Listado de secuencias

5 <110> Oxitec Limited
 <120> Amplificación y detección de múltiplex
 10 <130> 489.99609/03
 <160> 21
 <170> PatentIn versión 3.3
 15 <210> 1
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de K10
 <400> 1
 25 gtcaattgg gtttcaccgc gcttagttac a 31
 <210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de K10
 35 <400> 2
 gcgcggtgaa acccaattga ac 22
 <210> 3
 <211> 31
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de SV40
 45 <400> 3
 atcagccata ccacattgt agaggttta c 31
 <210> 4
 50 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Cebador de PCR derivado de SV40
 <400> 4
 caaatgtggt atggctgat 19
 60 <210> 5

ES 2 396 044 T3

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de K10

<400> 5
 ctctgctgac ttcaaacga gaagag 26

10 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de SV40

<400> 6
 20 ccattataag ctgcaataaa caagttaaca ac 32

<210> 7
 <211> 31
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR derivado de K10

30 <400> 7
 gttcaattgg gtttcaccgc gcttagttac a 31

<210> 8
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR derivado de SV40

40 <400> 8
 gtaagatcca ccggatctag ataac 25

<210> 9
 45 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> Cebador de PCR derivado de SV40

<400> 9
 gggaggtgtg ggaggtttt taaag 25

55 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de SV40

<400> 10
 65 atcagccata ccacattgt agaggttta c 31

<210> 11

ES 2 396 044 T3

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de Jak2
 <400> 11
 aacagatgct ctgagaaagg cattaga 27
 10 <210> 12
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de Jak2
 <400> 12
 20 ctcagagcat ctgtt 15
 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de Jak2
 30 <400> 13
 gcatctttat tatggcagag agaa 24
 <210> 14
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de Jak2
 40 <400> 14
 gtggagacga gagtaagtaa aactaca 27
 <210> 15
 <211> 29
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador de PCR derivado de Jak2
 <400> 15
 ctctgttaa attatagttt aactgaca 29
 55 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador de PCR derivado de Jak2
 <400> 16
 65 aacagatgct ctgagaaagg cattaga 27
 <210> 17

ES 2 396 044 T3

	<code><211> 34</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
5	<code><220></code>		
	<code><223> Cebador de PCR derivado de Kras</code>		
	<code><400> 17</code>		
	<code>gtcacatttt cattattttt attataaggc ctgc</code>		34
10	<code><210> 18</code>		
	<code><211> 26</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
15	<code><220></code>		
	<code><223> Cebador de PCR derivado de Kras</code>		
	<code><400> 18</code>		
20	<code>gatcatattc gtccacaaaa tgattc</code>		26
	<code><210> 19</code>		
	<code><211> 29</code>		
	<code><212> ADN</code>		
25	<code><213> Artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Cebador de PCR derivado de Kras</code>		
30	<code><400> 19</code>		
	<code>gaatataaac ttgtgtagt tggagctgt</code>		29
	<code><210> 20</code>		
	<code><211> 15</code>		
35	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Cebador de PCR derivado de Kras</code>		
40	<code><400> 20</code>		
	<code>cacaagtta tattc</code>		15
	<code><210> 21</code>		
45	<code><211> 26</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><220></code>		
50	<code><223> Cebador de PCR derivado de K10</code>		
	<code><400> 21</code>		
	<code>cctgagggtt aaatctccc cattga</code>		26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción de amplificación que comprende:
- 10 (i) uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos directos/inversos, en el que los pares de cebadores pueden amplificar uno o más ácidos nucleicos diana, si están presentes en la muestra,
- (ii) dos o más sondas, en el que cada sonda comprende:
- 15 un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y
- al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una
- 20 porción bicatenaria,
- en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y
- 25 en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes;
- (b) realizar una reacción de amplificación en la muestra/mezcla de reacción bajo condiciones de amplificación, en el que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de sondas que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana se hibridan con el ácido nucleico diana, consumiéndose así, en el que los oligonucleótidos consumidos de sondas ya no pueden participar más en formar la porción bicatenaria (el dúplex) de la sonda; y
- 30 (c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de sondas sin consumir en la mezcla de reacción detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,
- 35 en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana está presente o no en dicha muestra,
- 40 en el que una primera sonda de dichas al menos dos de las sondas tiene una temperatura de fusión T_{m1} en términos de su porción bicatenaria,
- 45 en el que una segunda sonda de dichas al menos dos de las sondas tiene una temperatura de fusión T_{m2} en términos de su porción bicatenaria,
- en el que $T_{m1} > T_{m2}$,
- 50 en el que las mismas marcas están independientemente unidas a las primera y segunda sondas, en el que una reducción de cualquier pico de fusión en T_{m1} y/o T_{m2} proporciona indicación de consumo de la primera y/o segunda sonda(s).
- 55 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que:
- (A) dicho perfil de fusión se mide antes de que tenga lugar la reacción/amplificación (perfil de fusión de pre-amplificación), y/o se mide después de completarse la reacción/amplificación (perfil de fusión de post-amplificación), y/o se mide durante la reacción/amplificación en cada ciclo o ciclos seleccionados (perfil de fusión de semi-amplificación),
- 60 en el que dicho procedimiento comprende adicionalmente la etapa (d)
- (i) comparar al menos dos perfiles de fusión obtenidos en (c)
- 65 y/o

(ii) comparar un perfil de fusión obtenido en la etapa (c)

con un perfil de fusión previamente obtenido de las mismas sondas o

5 con un perfil de fusión de las mismas sondas obtenido en paralelo al mismo tiempo en reacciones de control, o

con un perfil de fusión teórico de las mismas sondas

10 en el que un cambio en el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana está presente o no en dicha muestra/mezcla de reacción,

en el que dicho perfil de fusión de pre-amplificación se mide en el mismo recipiente de reacción antes del inicio de la reacción/amplificación, o se mide en un recipiente de reacción separado cuando no tiene lugar la amplificación debido a que esa mezcla de reacción carece de uno o más componentes necesarios para la reacción/amplificación,

15 en el que en la etapa (d) el perfil de fusión de post-amplificación o semi-amplificación se compara con el perfil de fusión de pre-amplificación del dúplex de sondas para determinar si una sonda particular se consume, siendo esto indicativo de la presencia de la diana correspondiente en la muestra,

20 preferentemente (A1) en el que al menos una marca detectable es una marca fluorescente, en el que la etapa (b) comprende además la etapa (b1) obtener emisiones de fluorescencia (EF) ciclo por ciclo a diversas temperaturas de medición (TM), en el que dichas emisiones de fluorescencia (EF) es una fluorescencia corregida con el nivel inicial (dR),

25 más preferentemente (A1a) en el que cuando dicha mezcla de reacción de amplificación comprende "n" sondas para la detección de múltiplex de "n" dianas de ácido nucleico, en el que la primera sonda tiene una temperatura de fusión T_{m1} , la segunda sonda tiene una temperatura de fusión T_{m2} , la tercera sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m3} , la n sonda tiene una temperatura de fusión T_{mn} , en el que $T_{m1} > T_{m2} > T_{m3} \dots > T_{mn}$, los porcentajes de la forma bicatenaria de cada sonda a una temperatura particular o temperaturas diferentes se determinan experimentalmente o se calculan en teoría por un programa informático, en el que una primera emisión de fluorescencia EFa se obtiene a una temperatura de medición TMa, a la que más del 50% de la primera sonda está en forma de dúplex, la segunda emisión de fluorescencia EFb se obtiene a una temperatura de medición TMb, a la que más del 50% de la segunda sonda está en forma de dúplex, la n-1 emisión de fluorescencia EF(n-1) se obtiene a una temperatura de medición TM(n-1), a la que más del 50% de la (n-1) sonda está en forma de dúplex, la n emisión de fluorescencia EFn se obtiene a una temperatura de medición TMn, a la que más del 80% de la n sonda está en forma de dúplex, y opcionalmente una emisión de fluorescencia EFO se obtiene a una temperatura de medición TMO, a la que no más del 10% de la primera sonda está en forma de dúplex, en el que n es un número entero positivo y $n \geq 2$,

40 o (A1b) en el que la etapa (b) comprende además la etapa (b2) determinar la cantidad consumida real (CCR) ciclo por ciclo de la emisión de fluorescencia para cada sonda, en el que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de la k sonda se representa como CCR_k , en el que a una temperatura de medición particular (TMa) la k sonda tiene el porcentaje (dska)% en forma ds (bicatenaria), la emisión de fluorescencia EFa a esta temperatura de medición TMa contribuida por la primera sonda será el (ds1a)% * (CCR1), la contribuida por la segunda sonda será el (ds2a)% * (CCR2), la contribuida por la k sonda será el (dska)% * (CCR_k), la contribuida por la n sonda será el (dsna)% * (CCR_n),

en el que el cálculo de cantidad consumida real (CCR) usa la siguiente fórmula:

a la temperatura de medición TMa, la emisión de fluorescencia total será:

50
$$EFa = (CCR1) * (ds1a)\% + (CCR2) * (ds2a)\% + (CCR3) * (ds3a)\% \dots + (CCRn) * (dsna)\%$$

a la temperatura de medición TMb, la emisión de fluorescencia total será

55
$$EFb = (CCR1) * (ds1b)\% + (CCR2) * (ds2b)\% + (CCR3) * (ds3b)\% \dots + (CCRn) * (dsna)\%$$

a la temperatura de medición TMc, la emisión de fluorescencia total será

60
$$EFc = (CCR1) * (ds1c)\% + (CCR2) * (ds2c)\% + (CCR3) * (ds3c)\% \dots + (CCRn) * (dsna)\%$$

y así sucesivamente, en el que la CCR para cada sonda puede calcularse a partir de las fórmulas anteriores, en las que "*" denota "multiplicar por", "k" es un número entero positivo, $1 \leq k \leq n$, y "n" es el número de sondas,

65 particularmente preferentemente en el que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de cada sonda se obtiene mediante un programa informático que realiza el cálculo a cada temperatura de medición en cada ciclo, o en el que:

(B) dicha amplificación es una amplificación isotérmica o una reacción de amplificación de ciclado térmico que comprende dos o más etapas de desnaturalización, hibridación y extensión de cebador.

5 3. Un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción que comprende:

10 dos o más sondas, en el que cada sonda comprende:

un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y

15 al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

20 en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y

25 en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión (temperatura de fusión T_m) de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes, y son distinguibles en un análisis de perfiles de fusión;

30 (b) realizar la reacción en la muestra/mezcla de reacción, en el que la reacción es una reacción de extensión de cebador bajo condiciones de extensión, en el que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de la sonda correspondiente que son cebadores extensibles se hibridan con ácido nucleico diana, consumiéndose así durante la reacción de extensión de cebador, en el que los oligonucleótidos consumidos de sondas ya no pueden participar más en formar la porción bicatenaria (el dúplex) de la sonda; y

35 (c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de las sondas sin consumir en la mezcla de reacción detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,

40 en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana está presente o no en dicha muestra.

4. Un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:

45 (a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción de hibridación que comprende:

dos o más sondas, en el que cada sonda comprende:

50 un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y

55 al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y

60 en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes y son distinguibles en un análisis de perfiles de fusión;

65 (b) realizar la reacción de hibridación en la muestra/mezcla de reacción bajo condiciones de hibridación, en el que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de sondas que son sustancialmente

complementarios a parte de ese ácido nucleico diana se hibridan con ácido nucleico diana, consumiéndose así durante la reacción, en el que los oligonucleótidos consumidos de sondas ya no pueden participar más en formar la porción bicatenaria (el dúplex) de la sonda; y

- 5 (c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de sondas sin consumir en la mezcla de reacción detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,

10 en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana está presente o no en dicha muestra.

5. Un procedimiento para monitorizar una amplificación por PCR de al menos dos dianas de ácido nucleico, comprendiendo dicho procedimiento:

- 15 (a) poner en contacto una muestra que comprende uno o más ácidos nucleicos diana con una mezcla de reacción de amplificación que comprende:

20 (i) uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos directos/inversos, en el que los pares de cebadores pueden amplificar uno o más ácidos nucleicos diana, si están presentes en la muestra,

(ii) dos o más sondas, en el que cada sonda comprende:

25 un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y

al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a una segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

30 en el que cada sonda comprende una marca fluorescente o par de marca fluorescente/extintor que puede producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y

35 en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes;

40 (b) realizar una reacción de amplificación que comprende el ciclado térmico de la muestra/mezcla de reacción de amplificación,

en el que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de sondas que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana son consumidos durante la reacción de amplificación; y

45 en el que la etapa (b) comprende además la etapa (b1) obtener emisiones de fluorescencia (EF) ciclo por ciclo a diversas temperaturas de medición (TM), en el que dichas emisiones de fluorescencia (EF) es fluorescencia corregida con el nivel inicial (dR),

50 en el que cuando dicha mezcla de reacción de amplificación comprende "n" sondas para la detección de múltiple de "n" dianas de ácido nucleico, en el que la primera sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m1} , la segunda sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m2} , la tercera sonda tiene una temperatura de fusión de T_{m3} , la n sonda tiene una temperatura de fusión de T_{mn} , en el que $T_{m1} > T_{m2} > T_{m3} \dots > T_{mn}$, en el que los porcentajes de la forma bicatenaria de cada sonda a una temperatura particular o temperaturas diferentes se determinan experimentalmente o se calculan en teoría por un programa informático, en el que una primera emisión de fluorescencia EFa se obtiene a una temperatura de medición TMa, a la que más del 50% de la primera sonda está en forma de dúplex, la segunda emisión de fluorescencia EFb se obtiene a una temperatura de medición TMb, a la que más del 50% de segunda sonda está en forma de dúplex, la n-1 emisión de fluorescencia EF(n-1) se obtiene a una temperatura de medición TM(n-1), a la que más del 50% de la (n-1) sonda está en forma de dúplex, la n emisión de fluorescencia EFn se obtiene a una temperatura de medición TMn, a la que más del 80% de la n sonda está en forma de dúplex, y

60 opcionalmente una emisión de fluorescencia EF0 se obtiene a una temperatura de medición TMO, a la que no más del 10% de la primera sonda está en forma de dúplex, en el que n es un número entero positivo y $n \geq 2$,

65 en el que la etapa (b) comprende además la etapa (b2) determinar la cantidad consumida real ciclo por ciclo de la emisión de fluorescencia para cada sonda, en el que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de la k sonda se representa como CCR_k , en el que a una temperatura de medición particular (TMa) dicha k sonda tiene el porcentaje (dska)% en forma ds (bicatenaria), la emisión de fluorescencia EFa a esta temperatura de medición TMa

contribuida por la k sonda será el $(dska)\% * (CCR_k)$, la contribuida por la n sonda será el $(dsna)\% * (CCR_n)$, en el que el cálculo de cantidad consumida real (CCR) usa la siguiente fórmula:

a la temperatura de medición TMa, la emisión de fluorescencia total será

$$EFa = (CCR1)*(ds1a)\% + (CCR2)*(ds2a)\% + (CCR3)*(ds3a)\%... + (CCRn)*(dsna)\%$$

a la temperatura de medición TMb, la emisión de fluorescencia total será

$$EFb = (CCR1)*(ds1b)\% + (CCR2)*(ds2b)\% + (CCR3)*(ds3b)\%... + (CCRn)*(dsna)\%$$

a la temperatura de medición TMc, la emisión de fluorescencia total será

$$EFc = (CCR1)*(ds1c)\% + (CCR2)*(ds2c)\% + (CCR3)*(ds3c)\%... + (CCRn)*(dsna)\%$$

y así sucesivamente, en el que la CCR individual puede calcularse a partir de las fórmulas anteriores, en las que “*” denota “multiplicar por”, “k” es un número entero positivo, $1 \leq k \leq n$, y “n” es el número de sondas,

en el que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de cada sonda se obtiene mediante un programa que realiza el cálculo a cada temperatura de medición en cada ciclo, y

en el que la cantidad consumida real de la emisión de fluorescencia de cada sonda está relacionada con el grado de amplificación del ácido nucleico diana con el que se une el primer oligonucleótido de esa sonda.

6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

(A) dicho consumo de sondas se logra mediante hibridación del primer oligonucleótido de la sonda con la secuencia diana, que va seguido de la incorporación del primer oligonucleótido de la sonda en el producto amplificado, en el que cuando el primer oligonucleótido de la sonda puede incorporarse en el producto amplificado, el primer oligonucleótido es cebador extensible o es uno del par de cebadores de oligonucleótidos directos/inversos, o

(B) dicho consumo de sondas se logra mediante hibridación del primer oligonucleótido de la sonda con la secuencia diana, que va seguido de degradación del primer y/o segundo oligonucleótido de la sonda, en el que cuando el primer oligonucleótido de la sonda se degrada durante la reacción, la mezcla de reacción comprende actividad de nucleasa dependiente de bicatenaria.

7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda comprende una primera marca y una segunda marca, en el que la primera marca es un fluoróforo y la segunda marca es un extintor, o viceversa, preferentemente en el que:

(A) la primera marca está unida al primer oligonucleótido y la segunda marca está unida al segundo oligonucleótido de forma que dicha primera marca y segunda marca están en estrecha proximidad cuando el dúplex interno de la sonda se forma, o en el que

(B) las marcas están sobre un oligonucleótido de la sonda, tanto el primer oligonucleótido como el segundo oligonucleótido,

preferentemente (B1) en el que el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca, y el segundo oligonucleótido de la sonda comprende al menos una, preferentemente dos, marcas, en el que el segundo oligonucleótido comprende una primera marca y una segunda marca, estando la primera marca unida o próxima a un extremo del segundo oligonucleótido y la segunda marca está unida o próxima al otro extremo del segundo oligonucleótido, por lo cual cuando el segundo oligonucleótido no se hibrida con el primer oligonucleótido, el segundo oligonucleótido está en una estructura de espiral al azar o de tallo-bucle que pone la primera marca y segunda marca en estrecha proximidad, o

(B2) en el que el primer oligonucleótido no comprende una marca y el segundo oligonucleótido comprende una marca en el que, cuando el segundo oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido para formar la porción bicatenaria de la sonda, la marca puede cambiar la emisión de señal con respecto a la emisión de la forma monocatenaria del segundo oligonucleótido, o

(B3) en el que el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca y en el que la sonda comprende dos segundos oligonucleótidos que pueden hibridarse adyacentemente o sustancialmente adyacentemente con diferentes partes de la segunda región del primer oligonucleótido, en el que uno de los segundos oligonucleótidos está unido a una primera marca, y el otro segundo oligonucleótido está unido a una segunda marca, de forma que cuando los dos segundos oligonucleótidos se hibridan con el primer oligonucleótido, las dos marcas se ponen en estrecha proximidad y una marca afecta a la señal del otro, o

(C) en el que el primer y segundo oligonucleótidos de una sonda están unidos por un resto de ligador que comprende nucleótidos o un ligador químico de no nucleótidos, permitiendo que el primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido formen una estructura de tallo-bucle, en el que el primer y segundo oligonucleótidos se marcan con una primera y segunda marca, respectivamente, de forma que, cuando la sonda forma una estructura de tallo-bucle interno, las marcas se ponen en estrecha proximidad y una marca afecta a la señal de la otra.

8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores:

(A) en el que dicha primera región de dicho primer oligonucleótido no está solapándose sustancialmente con la segunda región de dicho primer oligonucleótido, o

(B) en el que dicha primera región de dicho primer oligonucleótido está solapándose sustancialmente con la segunda región de dicho primer oligonucleótido o la segunda región está incorporada en la primera región, en el que la T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con la secuencia diana es superior a la T_m del dúplex de dicho primer oligonucleótido hibridado con el segundo oligonucleótido de forma que si una diana está presente, el primer oligonucleótido forma híbridos más fuertes con la diana y, por consiguiente, funde a una mayor temperatura que el dúplex de primer/segundo oligonucleótido; o

(C) en el que dicho primer oligonucleótido comprende una tercera región que es idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia de un cebador que se usa en la reacción de amplificación; o

(D) en el que tanto el primer como el segundo oligonucleótidos de sondas pueden consumirse durante la amplificación; o

(E) en el que dicho primer oligonucleótido se bloquea en el extremo 3', y en el que dicho segundo oligonucleótido se bloquea en el 3' extremo; o

(F) en el que múltiples primeros oligonucleótidos de diferentes sondas se hibridan con diferentes sitios de la misma cadena de una secuencia diana.

9. Un procedimiento para ensayar una muestra para uno o más nucleótidos de variante sobre los ácidos nucleicos diana, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto una muestra que comprende ácidos nucleicos diana con mezcla de reacción que comprende:

(i) uno o más pares de cebadores de oligonucleótidos directos/inversos, en el que los pares de cebadores pueden amplificar uno o más ácidos nucleicos diana, si están presentes en la muestra,

(ii) al menos un par de sondas, en el que la primera sonda en el par comprende la secuencia complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana natural, la segunda sonda en el par comprende la secuencia complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos diana que contiene nucleótidos de variante, en el que cada sonda en el par comprende:

un primer oligonucleótido que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y

al menos un segundo oligonucleótido que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

en el que cada sonda en el par comprende el mismo segundo oligonucleótido, en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda, y

en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes;

(b) realizar una reacción de amplificación en la muestra/mezcla de reacción de amplificación en la que, cuando un ácido nucleico diana está presente, los primeros oligonucleótidos de sondas que son sustancialmente complementarios a parte de ese ácido nucleico diana son consumidos durante la reacción de amplificación; y

(c) medir, al menos una vez, el perfil de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de sondas sin consumir detectando la(s) señal(es) de las marcas en aquellas sondas en función de la temperatura,

en el que el perfil de fusión proporciona una indicación de si al menos un ácido nucleico diana ha sido amplificado o no en dicha muestra/mezcla de reacción de amplificación.

5 10. Un kit para ensayar una o más dianas de ácido nucleico que comprende dos o más sondas, comprendiendo cada sonda:

10 un primer oligonucleótido de 15-150 nucleótidos que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y al menos un segundo oligonucleótido de 4-150 nucleótidos que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

15 en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda,

15 y en el que:

20 (a) el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca, el segundo oligonucleótido comprende una primera marca y una segunda marca, en el que la primera marca está unida o próxima a un extremo del segundo oligonucleótido y la segunda marca está unida o próxima al otro extremo del segundo oligonucleótido, por lo cual cuando el segundo oligonucleótido no se hibrida con el primer oligonucleótido, el segundo oligonucleótido está en una estructura de espiral al azar o de tallo-bucle que pone la primera marca y segunda marca en estrecha proximidad y en el que cuando el segundo oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido, las dos marcas se mantienen alejadas entre sí; o

25 (b) el primer oligonucleótido no comprende una marca y el segundo oligonucleótido comprende una marca, en el que cuando el segundo oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido para formar la porción bicatenaria de la sonda, la marca puede cambiar su emisión de señal detectable con respecto a la emisión de la marca cuando está en la forma monocatenaria del segundo oligonucleótido; o

30 (c) el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca, la sonda comprende dos segundos oligonucleótidos que pueden hibridarse adyacentemente o sustancialmente adyacentemente con diferentes partes de la segunda región del primer oligonucleótido, en el que uno de los segundos oligonucleótidos está unido a una primera marca, y el otro segundo oligonucleótido está unido a una segunda marca, de forma que cuando los dos segundos oligonucleótidos se hibridan con el primer oligonucleótido, las dos marcas se ponen en estrecha proximidad y una marca afecta a la señal de la otra,

35 y en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes.

40 11. Un kit para ensayar una o más dianas de ácido nucleico que comprende una mezcla de sondas que contiene dos o más sondas, en el que cada sonda comprende:

45 un primer oligonucleótido de 15-150 nucleótidos que comprende una primera región que es sustancialmente complementaria a parte de un ácido nucleico diana y una segunda región, y al menos un segundo oligonucleótido de 4-150 nucleótidos que comprende una región que es sustancialmente complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido, de forma que el primer y segundo oligonucleótidos pueden formar una porción bicatenaria,

50 en el que cada sonda comprende una marca detectable o combinación detectable de marcas que puede/pueden producir una señal variable que es característica de la presencia o ausencia de una porción bicatenaria entre el primer y segundo oligonucleótidos de esa sonda,

55 y en el que:

60 (a) la primera marca está unida a la segunda región del primer oligonucleótido y la segunda marca está unida a la región del segundo oligonucleótido que es complementaria a la segunda región del primer oligonucleótido de forma que la primera y segunda marcas se ponen en estrecha proximidad tras la formación del dúplex interno de la sonda; o

65 (b) el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca, el segundo oligonucleótido comprende una primera marca y una segunda marca, en el que la primera marca está unida o próxima a un extremo del segundo oligonucleótido y la segunda marca está unida o próxima al otro extremo del segundo oligonucleótido, por lo cual cuando el segundo oligonucleótido no se hibrida con el primer oligonucleótido, el segundo oligonucleótido está en una estructura de espiral al azar o de lazo-bucle que pone la primera marca y segunda marca en estrecha proximidad y en el que cuando el segundo oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido, las dos marcas

se mantienen alejadas entre sí; o

5 (c) el primer oligonucleótido no comprende una marca y el segundo oligonucleótido comprende una marca, en el que cuando el segundo oligonucleótido se hibrida con el primer oligonucleótido para formar la porción bicatenaria de la sonda, la marca puede cambiar su emisión de señal detectable con respecto a la emisión de la marca cuando está en la forma monocatenaria del segundo oligonucleótido; o

10 (d) el primer oligonucleótido de la sonda no comprende una marca, la sonda comprende dos segundos oligonucleótidos que pueden hibridarse adyacentemente o sustancialmente adyacentemente con diferentes partes de la segunda región del primer oligonucleótido, en el que uno de los segundos oligonucleótidos está unido a una primera marca, y el otro segundo oligonucleótido está unido a una segunda marca, de forma que cuando los dos segundos oligonucleótidos se hibridan con el primer oligonucleótido, las dos marcas se ponen en estrecha proximidad y una marca afecta a la señal de la otra; o

15 (e) el primer y segundo oligonucleótidos de una sonda están unidos por un resto de ligador que comprende nucleótidos o un ligador químico de no nucleótidos, permitiendo que el primer oligonucleótido y el segundo oligonucleótido formen una estructura de tallo-bucle, en el que el primer y el segundo oligonucleótidos se marcan con una primera y segunda marca, respectivamente, de forma que, cuando la sonda forma una estructura de tallo-bucle interno, las marcas se ponen en estrecha proximidad y una marca afecta a la señal de la otra;

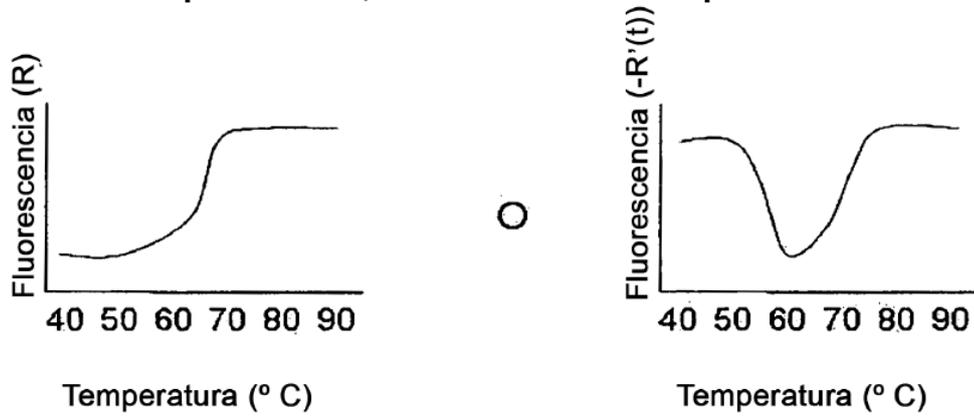
20 y en el que al menos dos de las sondas comprenden la misma marca detectable o marcas detectables diferentes con espectros de emisión indistinguibles y en el que las características de fusión de las porciones bicatenarias entre el primer y segundo oligonucleótidos de cada una de tales sondas son diferentes.

25 12. Un kit según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que al menos una marca es una marca fluorescente; o

30 un kit según la reivindicación 10, partes (a) o (c), o la reivindicación 11 partes (a), (b), (d) o (e), en el que la sonda comprende una primera marca y una segunda marca, preferentemente en el que la primera marca es un fluoróforo y la segunda marca es un extintor, o viceversa.

13. Uso de una sonda como se define en cualquiera de las partes (a)-(c) de la reivindicación 10, o una mezcla de sondas como se define en la reivindicación 11, en un procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

Antes de la amplificación, la sonda tiene un perfil de fusión



Amplificación

La sonda es consumida

Después de la amplificación, la sonda restante tiene un perfil de fusión diferente

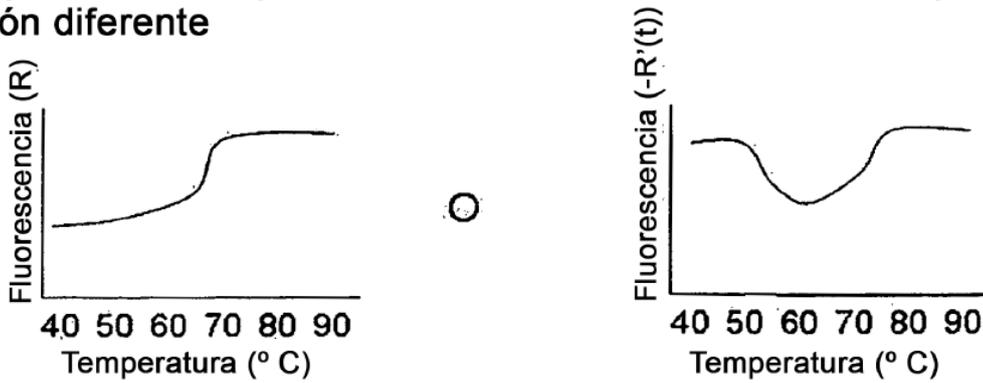
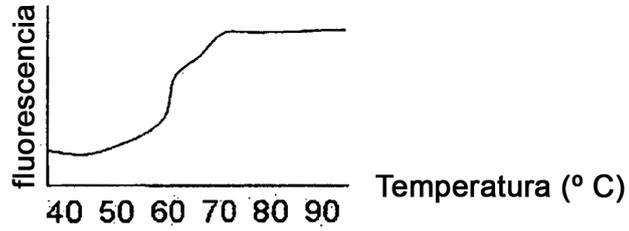


FIG.1

Antes de la amplificación, una mezcla de la sonda 1 y 2 tiene un perfil de fusión



Después de la amplificación, la mezcla de sondas restantes tiene un perfil de fusión diferente

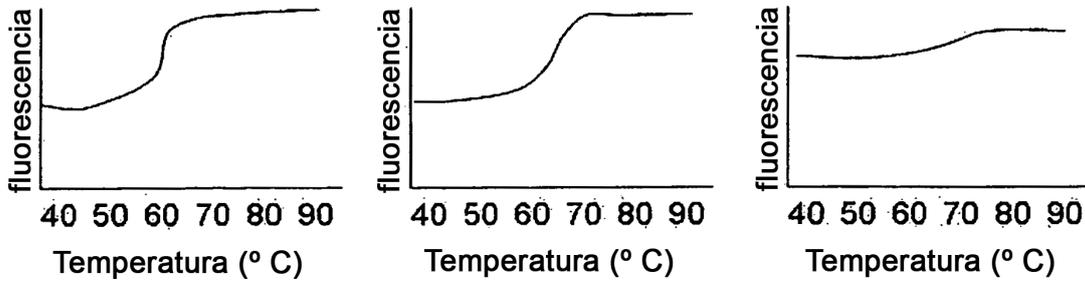
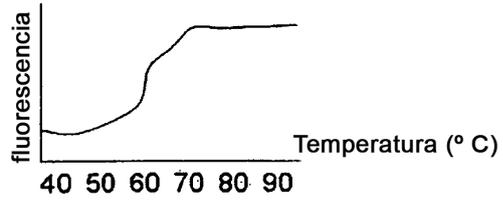


FIG.2

Antes de la amplificación, una mezcla de la sonda 1 y la sonda 2 tiene un perfil de fusión



Amplificación

La recogida de fluorescencia ciclo por ciclo

La diana 1 está presente

La diana 2 está presente

Tanto la diana 1 como la diana 2 están presentes

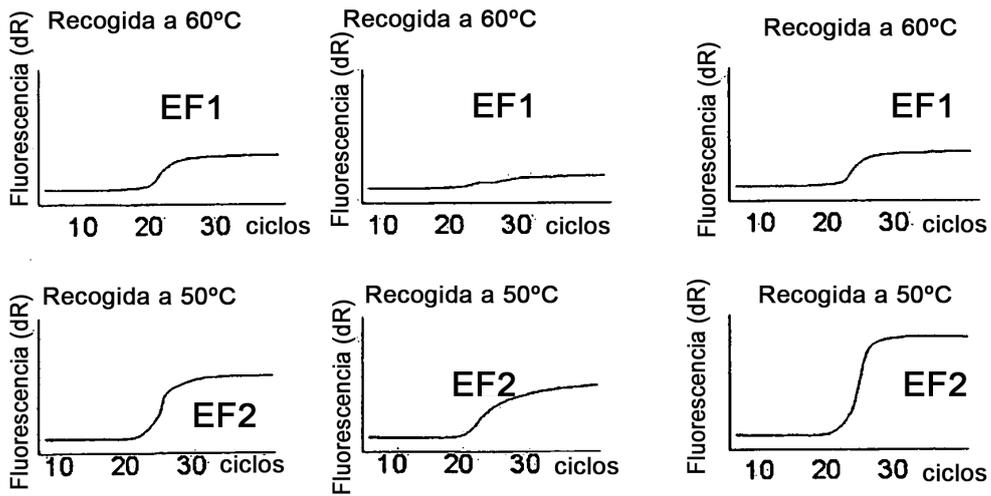


FIG.3

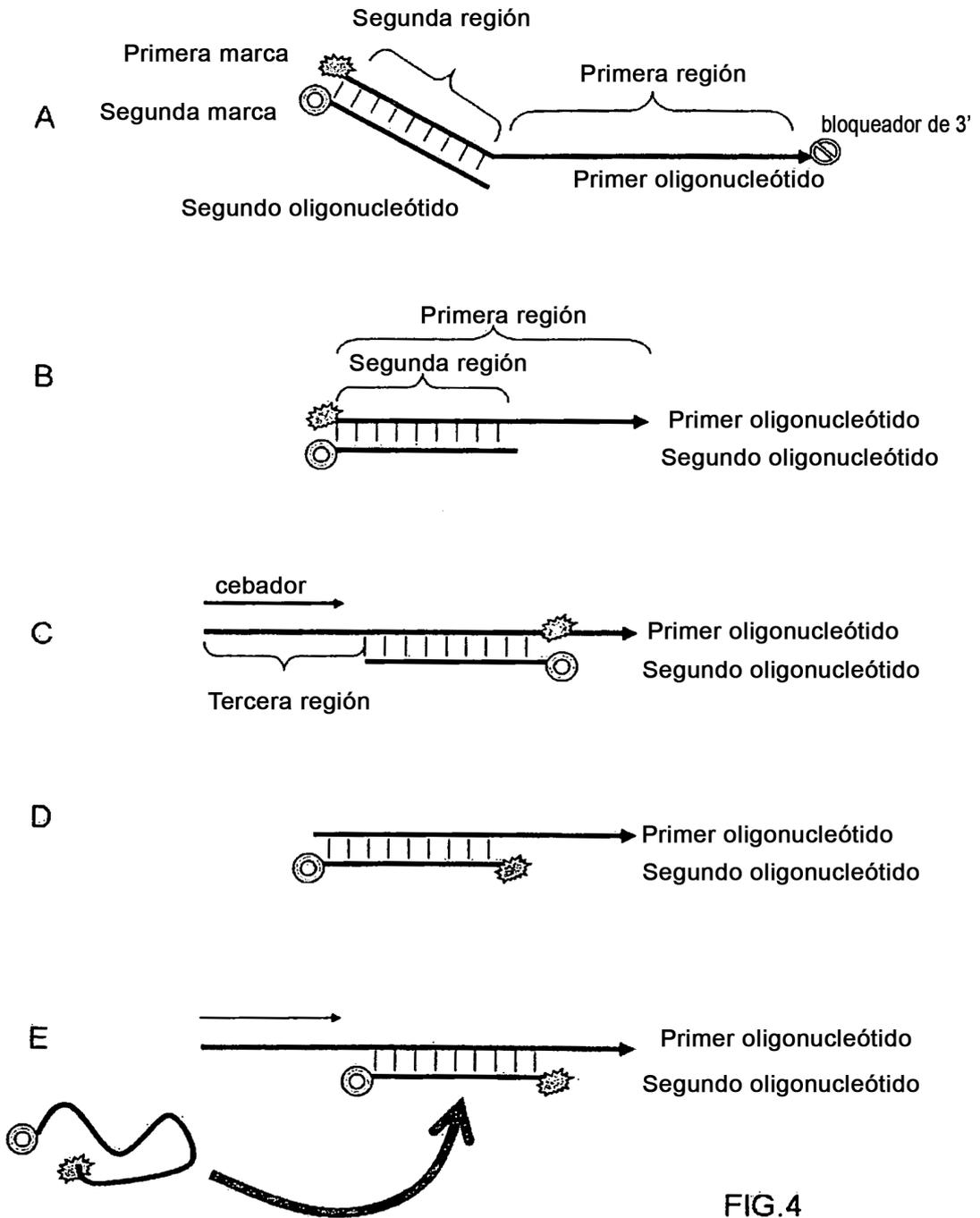


FIG.4

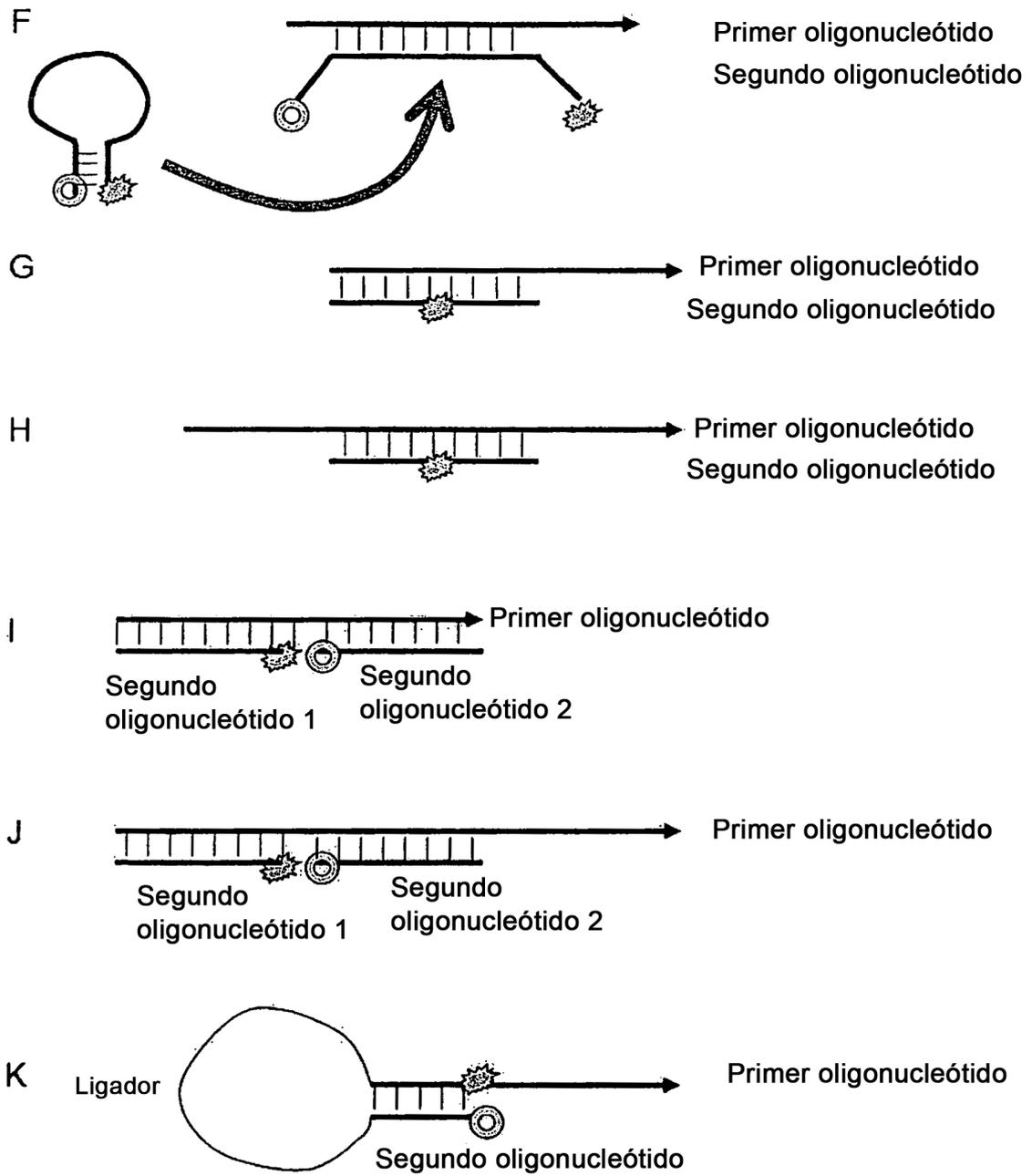


FIG.4 (continuación)

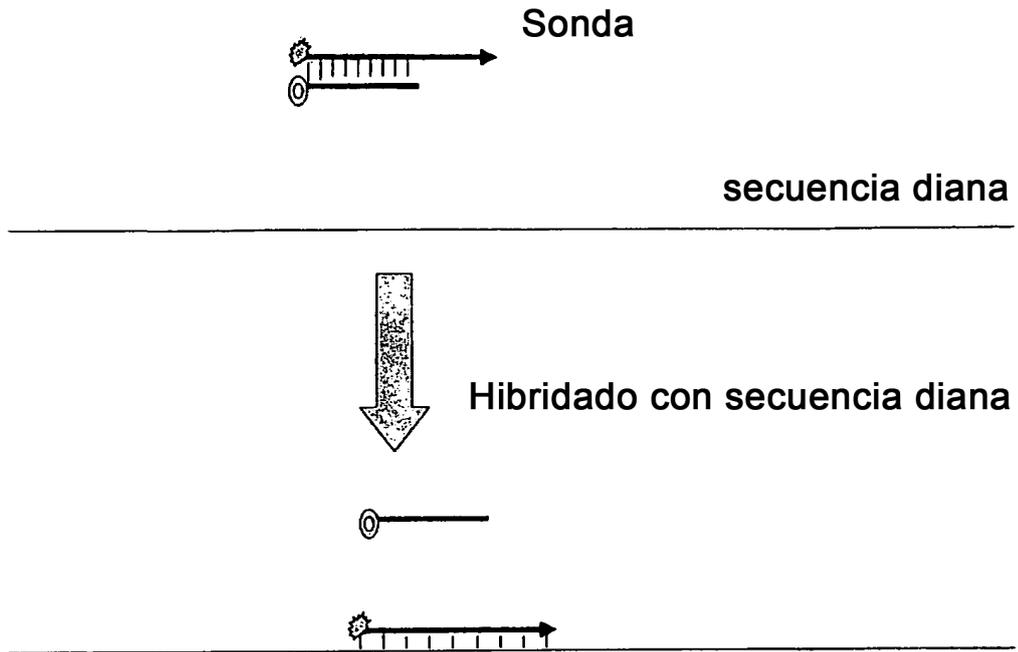


FIG.5

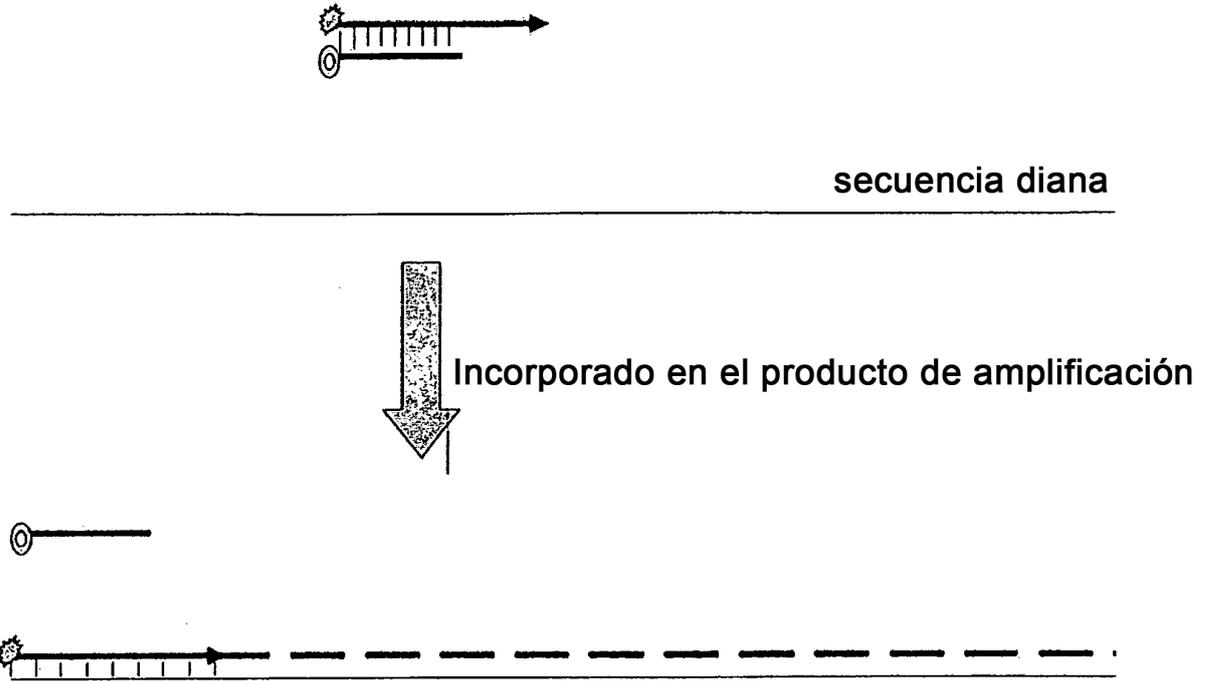


FIG.6

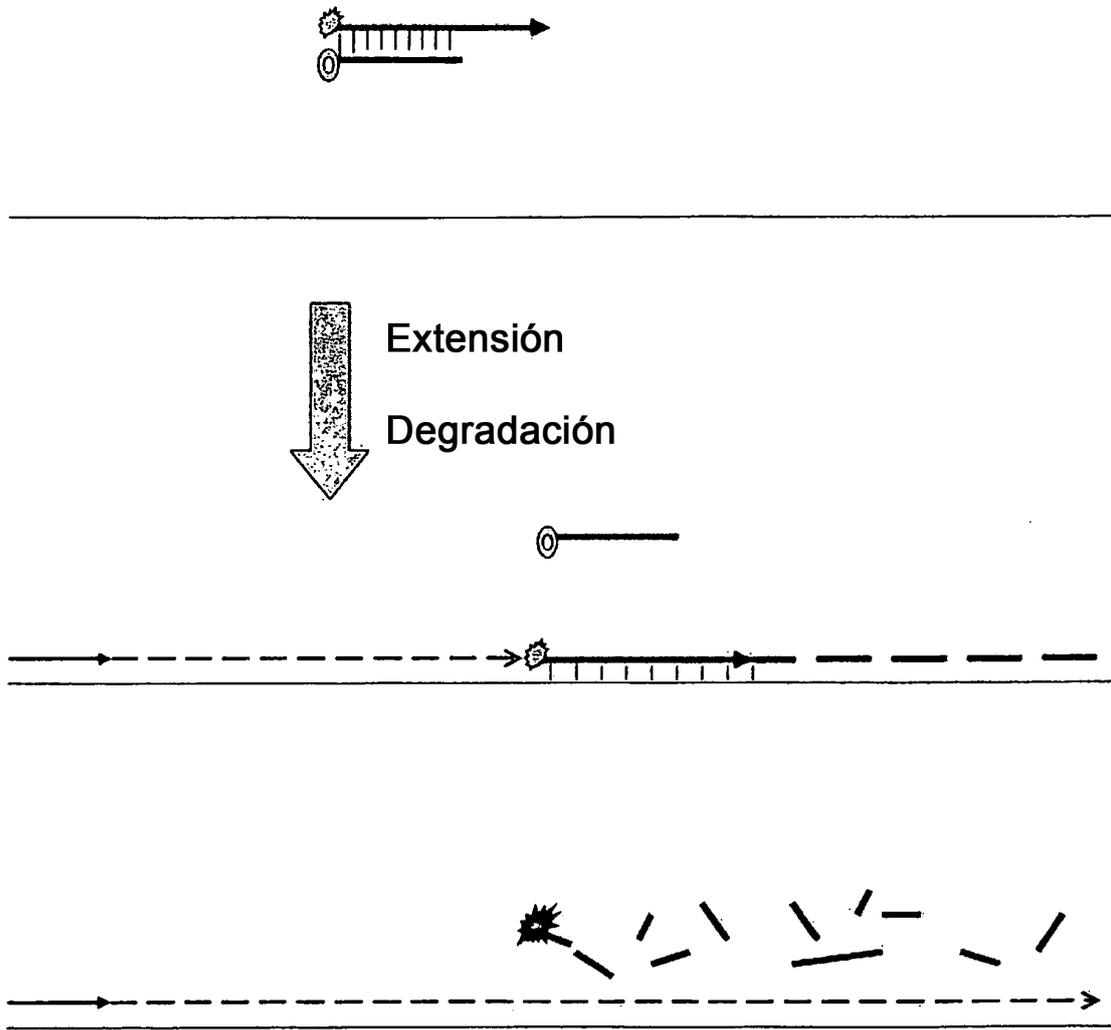


FIG.7

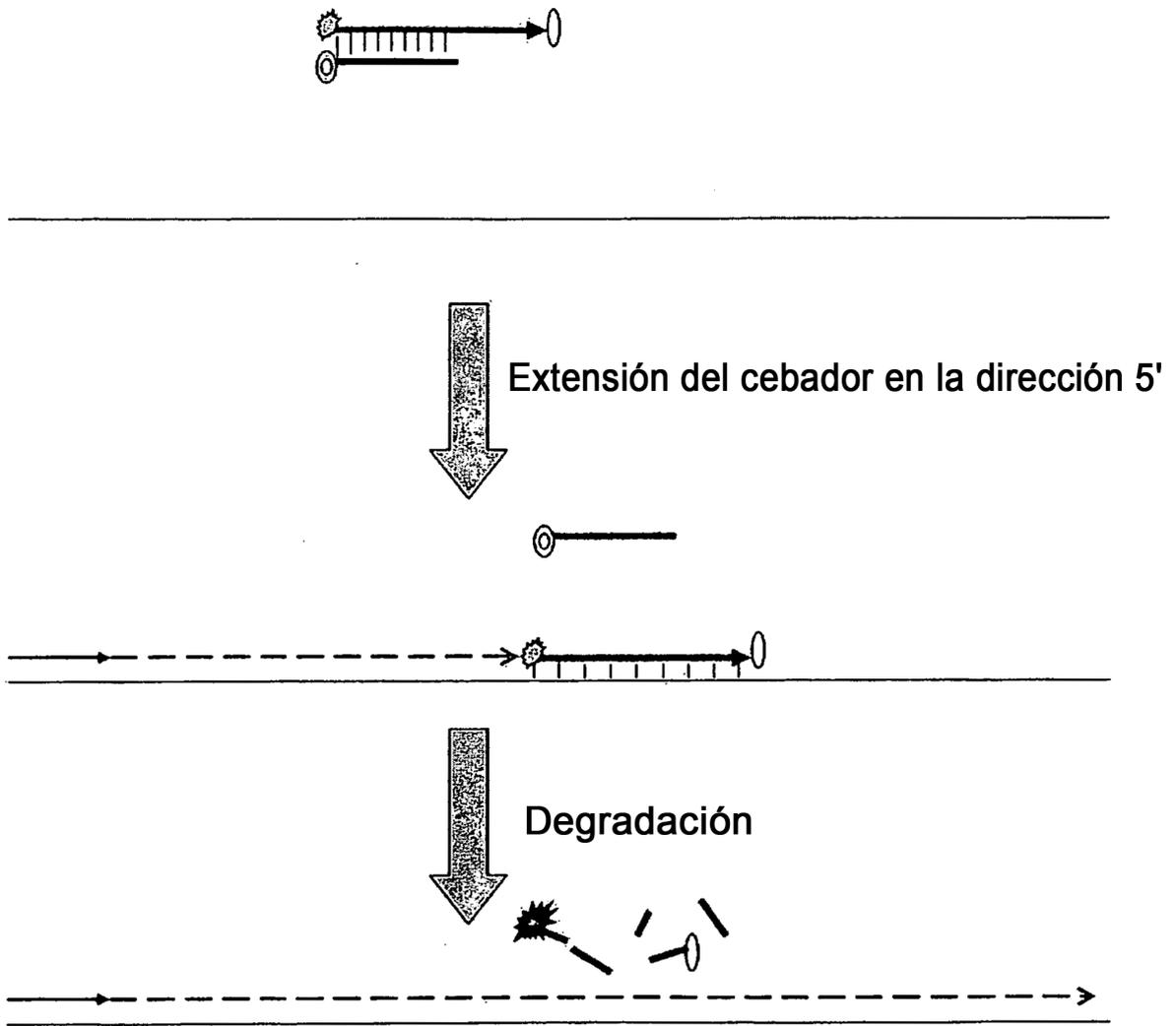


FIG.8

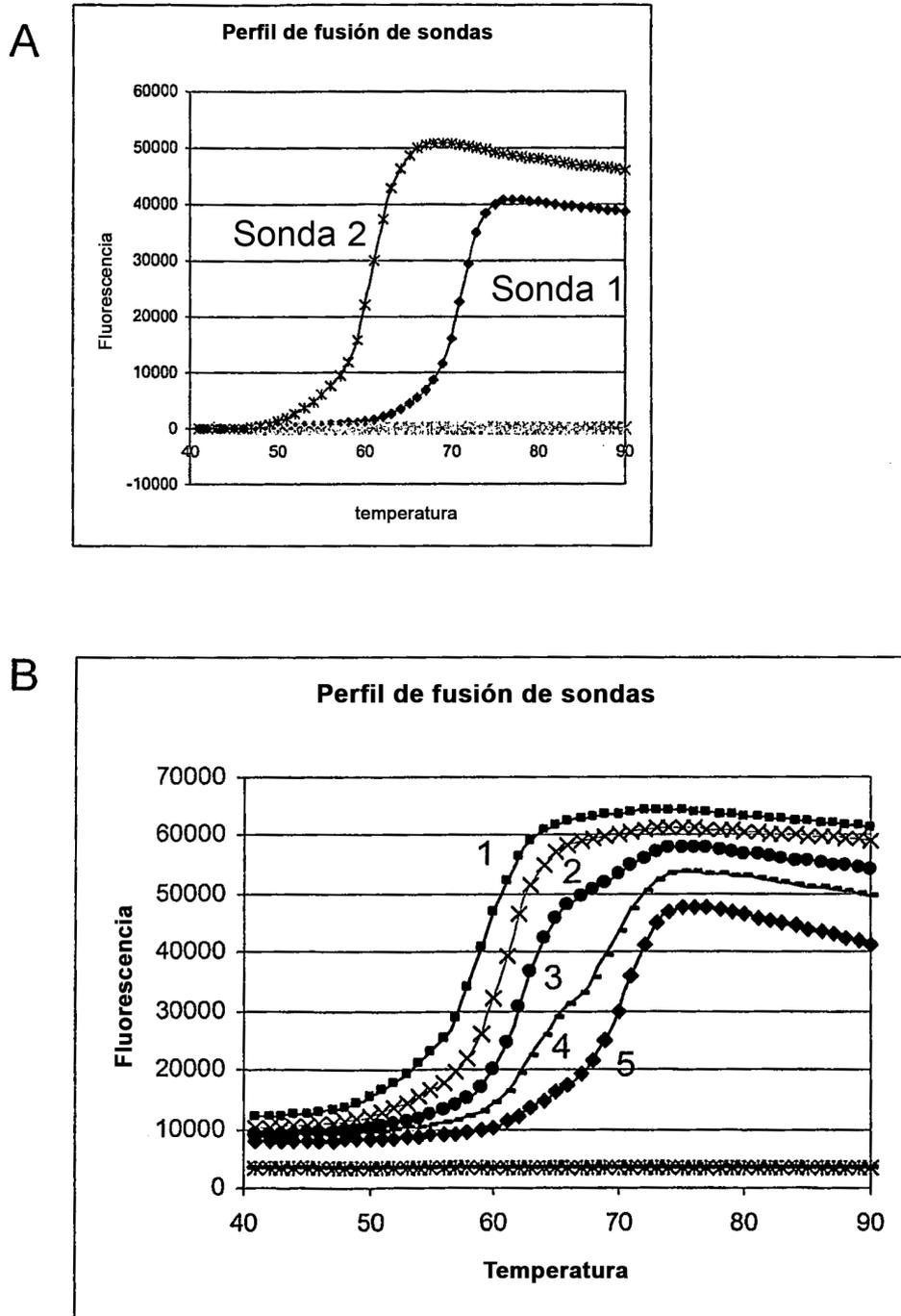


FIG. 9

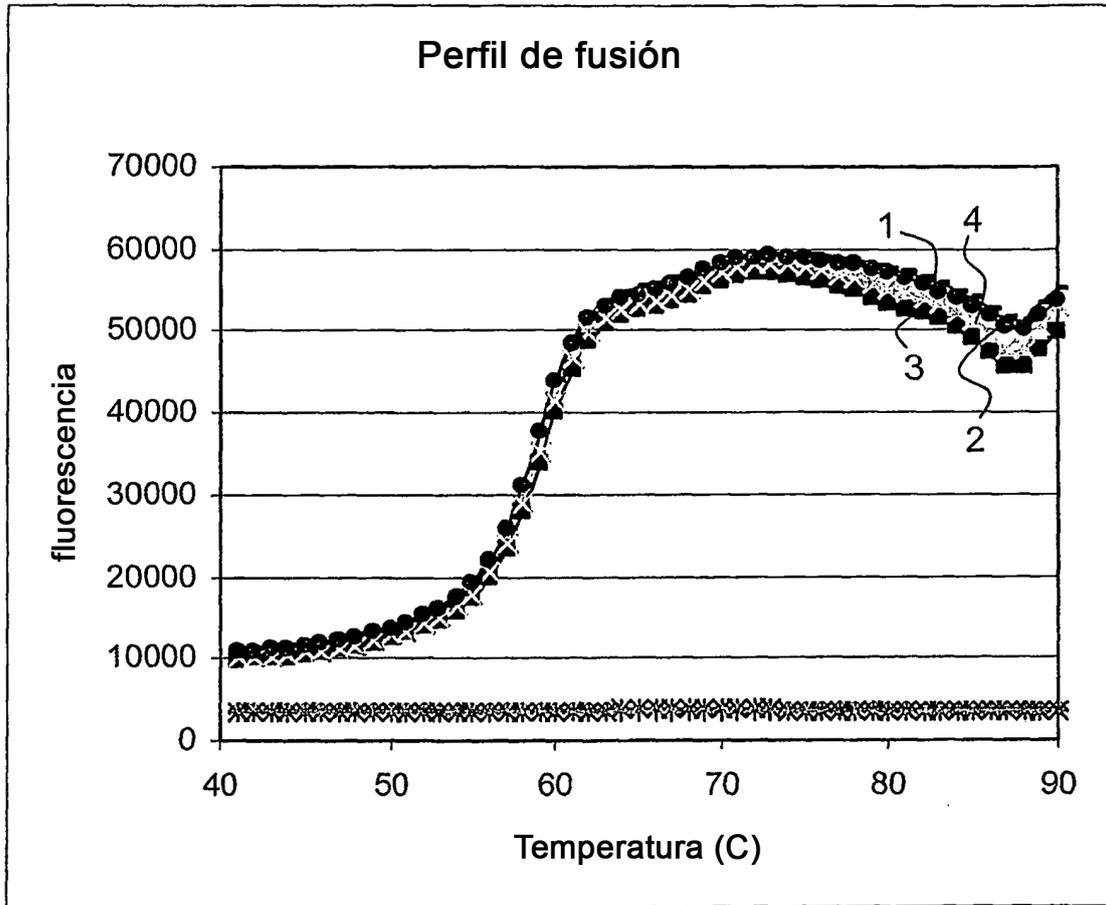


FIG. 10

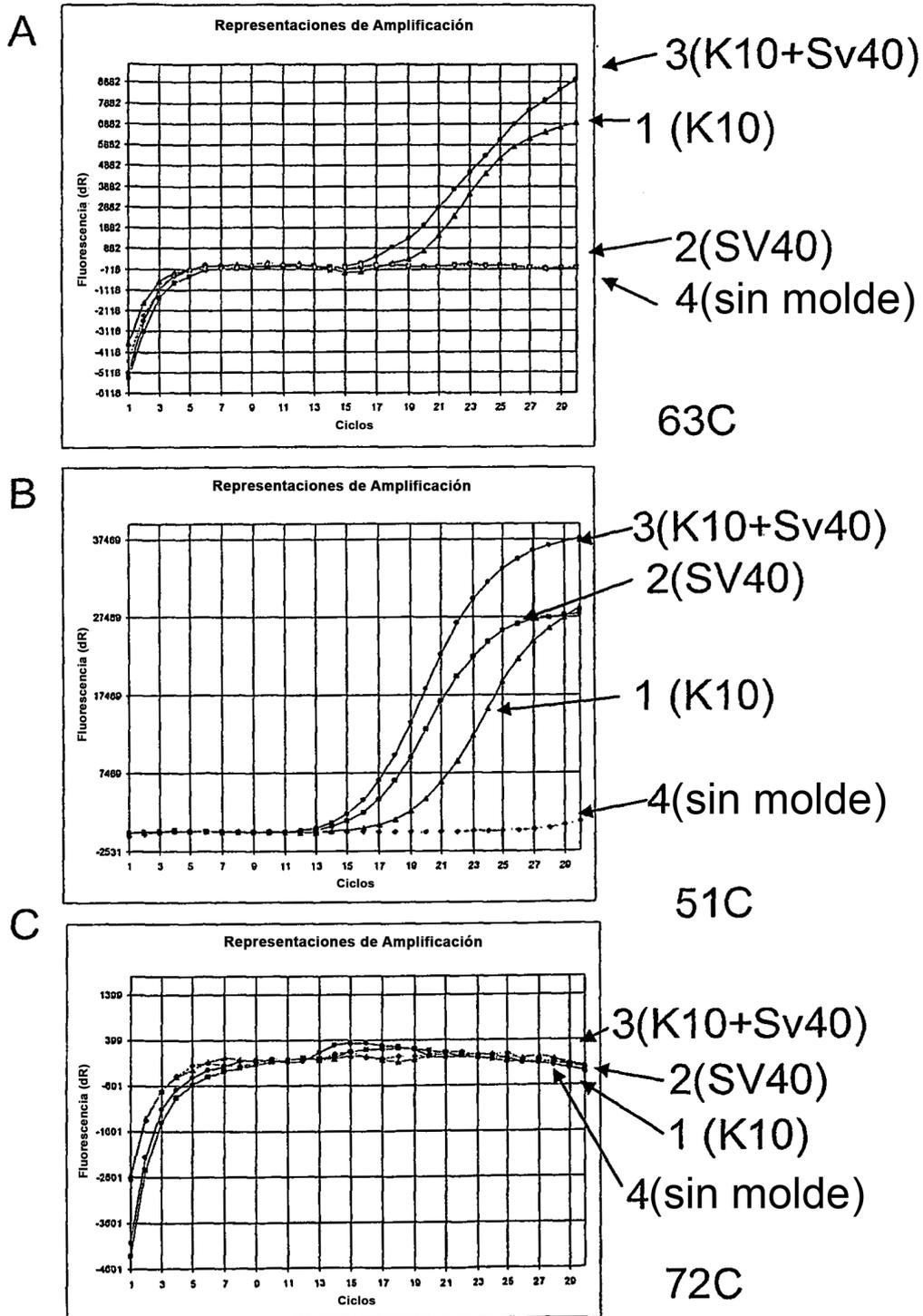


FIG. 11

Perfil de fusión de post-amplificación

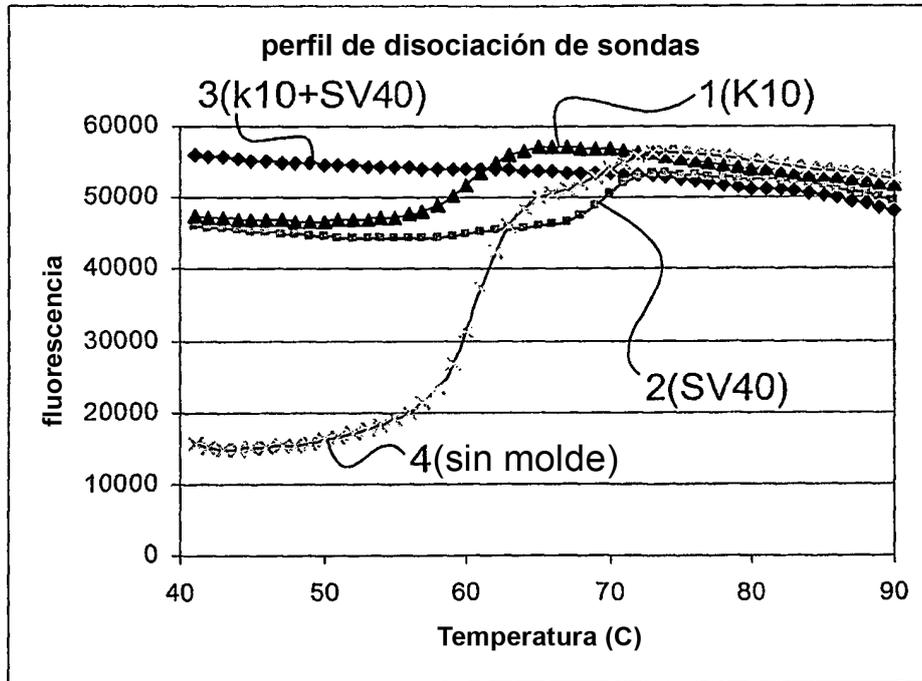


FIG. 12

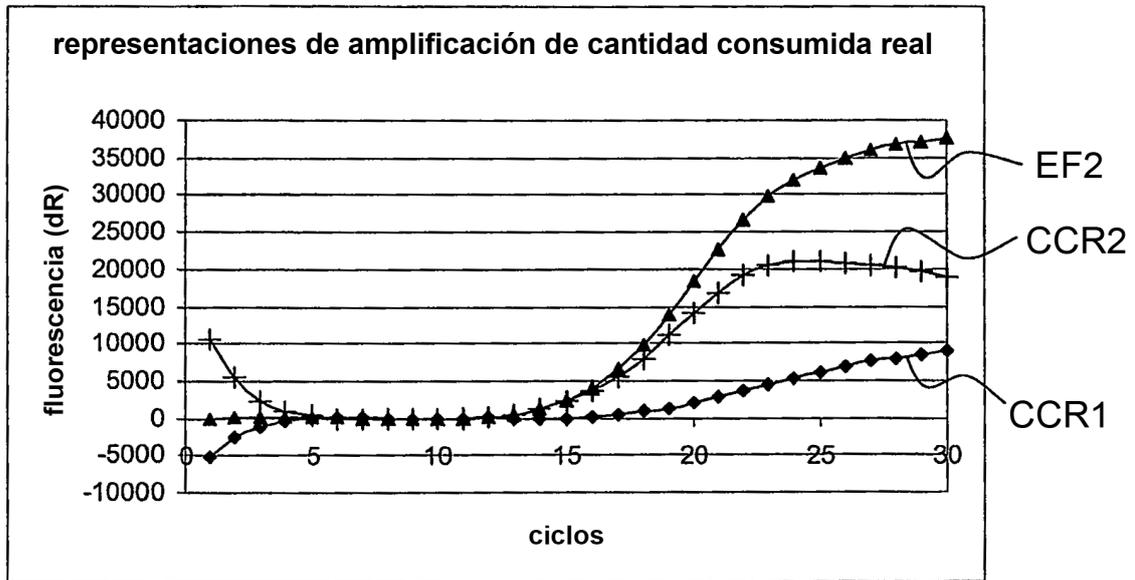
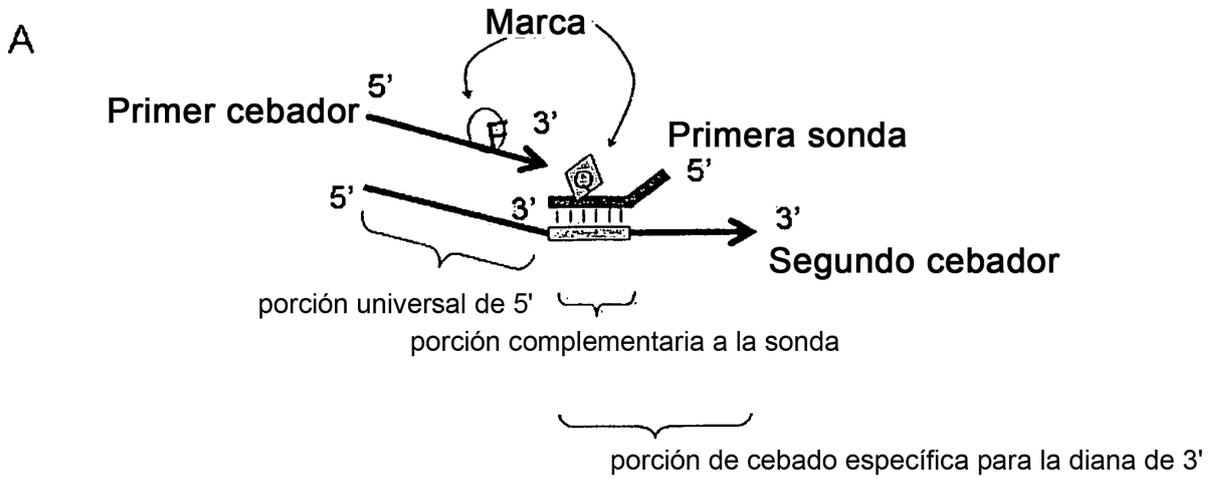


FIG. 13

Combinación de cebadores y sondas



B

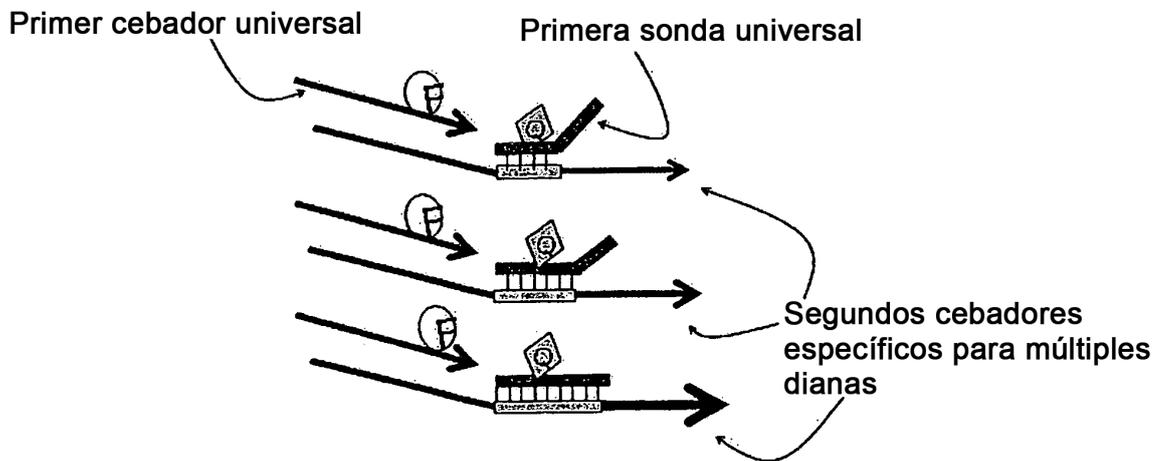
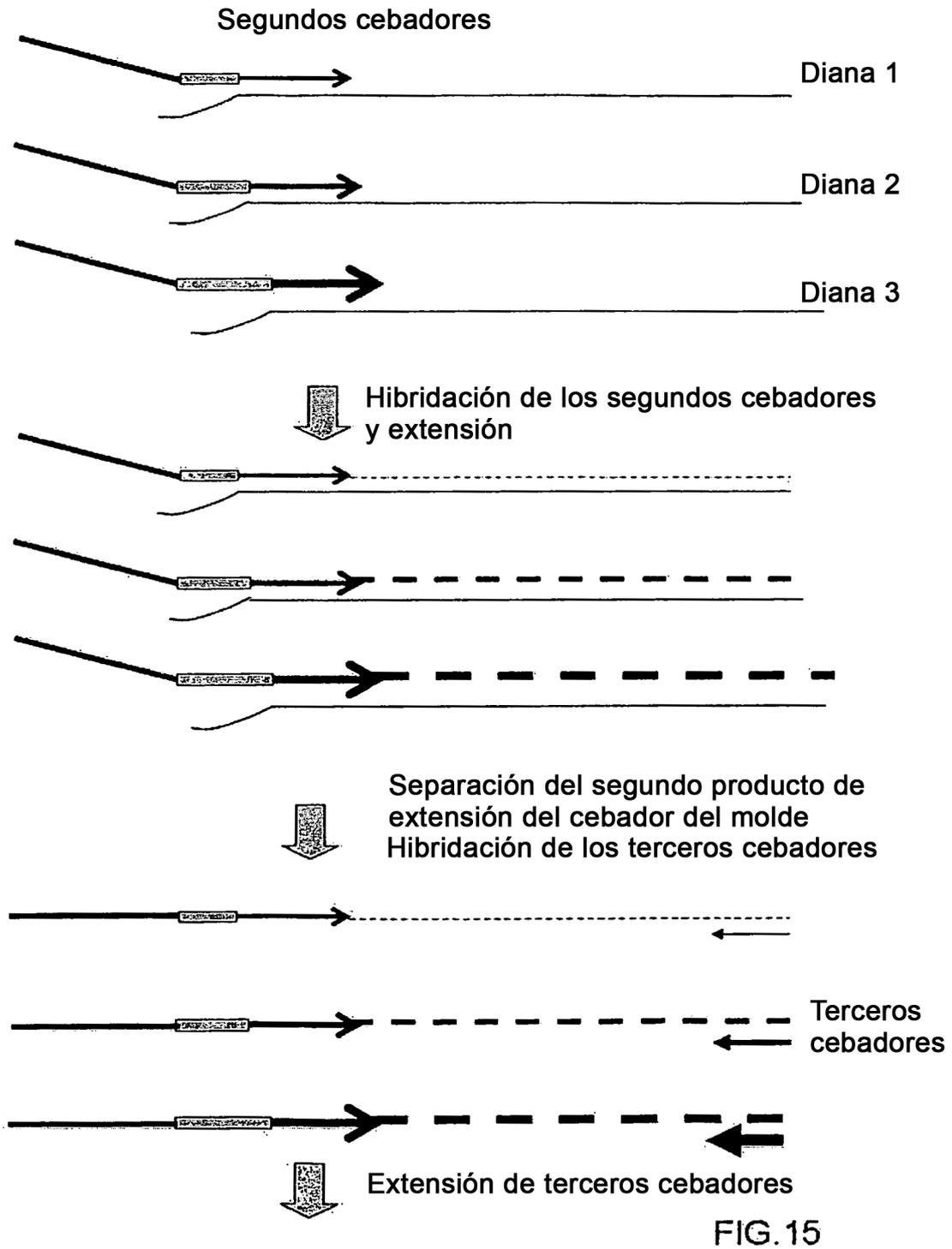


FIG.14



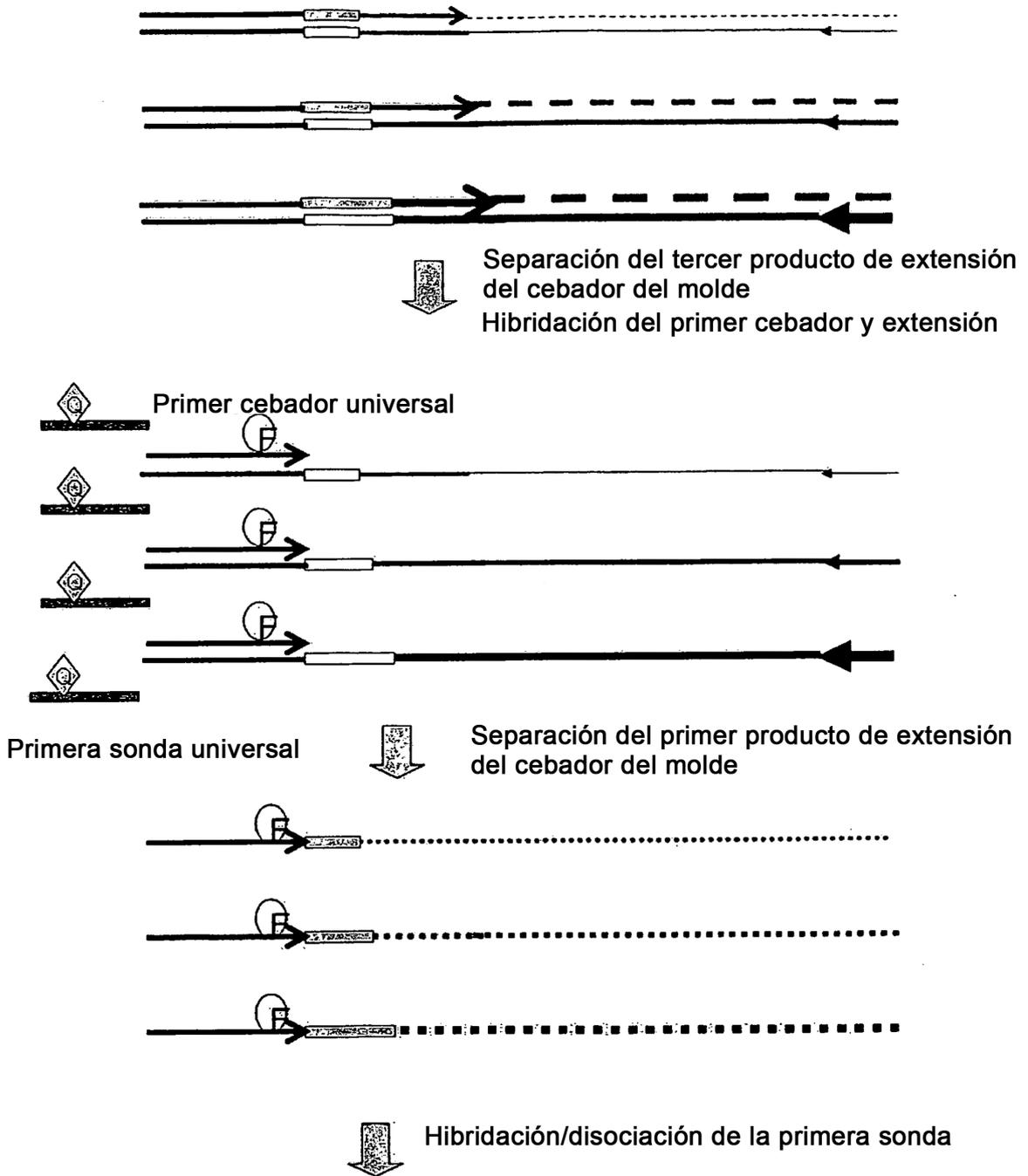
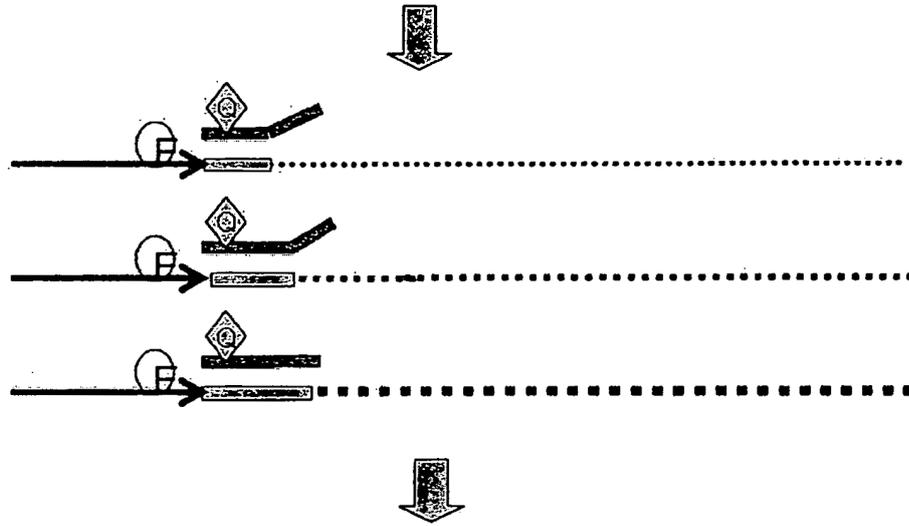


FIG. 15 continuación



Detección
(medida de T_m y/o perfil de fusión para cada diana)

FIG. 15 continuación

Combinación de cebadores y sondas

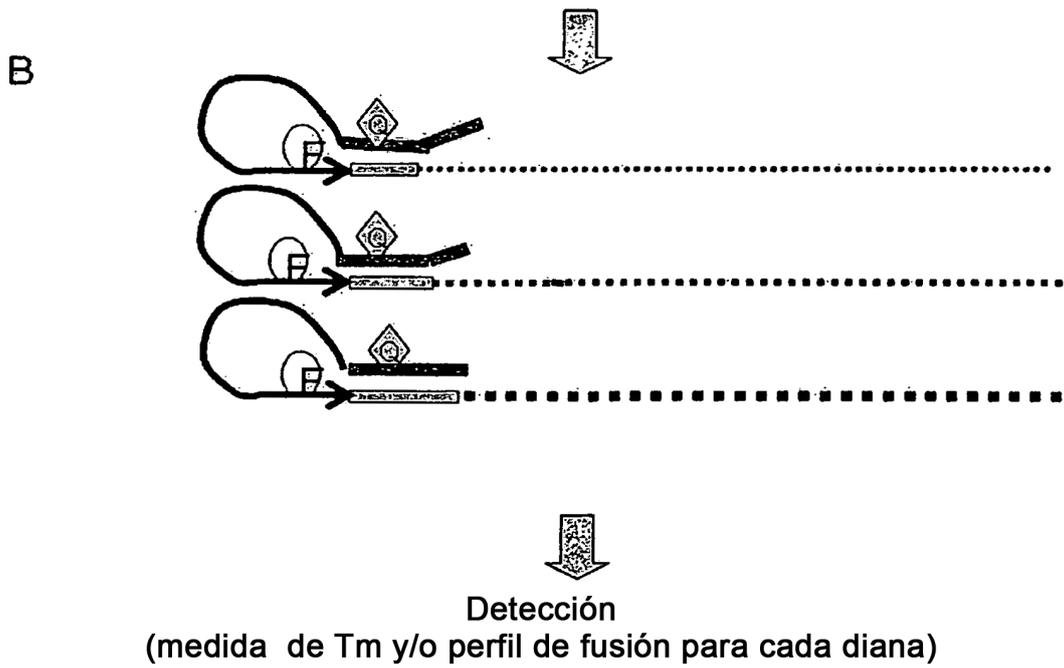
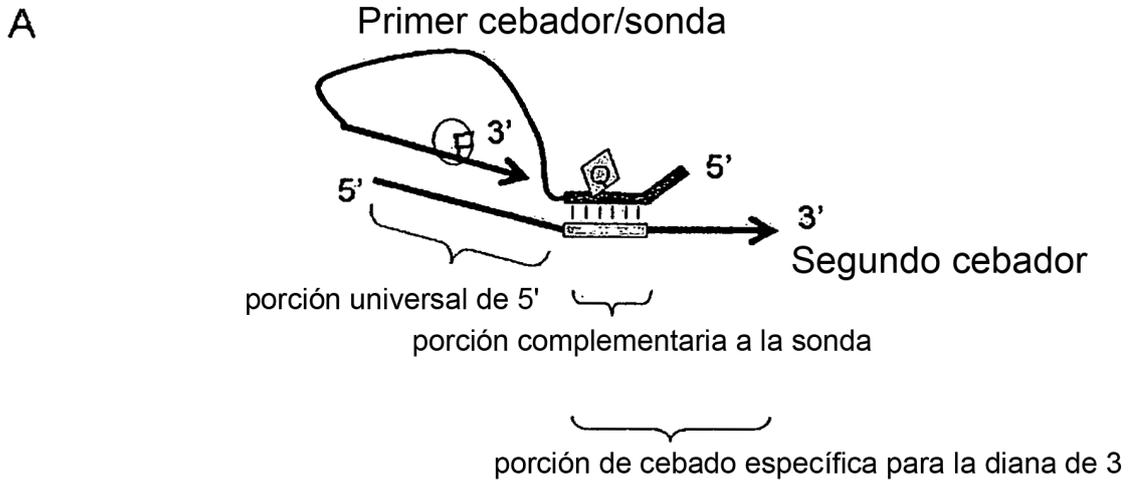
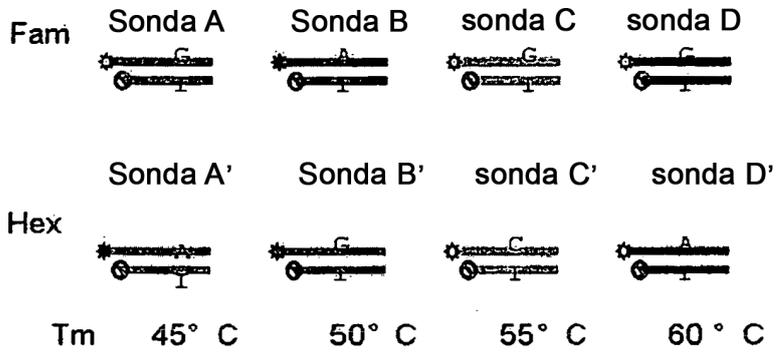


FIG. 16

A



B

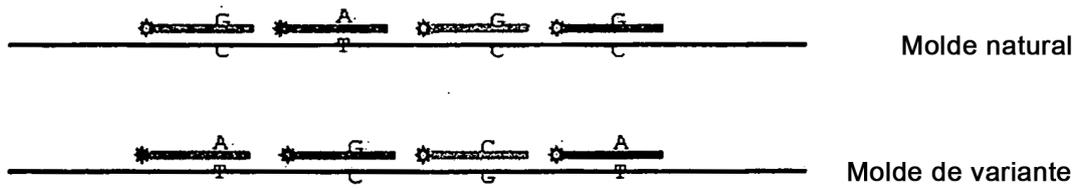
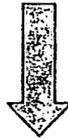
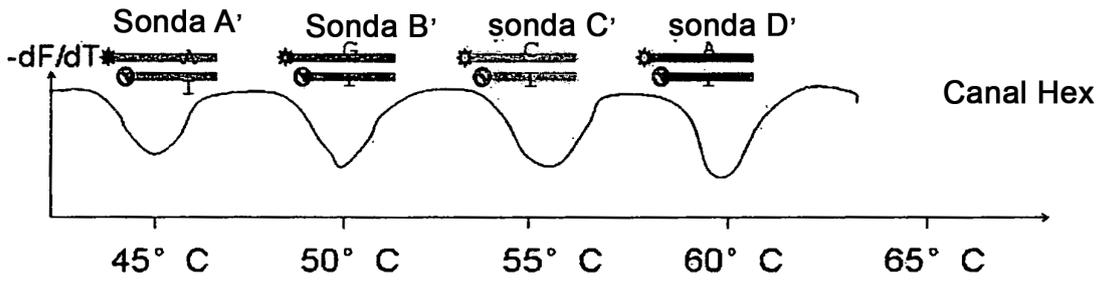
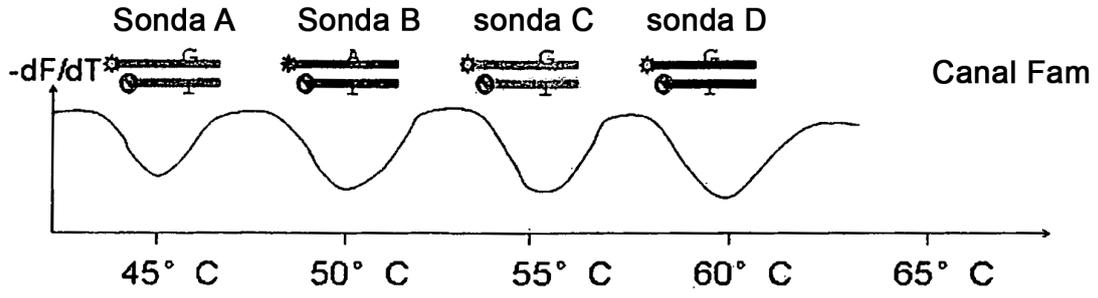


FIG. 17



Durante la amplificación por PCR, si B' y C' de variantes están presentes, las sondas A, B', C' y D son consumidas

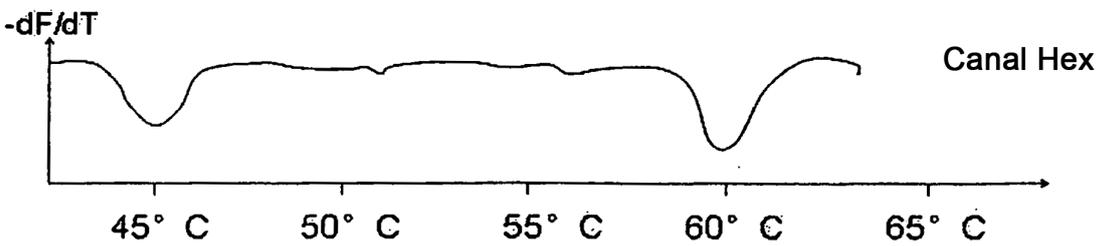
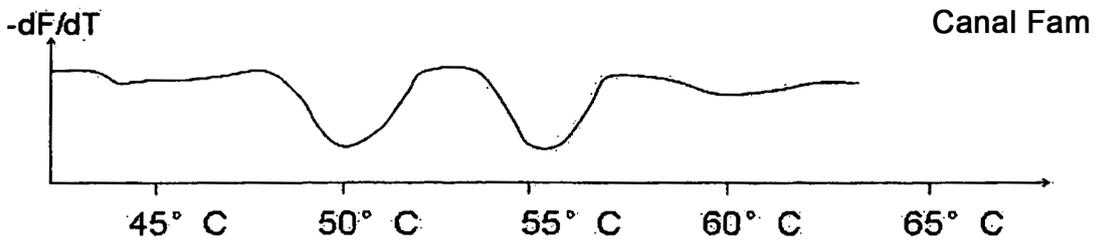


FIG. 18

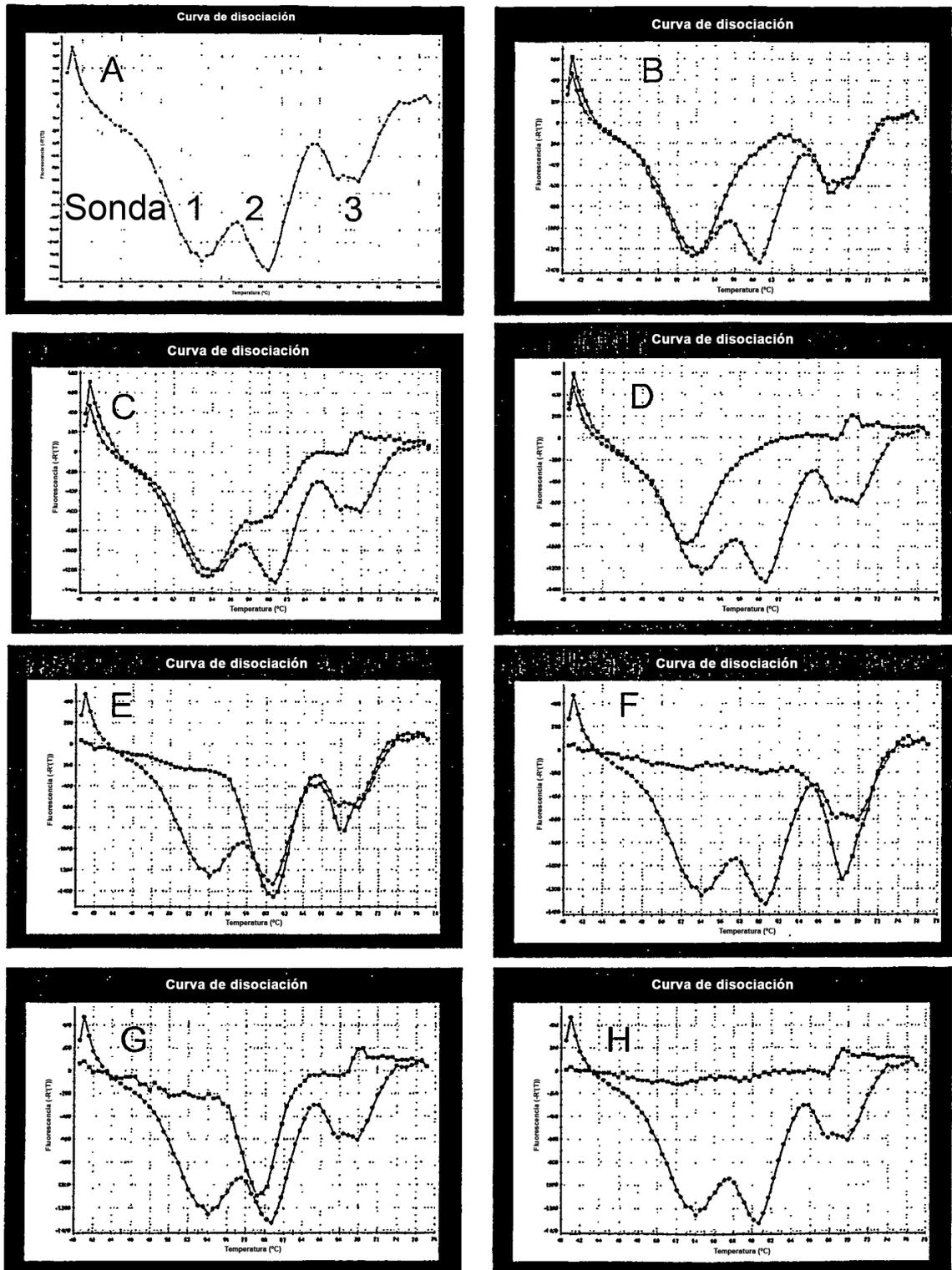


FIG. 19

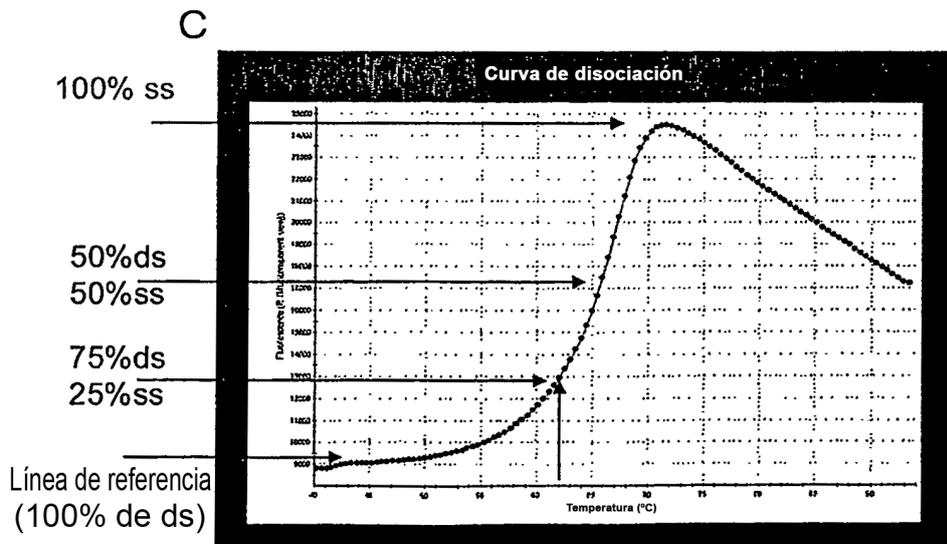
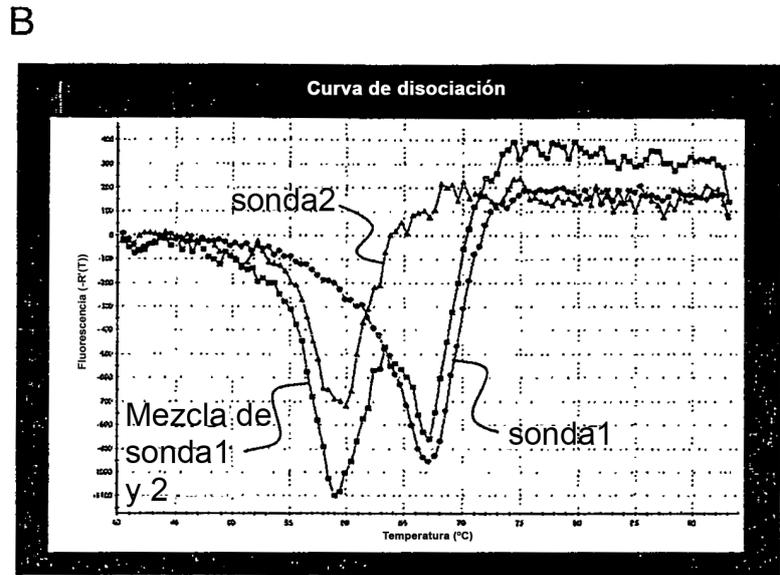
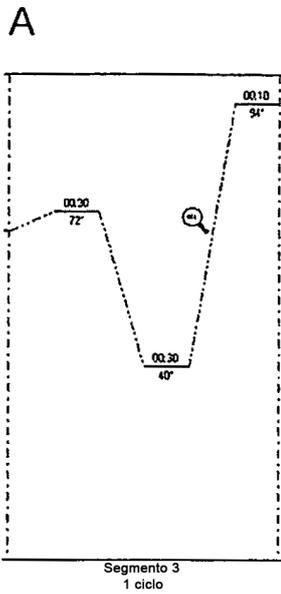


FIG. 20

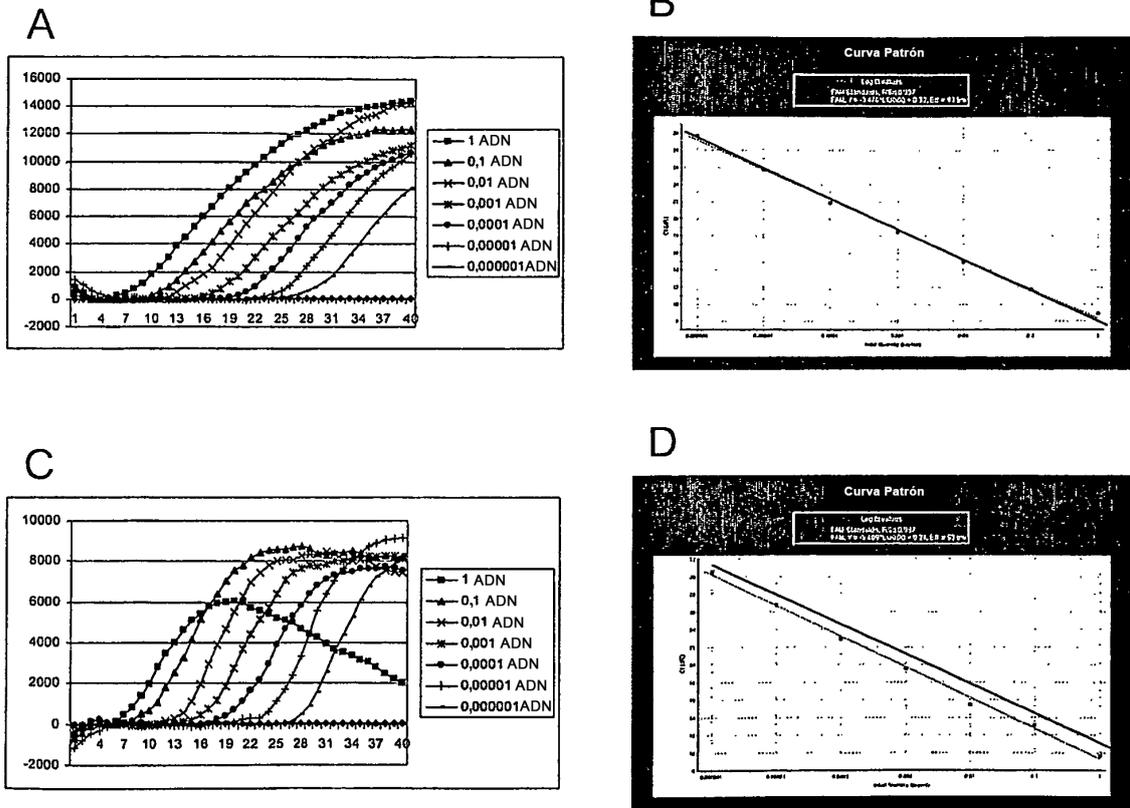


FIG. 21

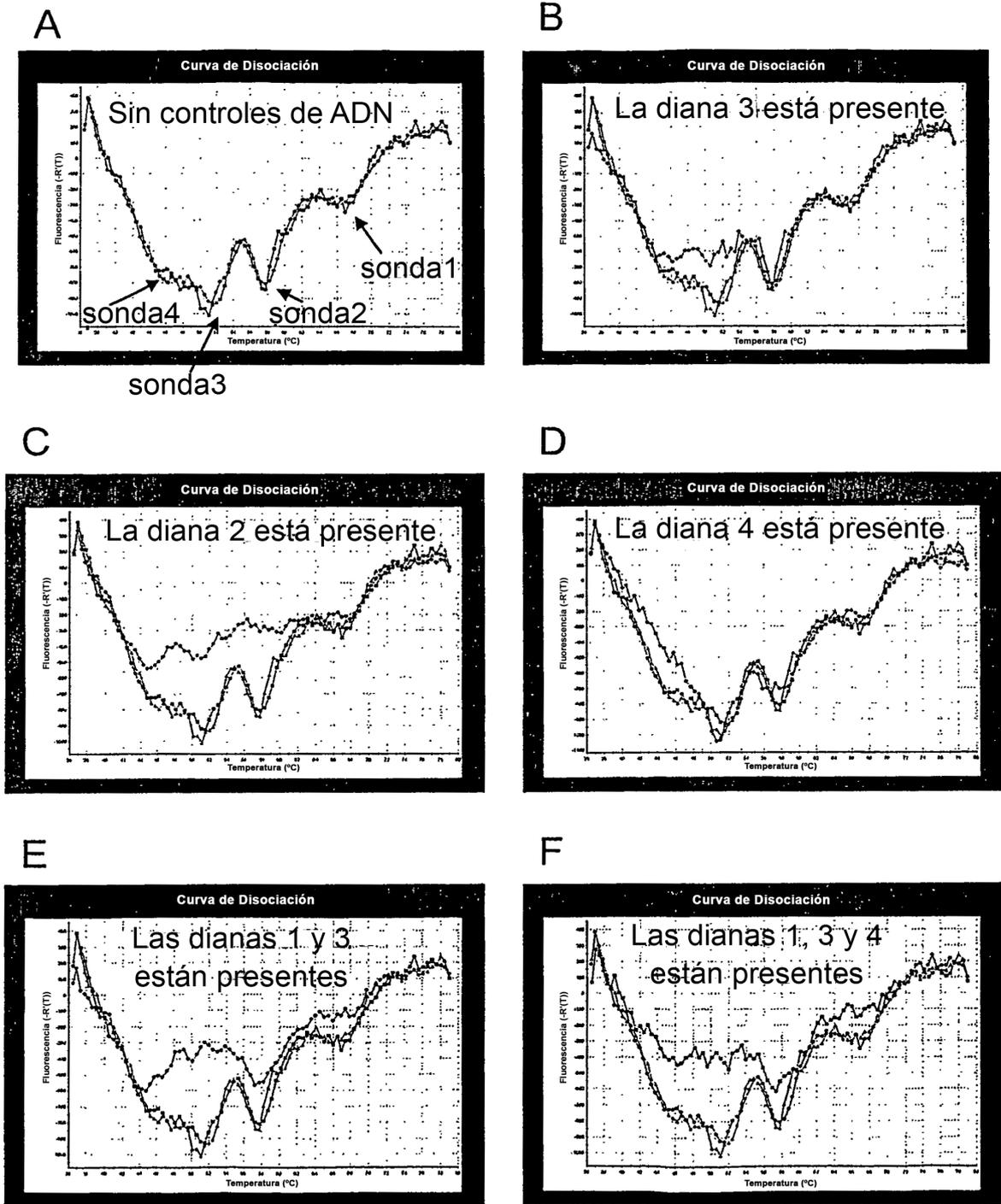


FIG. 22