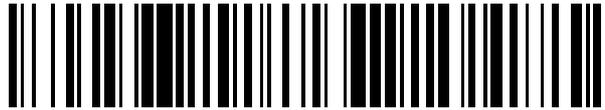


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 718**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09804177 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2379747**

54 Título: **PCR multiplex monocromática cuantitativa**

30 Prioridad:

22.12.2008 US 139890 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
615 Arapeen Drive, Suite 310
Salt Lake City, Utah 84108, US**

72 Inventor/es:

CAWTHON, RICHARD M.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 433 718 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

PCR multiplex monocromática cuantitativa

Campo técnico

5 Se describen métodos para determinar el número de copias relativo y absoluto de una primera secuencia de ácido nucleico diana comparado con una segunda secuencia de ácido nucleico diana en una única reacción con un único marcador de detección y kits útiles en la práctica de los métodos.

Antecedentes de la invención

10 La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QPCR) determina, para cada pocillo de reacción, el C_t , es decir el número de ciclos fraccionado en el que el incremento de la fluorescencia del pocillo (proporcional a la formación del producto) supera un umbral determinado que es varias desviaciones estándar mayor que la fluorescencia en la línea base (Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*, 11, 1026-1030). La representación C_t frente a log (cantidad de ADN diana introducido) es lineal, lo que permite la cuantificación relativa de desconocidos por comparación con una curva estándar derivada de amplificar, en la misma placa, diluciones seriadas de una muestra de ADN de referencia.

15 Para muchas aplicaciones de QPCR, el investigador desea normalizar la señal de una secuencia diana (T) respecto a la señal de una secuencia de referencia (R). Los estudios iniciales midieron T y R en reacciones separadas (monoplex) con un colorante que fluoresce después de la intercalación en cualquier ADN bicatenario, por ejemplo, bromuro de etidio o SYBR Green I, y esta estrategia continúa. Estudios más recientes han medido T y R en el mismo recipiente de reacción, en una QPCR multiplex multicolor, usando colorantes fluorescentes separados con distintos espectros de excitación/emisión para cada una de las secuencias de ADN que se estaban cuantificando (Wittwer, C.T., Hermann, M.G., Gundry, C.N. y Elenitoba-Johnson, K.S. (2001) Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25, 430-442). La medida de las proporciones T/R por QPCR multiplex disminuye a la mitad el número de reacciones de PCR separadas que deben correrse. Además, como tanto las señales T como R se recogen en cada recipiente de reacción, la variación en la cantidad de una muestra de ADN dado que se pipetea para reacciones replicadas ya no genera variación en las proporciones T/R, como lo hace cuando T y R se miden en pocillos separados en una QPCR monoplex. WO0166799 (DUPONT, 2001-09-13) describe una QPCR multiplex con un colorante intercalante.

20 La desventaja principal de la QPCR multiplex multicolor es el coste relativamente alto de las sondas fluorescentes y el alto coste de los instrumentos de QPCR especializados que están equipados para leer dos o más colores fluorescentes. En las estrategias tradicionales de PCR multiplex (ya sea la PCR cuantitativa o no), también resulta a veces excesivamente largo identificar conjuntos de cebadores y concentraciones de cebadores que eviten que la amplificación temprana de un molde con número de copias más alto por una pareja de cebadores inhiba la amplificación tardía de un molde diferente con menor número de copias por una segunda pareja de cebadores.

Resumen de la invención

35 La presente invención proporciona métodos para determinar el número de copias de dos o más secuencias de ácido nucleico diana en una única reacción con un único marcador de detección. También se describen métodos para determinar el número de copias de secuencias teloméricas. Estos datos pueden usarse para asociar la longitud del telómero medida con un riesgo de mortalidad o probabilidad de ocurrencia de enfermedad que se corresponde con una longitud de telómero observada en una población.

40 En la presente memoria se describen métodos y composiciones para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana comparado con el número de copias de un segundo ácido nucleico diana por una PCR multiplex monocromática cuantitativa (MMQPCR) en un único pocillo, un sistema homogéneo, con un único marcador de detección.

45 Las ventajas adicionales de los métodos y composiciones descritos se mostrarán en parte en la descripción siguiente y, en parte, se entenderán a partir de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de los métodos y composiciones descritos. Las ventajas de los métodos y composiciones descritos se averiguarán y conseguirán por medio de los elementos y combinaciones particularmente remarcadas out en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son sólo ejemplares y explicativas y no restrictivas de la invención según se reivindica.

50 Descripción breve de las figuras

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta especificación, ilustran varias realizaciones de los métodos y composiciones descritos y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de los métodos y composiciones descritos.

La Figura 1 muestra en Ciclo 1 el cebador telg que hibrida con secuencias teloméricas nativas y ceba la síntesis de ADN. El cebador telc hibrida con secuencias teloméricas nativas pero no puede cebar la síntesis de ADN, debido a su emparejamiento erróneo en 3'. Cuando se hibridan entre sí como se muestra, y en otras configuraciones no mostradas, telg y telc tienen múltiples emparejamientos erróneos, incluyendo en sus bases terminales 3', de manera que se inhibe la formación de dímeros de cebadores. Los extremos 3' de telg y telc pueden alinearse como una superposición de tres pb perfectamente complementaria, no es lo suficientemente estable como para permitir la formación eficaz de dímeros de cebadores. En el Ciclo 2, telc puede hibridar a lo largo de los productos de extensión del cebador telg que se sintetizaron en el Ciclo 1 pero sólo puede cebar la síntesis de ADN cuando hibrida en la configuración mostrada, ya que otras configuraciones producen un emparejamiento erróneo en la base terminal 3' de telc. En el producto de extensión de telg, la barra superior marca la secuencia del cebador telg en sí mismo, y las bases en *itálica* marcan la secuencia recién sintetizada en el Ciclo 1 de la PCR. Las secuencias en mayúsculas no de molde en los extremos 5' de los cebadores evitan que los extremos 3' del producto telomérico de PCR ceben la síntesis de ADN en la mitad de otras copias del producto telomérico de PCR.

La Figura 2 muestra las curvas de fusión después de 25 ciclos de amplificación (perfil térmico proporcionado en la sección de Materiales y Métodos) de 150 ng de ADN genómico humano sólo con cebadores teloméricos (círculos), sólo cebadores de albúmina ("x" s) o ambos conjuntos de cebadores (triángulos). Las curvas de fusión control sin molde están en negro sin símbolos. Después de la incubación final a 88°C, las reacciones se enfriaron hasta 72°C y la señal se adquirió de 72°C a 95°C, en pasos de 0,5°C, con un periodo de permanencia de 30 segundos por paso. Existe una diferencia de aproximadamente 11°C en las temperaturas de fusión de los amplicones teloméricos y de albúmina.

La Figura 3 muestra PCR Múltiple Monocromática Cuantitativa (MMQPCR) de 20 ng de cada una de las tres muestras de ADN humano de referencia que previamente se ha mostrado que tienen telómeros largos (círculos), telómeros de longitud media ("x" s) o telómeros cortos (triángulos). Las curvas de amplificación control sin molde se muestran con cuadrados negros. Panel superior: representación semi-logarítmica; panel inferior: representación lineal.

La Figura 4 muestra curvas estándar usadas para determinar las proporciones relativas T/S. Se prepararon cinco concentraciones de una muestra de ADN genómico humano estándar que abarcan un intervalo de 81 veces por diluciones seriadas de 3 veces (150 ng, 50 ng, 16,7 ng, 5,55 ng y 1,85 ng por pocillo) y se alicuotaron en duplicado en una placa de PCR de 96 pocillos. Las señales fluorescentes tanto de la diana como de referencia se recogieron de cada pocillo de reacción. Los círculos representan los datos del gen de albúmina de copia única, adquiridos a 88°C; los triángulos los datos para las repeticiones teloméricas, adquiridos a 74°C. El mismo ADN Estándar se usó para formar las reacciones de curva estándar en cada placa en el estudio.

La Figura 5 muestra la correlación de proporciones T/S relativas medidas por PCR Multiplex Monocromática Cuantitativa con albúmina como el gen de copia única, y longitudes medias de Fragmentos de Restricción terminal (TRF) determinadas por análisis de transferencia Southern, en muestras de ADN de sangre completa de 95 individuos. Cada valor T/S es la media de medidas en triplicado; cada longitud TRF media es el promedio de medidas en duplicado. La ecuación de la regresión lineal y coeficiente de correlación se determinaron usando Microsoft Excel.

La Figura 6 muestra la reproducibilidad de proporciones T/S relativas en análisis independientes del ensayo MMQPCR. Las mismas 95 muestras de ADN ensayadas en la Figura 4 se ensayaron de nuevo al día siguiente, teniendo cuidado de que la máquina MyiQ PCR específica y las posiciones en los pocillos de reacción ocupadas por cada muestra de ADN fueran diferentes del día previo. La ecuación de la regresión lineal y coeficiente de correlación se determinaron usando Microsoft Excel.

La Figura 7 muestra la correlación entre las proporciones T/S obtenidas con albúmina como el gen de copia única frente a beta-globina como el gen de copia única. Las proporciones T/S relativas se midieron en las mismas 95 muestras de ADN, en triplicado, en dos análisis separados, sustituyendo los cebadores de beta-globina por los cebadores de albúmina. Para cada muestra, la T/S media de los dos análisis separados con albúmina como el gen de copia única (eje de las x) se representa frente a la T/S media de los dos análisis con beta-globina como el gen de copia única (eje de las y). La ecuación de la regresión lineal y coeficiente de correlación se determinaron usando Microsoft Excel.

Descripción detallada

La presente invención comprende métodos y sistemas dirigidos a determinar el número de copias de uno o más ácidos nucleicos diana. El método y composiciones descritos pueden entenderse más fácilmente por referencia a la descripción detallada siguiente de realizaciones particulares y el Ejemplo incluido en ella y a las Figuras y su descripción previa y siguiente.

Las composiciones y métodos descritos pueden usarse para la detección en tiempo real de ácidos nucleicos diana. La detección en tiempo real es la detección que puede tener lugar durante o inmediatamente después de la reacción u operación de amplificación. Generalmente, dicha detección puede conseguirse detectando el producto de

amplificación en uno o más tiempos discretos durante la amplificación, continuamente durante toda o una o más partes de la amplificación o una combinación de tiempos discretos y detección continua. La detección en tiempo real puede ayudarse mediante el uso de marcadores o restos que contienen o producen una señal detectable que puede detectarse sin alterar la reacción u operación de amplificación. Los marcadores fluorescentes son un ejemplo de marcadores útiles para la detección en tiempo real. Un medio particularmente útil para obtener detección en tiempo real es el uso de marcadores de detección en la operación de amplificación. Con marcadores de detección diseñados adecuadamente, pueden generarse señales de detección, incluyendo señales fluorescentes, como resultados de la amplificación. En la mayor parte de dichos casos, las señales de detección serán proporcionales a la cantidad de producto de amplificación y/o la cantidad de secuencia diana o molécula diana.

En la presente memoria se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana. Un ácido nucleico diana puede obtenerse de una muestra o generarse artificialmente como se describe en otro lugar de la presente memoria.

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en la presente memoria, ya sea anteriormente o más adelante, con el fin de describir más completamente el estado de la técnica como conocen los expertos en ésta a partir de la fecha de la invención descrita y reivindicada en la presente memoria.

Debe entenderse que esta invención no está limitada a métodos sintéticos específicos, o a métodos de biotecnología recombinante específicos a no ser que se especifique otra cosa, o a reactivos particulares a no ser que se especifique otra cosa, a vehículos farmacéuticos específicos, o a formulaciones farmacéuticas particulares, o a regímenes de administración, ya que, por supuesto, éstos pueden variar.

Definiciones y nomenclatura

La terminología usada en la presente memoria es sólo para el propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante.

Tal y como se usa en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el, la" pueden incluir los referentes plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye mezclas de compuestos, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de dichos vehículos, y semejantes. La referencia a "un componente" puede incluir un único componente o múltiples componentes o una mezcla de componentes a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa.

Los intervalos pueden expresarse en la presente memoria como de "aproximadamente" un valor particular, y/o a "aproximadamente" otro valor particular. El término "aproximadamente" se usa en la presente memoria para significar aproximadamente en la región de, en términos generales o alrededor. Cuando el término "aproximadamente" se usa conjuntamente con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos mostrados. En general, el término "aproximadamente" se usa en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado por una variación de 20%. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye de un valor particular y/o al otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, por el uso del "aproximadamente" anterior, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final.

La palabra "o" tal y como se usa en la presente memoria significa un miembro cualquiera de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

Por "muestra" se quiere decir un animal; un tejido u órgano de un animal; una célula (bien en un sujeto, tomada directamente de un sujeto o una célula mantenida en cultivo o de una línea celular cultivada); un lisado celular (o fracción de lisado) o extracto celular; o una disolución que contiene una o más moléculas derivadas de una célula o material celular (por ejemplo, un polipéptido o ácido nucleico), que se ensaya como se describe en la presente memoria. Una muestra también puede ser cualquier fluido o excreción corporal (por ejemplo, pero no limitado a, sangre, orina, heces, saliva, lágrimas, bilis) que contiene células o componentes celulares.

La expresión "ácido nucleico" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido natural o sintético, ya sea ADN o ARN o híbrido ADN-ARN, monocatenario o bicatenario, con sentido o antisentido, que es capaz de hibridar con un ácido nucleico complementario por emparejamiento de bases de Watson-Crick. Los ácidos nucleicos de la invención también pueden incluir análogos de nucleótidos (por ejemplo, BrdU) y uniones internucleósido distintas de fosfodiéster (por ejemplo, ácido nucleico peptídico (PNA) o uniones tiodiéster). En particular, los ácidos nucleicos pueden incluir, sin limitación, ADN, ARN, ADNc, ADNg, ADNss, ADNds o cualquier combinación de éstos.

Por "se une específicamente" se quiere decir que la composición reconoce e interacciona físicamente con su diana cognada. Por ejemplo, un cebador puede unirse específicamente a su ácido nucleico diana. Por ejemplo, un cebador

del primer conjunto de cebadores puede unirse específicamente a la primera secuencia de ácido nucleico diana y no reconoce significativamente ni interacciona con otras dianas o secuencias de ácido nucleico diana.

5 Por "sonda", "cebador" u oligonucleótido se quiere decir una molécula de ADN o ARN monocatenaria de secuencia definida que puede emparejarse por bases con una segunda molécula de ADN o ARN que contiene una secuencia complementaria (la "diana"). La estabilidad del híbrido resultante depende del grado del emparejamiento de bases que ocurre. El grado del emparejamiento de bases se ve influido por parámetros tales como el grado de complementariedad entre las moléculas de sonda y diana y el grado de astringencia de las condiciones de hibridación. El grado de astringencia de la hibridación se ve influido por parámetros tales como la temperatura, concentración de sales y la concentración de moléculas orgánicas tales como formamida y se determina pro
10 métodos conocidos para un experto en la técnica. Las sondas o cebadores específicos para ácidos nucleicos diana (por ejemplo, genes y/o ARNm) tienen al menos 80%-90% de complementariedad de secuencia, al menos 91%-95% de complementariedad de secuencia, al menos 96%-99% de complementariedad de secuencia o al menos 100% de complementariedad de secuencia con la región de la diana con la que hibridan. Las sondas, cebadores y oligonucleótidos pueden marcarse de manera detectable, bien radiactivamente o no radiactivamente, por métodos
15 muy conocidos para los expertos en la técnica. Las sondas, cebadores y oligonucleótidos se usan para métodos que implican la hibridación de ácidos nucleicos, tales como: la PCR multiplex monocromática cuantitativa (MMQPCR) descrita en la presente memoria así como secuenciación de ácidos nucleicos, transcripción inversa y/o amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa, análisis de polimorfismos conformacionales de cadena única (SSCP), análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP), hibridación Southern, hibridación Northern, hibridación in situ, ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA).

Por "conjunto de cebadores" se quiere decir al menos dos cebadores que contiene cada uno una secuencia complementaria a una cadena opuesta de la misma secuencia diana. En un conjunto de cebadores, al menos uno de los dos cebadores debe ser un "cebador directo" al menos uno de los dos cebadores debe ser un "cebador inverso". Un "cebador directo" es un cebador que es complementario a una cadena con sentido de un ácido nucleico
25 diana, en el que un "cebador inverso" es un cebador que es complementario al complemento de la cadena con sentido del ácido nucleico diana (también referido como la cadena anti-sentido del ácido nucleico diana). Un conjunto de cebadores puede ser una pareja de cebadores que puede ser usada en una reacción de PCR.

Por "amplicón" se quiere decir partes de ADN formadas como los productos de eventos de amplificación naturales o artificiales. Por ejemplo, pueden formarse mediante los métodos descritos en la presente memoria, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) o reacciones en cadena de la ligasa (LCR), así como por duplicación génica natural.

Por "hibrida específicamente" se quiere decir que una sonda, cebador u oligonucleótido reconoce e interacciona físicamente (esto es, pares de bases) con un ácido nucleico sustancialmente complementario (por ejemplo, un ácido nucleico diana) en condiciones de alta astringencia y no se empareja por bases sustancialmente con otros ácidos nucleicos.

35 Por "condiciones de alta astringencia" se quiere decir condiciones que permiten la hibridación comparable con la que resulta del uso de una sonda de ADN con una longitud de al menos 40 nucleótidos, en un tampón que contiene 0,5 M NaHPO₄, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA y 1% BSA (Fracción V) a una temperatura de 65⁰C o un tampón que contiene 48% formamida, 4,8 X SSC, 0,2 M Tris-Cl, pH 7,6, 1 X disolución de Denhardt, 10% sulfato de dextrano y 0,1% SDS a una temperatura de 42⁰C. Otras condiciones para hibridación de alta astringencia, tales como para
40 PCR, Northern, Southern o hibridación in situ, secuenciación de ADN, etc..., son muy conocidas para los expertos en la técnica de la biología molecular. (Véase, por ejemplo, F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1998).

Materiales

Se describen materiales, composiciones y componentes que pueden usarse para, pueden usarse conjuntamente con, pueden usarse en la preparación de, o son productos de los métodos y composiciones descritos. Éstos y otros materiales se describen en la presente memoria y se entiende que cuando las combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc., de estos materiales se describen aunque no se describa explícitamente la referencia específica a cada una de varias combinaciones y permutación individuales y colectivas de estos compuestos, cada uno se contempla específicamente y se describe en la presente memoria. Así, si se describe una clase de moléculas A, B y C así como una clase de moléculas D, E y F y se describe un ejemplo de una molécula de combinación A-D, incluso si cada una no se indica individualmente, cada una se contempla individualmente y colectivamente. Así, en este ejemplo, cada una de las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F se contempla específicamente y debe considerarse descrita a partir de la descripción de A, B y C; D, E y F; y la combinación de ejemplo A-D. Asimismo, cualquier subconjunto o combinación de éstas también se contempla y describe específicamente. Así, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F y C-E se contempla específicamente y debe considerarse descrita a partir de la descripción de A, B y C; D, E y F; y la combinación de ejemplo A-D. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta descripción, incluyendo, pero no limitado a, las etapas en los métodos de preparar y usar las composiciones descritas. Así, si existe una variedad de etapas adicionales que pueden realizarse se entiende que cada una de estas etapas adicionales puede realizarse con cualquier realización específica o

combinación de realizaciones de los métodos descritos, y que cada una de dichas combinaciones se contempla específicamente y debe considerarse descrita.

A. Muestras diana

5 Las muestras diana pueden derivar de cualquier fuente que tiene, o se sospecha que tiene, moléculas diana. Las muestras diana pueden contener, por ejemplo, una o unas moléculas diana tales como ácidos nucleicos. Una muestra diana puede ser la fuente de ácidos nucleicos diana. Una muestra diana puede incluir ácidos nucleicos diana naturales, ácidos nucleicos diana sintetizados químicamente, o ambos. Una muestra diana puede ser, por ejemplo, una muestra de una o más células, tejidos o fluidos corporales tales como sangre, orina, semen, fluido linfático, fluido cerebroespinal, o fluido amniótico, u otras muestras biológicas, tales como células de cultivo tisular, frotis bucales, enjuague bucal, heces, cortes de tejido, aspiración de biopsia y muestras arqueológicas tales como hueso o tejido momificado. Los tipos de muestras diana útiles incluyen muestras de sangre, muestras de orina, muestras de semen, muestras de fluido linfático, muestras de fluido cerebroespinal, muestras de fluido amniótico, muestras de biopsia, muestras de biopsia por aspiración con aguja, muestras de cáncer, muestras de tumor, muestras de tejido, muestras de células, muestras de lisado celular, muestras de lisado celular crudo, muestras forenses, muestras arqueológicas, muestras de infección, muestras de infección nosocomial, muestras de producción, muestras de preparación de fármacos, muestras de producción de moléculas biológicas, muestras de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos y/o muestras de preparación de carbohidratos.

1. Ácidos nucleicos diana

20 Las muestras de ácido nucleico pueden derivar de cualquier fuente que tiene, o se sospecha que tiene, ácidos nucleicos diana. Una muestra de ácido nucleico es la fuente de moléculas de ácido nucleico y secuencias de ácido nucleico tales como ácidos nucleicos diana. La muestra de ácido nucleico puede contener ARN o ADN o ambos. El ácido nucleico diana también puede ser ADNc. Además, el ARNm puede transcribirse de manera inversa para formar ADNc que puede servir como un ácido nucleico diana para usarse en los métodos descritos en la presente memoria.

25 Un "ácido nucleico diana" o "secuencia diana" quiere significar una secuencia de ácido nucleico en un ácido nucleico bicatenario o monocatenario. Por "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se quiere decir al menos dos nucleótidos unidos entre sí covalentemente. Un ácido nucleico de la presente invención contendrá generalmente enlaces fosfodiéster aunque, en algunos casos, se incluyen análogos de ácido nucleico que puede tener núcleos alternativos, que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage, S.L. et al., Tetrahedron 49: 1925-63 (1993) y referencias en ésta; Letsinger, R.L. et al., J. Org. Chem. 35: 3800-03 (1970); Sprinzl, M. et al., Eur. J. Biochem. 81: 579-89 (1977); Letsinger, R.L. et al., Nucleic Acids Res. 14: 3487-99 (1996); Sawai et al., Chem. Lett. 805 (1984); Letsinger, R.L. et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); y Pauwels et al., Chemica Scripta 26: 141-49 (1986)), fosforotioato (Mag, M. et al., Nucleic Acids Res. 19: 1437-41 (1991); y Pat. U.S. No. 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 2321 (1989)), uniones O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press, 1991), y núcleos y uniones de ácido nucleico peptídico (Egholm, M., Am. Chem. Soc. 114: 1895-97 (1992); Meier et al., Che. Int. Ed. Engl. 31: 1008 (1992); Egholm, M., Nature 365: 566-68 (1993); Carlsson, C. et al., Nature 380: 207 (1996)). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con núcleos positivos (Dempcy, R.O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097-101 (1995)); núcleos no iónicos (Pat. U.S. Nos. 5.386.023; 5.637.684; 5.602.240; 5.216.141; y 4.469.863; Kiedrowski et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30: 423 (1991); Letsinger, R.L. et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); Letsinger, R.L. et al., Nucleoside & Nucleotide 13: 1597 (1994); Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34: 17 (1994)) y núcleos no de ribosa, incluyendo los descritos en las Pat. U.S. Nos. 5.235.033 y 5.034.506 y en los Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos en la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. 169-176 (1995)).

30 Cualquier secuencia de ácido nucleico que se quiere medir, identificar, detectar o cuyo número de copias se quiere determinar puede servir como una secuencia de ácido nucleico diana. En los métodos descritos en la presente memoria, puede haber más de una secuencia de ácido nucleico diana. En el evento en el que estén presentes dos secuencias de ácido nucleico diana, se referirán como una primera y una segunda secuencia de ácido nucleico diana, respectivamente. En el evento en el que estén presentes tres secuencias de ácido nucleico diana, se referirán como una primera, una segunda y una tercera secuencia de ácido nucleico diana, respectivamente y así sucesivamente. Los ácidos nucleicos diana descritos en los métodos de la presente memoria pueden tener el mismo número de copias, uno similar o uno diferente. Por ejemplo, el primer ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico con múltiple número de copias y el segundo ácido nucleico diana es un gen con copia única. Por ejemplo, el primer ácido nucleico diana puede ser secuencias repetidas teloméricas, ADNmt, ADNr o ADN con repeticiones Alu. Por ejemplo, el primer ácido nucleico diana puede ser ADNc transcrito de manera inversa a partir de un ARNm con alto número de copias y el segundo ácido nucleico diana puede ser ADNc transcrito de manera inversa a partir de ARNm con bajo número de copias.

Los genes con copia única son genes que tienen una única copia por genoma haploide. Los genes con copia única tienen por lo tanto dos copias por célula. Los genes con copia única incluyen, pero no están limitados a, el gen de la albúmina o el gen de la beta-globina.

5 Los telómeros son estructuras especializadas encontradas en los extremos de los cromosomas lineales de los eucariotas. Los telómeros están compuestos generalmente de repeticiones en tándem cortas, con una unidad de secuencia repetida especificada por la enzima telomerasa particular de ese organismo. Se conocen las secuencias de repetición de los telómeros para una variedad de organismos. Para vertebrados, plantas, determinados tipos de hongos y algunos protozoos, las secuencias son repeticiones perfectas. Por ejemplo, la unidad de secuencia repetida humana es (TTAGGG) n (SEQ ID NO: 1). En otros organismos, las secuencias repetidas son irregulares, 10 tales como las de *Saccharomyces cerevisiae* en el que la secuencia es G1-3T/C1-3A variable. En algunos organismos eucariotas, los telómeros carecen de las repeticiones de secuencia en tándem cortas pero tienen elementos de secuencia que funcionan como telómeros. Por ejemplo, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el telómero es una mezcla de elementos retrotransposón Het-A y TART mientras que en el mosquito *Anopheles gambiae* los telómeros son formaciones de repeticiones en tándem de secuencias complejas. Para los 15 propósitos de la presente invención, los telómeros con diferentes estructuras están englobados en el alcance de la presente invención.

Además de las secuencias repetidas, el extremo 3' de algunos telómeros contiene una región monocatenaria, que para los seres humanos está localizada en la cadena rica en G. La cadena monocatenaria está compuesta por repeticiones (TTAGGG) n (SEQ ID NO: 1), siendo n generalmente aproximadamente 9-35, aunque puede ser menor 20 o mayor. Tal y como se usa en la presente memoria, la longitud de la región monocatenaria 3' también puede correlacionarse con riesgo de mortalidad.

Típicamente, la maquinaria de replicación del ADN actúa en la dirección 5' a 3' y la síntesis de la cadena retrasada ocurre discontinuamente por el uso de cebadores de ARN cortos que se degradan después de la síntesis de la 25 cadena. Como las secuencias en el extremo 3' de un ADN lineal no están disponibles para completar la síntesis de la región ocupada previamente por el cebador de ARN, la región 3' terminal del cromosoma lineal no se replica. Este "problema de replicación terminal" se resuelve por la acción de la telomerasa, una ribonucleoproteína transcriptasa inversa específica de telómero. La enzima telomerasa tiene un componente ARN integral que actúa como un molde para extender el extremo 3' del telómero. Las extensiones repetidas por la actividad telomerasa resultan en la generación de repeticiones de telómero copiadas a partir del molde de ARN unido al telómero. Después de la 30 elongación por la telomerasa, la síntesis de la cadena retrasada por la ADN polimerasa completa la formación de la estructura telomérica bicatenaria.

En las células somáticas humanas normales, la telomerasa no se expresa o se expresa en niveles bajos. Consecuentemente, los telómeros se acortan 50-200 pb con cada división celular hasta que las células alcanzan la senescencia replicativa, punto en el cual las células pierden la capacidad de proliferar. Esta capacidad limitada de 35 las células de replicarse se refiere generalmente como un límite de Hayflick y puede proporcionar a las células un mecanismo de conteo, es decir, un reloj mitótico, para contar las divisiones celulares y regular el desarrollo celular. Correspondientemente, la activación de la telomerasa en células que carecen de actividad telomerasa, por ejemplo, por la expresión de telomerasa a partir de un promotor retroviral constitutivo o activación de polimerasa endógena, permite a las células mantener la capacidad proliferativa y da lugar a la inmortalización de la célula.

40 De forma interesante, estas células inmortalizadas tienen telómeros estables cortos mientras los telómeros más cortos empiezan a extenderse. Este fenómeno sugiere que la enzima telomerasa protege a los telómeros cortos de un acortamiento adicional mientras extiende aquellos que se encuentran por debajo de una longitud umbral determinada. Así, la presencia de la actividad telomerasa no parece ser necesaria cuando los telómeros tienen una 45 longitud determinada, pero se vuelve crítica para el mantenimiento de la integridad de los telómeros cuando la longitud se encuentra por debajo de un límite crítico.

Está bien establecido que la longitud e integridad de los telómeros es importante para la segregación apropiada de los cromosomas y el crecimiento celular. Por ejemplo, el desarrollo de muchos tipos de cáncer se correlaciona con la activación del mantenimiento de los telómeros mientras la senescencia celular se correlaciona con la pérdida de la integridad de los telómeros. El acortamiento de los telómeros inducido mediante la inhibición de la actividad 50 telomerasa puede dar lugar a senescencia proliferativa y apoptosis celular (Zhang, X. et al., *Genes Dev.* 2388-99 (1999)). Además, las inactivaciones genéticas de ARN de telomerasa en ratones resulta en animales con defectos en el desarrollo, patologías relacionadas con la edad y susceptibilidad incrementada a cáncer (Rudolph, K.L. et al., *Cell* 96: 701-12 (1999); Herrera, E. et al., *EMBO J.* 18: 2950-60 (1999)). De manera similar, en el trastorno autosómico dominante de la disqueratosis congénita (DKC), que surge a partir de una mutación en el gen que codifica el 55 componente ARN de la telomerasa, los pacientes aquejados presentan acortamiento acelerado de los telómeros y mueren a una edad media de 16 años (máximo aproximadamente 50 años), habitualmente de infecciones graves secundarias a fallo en la médula ósea. Las características clínicas de los pacientes con DKC, sugerentes de envejecimiento acelerado, incluyen canas prematuras y pérdida de pelo; despigmentación de la piel; pobre cicatrización de heridas; alto riesgo de infecciones graves; y una incidencia incrementada de malignidades, osteoporosis y fibrosis pulmonar. Además, las longitudes medias más cortas de los telómeros medidas en ADN 60

sanguíneo de individuos ancianos normales se superponen con las longitudes medias más altas de los telómeros medidas en la sangre de los pacientes con DKC.

5 A la vista del papel que juegan los telómeros en el crecimiento celular y en la senescencia celular, es deseable tener métodos para predecir la ocurrencia de enfermedades relacionadas con la edad y riesgo de mortalidad basado en la longitud de los telómeros. Los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo los métodos de MMQPCR, proporcionarán una base para identificar a los individuos con un riesgo incrementado de desarrollar enfermedades asociadas con la edad particulares, tales como cáncer e hipertensión, de manera que puede administrarse una intervención médica temprana a los individuos en los grupos de alto riesgo.

10 En los métodos descritos en la presente memoria, puede determinarse el número de copias de un telómero para un único cromosoma en una célula. En un aspecto, se mide el número promedio de copias de un telómero o número medio de copias de un telómero para una única célula. En otra realización, se mide el número promedio de copias de un telómero o número medio de copias de un telómero para una población de células. Un cambio en el número de copias de un telómero es un incremento o disminución en el número de copias del telómero, en particular un incremento o disminución en el número promedio de copias del telómero. El cambio puede ser respecto a un punto de tiempo particular, es decir, el número de copias del telómero de un organismo en el tiempo t1 comparado con la longitud del telómero en un tiempo posterior t2. Un cambio o diferencia en el número de copias de un telómero también puede compararse frente al número promedio o medio de copias de un telómero de una población de células o población de organismos particular. En algunos aspectos, un cambio o diferencia en el número de copias de un telómero también puede compararse frente al número promedio o medio de copias de un telómero de una población que no padece una afección patológica. En determinadas realizaciones, el cambio en el número de copias de un telómero se mide frente a una población que existe en periodos de tiempo diferentes.

15 Aunque el número de copias de un telómero puede determinarse para todos los eucariotas, en un aspecto, los números de copias de un telómero se determinan para vertebrados, incluyendo sin limitación, anfibios, pájaros y mamíferos, por ejemplo, roedores, ungulados y primates, particularmente seres humanos. Los números de copias de un telómero también pueden determinarse para organismos en los que la longevidad es un rasgo deseable o en los que se correlaciona la longevidad y susceptibilidad a enfermedad. En otro aspecto, los telómeros pueden medirse para organismos clonados con el fin de evaluar el riesgo de mortalidad o susceptibilidad a enfermedad asociado con la integridad alterada de los telómeros en esos organismos.

20 Las secuencias de ácido nucleico teloméricas, tal como las descritas anteriormente, pueden servir como una secuencia diana. Las secuencias de ácido nucleico teloméricas, o cualquier otro ácido nucleico diana, pueden tener cualquier longitud, con el entendimiento de que las secuencias más largas son más específicas. En algunas realizaciones, puede ser deseable fragmentar o escindir el ácido nucleico de muestra en fragmentos de 100-10.000 pares de bases. En un aspecto, pueden usarse los fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases. La fragmentación o escisión puede hacerse de cualquiera de varias maneras muy conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo métodos mecánicos, químicos y enzimáticos. Así, los ácidos nucleicos pueden someterse a sonicación, prensa French, cizalla, o tratarse con nucleasas (por ejemplo, ADNasa, enzimas de restricción, ARNasa, etc.), o agentes químicos de escisión (por ejemplo, ácido/piperidina, hidrazina/piperidina, complejos hierro-EDTA, complejos 1,10-fenantrolina-cobre, etc.).

2. Polimerasas

30 En los métodos descritos en la presente memoria, se requiere una enzima de amplificación. Por ejemplo, después de poner en contacto los cebadores con los ácidos nucleicos diana, la reacción puede tratarse con una enzima de amplificación. Las enzimas de amplificación son generalmente polimerasas, tales como ADN polimerasas. Una variedad de polimerasas adecuadas son muy conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitado, a ADN polimerasa Taq, Klen Taq, Tfi polimerasa, DynaZyme, etc. Generalmente, todas las polimerasas son aplicables a la presente invención. En un aspecto, las polimerasas son polimerasas termoestables que carecen de actividad exonucleasa 3' a 5' o polimerasas preparadas por ingeniería para tener actividades exonucleasa 3' a 5' reducida o no funcional (por ejemplo, Pfu(exo-), Vent (exo-), Pyra (exo-), etc.), ya que el uso de polimerasas con una fuerte actividad exonucleasa 3' a 5' tiende a eliminar los nucleótidos terminales 3' emparejados erróneamente que se necesitan en algunas aplicaciones para evitar o retrasar las amplificaciones de dímeros de cebadores y en otras aplicaciones para llevar a cabo amplificaciones específicas de alelo. También son aplicables mezclas de polimerasas usadas para extender de manera óptima cebadores hibridados. En otro aspecto, las enzimas polimerasa útiles para la presente invención se formulan para volverse activas sólo a temperaturas adecuadas para la amplificación.

35 La presencia de anticuerpos inhibidores de polimerasa, que se inactivan a las temperaturas de la amplificación, o que secuestran las enzimas en una forma en la que no están disponibles hasta que se alcanzan las temperaturas de amplificación son todas adecuadas. Estas formulaciones de polimerasa permiten el mezclado de todos los componentes en un único recipiente de reacción a la vez que se evita el cebado de secuencias de ácido nucleico no diana.

Además, los expertos en la técnica apreciarán que pueden añadirse varios agentes a la reacción para incrementar la capacidad de procesamiento de la polimerasa, estabilizar la polimerasa frente a la inactivación, disminuir la

hibridación no específica de los cebadores o incrementar la eficacia de la replicación. Dichos aditivos incluyen, pero no están limitados a, dimetilsulfóxido, formamida, acetamida, glicerol, polietilén glicol o agentes proteínicos tales como la proteína de unión a ADN monocatenario de *E. coli*, proteína 32 del gen T4, albúmina de suero bovino, gelatina, etc. En otro aspecto, el experto en la técnica puede usar varios análogos de nucleótidos para la

5
amplificación de tipos particulares de secuencias, por ejemplo secuencias ricas en GC o repetidas. Estos análogos incluyen, entre otros, c7-dGTP, hidroximetil-dUTP, dITP, 7-deaza-dGTP, etc.

3. Cebadores

Por "cebador", "ácido nucleico cebador", "cebador oligonucleotídico", "sonda oligonucleotídica" o equivalentes gramaticales tal y como se usan en la presente memoria se quiere decir un ácido nucleico que hibridará con alguna

10
parte de un ácido nucleico diana. Los cebadores o sondas de la presente invención se diseñan para ser sustancialmente complementarios a una secuencia diana de manera que ocurra la hibridación de la secuencia diana y los cebadores de la presente invención.

En algunos aspectos, puede diseñarse un cebador para bloquear que el cebador cebe la extensión del ácido nucleico diana en todas menos en una configuración. Por ejemplo, uno de los cebadores en un conjunto de

15
cebadores puede diseñarse para bloquear que el cebador cebe la extensión de los ácidos nucleicos diana creando una base con emparejamiento erróneo en el extremo 3' del cebador. Mediante el diseño y utilización de dicho cebador, el cebador es todavía capaz de hibridar con su secuencia complementaria; sin embargo, sólo cebará la síntesis de ADN en una única conformación, proporcionando así previsibilidad respecto al tamaño del amplicón y por lo tanto previsibilidad respecto a la T_m del amplicón.

Por ejemplo, en la presente memoria se describen cebadores y conjuntos de cebadores, en el que un cebador del primer conjunto de cebadores comprende al menos un nucleótido adyacente al extremo 3' del cebador, en el que

20
dicho nucleótido tiene emparejamiento erróneo frente, no complementario a, el ácido nucleico diana, pero es complementario al nucleótido 3' terminal del otro cebador en el conjunto de cebadores.

En la presente memoria también se describen cebadores y conjuntos de cebadores, en el que un cebador de un conjunto de cebadores comprende al menos un nucleótido adyacente al extremo 3' del cebador, en el que dicho

25
nucleótido tiene emparejamiento erróneo frente, no complementario a, el ácido nucleico diana, pero es complementario al nucleótido 3' terminal del otro cebador en el conjunto de cebadores, en el que el producto de extensión del cebador que contiene el emparejamiento erróneo del conjunto de cebadores puede hibridar con el otro cebador en el conjunto de cebadores, permitiendo que dicho otro cebador cebe la síntesis de ADN a lo largo de dicho producto de extensión.

30

Para asegurar que un cebador bloqueado sólo cebará en una configuración única, específica puede diseñarse un conjunto de cebadores que incluye el cebador bloqueado de manera que los cebadores del conjunto de cebadores se superpongan con complementariedad perfecta sobre la región de la base con emparejamiento erróneo presente

35
en el cebador bloqueado. Dicho diseño puede realizarse de manera que se evita la formación de dímeros de cebadores y para minimizar la capacidad de los dos cebadores de cebarse entre sí. Dicho diseño puede utilizarse cuando la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia que comprende múltiples repeticiones tal como las repeticiones encontradas en un telómero (secuencia telomérica). Un ejemplo de dicho método se describe en otro lugar de la presente memoria, incluyendo los Ejemplos más adelante.

Como se describe en la presente memoria, los cebadores para la amplificación directa de repeticiones de telómeros pueden comprender un primer cebador que hibrida con una primera cadena única del ácido nucleico diana y un

40
segundo cebador que hibrida con una segunda cadena única del ácido nucleico diana, en el que la primera y segunda cadenas son sustancialmente complementarias. Los cebadores son capaces de extensión de cebador por la polimerasa cuando hibridan con sus cadenas respectivas. Esto es, los cebadores hibridados con el ácido nucleico diana tienen sus residuos de nucleótidos 3' terminales complementarios al residuo de nucleótido en el ácido nucleico diana de manera que los cebadores son extensibles por la polimerasa. Los cebadores seleccionados son complementarios a unidades repetitivas de la región repetitiva. Por ejemplo, al menos un residuo de nucleótido de al menos uno de los cebadores puede alterarse para producir emparejamiento erróneos con un residuo de nucleótido de al menos una unidad repetitiva con la que hibrida el cebador, en el que el residuo de nucleótido alterado también produce un emparejamiento erróneo con el residuo de nucleótido 3' terminal del otro cebador cuando los cebadores hibridan entre sí. La inclusión de un emparejamiento erróneo evita o limita la extensión del cebador y los híbridos cebador-cebador.

45
50

Un conjunto de cebadores para amplificación directa de repeticiones de telómero puede comprender un conjunto de cebadores en el que al menos un residuo de nucleótido del primer cebador se altera para producir un emparejamiento erróneo entre el residuo alterado y un residuo de nucleótido de al menos una unidad repetitiva de la primera cadena con la que hibrida el cebador, en el que el residuo de nucleótido alterado también produce un emparejamiento erróneo con el residuo de nucleótido 3' terminal del segundo cebador cuando el primer y segundo cebadores hibridan entre sí. El residuo de nucleótido alterado puede ser uno o más residuos de nucleótidos del nucleótido 3' terminal para permitir la extensión eficaz por la polimerasa cuando el cebador alterado hibrida con los ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, el residuo de nucleótido alterado puede ser al menos 1 residuo de nucleótido,

55

al menos 2 residuos de nucleótidos o al menos 3 residuos de nucleótidos del nucleótido 3' terminal para permitir la extensión eficaz por la polimerasa cuando el cebador alterado hibrida con los ácidos nucleicos diana.

Como se discute en otro lugar de la presente memoria, los cebadores de los conjuntos de cebadores pueden diseñarse para tener Tm similares para limitar la generación de productos de amplificación no deseados y para permitir la amplificación y detección de varios ácidos nucleicos diana en un único volumen de reacción. Además, como los telómeros de varios organismos tienen diferentes secuencias de unidad repetitiva, la amplificación de los telómeros de un organismo específico empleará cebadores específicos para la unidad repetitiva de cada organismo diferente. Las secuencias teloméricas humanas se usan en la presente memoria para ilustrar la práctica de la presente invención para la amplificación directa y cuantificación de secuencias de ácido nucleico repetidas en tándem, pero la invención no está limitada a la realización específica descrita.

También se describen cebadores para incrementar la temperatura de fusión (Tm) del amplicón resultante por encima de la del otro amplicón de los métodos descritos en la presente memoria. Estos cebadores pueden referirse como cebadores que comprenden un anclaje GC". "Anclajes GC" se refiere típicamente a la presencia de bases G o C en las últimas cinco bases del extremo 3' de cebadores que ayudan a estimular la unión específica al extremo 3' debido a la unión más fuerte de las bases G y C. Típicamente, deben evitarse más de 3 G o C en las últimas 5 bases en el extremo 3' del cebador. Sin embargo, en los métodos descritos en la presente memoria los cebadores que comprenden un "Anclaje GC" son cebadores que comprenden una secuencia etiqueta 5' (anclaje GC) que confiere una mayor temperatura de fusión al producto de PCR resultante (amplicón) que la temperatura de fusión sin el anclaje GC. La secuencia etiqueta 5' de los cebadores que comprenden un "anclaje GC" comprende un anclaje GC en el extremo 5' de la secuencia cebadora que no es complementario a ninguna parte de la secuencia del ácido nucleico diana. Un "anclaje GC" es una serie de nucleótidos G y C que pueden unirse al extremo 5' de un cebador con el fin de incrementar la temperatura de fusión del amplicón. Un anclaje GC puede tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos. Un anclaje GC también puede referirse como una región rica en GC o etiqueta rica en GC.

Los anclajes GC pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria para incrementar la Tm de uno de los amplicones. Mediante el incremento de la Tm del amplicón puede adquirirse una señal fluorescente a una temperatura lo suficientemente alta como para fundir completamente el otro amplicón, permitiendo así la adquisición de una señal fluorescente para dos o más amplicones diferentes a dos o más temperaturas diferentes. Los cebadores con anclaje GC pueden diseñarse para uso en la misma reacción de amplificación de manera que los anclajes GC en cebadores diferentes son diferentes entre sí para evitar la formación de horquillas o dímeros de cebadores que podrían resultar en una parada de la reacción de amplificación.

Como los cebadores hibridados a los ácidos nucleicos diana deben ser capaces de extensión por cebador, las alteraciones del primer y segundo cebadores deben ser en nucleótidos no complementarios de la unidad repetitiva. Así, en un aspecto, cuando tanto el primer como segundo cebadores comprenden residuos alterados, las alteraciones están en posiciones de nucleótidos adyacentes a la unidad repetitiva. En otro aspecto, las alteraciones están situadas en posiciones de nucleótidos no adyacentes a la unidad repetitiva. En general, los emparejamientos erróneos en posiciones de nucleótidos adyacentes proporcionan el mayor número de emparejamiento de bases o residuos complementarios entre el nucleótido alterado y el nucleótido 3' terminal, que puede ser importante para amplificar eficazmente secuencias repetitivas cortas (es decir, 3-6 pares de bases).

La complementariedad de los cebadores con el ácido nucleico diana no necesita ser perfecta. Así, por "complementario" o "sustancialmente complementario" se quiere decir en la presente memoria que las sondas son lo suficientemente complementarias a las secuencias diana como para hibridar en condiciones normales de reacción. Las desviaciones de la complementariedad perfecta son permisibles siempre que las desviaciones no sean suficientes para evitar completamente la hibridación. Sin embargo, si el número de alteraciones o mutaciones es suficiente de manera que no puede ocurrir la hibridación en las condiciones menos astringentes de hibridación, como se define más adelante, la secuencia no es una secuencia diana complementaria.

Aunque los cebadores son generalmente monocatenarios, los ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifique, o contener partes de secuencia tanto bicatenaria como monocatenaria. El ácido nucleico puede ser ADN, ARN o híbrido, en el que el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, inosina, etc. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "nucleósido" incluye nucleótidos así como análogos de nucleósidos y nucleótidos y nucleósidos modificados tales como nucleósidos modificados con amino. Además, "nucleósido" incluye estructuras análogas no naturales. Así, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico, conteniendo cada una una base, se refieren en la presente memoria como un nucleótido,

El tamaño del ácido nucleico cebador puede variar, como apreciarán los expertos en la técnica, en general variando de 5 a 500 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, pueden usarse cebadores de entre 10 y 100 nucleótidos, entre 12 y 75 nucleótidos y de 15 a 50 nucleótidos pueden usarse, dependiendo del uso, especificidad requerida y la técnica de amplificación.

Para cualquier pareja de cebadores, la capacidad de los cebadores de hibridar entre sí puede examinarse alineando la secuencia del primer cebador con el segundo cebador. La estabilidad de los híbridos, especialmente la temperatura de fusión térmica (T_m), puede determinarse por los métodos descritos más adelante y por métodos muy conocidos en la técnica. Éstos incluyen, pero no están limitados a, cálculos termodinámicos del vecino más próximo (Breslauer, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8893-97 (1986); Wetmur, J.G., Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227-59 (1991); Rychlik, W. et al., J. NIH Res. 6: 78 (1994)), estimaciones con la Regla de Wallace (Suggs, S.V. et al., "Use of Synthetic oligodeoxiribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences", "Developmental biology using purified genes, D.B. Brown, ed., p 683-693, Academic Press, Nueva York (1981) y estimaciones de la T_m basadas en Bolton y McCarthy (véase Baldino, F.J. et al., Methods Enzymol. 168: 761-77 (1989); Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Capítulo 10, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001)). El efecto de varios parámetros, incluyendo, pero no limitado a, fuerza iónica, longitud de la sonda, contenido G/C y emparejamientos erróneos se tienen en consideración cuando se evalúa la estabilidad de los híbridos. La consideración de estos factores es muy conocida para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J., supra).

Los cebadores que pueden usarse en los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para amplificar varios ácidos nucleicos diana. Puede usarse un único conjunto de cebadores, por ejemplo una pareja de cebadores, para amplificar un único ácido nucleico diana. En otra realización, pueden usarse múltiples conjuntos de cebadores para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos diana. Las amplificaciones pueden realizarse separadamente para cada único conjunto de cebadores o en un único recipiente de reacción usando combinaciones de conjuntos de cebadores, conocido generalmente en la técnica como multiplexado. Cuando se usan múltiples conjuntos de cebadores en una única reacción, los cebadores se diseñan para limitar la formación de productos no deseables y limitar la interferencia entre los cebadores de cada conjunto de cebadores.

Las reacciones generales de amplificación por PCR pueden realizarse según procedimientos muy conocidos en la técnica, como se ha discutido anteriormente (véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 4.683.195 y 4.683.202). El tiempo y temperatura de la etapa de extensión de cebador dependerá de la polimerasa, la longitud del ácido nucleico diana que se está amplificando y la secuencia del cebador empleada para la amplificación. El número de etapas reiterativas requerido para amplificar suficientemente el ácido nucleico diana dependerá de la eficacia de la amplificación para cada ciclo y el número de copias de partida del ácido nucleico diana. Como es muy conocido en la técnica, estos parámetros pueden ajustarse por el experto en la técnica para efectuar un nivel deseado de amplificación. Los expertos en la técnica entenderán que la presente invención no está limitada por variaciones en los tiempos, temperaturas, condiciones de tampón y los ciclos de amplificación aplicados en el proceso de amplificación.

En la hibridación de los cebadores a los ácidos nucleicos diana y en las reacciones de amplificación descritas, los ensayos se hacen generalmente en condiciones astringentes que permiten la formación de los híbridos en presencia de ácido nucleico diana. Los expertos en la técnica pueden alterar los parámetros de temperatura, concentración de sales, pH, disolvente orgánico, agentes caotrópicos u otras variables para controlar la astringencia de la hibridación y también para minimizar la hibridación de los cebadores a dianas no específicas (es decir, por el uso de PCR de "inicio en caliente" o PCR "touchdown").

4. Marcadores de detección

Para ayudar en la determinación del número de copias de los ácidos nucleicos diana usando las composiciones y métodos descritos, pueden incorporarse directamente en los ácidos nucleicos diana amplificados marcadores de detección o pueden acoplarse a moléculas de detección. Tal y como se usa en la presente memoria, un marcador de detección es cualquier molécula que puede asociarse con un ácido nucleico amplificado, directamente o indirectamente, y que resulta en una señal mensurable, detectable, bien directamente o indirectamente. En los métodos descritos en la presente memoria, puede usarse un único marcador de detección. Por un "único marcador de detección" se quiere decir un único tipo de marcador de detección. Por ejemplo, un único marcador de detección puede ser cualquier marcador de detección como se describe en la presente memoria, sin embargo sólo un tipo de marcador de detección puede usarse en cada sistema homogéneo. Por ejemplo, un único marcador de detección puede ser SYBR Green I (Invitrogen), isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5,6-carboximetil fluoresceína o rojo Texas pero no una combinación de todos éstos. Así, SYBR Green I (Invitrogen) isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5,6-carboximetil fluoresceína o rojo Texas son cada uno únicos marcadores de detección, por ejemplo, SYBR Green I (Invitrogen) es un único marcador de detección, isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un único marcador de detección, 5,6-carboximetil fluoresceína es un único marcador de detección y rojo Texas es un único marcador de detección.

Otro ejemplo se proporciona en los Ejemplos más adelante en el que SYBR Green es el "único marcador de detección" usado para determinar el número de copias de dos dianas diferentes. Además, un único marcador de detección también puede referirse como un único marcador de detección monocromático. Un "único marcador de detección monocromático" es un único marcador de detección que sólo tiene un color. Por ejemplo, un único marcador de detección monocromático puede ser un marcador de detección que emite un único color que puede detectarse.

Los expertos en la técnica conocen muchos de dichos marcadores para incorporación en ácidos nucleicos o acoplamiento a sondas de ácido nucleico. Los ejemplos de marcadores de detección adecuados para uso en los métodos descritos son isótopos radiactivos, moléculas fosforescentes, enzimas, anticuerpos y ligandos así como moléculas fluorescentes incluyendo colorantes fluorescentes y marcadores fluorescentes. Los marcadores fluorescentes son útiles para la detección en tiempo real de la amplificación.

Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria pueden usar colorantes fluorescentes que se unen preferentemente a productos de amplificación de ácido nucleico bicatenario durante la reacción de PCR, proporcionando de esta manera la monitorización continua de la síntesis de los productos (véase Higuchi, R. et al., *Biotechnology* 11: 1026-1030 (1993); Morrison, T.B. et al., *Biotechniques* 24: 954-962 (1998)).

Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no están limitados a, SYBR Green I (Invitrogen), isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo (NBD), cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, amino-metil cumarina (AMCA), Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina, xantenos, acridinas, oxazinas, ficoeritrina, quelatos macrocíclicos de iones lantánido tales como colorante quantum TM, colorantes de transferencia de energía fluorescente, tales como heterodímero tiazol naranja-etidio, y los colorantes cianina Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7. Los ejemplos de otros marcadores fluorescentes específicos incluyen 3-Hidroxipireno, ácido 5,8,10-Tri-Sulfónico, 5-Hidroxi Triptamina (5-HT), Ácido Fucsina, Alizarina Complexon, Alizarina Rojo, Aloficocianina, Aminocumarina, Estearato de Antroilo, Astrazon Rojo Brillante 4G, Astrazon Naranja R, Astrazon Rojo 6B, Astrazon Amarillo 7 GLL, Atabrina, Auramina, Aurofosfina, Aurofosfina G, BAO 9 (Bisaminofeniloxadiazol), BCECF, Sulfato de Berberina, Bisbenzamida, Disolución de Blancofor FFG, Blancofor SV, Bodipy F1, Sulfoflavina Brillante FF, Calcien Azul, Calcio Verde, Disolución de Calcoflúor RW, Calcoflúor Blanco, Disolución de Calcofor Blanco ABT, Disolución de Calcoflúor Blanco Estándar, Carboestirilo, Cascade Amarillo, Catecolamina, Quinacrina, Corifosfina O, Cumarina-Faloidina, CY3.1 8, CY5.1 8, CY7, Dans (Ácido 1-Dimetil Amino Naftalina 5 Sulfónico), Dansa (Ácido Diamino Naftil Sulfónico), Dansil NH-CH₃, Diamino Fenil Oxidiazol (DAO), ácido Dimetilamino-5-sulfónico, Difluoruro de Dipirrometenoboro, Difetil Flavina Brillante 7GFF, Dopamina, Eritrosina ITC, Eucrisina, FIF (Fluorescencia Inducida por Formaldehído), Flazo Naranja, Fluo 3, Fluorescamina, Fura-2, Genacril Rojo Brillante B, Genacril Amarillo Brillante 10GF, Genacril Rosa 3G, Genacril Amarillo 5GF, Ácido Gloxálico, Granular Azul, Hematoporfirina, Indo-1, IntraWhite Cf Líquido, Leucofor PAF, Leucofor SF, Leucofor WS, Lisamina Rodamina B200 (RD200), Lucifer Amarillo CH, Lucifer Amarillo VS, Magdala Rojo, Magdala Azul, Maxilon Brillante Flavina 10 GFF, Maxilon Brillante Flavina 8 GFF, MPS (Metil Pironina Estilbeno Verde), Mitramicina, NBD Amina, Nitrobenzoxadidol, Noradrenalina, Rojo Rápido Nuclear, Amarillo Nuclear, Flavina Nylosan Brillante E&G, Oxadiazol, Azul Pacífico, Pararosanolina (Feulgen), Disolución Phorwhite AR, Phorwhite BKL, Phorwhite Rev, Phorwhite RPA, Fosfina 3R, Ftalocianina, Ficoeritrina R, Poliazaindaceno Pontocromo Negro Azul, Porfirina, Primulina, Proción Amarillo, Pironina, Pironina B, Flavina Pirozal Brillante 7GF, Mostaza de Quinacrina, Rodamina 123, Rodamina 5 GLD, Rodamina 6G, Rodamina B, Rodamina B 200, Rodamina B Extra, Rodamina BB, Rodamina BG, Rodamina WT, Serotonina, Rojo Sevron Brillante 2B, Rojo Brillante Sevron 4G, Rojo Brillante Sevron B, Naranja Sevron, Amarillo Sevron L, SITS (Primulina), SITS (ácido estilbeno isotiosulfónico), Estilbeno, Snarf 1, sulfo Rodamina B Can C, Sulfo Rodamina G Extra, Tetraciclina, Rojo Tiazina R, Tioflavina S, Tioflavina TCN, Tioflavina 5, Tiolita, Tiozol Naranja, Tinopol CBS, Azul True, Ultralita, Uranina B, Uvitex SFC, Naranja Xileno y XRITC. Los marcadores fluorescentes pueden obtenerse de una variedad de fuentes comerciales, incluyendo Invitrogen, Carlsbad, CA; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Molecular Probes, Eugene, OR; y Research Organics, Cleveland, Ohio.

5. Instrumentos

La instrumentación adecuada para uso con los métodos y composiciones descritos incluyen pero no están limitados a ABI Prism 7700, Applied Biosystems Division, Perkin Elmer, Foster City, Calif., EEUU; LightCycler™, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Ind., EEUU.

Pueden usarse varios algoritmos para calcular el número de copias de los ácidos nucleicos diana en las muestras como se describe en la presente memoria (véase ABI Prism 7700 Software Versión 1.7; Lightcycler™ Software Versión 3). La determinación del número de copias puede implicar el uso de muestras estándar con un número de copias conocido del ácido nucleico diana y la generación de curvas estándar a partir de los logaritmos de los estándares y el ciclo de umbral (Ct). En general, Ct es el ciclo de PCR o ciclo de PCR fraccionado en el que la fluorescencia generada por el producto de amplificación es varias desviaciones más alta que la fluorescencia de la línea base (Higuchi, R. et al., *supra*). MMQPCR proporciona una linealidad de aproximadamente 7 a 8 órdenes de magnitud, lo que permite una medida del número de copias de los ácidos nucleicos diana sobre un amplio intervalo dinámico. El número absoluto de copias del ácido nucleico diana puede derivarse comparando los valores Ct de la curva estándar y las muestras.

El número de copias de los ácidos nucleicos diana también puede determinarse por MMQPCR comparativa. El uso de ácidos nucleicos con un número de copias conocido o número de copias consistente permite la cuantificación del número de copias de los ácidos nucleicos diana en una muestra. El estándar puede ser un gen de copia única, un ácido nucleico con un número de copias conocido o cuando se cuantifica el número de copias de ADN, un gen de mantenimiento expresado constitutivamente (véase Johnson, M.R. *Anal. Biochem.* 278: 175-184 (2000); Boulay, J.-L. et al., *Biotechniques* 27: 228-232 (1999)).

Métodos

En la presente memoria se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprende: a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad de marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

Una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica para amplificar (es decir, incrementar el número de copias de) una o más copias de una secuencia de ácido nucleico diana. La amplificación puede ser de varios órdenes de magnitud, generando miles a billones de copias de una secuencia de ADN particular. La reacción en cadena de la polimerasa se basa en el ciclado térmico, que consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento repetidos de la reacción para conseguir la fusión del ADN y la replicación enzimática del ácido nucleico. Al progresar la PCR, el ADN generado se usa él mismo como un molde para la replicación, poniendo en marcha una reacción en cadena en la que el molde de ADN se amplifica exponencialmente.

La PCR consiste habitualmente en una serie de cambios repetidos de temperatura denominados ciclos; cada ciclo consiste típicamente en 2-3 etapas discretas de temperatura. La PCR puede realizarse con ciclos que tienen tres a cuatro etapas, cada una a una temperatura diferente. El ciclado está frecuentemente precedido de una única etapa con temperatura alta ($>90^{\circ}\text{C}$) denominada una retención, que se aplica con el fin de fundir completamente (es decir, volverlo monocatenario) una secuencia de ácido nucleico bicatenario, seguido de un conjunto repetido de cambios en la temperatura durante los cuales ocurre la amplificación del ácido nucleico diana, seguido de una retención final al final para la extensión del producto final o almacenamiento breve. Las temperaturas usadas y la duración de tiempo que se aplican en cada ciclo dependen de una variedad de parámetros. Estos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN (por ejemplo, la ADN polimerasa), la concentración de iones divalentes y dNTP en la reacción, la temperatura de fusión de los cebadores y las temperaturas de fusión de los productos de la amplificación.

La PCR incluye al menos una etapa de desnaturalización, una etapa de hibridación y una etapa de elongación. La etapa de elongación también puede referirse como una etapa de extensión. En la PCR, las etapas de desnaturalización, hibridación y elongación ocurren, en orden, al menos una vez (también conocido como un único "ciclo"), pero se repiten típicamente durante hasta 40 ciclos. Cuando la ADN polimerasa usada requiere activación por calor, una etapa adicional, denominada la etapa de inicialización, precede a la etapa de ciclado de la PCR. Cada etapa tiene una temperatura respectiva asociada a ella. La temperatura asociada con cada etapa se refiere como una temperatura de inicialización, una temperatura de desnaturalización, una temperatura de hibridación y una temperatura de extensión o elongación, respectivamente.

Una etapa de inicialización consiste en calentar la reacción hasta una temperatura de inicialización de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 ó 98°C , que se puede mantener durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 minutos. La etapa de inicialización sólo se requiere típicamente cuando las ADN polimerasas que se están usando en la PCR requieren activación por calor. Por ejemplo, si se está usando una polimerasa termoestable, puede usarse una etapa de inicialización con una temperatura de inicialización de 98°C .

Una etapa de desnaturalización es típicamente la primera etapa en el ciclo repetido de la PCR y consiste en el calentamiento de la reacción hasta etapa de desnaturalización de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 ó 98°C durante 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 ó 35 segundos. La etapa de desnaturalización funde el molde de ADN por la disrupción de los enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias, rindiendo cadenas únicas de ADN.

Una etapa de hibridación es típicamente la segunda etapa en el ciclo repetido de la PCR y consiste en la disminución de la temperatura hasta una temperatura de hibridación de 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70°C durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 ó 45 segundos lo que permite la hibridación de los cebadores en un conjunto de cebadores hibriden con un ácido nucleico diana. La temperatura de hibridación puede ser aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10°C por debajo de la T_m de los cebadores usados. Se forman enlaces de hidrógeno ADN-ADN estables cuando la secuencia del cebador concuerda mucho con la secuencia del molde. La polimerasa se une al híbrido cebador-molde y empieza la síntesis de ADN.

La etapa de extensión/elongación es la etapa en la que la polimerasa de ácido nucleico sintetiza una nueva cadena de ácido nucleico complementaria a la cadena de ácido nucleico diana añadiendo dNTP que son complementarios al ácido nucleico diana en la dirección 5' a 3', condensando el grupo fosfato 5' del dNTP con el grupo hidroxilo 3' al final de la cadena de ácido nucleico diana que se está formando (extendiendo). El tiempo de extensión depende de la polimerasa de ácido nucleico usada y de la longitud del ácido nucleico diana que se va a amplificar. Como regla general, a su temperatura óptima, la polimerasa de ácido nucleico polimerizará mil bases por minuto. En condiciones óptimas, es decir, si no hay limitaciones debido a sustratos o reactivos limitantes, en cada etapa de extensión, la cantidad de ácido nucleico diana se duplica, lo que da lugar a la amplificación exponencial (geométrica) del ácido nucleico diana específico. La temperatura de elongación en esta etapa depende de la polimerasa de ácido nucleico usada. Por ejemplo; la Taq polimerasa tiene su temperatura de actividad óptima a 75-80°C, y comúnmente se usa una temperatura de 72°C con esta enzima.

La PCR también puede comprender una etapa de elongación final. La elongación final puede realizarse a una temperatura de elongación final de 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 ó 75°C durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 minutos después del último ciclo de PCR para asegurar que cualquier ADN monocatenario remanente se copia completamente para hacer un producto de ADN bicatenario.

La PCR también puede comprender una etapa de adquisición de la señal en la que puede determinarse la cantidad de un marcador de detección. La etapa de adquisición de la señal puede realizarse durante la amplificación de la secuencia diana. En algunos aspectos la etapa de adquisición de la señal sigue a una etapa de desnaturalización, una etapa de hibridación y una etapa de elongación. La etapa de adquisición de la señal se realiza a una temperatura de adquisición de la señal. La temperatura de adquisición de la señal puede ser cualquier temperatura y puede realizarse a uno o más tiempos durante la PCR. Cuando se está determinando el número de copias de dos o más ácidos nucleicos diana como se describe en la presente memoria, la temperatura de adquisición de la señal debe ser diferente para la detección del marcador de detección de cada amplicón. Por ejemplo, las temperaturas para las dos o más temperaturas de adquisición de la señal debe seleccionarse de manera que la primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de la T_m del primer amplicón y la segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de la T_m del segundo amplicón. La diferencia entre las dos o más temperaturas de adquisición de la señal puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10°C. Una Etapa de Adquisición de la Señal puede realizarse durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 segundos a la temperatura de adquisición.

La PCR también puede comprender una etapa final de retención. La etapa final de retención puede ser a una temperatura final de retención de: Esta etapa a 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15°C durante un tiempo indefinido. La etapa final de retención puede emplearse para un almacenamiento a corto plazo de la reacción.

La reacción en cadena de la polimerasa también puede comprender etapas consecutivas de ciclos. Cada etapa consecutiva de ciclos puede comprender una o más de las etapas de PCR descritas anteriormente. Cada etapa consecutiva de ciclos también puede referirse como un "ciclo" de la PCR. Cada etapa consecutiva de ciclos puede realizarse a las mismas o diferentes temperaturas para cada ciclo de la PCR. Puede correrse una PCR en la que la temperatura de hibridación se cambia durante uno o más de los ciclos de PCR. Por ejemplo, la PCR puede correrse durante un total de 40 ciclos, en el que la temperatura de hibridación es la misma para una primera etapa de ciclos, después la temperatura de hibridación se eleva durante una segunda etapa de ciclos y la temperatura de hibridación se disminuye para la tercera etapa de ciclos.

Un "sistema homogéneo" es un sistema en el que la amplificación y detección de un ácido nucleico diana tiene lugar en la misma reacción. Un sistema homogéneo es uno que genera una señal detectable durante la amplificación de una secuencia diana. Por "durante la amplificación" se quiere decir después de un ciclo de PCR, pero antes de un ciclo siguiente de PCR. "Durante la amplificación" también quiere decir durante la PCR, pero antes de una etapa final de retención.

El número relativo de copias puede realizarse por los métodos descritos en otro lugar de la presente memoria. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para medir las cantidades de secuencias repetidas de telómero (T) en muestras de ADN experimentales en un conjunto de pocillos de reacción y la cantidad de genes de copia única (S) en pocillos separados, en comparación con un ADN de referencia, rindiendo proporciones T/S relativas que son proporcionales a la longitud promedio del telómero. En un aspecto, las señales T pueden recogerse en ciclos tempranos, antes de que las señales S suban por encima de la línea base y las señales S pueden recogerse a una temperatura que funde completamente el producto de telómero, enviando su señal respecto a la línea base. La correlación de las proporciones T/S también puede correlacionarse con las longitudes de Fragmento de Restricción Final (TRF) medidas por transferencia Southern para determinar los números de copias.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, en el que el número de copias de la primera secuencia de ácido nucleico diana es mayor que el número de copias de la segunda secuencia de ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para

formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; e) repetir las etapas (b) a (d) hasta que se determina el marcador de detección a dicha segunda temperatura de adquisición de la señal; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m , en el que la cantidad del marcador de detección se detecta a dicha primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal durante cada una de dichas etapas de amplificación; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m , en el que la diferencia entre la primera T_m y la segunda T_m es al menos 4 grados Celsius; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, en el que al menos uno de los cebadores en el segundo conjunto de cebadores comprende un anclaje GC en el extremo 5' del cebador; b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con

5 el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y
amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de
cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que
dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de
detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal
está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda
temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador del detección, en el que dicha segunda
temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; e)
10 repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho
segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido
nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico
diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de
cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo,
15 en el que al menos uno de los cebadores en dicho primer conjunto de cebadores comprende una secuencia 5' que
incluye los nucleótidos A y T; b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana
con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión
(T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo
conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m
20 es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del
marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de
adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción
hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el
que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de
25 dicha segunda T_m ; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de
dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido
nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico
diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de
30 cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo,
en el que los extremos 3' de los cebadores del primer conjunto de cebadores son complementarios entre sí y en el
que un cebador del primer conjunto de cebadores es cebador con emparejamiento erróneo que comprende al menos
un nucleótido con emparejamiento erróneo adyacente al extremo 3' del cebador, en el que dicho nucleótido no es
complementario al ácido nucleico diana pero es complementario al nucleótido 3' terminal del otro cebador en el
35 primer conjunto de cebadores; b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico
diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de
fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo
conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m
es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del
40 marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de
adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción
hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el
que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de
dicha segunda T_m ; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de
45 dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido
nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico
diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de
cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo,
50 en el que uno de los cebadores del primer conjunto de cebadores está bloqueado para cebar el primer ácido
nucleico diana; b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer
conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y
amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de
cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que
55 dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de
detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal
está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda
temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda
temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; e)
60 repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho
segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido
nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico

diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, en el que el marcador de detección es un colorante intercalante; b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que
 5 tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la
 10 temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En algunos aspectos de los métodos descritos en la presente memoria, el número de copias del primer y del
 15 segundo ácidos nucleicos diana mide la cantidad relativa del primer ácido nucleico comparada con el segundo ácido nucleico.

En algunos aspectos, las secuencias diana y de referencia pueden cuantificarse exactamente en una QPCR multiplex usando SYBR Green I como el único colorante fluorescente y los equipos de QPCR equipados sólo para la
 20 detección de un único color, por una estrategia que evita que la amplificación del molde de amplificación temprano interfiera con la amplificación del molde de amplificación tardío. En algunos aspectos, para cuantificar dos moldes en un conjunto de muestras de ADN por MMQPCR, deben cumplirse dos requerimientos. En primer lugar, deben encontrarse condiciones de PCR de manera que, para cada muestra de ADN en el conjunto, cuando se alcanza el umbral del ciclo para el producto de amplificación temprano, la señal de la amplificación del producto de
 25 amplificación tardío todavía esté en la línea base. En segundo lugar, el producto de amplificación tardío debe tener una temperatura de fusión mayor que el producto de amplificación temprano, de manera que la fluorescencia del producto de amplificación tardío pueda monitorizarse a una temperatura lo suficientemente baja como para mantenerlo bicatenario, pero lo suficientemente alta como para fundir completamente el producto de amplificación temprano, enviando su señal de fluorescencia a la línea base. Mediante el diseño de cebadores para mantener
 30 ambos productos de PCR pequeños y la adición de etiquetas 5' ricas en GC tales como anclajes GC a los cebadores para el producto de amplificación tardío, se puede asegurar que el producto de amplificación tardío tendrá la temperatura de fusión más alta.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para cuantificar los niveles de dos moldes diferentes en una muestra biológica, en el que cada molde varía en el número de copias, y aún así no hay superposición en los
 35 intervalos del número de copias del primer y segundo moldes. Por ejemplo, las células tienen muchas más copias de repeticiones teloméricas que las copias de genes nucleares de copia única; la misma situación se encuentra para copias de mtADN frente a genes de copia única, copias de ADN_r frente a genes de copia única, copias de Alu ADN frente a genes de copia única, etc. De manera similar, en los estudios de QPCR multiplex con transcriptasa inversa (RT-QPCR) de los niveles de ARNm, el objetivo es frecuentemente cuantificar los niveles de dos especies diferentes de ARNm, variando cada una en el número de copias pero con intervalos no superpuestos del número de copias.
 40 Para cada una de estas parejas de moldes, el C_t para el molde más abundante puede recogerse cuando la señal de amplificación del molde menos abundante está en la línea base; y el C_t para el molde menos abundante puede recogerse a una temperatura alta que deja su producto rico en GC bicatenario, mientras funde completamente y elimina la señal del producto del molde abundante. Mediante la recolección de señales fluorescentes a dos temperaturas diferentes a lo largo del ciclo de PCR, y analizando estas señales separadamente, se puede
 45 cuantificar cada uno de los dos moldes independientemente con un único marcador de detección monocromático,

Hasta la fecha, se ha considerado imposible determinar los números de copias relativos de dos secuencias de ADN diferentes en una reacción en cadena de la polimerasa multiplex cuantitativa usando un único colorante intercalante del ADN, porque la señal fluorescente acumulativa surge de ambos amplicones. Los métodos descritos en la
 50 presente memoria presentan una estrategia que permite recoger separadamente las señales de los dos amplicones. Los umbrales de ciclo (C_t s) para el primer amplicón se recogen en ciclos tempranos, cuando la señal del segundo amplicón está todavía en la línea base. Los C_t s del segundo amplicón se recogen a una temperatura muy por encima de la temperatura de fusión (T_m) del primer amplicón, volviendo el primer amplicón monocatenario y enviando su señal a la línea base. Los cebadores se diseñan para hacer ambos amplicones pequeños, y el segundo amplicón rico en GC, elevando su T_m . Las parejas de moldes que ocurren en las muestras biológicas como especies
 55 muy y poco abundantes sin superposición en los intervalos de número de copias son dianas naturales para esta estrategia. Incluso dos moldes con un número de copias similar puede distinguirse aplicando diseños de cebador y ciclo térmico que retrasan la amplificación de un amplicón. Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para determinar las longitudes teloméricas relativas en muestras de ADN humanas.

Métodos para número de copias similar

60 En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, en el que el número de copias de la primera secuencia de ácido

nucleico diana es similar al número de copias de la segunda secuencia de ácido nucleico diana que comprenden: a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo; b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m ; d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

Cuando el número de copias de la primera secuencia de ácido nucleico diana es similar al número de copias de la segunda secuencia de ácido nucleico diana, los ciclos de la PCR o las etapas individuales de la PCR pueden alterarse o cambiarse. Por ejemplo, cuando el número de copias de la primera secuencia de ácido nucleico diana es similar al número de copias de la segunda secuencia de ácido nucleico diana la reacción en cadena de la polimerasa de este método puede comprender además al menos tres etapas consecutivas, en el que la primera etapa de la reacción en cadena de la polimerasa comprende un ciclo de reacción en cadena de la polimerasa en el que la temperatura de hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa es mayor que la temperatura de hibridación de la segunda etapa, en el que la segunda etapa de la reacción en cadena de la polimerasa comprende un ciclo de reacción en cadena de la polimerasa en el que la temperatura de hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa es menor que la temperatura de hibridación de la primera etapa y en el que la tercera etapa de la reacción en cadena de la polimerasa comprende una reacción en cadena de la polimerasa en la que la temperatura de hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa es menor que la temperatura de hibridación de la primera etapa y mayor que la temperatura de hibridación de la segunda etapa.

En algunos aspectos, cuando se emplean etapas consecutivas de la reacción en cadena de la polimerasa, sólo se forma el segundo amplicón durante la primera etapa de la reacción en cadena de la polimerasa. En algunos aspectos, cuando se emplean etapas consecutivas de la reacción en cadena de la polimerasa sólo se forma el primer amplicón durante la segunda etapa de la reacción en cadena de la polimerasa. En algunos aspectos, cuando se emplean etapas consecutivas de la reacción en cadena de la polimerasa se forman tanto el primer como segundo amplicones durante la tercera etapa de la reacción en cadena de la polimerasa. En algunos aspectos, cuando se emplean etapas consecutivas de la reacción en cadena de la polimerasa sólo se forma el segundo amplicón durante la primera etapa de la reacción en cadena de la polimerasa y sólo se forma el primer amplicón durante la segunda etapa de la reacción en cadena de la polimerasa y tanto el primer como segundo amplicones se forman durante la tercera etapa de la reacción en cadena de la polimerasa.

La composición de los cebadores y las diferentes temperaturas de la PCR también pueden alterarse dependiendo de la diana y la T_m de los cebadores, amplicones y polimerasas que se están usando o generando.

En algunos aspectos, para cuantificar dos moldes con abundancia similar por MMQPCR, la amplificación de uno de los moldes se retrasa varios ciclos. Por ejemplo, se puede diseñar una pareja de cebadores para hibridar a 68°C y la otra pareja a 50°C . Después de la activación inicial de 15 minutos de la ADN polimerasa de inicio caliente y la desnaturalización de la muestra de ADN genómico, el ciclado entre 94°C y 68°C durante al menos cuatro ciclos proporcionará un comienzo principal de 4 ciclos (o más) en la amplificación para el primer molde, dejando el segundo molde sin cebar. A continuación, el ciclado entre 94°C y 50°C durante dos ciclos continuará amplificando el primer molde, pero también inicia la amplificación del segundo molde. Obsérvese que los cebadores para el segundo molde pueden tener las etiquetas 5' ricas en GC, tal como anclajes GC, para conferir una temperatura de fusión alta en su producto de PCR. Como el ciclado entre 94°C y 50°C durante dos ciclos es suficiente para sintetizar secuencias complementarias a la longitud total de estos cebadores, sigue que una vez que estos dos ciclos se han completado, la temperatura de hibridación puede elevarse de nuevo, y los ciclos restantes en el programa pueden tener un perfil térmico similar al de la Etapa 3 en el protocolo siguiente (véase Materiales y Métodos), durante el cual la señal de fluorescencia se recoge a dos temperaturas diferentes en cada ciclo.

En otro aspecto, se proporciona una segunda estrategia para retrasar la amplificación de un mole varios ciclos para permitir que ambas parejas de cebadores inicien la formación del producto; después, aplicar cuatro o más ciclos con una temperatura de desnaturalización lo suficientemente alta como para fundir el amplicón con baja fusión pero no lo suficientemente alta como para fundir el amplicón con alta fusión; y finalmente cambiar a un perfil térmico similar al de la Etapa 3 (véase Materiales y Métodos) para los ciclos restantes. La etapa de ciclado con una temperatura de desnaturalización disminuida puede aún permitir una amplificación lineal a partir del molde original cuya amplificación se pretende retrasar. Una solución a este problema es usar ambas parejas de cebadores con una temperatura de hibridación inicial relativamente baja, por ejemplo 50°C pero temperaturas de hibridación posteriores más altas para los amplicones de PCR conferidas por etiquetas 5', tal como anclajes GC. Mediante el ciclado entre 94°C y 50°C durante dos ciclos, suficiente para generar los productos de PCR iniciales, después de lo cual la

temperatura de hibridación se elevará lo suficiente como para evitar cualquier cebado adicional de los moldes de ADN originales.

En un aspecto, el primer ácido nucleico diana está en un primer ácido nucleico y dicho segundo ácido nucleico diana está en un segundo ácido nucleico. En este aspecto, el número de copias del primer y segundo ácido nucleico diana mide la cantidad relativa de dicho primer ácido nucleico comparado con dicho segundo ácido nucleico. En otro aspecto, el primer ácido nucleico diana está en un primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico diana está en un segundo ácido nucleico. El número de copias del primer ácido nucleico diana mide repeticiones no en tándem del primer ácido nucleico diana en el primer ácido nucleico en el que las repeticiones no en tándem se amplifican independientemente por dicha primera pareja de cebadores.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana comparado con el número de copias de un segundo ácido nucleico diana por PCR multiplex cuantitativa. El primer ácido nucleico diana comprende repeticiones en tándem y el número de copias de dicha primera secuencia de ácido nucleico diana es mayor que el número de copias de dicha segunda secuencia de ácido nucleico diana. El método comprende: (1) poner en contacto una muestra que comprende el primer ácido nucleico diana y el segundo ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores, un segundo conjunto de cebadores y un colorante intercalante, en el que el primer conjunto de cebadores es capaz de amplificar por PCR el primer ácido nucleico diana para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m), en el que un primer cebador de la primera pareja de cebadores comprende un nucleótido con emparejamiento erróneo en otro que el extremo 3' que no se empareja por bases con un nucleótido en una primera cadena de dicho primer ácido nucleico diana cuando dicho cebador hibrida con dicha primera cadena y en el que el segundo cebador de dicha primera pareja de cebadores tienen un nucleótido 3' que no se empareja por bases con un nucleótido en la segunda cadena de dicho primer ácido nucleico pero que se empareja por bases con dicho nucleótido con emparejamiento erróneo en un transcrito de PCR de dicha primera cadena cuando dicho segundo cebador hibrida con dicho transcrito de PCR, mediante lo cual el primer amplicón producido por ciclos repetidos de PCR tiene un tamaño definido con dicha primera T_m y en el que dicho segundo conjunto de cebadores es capaz de amplificar dicho segundo ácido nucleico diana para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m ; (2) ciclar por PCR la muestra a través de un perfil de temperatura que incluye la primera y segunda temperaturas de adquisición de la señal para medir la intercalación del colorante en el primer y segundo amplicones, en el que la primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de la primera T_m y dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha T_m y por debajo de la segunda T_m ; (3) repetir la etapa de ciclado de la PCR; y (4) medir la señal de intercalación de la intercalación del colorante en la primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal durante al menos dos ciclos diferentes de PCR para determinar el número de copias relativo del primer y el segundo ácidos nucleicos diana.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana comparado con el número de copias de un segundo ácido nucleico diana por PCR multiplex cuantitativa, en el que el número de copias de la primera secuencia de ácido nucleico diana es similar al número de copias de la segunda secuencia de ácido nucleico diana. El método comprende: (1) poner en contacto una muestra que comprende el primer ácido nucleico diana y el segundo ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores, un segundo conjunto de cebadores y un colorante intercalante, en el que el primer conjunto de cebadores es capaz de amplificar el primer ácido nucleico diana para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y en el que el complejo de hibridación entre la primera pareja de cebadores y el primer ácido nucleico diana tiene una primera T_m del cebador y en el que el segundo conjunto de cebadores es capaz de amplificar el segundo ácido nucleico diana para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m y en el que el complejo de hibridación entre dicha segunda pareja de cebadores y dicho segundo ácido nucleico diana tiene una segunda T_m del cebador, en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m y en el que dicha primera T_m del cebador es mayor que dicha segunda T_m del cebador; (2) someter dicha muestra a un número predeterminado de ciclos de PCR en el que la primera temperatura de hibridación durante dichos ciclos predeterminados de PCR está por encima de de dicha segunda T_m del cebador para evitar la amplificación de dicho segundo ácido nucleico diana; (3) ciclado por PCR de dicha muestra a través de un perfil de temperatura en el que la temperatura de hibridación del cebador es o está por debajo de dicha segunda T_m del cebador mediante lo cual dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana se amplifican por PCR y en el que dicho perfil de temperatura incluye la primera y segunda temperaturas de adquisición de la señal para medir la intercalación de dicho colorante en dicho primer y segundo amplicones, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m y dicha segunda temperatura de adquisición de la señal esta por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; (4) repetir dicha etapa de ciclado de PCR; y (5) medir la señal de intercalación de la intercalación de dicho colorante a dicha primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal durante al menos dos ciclos diferentes de PCR, en el que el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana se determina a partir de dichas señales de intercalación y dicho número predeterminado de ciclos de PCR.

En la presente memoria también se describen métodos para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana comparado con el número de copias de un segundo ácido nucleico diana por PCR multiplex cuantitativa, en el que el número de copias de la primera secuencia de ácido nucleico diana es similar al número de copias de dicha segunda secuencia de ácido nucleico diana. El método comprende: (1) poner en contacto una

muestra que comprende dicho primer ácido nucleico diana y dicho segundo ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores, un segundo conjunto de cebadores y un colorante intercalante, en el que dicho primer conjunto de cebadores es capaz de amplificar dicha primera secuencia de ácido nucleico diana para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y en el que el complejo de hibridación entre dicha primera pareja de cebadores y dicho primer ácido nucleico diana tiene una primera T_m del cebador y dicho segundo conjunto de cebadores es capaz de amplificar dicho segundo ácido nucleico diana para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m y en el que el complejo de hibridación entre dicha segunda pareja de cebadores y dicho segundo ácido nucleico diana tiene una segunda T_m del cebador, en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m y en el que dicha primera T_m del cebador es mayor que dicha segunda T_m del cebador; (2) someter dicha muestra a un primer número predeterminado de ciclos de PCR en el que la temperatura de hibridación del cebador durante dichos ciclos predeterminados de PCR es o está por debajo de dicha primera T_m de cebador para amplificar dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana; (3) someter dicha muestra a un segundo número predeterminado de ciclos de PCR en el que la temperatura de desnaturalización está por debajo de dicha segunda T_m para evitar la amplificación adicional de dicho segundo ácido nucleico diana; (4) ciclado por PCR de dicha muestra a través de un perfil de temperatura en el que la temperatura de hibridación del cebador es o está por debajo de dicha segunda T_m del cebador mediante lo cual dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana se amplifican por PCR y en el que dicho perfil de temperatura incluye la primera y segunda temperaturas de adquisición de la señal para medir la intercalación de dicho colorante en dicho primer y segundo amplicones, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m y dicha segunda temperatura de adquisición de la señal esta por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m ; (5) repetir dicha etapa de ciclado de PCR; y (6) medir la señal de intercalación de la intercalación de dicho colorante a dicha primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal durante al menos dos ciclos diferentes de PCR, en el que el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana se determina a partir de dichas señales de intercalación y dicho segundo número predeterminado de ciclos de PCR.

En algunos aspectos de los métodos descritos en la presente memoria, puede usarse una segunda muestra como una referencia para medir el número de copias. Los métodos comprenden además al menos una muestra de referencia que comprende un ácido nucleico de referencia que comprende números de copias conocidos de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana, dicha primera y dicha segunda pareja de cebadores y dicho colorante intercalante; en el que dicha segunda muestra se somete a las mismas condiciones de PCR que dicha primera muestra y en el que las señales de intercalación a dicha primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal para dicha segunda muestra se comparan con las señales de intercalación a dicha primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal en dicha primera muestra para proporcionar una indicación del número de copias absoluto de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.

En algunos aspectos los métodos comprenden: (1) poner en contacto una muestra que comprende dicho primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y dicho segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores, en el que dicho primer conjunto de cebadores es capaz de amplificar dicho primer ácido nucleico diana para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y dicho segundo conjunto de cebadores es capaz de amplificar dicho segundo ácido nucleico diana para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m , en el que dicha segunda T_m es lo suficientemente mayor que dicha primera T_m como para asegurar que dicho primer amplicón se funde completamente a una temperatura a la que dicho segundo amplicón todavía no ha empezado a fundirse; en presencia de cualquier único marcador de detección que fluoresce después de la intercalación en ADN bicatenario; (2) ciclado repetido por PCR de dicha muestra a través de un perfil de temperatura que incluye la primera y segunda temperaturas de adquisición de la señal para medir la intercalación de dicho colorante en dicho primer y segundo amplicones, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal es lo suficientemente baja respecto a dicha primera T_m como para que dicho primer amplicón no haya empezado todavía a fundirse y dicha segunda temperatura de adquisición de la señal es lo suficientemente alta respecto a dicha primera T_m como para que el primer amplicón está completamente fundido y lo suficientemente baja respecto a dicha segunda T_m como para que el segundo amplicón no haya empezado todavía a fundirse; y (3) medir la señal de intercalación de dicho colorante a dicha primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal durante al menos dos ciclos diferentes de PCR para determinar el número de copias relativo de dicho primer y segundo ácidos nucleicos diana, en un conjunto de condiciones que permita que dicha primera señal cruce el umbral de detección en un número de ciclo en el que dicha segunda señal todavía está en la línea base.

Kits

Los materiales descritos anteriormente así como otros materiales pueden envasarse conjuntamente en cualquier combinación adecuada como un kit útil para realizar o ayudar en la realización de, el método descrito. Es útil si los componentes del kit en un kit dado se diseñan y adaptan para uso conjunto en el método descrito. Por ejemplo, se describen kits para determinar el número de copias de uno o más ácidos nucleicos diana, comprendiendo el kit una o más composiciones de reactivos y uno o más componentes o reactivos para determinar el número de copias de uno o más ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, los kits pueden incluir una o más composiciones de reactivos y uno o más conjuntos de cebadores, un marcador de detección, una polimerasa de ácido nucleico o una combinación. Otra forma de kit puede comprender una pluralidad de composiciones de reactivo. Los kits también pueden contener, por ejemplo, nucleótidos, tampones, ligasa, sondas en círculo abierto, oligonucleótidos con huecos o una combinación.

5 Se describen kits que pueden usarse en dichos métodos. Los kits pueden incluir al menos primeras y segundas parejas de cebadores de PCR para amplificar el primero y segundo ácidos nucleicos diana. Dichos componentes pueden estar en un primer contenedor que está adaptado para usarse en una máquina de amplificación por PCR. En un aspecto, la muestra de ensayo se añade al contenedor y la amplificación por PCR se realiza según los métodos descritos. Los kits también pueden incluir uno o más, o todos, de los componentes para realizar la PCR incluyendo desoxinucleótidos trifosfato, ADN polimerasa termoestable y un marcador de detección.

10 En un aspecto, el kit puede comprender un segundo contenedor, también adaptado para uso en una máquina de PCR, que contiene una segunda muestra que comprende un ácido nucleico de referencia que comprende números de copias conocidos del primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana y opcionalmente los demás componentes necesarios para realizar PCR, incluyendo la primera y segunda parejas de cebadores y un colorante intercalante. Este segundo contenedor se somete a las mismas condiciones de PCR que la muestra del primer contenedor. El segundo contenedor proporciona señales de intercalación de referencia para números de copias conocidos del primer y segundo ácidos nucleicos diana facilitando de esta manera la determinación del número de copias absoluto del primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo. Pueden incluirse en el kit contenedores adicionales que contienen ácidos nucleicos de referencia que tienen diferentes números de copias del primer y segundo ácidos nucleicos diana. Dichos contenedores proporcionan señales de intercalación adicionales que proporcionan diferentes puntos de referencia en un intervalo de proporciones de números de copia absolutos. Dichos contenedores adicionales son particularmente útiles cuando el número de copias del primer y segundo ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo puede variar en un intervalo amplio.

20 También se describen kits que tienen un primer contenedor, adaptado para uso en una máquina de PCR, en el que dicho primer contenedor comprende un ácido nucleico de referencia que comprende números de copias conocidos del primer y segundo ácidos nucleicos diana. El kit puede comprender además al menos un contenedor adicional que comprende un segundo ácido nucleico de referencia que tiene un número de copias diferente del primer y segundo ácidos nucleicos diana comparado con el ácido nucleico de referencia de dicho primer contenedor. Los contenedores contienen opcionalmente un colorante intercalante y los demás componentes necesarios para PCR. Dichos kits son útiles en la estandarización de las señales de intercalación de una máquina de PCR para uno o más ácidos nucleicos de referencia diferentes.

Sistemas

30 Se describen sistemas útiles para realizar, o ayudar en la realización de, el método descrito. También se describen sistemas para producir composiciones de reactivos. Los sistemas comprenden generalmente combinaciones de artículos de fabricación tales como estructuras, máquinas, dispositivos y semejantes, y composiciones, compuestos, materiales y semejantes. Se contemplan dichas combinaciones que se describen o que son evidentes a partir de la descripción. Por ejemplo, se describen y contemplan los sistemas que comprenden soportes sólidos y composiciones de reactivos.

35 Estructuras de datos y control informático

Se describen estructuras de datos usadas en, generadas por, o generadas a partir de, el método descrito. Las estructuras de datos son generalmente cualquier forma de dato, información y/o objetos recogidos, organizados, almacenados y/o incluidos en una composición o medio. Una huella diana almacenada en forma electrónica, tal como en RAM o un disco de almacenamiento, es un tipo de estructura de datos.

40 El método descrito, o cualquier parte de éste o preparación a partir de éste, puede controlarse, gestionarse o asistirse de otra forma por control informático. Dicho control informático puede conseguirse por un proceso o método controlado informáticamente, puede usar y/o generar estructuras de datos, y puede usar un programa informático. Dicho control informático, procesos controlados informáticamente, estructuras de datos y programas informáticos se contemplan y debe entenderse que están descritos en la presente memoria.

45 Ejemplos

Ejemplo 1

Sujetos de investigación

50 Se extrajo ADN genómico directamente de muestras de sangre por procedimientos estándar y se almacenaron a largo plazo en TE⁴ (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) a 4⁰C a una concentración de aproximadamente 100 ng por microlitro. Se diluyeron las preparaciones madre de ADN en agua pura justo antes de comenzar los análisis de QPCR. Las muestras, de 95 individuos de Utah (47 mujeres y 48 hombres, intervalo de edad 5-94 años), son los analizados en nuestro artículo previo que describe la medida de la longitud de telómeros por PCR monoplex cuantitativa (Cawthon, R.M. (2002) Telomere measurement by singleplex quantitative PCR. Nucleic Acids Res. 30, e47).

55

PCR multiplex monocromática cuantitativa (MMQPCR)

Las reacciones de PCR se establecieron alicuotando 15 microlitros de mezcla madre en cada pocillo de reacción de una placa de 96 pocillos compatible con el Sistema de Detección de PCR en Tiempo Real de un Único Color Bio-Rad MyiQ, seguido de 10 microlitros de cada muestra experimental de ADN, que contiene aproximadamente 20 nanogramos de ADN diluidos en agua pura, para un volumen final de 25 microlitros por reacción. Se prepararon cinco concentraciones de una muestra de ADN de referencia (el "ADN Estándar") que abarcaban un intervalo de 81 veces de concentración de ADN por dilución seriada y se analizó en duplicado en cada placa de 96 pocillos en este estudio; estas reacciones proporcionaron datos para la generación de las curvas estándar usadas para la cuantificación relativa. Todas las muestras de ADN experimental se ensayaron en triplicado.

Las concentraciones finales de reactivos en la PCR fueron 0,75x SYBR Green I (Invitrogen), 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM cada dNTP, 1 mM DTT y 1 M betaína (U.S. Biochemicals). Cada reacción de 25 microlitros recibió 0,625 U ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Inc.). Para la QPCR multiplex, la pareja de cebadores de telómero telg y telc (concentraciones finales 900 nM cada uno) se combinaron con la pareja de cebadores de albúmina albu y albd (concentraciones finales 900 nM cada uno) o con la pareja de cebadores de beta-globina hbgu y hbgd (concentraciones finales 500 nM cada uno) en la mezcla madre. Todas las secuencias de los cebadores y la base para su diseño se presentan en la sección de Resultados.

El perfil de ciclado térmico fue Etapa 1: 15 min a 95^oC; Etapa 2: 2 ciclos de 15 s a 94^oC, 15 s a 49^oC; y Etapa 3: 32 ciclos de 15 s a 94^oC, 10 s a 62^oC, 15 s a 74^oC con adquisición de la señal, 10 s a 84^oC, 15 s a 88^oC con adquisición de la señal. Las lecturas a 74^oC proporcionaron los C_s para la amplificación del molde de telómero; las lecturas a 88^oC proporcionaron los C_s para la amplificación del molde de gen de copia única.

Después de terminar el ciclado térmico y la recogida de datos brutos, se usó el software MyiQ (Bio-Rad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software) para generar dos curvas estándar para cada placa, una para la señal del telómero y otra para la señal scg. La proporción T/S para una muestra de ADN experimental es T, el número de nanogramos del ADN Estándar que concuerda con la muestra experimental para número de copias del molde de telómero, dividido por S, el número de nanogramos del ADN Estándar que concuerda con la muestra experimental para el número de copias del scg. Como cada muestra experimental se ensayó en triplicado, se obtuvieron tres resultados T/S para cada muestra; el resultado final reportado para una muestra en un análisis dado es el promedio de los tres valores T/S. Se espera que T/S promedio sea proporcional a la longitud promedio del telómero por célula. Las muestras con una T/S>1,0 tienen una longitud promedio de telómero mayor que la del ADN Estándar; las muestras con una T/S<1,0 tienen una longitud promedio de telómero menor que la del ADN Estándar.

Determinación de longitudes medias de Fragmento de Restricción Terminal (TRF)

Las longitudes medias de TRF se determinaron en duplicado como se ha descrito previamente (Cawthon, R.M. (2002) Nucleic Acids Res, 30, e47). Brevemente, El ADN se digirió con endonucleasa de restricción HaeIII y las muestras digeridas se mezclaron con estándares de tamaño de ADN antes de electroforesis en gel de agarosa y transferencia Southern en membranas de nylon. Después de la hibridación de las transferencias con una sonda oligonucleotídica telomérica radiactiva (TTAGGG)₇ SEQ ID NO: 1) y captura de las imágenes de muestra de telómero, las transferencias se cortaron e hibridaron con sondas radiactivas específicas para los estándares de tamaño de ADN. Las imágenes de los estándares de tamaño y las imágenes de muestras de telómero se superpusieron para localizar las posiciones de los intervalos de tamaño en las muestras de telómero. La longitud media de TRF se calculó como $\sum(OD_i)/\sum(OD_i/L_i)$, en la que OD_i es la radiactividad total por encima del fondo en el intervalo i y L_i es la longitud promedio de i en pares de bases.

Resultados**Cebadores que amplifican un producto con una longitud fijada de repeticiones teloméricas de hexámeros en tándem**

La longitud promedio relativa de telómeros puede medirse por PCR cuantitativa usando cebadores que hibridan con repeticiones de hexámero teloméricas, porque el número de sitios de unión para los cebadores se incrementa al incrementarse la longitud promedio del telómero. Nuestros cebadores originales tel y tel2 para la medida de la longitud de telómero por QPCR singleplex (1) son ambos capaces de cebar en múltiples localizaciones a lo largo de las repeticiones en tándem de ADN telomérico. Pueden, por lo tanto, generar una serie de productos de varios tamaños, algunos de los cuales se funden a temperaturas lo suficientemente altas como para superponerse con la curva de fusión del amplicón de scg. Consecuentemente, no son posibles las lecturas "limpias", a una temperatura alta, de la señal de fluorescencia de SYBR Green I del amplicón bicatenario de scg, sin señal interferente de los productos de PCR de telómero bicatenarios, como se requiere para una MMQPCR exitosa cuando tel1 y tel 2 son los cebadores de telómero.

Para resolver este problema, se diseñó una pareja de cebadores, telg, AACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT SEQ ID NO: 2) y telc, TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACAA SEQ ID NO: 3), que genera un producto corto con longitud fijada (Figura 1). Sólo telg es capaz de cebar la síntesis de ADN a lo largo de las secuencias de ADN

telomérico nativo. El cebador telc se bloquea para cebar ADN telomérico nativo por una base con emparejamiento erróneo en su extremo 3'. Sin embargo, telc es capaz de hibridar a lo largo de varias cadenas del producto de extensión del cebador telg y exactamente una configuración de estas hibridaciones permite el cebado de la síntesis de ADN, permitiendo de esta manera la generación de un único producto con longitud fijada. Esto se consigue introduciendo un cambio de nucleótido en telg en la tercera base desde el extremo 3', de manera que las últimas 3 bases de los cebadores telg y telc se superponen con complementariedad perfecta. Esta superposición no es suficiente para permitir que los cebadores telg y telc nativos se ceben entre sí eficazmente, por lo que la formación de dímeros de cebadores es indetectable en el intervalo de ciclos en los que ocurre la cuantificación de la longitud del telómero. Sin embargo, cuando el producto de extensión de telg hibrida con telc, esta superposición de tres bases es el único sitio en el que el extremo 3' de telc puede cebar eficazmente la síntesis de ADN. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente US 2003/0162266. El producto de PCR resultante tiene, por lo tanto, una longitud fijada y tres bases más corta que la suma de las longitudes de los dos cebadores usados para generarlo. La curva de fusión pronunciada para este producto (curva verde en la Figura 2) es consistente con la formación de producto con una longitud específica, fijada y la electroforesis en gel de agarosa en geles del 6% reveló sólo el producto de 79 pb esperado (datos no mostrados). La Figura 2 también demuestra que la curva de fusión para el producto de PCR de telómero está bien separada de la curva de fusión para el producto de PCR de albúmina (curva azul en la Figura 2), lo que permite leer la señal de SYBR Green I de la albúmina a una temperatura que funde completamente el producto de PCR de telómero.

Diseño de cebadores para genes de copia única (albúmina y beta-globina)

Se diseñaron cebadores de manera que el amplicón de scg se fundiera a una temperatura mucho mayor que el amplicón del telómero. La señal fluorescente del amplicón scg podría adquirirse a una temperatura lo suficientemente alta como para fundir completamente el amplicón del telómero, eliminando su contribución a la señal, pero lo suficientemente baja como para mantener el amplicón scg bicatenario y por lo tanto capaz de unir SYBR Green I.

Los cebadores para la amplificación del scg albúmina son albu: CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGaaatgctgcacagaatccttg SEQ ID NO: 4); y albd: GCCCGGCCGCGGCGGCGGGCTCCCGCCGgaaaagcatggtcgcctgtt SEQ ID NO: 5). El tamaño predicho del producto es 98 pb. Los cebadores para la amplificación del scg beta-globina son hbgu: CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGcttcacacgttcacctg SEQ ID NO: 6); y hbgd: GCCCGGCCGCGGCGGCGGGCTCCCGCCGgaggagaagtctgcccgtt SEQ ID NO: 7). El tamaño predicho del producto es 106 pb. Las bases en mayúscula son secuencias etiqueta 5' no de molde que confieren un temperatura de fusión muy alta al producto de PCR resultante. Por favor, obsérvese que las secuencias etiqueta 5' para los cebadores de albúmina son idénticas a las usados en los cebadores de beta-globina. Obsérvese también que dos secuencias etiqueta 5' ricas en GC en cada conjunto de cebadores son muy diferentes entre sí; si fueran la misma, sería probable que ocurriera la formación de horquillas durante la PCR inactivando la amplificación.

La adición de un anclaje GC al extremo 5' de un cebador de PCR para elevar la temperatura de fusión de un extremo del producto de PCR es una práctica común cuando se criba un gen para mutaciones puntuales por Electroforesis en Gel en Gradiente Desnaturalizante (2). Uniendo anclajes GC 5' a ambos cebadores usados para amplificar el scg, y manteniendo la secuencia genómica diana corta, se generará un producto de PCR con una temperatura de fusión muy alta. La Figura 2 muestra que la T_m para el producto de PCR de albúmina con doble anclaje GC está por encima de 91°C. La electroforesis en gel de agarosa en geles al 6% reveló sólo el producto con el tamaño esperado. Se obtuvieron resultados similares para el producto de PCR de la beta-globina con doble anclaje GC (datos no mostrados).

Los 5' anclajes GC también aseguran que los dos cebadores usados para amplificar el scg tienen T_m s para su amplicón que son mayores que la T_m del producto de PCR de telómero. Los beneficios de este diseño se discuten más adelante (véase **Diseño del perfil térmico y del ciclado**). Un análisis usando el programa OligoAnalyzer (www.idtdna.com) indicó que los cuatro cebadores scg (albu, albd, hbgu y hbgd) tienen T_m s mayores de 84°C en la composición de tampón usada en este estudio.

Diseño del perfil térmico y del ciclado

En la Etapa 1 del protocolo del ciclado térmico, la ADN polimerasa AmpliTaq Gold se activa con calor y la muestra de ADN genómico se desnaturaliza. En la Etapa 2, se necesitan dos ciclos de temperatura relativamente baja para hibridar eficazmente y extender los cebadores de telómero, debido a la presencia en esos cebadores de mutaciones introducidas a propósito que evitan la formación y amplificación de productos de PCR que son dímeros de cebadores (1).

En la Etapa 3 el ciclo repetitivo empieza con una etapa de desnaturalización, una de hibridación y una de extensión con adquisición de la señal que son típicas de la QPCR convencional. Éstas están seguidas de dos etapas no convencionales: incubación a 84°C durante 10 s e incubación a 88°C durante 15 s con una segunda adquisición de la señal. El calentamiento hasta 84°C funde el producto de telómero amplificado temprano, liberando la ADN polimerasa (que se une a ADN bicatenario pero no monocatenario, ref. 3) para trabajar en el producto de PCR de

scg, en la que la síntesis de ADN puede proceder, debido a las temperaturas de hibridación altas (por encima de 84°C) de los cebadores de scg y la capacidad de la ADN polimerasa Taq de mantener una actividad robusta incluso a 84°C (4).

- 5 En la PCR multiplex convencional, concentraciones altas del producto amplificado más temprano inhiben frecuentemente la amplificación posterior de moldes menos abundantes, debido a la unión mencionada anteriormente de la ADN polimerasa por el producto temprano. La solución recomendada habitual es limitar las concentraciones de cebadores para la secuencia diana más abundante, de manera que se forma menos producto, dejando suficiente ADN polimerasa no unida y libre para continuar copiando el molde menos abundante. Pero el disminuir las concentraciones de cebadores resulta frecuentemente en una eficacia reducida de la PCR o incluso un fracaso completo para amplificar la secuencia diana. Las eficacias reducidas también contribuyen a una mayor variación en los valores C_t entre replicados. La etapa de incubación a 84°C en MMQPCR elimina la necesidad de limitar las concentraciones de cebadores para el molde más abundante, liberando la polimerasa de incluso concentraciones altas del producto de PCR correspondiente, de manera que el segundo producto puede sintetizarse eficazmente.
- 10
- 15 El calentamiento adicional hasta 88°C para la etapa de la segunda adquisición de la señal asegura que el producto de PCR de telómero se funde completamente y es incapaz de interferir con la recogida de la señal fluorescente SYBR Green I que surge del amplión scg que se acumula.

Validez del método MMQPCR sobre el intervalo natural de longitudes de telómero

- 20 La Figura 3 muestra curvas de amplificación recogidas a dos temperaturas diferentes (74°C y 88°C) para tres muestras de ADN genómico humano de referencia que se ha mostrado previamente que tienen longitudes de telómero promedio altas, medias o bajas (aproximadamente un intervalo de 3 veces de longitudes de telómero). Tomando como base los perfiles de fusión presentados en la Figura 2, las lecturas a 74°C deben detectar los productos de PCR tanto del telómero como de la albúmina y las lecturas a 88°C deben detectar sólo el producto de la albúmina. Sin embargo, como el molde de la albúmina tiene un número de copias mucho menor que el molde de telómero en cada muestra de ADN los C_t s a 74°C, todos recogidos cuando las señales correspondientes de albúmina todavía estaban en la línea base, son medidas sólo de la amplificación del telómero. (Se ha confirmado, en reacciones sin los cebadores de telómero, que la señal del gen de copia única se eleva por encima de la línea base esencialmente en el mismo número de ciclo ya se recoja a 74°C ó 88°C). Incluso la muestra con los telómeros más cortos (aproximadamente 1.670 pb) y, por lo tanto, la curva de amplificación más desplazada hacia la derecha (curva azul), cruza el umbral en un número de ciclo cuando la señal de amplificación del gen de la albúmina todavía está en la línea base. En el presente estudio de 95 muestras de ADN de sangre completa de sujetos con edades de 5-94 años, cada señal de amplificación de scg de las muestras estaba en la línea base cuando se recogió el C_t para la señal de telómero correspondiente.
- 25
- 30

Curvas estándar independientes para telómeros y gen de copia única

- 35 La Figura 4 muestra dos curvas estándar independientes, una para las repeticiones de telómero y otra para el scg albúmina, determinadas para el ADN Estándar por la adquisición de la señal fluorescente SYBR Green I a dos temperaturas diferentes (74°C para la señal de telómero y 88°C para la señal de albúmina) en cada ciclo de la Etapa 3 del protocolo de ciclado. Esta misma muestra de ADN se usó para generar dos curvas estándar para cada placa de reacción de PCR separada en este estudio. En esta representación semi-logarítmica de concentración de ADN frente a umbral de ciclo, ambas curvas son lineales sobre el intervalo de concentración de ADN de 81 veces. Las eficacias de la PCR para las amplificaciones tanto del telómero como de la albúmina fueron mayores del 90% y aproximadamente iguales. Para esta muestra de ADN Estándar particular, a cada concentración de ADN el C_t para albúmina ocurrió aproximadamente seis ciclos después en el ciclado que el C_t para las repeticiones de telómero.
- 40

- 45 En la Figura 3, se introdujeron cantidades esencialmente idénticas de ADN en las reacciones (basado en lecturas espectrofotométricas UV a DO_{260}), de manera que las diferencias en C_t observadas a 74°C reflejarán sólo diferencias en la longitud del telómero (sin influencia de la variación en las cantidades de ADN introducido). (En la práctica normal, no existe necesidad de concordar precisamente las muestras experimentales para ADN introducido, ya que el procedimiento de normalizar la señal T respecto a la señal S aborda este asunto. Es aceptable un intervalo amplio de cantidades de ADN introducido, siempre que la señales tanto T como S estén en el intervalo de las curvas estándar T y S; véase la Figura 4). La superposición casi perfecta de las tres curvas de amplificación adquiridas a 88°C se esperaba, ya que a esta temperatura sólo se recoge la señal del gen de copia única (gen de albúmina). El panel inferior muestra que los umbrales de ciclo para las señales de telómero pueden recogerse a 74°C cuando la señal de albúmina todavía está en la línea base. (Se ha confirmado, en reacciones sin los cebadores de telómero, que la señal del gen de copia única se eleva por encima de la línea base esencialmente en el mismo número de ciclo ya se recoja a 74°C ó 88°C. También, se ha confirmado, en reacciones sin los cebadores del gen de copia única, que la señal de amplificación del telómero es completamente plana y a cero a lo largo del análisis de PCR cuando la lectura es a 88°C, como se esperaba basado en los perfiles de fusión mostrados en la Figura 2). Como el software Bio-Rad MyiQ sólo puede mostrar una curva de amplificación de temperatura cada vez, las visualizaciones para las lecturas a 74°C y 88°C se han superpuesto.
- 50
- 55

Correlación entre longitudes medias TRF y proporciones T/S relativas

Para ensayar la validez de la estrategia MMQPCR para la medida de la longitud de telómeros, se compararon las longitudes de telómero relativas (proporciones T/S promedio) en muestras de ADN de sangre completa de 95 individuos, con edades de 5-94 años, medidas en triplicado por MMQPCR con las longitudes medias de Fragmento de Restricción Terminal (TRF) de esas mismas muestras de ADN según se mide por la estrategia tradicional de transferencia Southern (1). La Figura 5 muestra la correlación fuerte en las longitudes de telómero relativas medidas por estas diferentes técnicas ($R^2 = 0,844$). Esta correlación es más alta que la correlación según se ha reportado previamente (1) para proporciones T/S medidas en estas mismas muestras por QPCR singleplex frente a sus longitudes medias TRF ($R^2 = 0,677$).

Reproducibilidad de las medidas de la proporción T/S

Para examinar la reproducibilidad intra-ensayo de las medidas T/S por MMQPCR, se determinó el coeficiente de variación (desviación estándar dividida por la media) para T/S para cada una de las 95 muestras de ADN ensayadas en triplicado en un único análisis del ensayo MMQPCR, usando albúmina como el scg. La media geométrica intra-ensayo del coeficiente de variación fue 5,22%. Para examinar la reproducibilidad inter-ensayo, las medidas de T/S en las mismas 95 muestras de ADN se repitió, de nuevo en triplicado, en otro día, teniendo cuidado de que la máquina específica de PCR MyiQ y las posiciones de los pocillos de reacción ocupados por cada muestra de ADN fueran diferentes en estos dos análisis independientes del ensayo. La Figura 6 muestra la correlación fuerte entre las proporciones T/S promedio determinadas por el primer y segundo análisis ($R^2 = 0,91$). La pendiente de la línea de regresión lineal a través de los datos fue casi uno y la intersección con y cerca de cero, como se esperaba. Se determinó el coeficiente de variación de cada una de las 95 parejas de valores T/S promedio de los dos análisis independientes. La media geométrica inter-ensayo del coeficiente de variación fue 3,13%.

Las proporciones T/S son independientes del gen de copia única usado

Para ensayar si el uso de beta-globina en lugar de albúmina, como el scg podría alterar las longitudes de los telómeros relativas aparentes, las medidas de T/S en las mismas 95 muestras de ADN se repitieron en triplicado, en dos análisis separados, sustituyendo los cebadores de beta-globina por los cebadores de albúmina. La Figura 7 representa los valores T/S promedio de los dos análisis con albúmina como el scg (eje de las x) frente a los valores T/S promedio de los dos análisis con beta-globina como el scg (eje de las y). Los valores T/S obtenidos con albúmina se correlacionan altamente con los obtenidos usando beta-globina ($R^2 = 0,934$).

Las longitudes de los telómeros relativos (proporciones T/S) medidas en 95 muestras de ADN por el método de la PCR multiplex monocromática cuantitativa descrito se correlacionaron muy altamente con las longitudes de Fragmento de Restricción Terminal relativas medidas por transferencia Southern. Las proporciones T/S medidas en estas mismas muestras por un ensayo QPCR singleplex original no se correlacionaron tan altamente con las longitudes TRF. Estos resultados sugieren que la medida de la longitud del telómero por MMQPCR es más exacta que la medida de la longitud del telómero por QPCR singleplex. Además, los resultados T/S obtenidos con MMQPCR fueron altamente reproducibles en análisis independientes del ensayo. El hacer multiplex el ensayo QPCR del telómero permite un rendimiento incrementado y costes más bajos para estudios epidemiológicos de la longitud del telómero. Además, el coste adicional habitual asociado con la conversión a un ensayo multiplex, de tener que sintetizar o comprar sondas fluorescentes multi-color personalizadas también se evita adoptando este método.

MMQPCR también puede adaptarse fácilmente para el estudio de muchas parejas de moldes de ADN que ocurren naturalmente en números de copia muy diferentes, por ejemplo, copias de ADNmt frente a genes de copia única, copias de ADNr frente a genes de copia única y copias de ADN Alu frente a genes de copia única. De manera similar, las parejas de especies de ARN con números de copias muy diferentes pueden ser cuantificables por este método, después de transcripción inversa en ADNc. Para la mayor parte de parejas de dianas, pueden seguirse los principios estándar de diseño de cebadores, siendo las únicas directrices adicionales que los cebadores para el molde más abundante pueden generar un producto relativamente corto (40-80 pb) de manera que su T_m será apropiadamente baja ($<83^\circ\text{C}$) y los cebadores para el molde menos abundante pueden contener los anclajes GC 5' presentados aquí (o unos similares) y generar un producto corto de manera que su T_m será lo suficientemente alta ($>90^\circ\text{C}$). Además, la molestia y dificultades auxiliares en QPCR multiplex convencional de tener que limitar las concentraciones de cebadores usadas para amplificar el molde más abundante, se eliminan en MMQPCR. Las características del diseño de los cebadores de telómero telg y telc en la presente memoria se usaron para amplificar repeticiones en tándem cortas con cebadores que hibridan con estas repeticiones. Además de medir las longitudes de telómeros por MMQPCR, se midieron las proporciones ADNmt a ADNn mediante esta estrategia y funcionó bien. Incluso parejas de moldes con números de copias similares pueden estudiarse mediante esta estrategia aplicando los diseños de cebador y perfil térmico que retrasan la amplificación de un amplicón.

Ejemplo 2 - MMQPCR de dos dianas con una abundancia similar

En el caso de que dos ácidos nucleicos diana presenten una abundancia similar, puede emplearse MMQPCR. Con el fin de hacer esto, se retrasa artificialmente la amplificación de una diana, mientras se permite que la otra diana se continúe amplificando. Por ejemplo, las composiciones y métodos descritos en el Ejemplo 1 se usan para determinar

5 el número de copias de un primer ácido nucleico diana y el número de copias de un segundo ácido nucleico, cuando el primer y segundo ácido nucleicos diana presentan una abundancia similar. Para hacer esto, se usan las mismas composiciones y métodos descritos anteriormente, excepto por los parámetros de ciclado de PCR proporcionados. Un perfil de ciclado térmico podría ser Etapa 1: 15 min a 95⁰C; Etapa 2: 2 ciclos de 15 s a 94⁰C, 15 s a 49⁰C; Etapa 3: 2 a 6 ciclos de 15 s a 88⁰C, 10 s a 62⁰C, 15 s a 74⁰C; Etapa 4: 32 ciclos de 15 s a 94⁰C, 10 s a 62⁰C, 15 s a 74⁰C con adquisición de la señal, 10 s a 84⁰C, 15 s a 88⁰C con adquisición de la señal.

10 La Etapa 3 anterior permitirá la amplificación exponencial del producto de telómero, porque está completamente fundido a 88 grados. Sin embargo, el producto de gen de copia única es completamente bicatenario a 88 grados, de manera que los cebadores del gen de copia única no pueden acceder y amplificar el producto de gen de copia única durante esta Etapa 3 de ciclado.

15 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenecen el método y las composiciones descritos. Aunque pueden usarse cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo del presente método y composiciones, los métodos, dispositivos y materiales particularmente útiles son como se describe.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CAWTHON, RICHARD
 <120> PCR MULTIPLEX MONOCROMÁTICA CUANTITATIVA
 <130> 21101.0199P1
 5 <150> 61/139.890
 <151> 2008-12-22
 <160> 7
 <170> FastSEQ para Wondows Versión 4.0
 <210> 1
 10 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: nota= construcción sintética
 15 <400> 1
ttaggg 6
 <210> 2
 <211> 40
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: nota= construcción sintética
 <400> 2
acactaaggt ttgggttgg gttggggtt gggtagtgt 40
 25 <210> 3
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: nota= construcción sintética
 <400> 3
**tgtaggtat ccctatccct atccctatcc ctatccctaa ca
 42**
 <210> 4
 <211> 48
 35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: nota= construcción sintética

<400> 4

cggcggcggg cggcgcgggc tgggcggaaa tgctgcacag
aatcctg 48

5

<210> 5

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: nota= construcción sintética

<400> 5

gcccggcccg ccgccccgt cccgccgga aagcatggc
gcctgtt 47

<210> 6

15

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: nota= construcción sintética

20

<400> 6

cggcggcggg cggcgcgggc tgggcggctt catccacgtt cac-
ctg 47

<210> 7

<211> 45

<212> ADN

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: nota= construcción sintética

<400> 7

gcccggcccg ccgccccgt cccgccggag gagaagtctg
ccgtt 45

30

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el número de copias de un primer ácido nucleico diana y un segundo ácido nucleico diana, que comprende:
- 5 a) poner en contacto un primer ácido nucleico diana con un primer conjunto de cebadores y un segundo ácido nucleico diana con un segundo conjunto de cebadores y añadir un único marcador de detección para formar una mezcla de reacción en un sistema homogéneo, en el que el número de copias de la primera secuencia de ácido nucleico diana es mayor que el número de copias de la segunda secuencia de ácido nucleico diana,
- 10 b) amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el primer ácido nucleico diana con el primer conjunto de cebadores para formar un primer amplicón que tiene una primera temperatura de fusión (T_m) y amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa el segundo ácido nucleico diana con el segundo conjunto de cebadores para formar un segundo amplicón que tiene una segunda T_m, en el que dicha segunda T_m es mayor que dicha primera T_m;
- 15 c) durante la reacción en cadena de la polimerasa, determinar la cantidad del marcador de detección a una primera temperatura de adquisición, en el que dicha primera temperatura de adquisición de la señal está por debajo de dicha primera T_m;
- d) incrementar la temperatura de la mezcla de reacción hasta una segunda temperatura de adquisición de la señal y determinar la cantidad del marcador de detección, en el que dicha segunda temperatura de adquisición de la señal está por encima de dicha primera T_m y por debajo de dicha segunda T_m;
- e) repetir las etapas (b) a (d) al menos una vez; y
- 20 f) determinar el número de copias relativo de dicho primer y dicho segundo ácidos nucleicos diana.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la reacción en cadena de la polimerasa comprende al menos tres etapas consecutivas de ciclos, en el que la primera etapa de ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa comprende una reacción en cadena de la polimerasa en el que la temperatura de hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa es mayor que la temperatura de hibridación de la segunda etapa de ciclos, en el que la
- 25 segunda etapa de ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa comprende una reacción en cadena de la polimerasa en el que la temperatura de hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa es menor que la temperatura de hibridación de la primera etapa de ciclos y en el que la tercera etapa de ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa comprende una reacción en cadena de la polimerasa en la que la temperatura de hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa es menor que la temperatura de hibridación de la primera etapa de ciclos y mayor que la temperatura de hibridación de la segunda etapa de ciclos.
- 30 3. El método de la reivindicación 2, en el que
- a) sólo se forma el primer amplicón durante la primera etapa de ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa,
- b) sólo se forma el segundo amplicón durante la segunda etapa de ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa,
- o
- 35 c) tanto el primer como segundo amplicones se forman durante la tercera etapa de ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa.
4. El método de la reivindicación 2, en el que la etapa de amplificación se repite hasta que se determina el marcador de detección a dicha segunda temperatura de adquisición de la señal.
5. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la cantidad del marcador de detección se detecta a dicha primera y
- 40 dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal durante cada una de dichas etapas de amplificación.
6. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la diferencia entre la primera T_m y la segunda T_m es al menos 4 grados Celsius.
7. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que
- a) al menos uno de los cebadores en el segundo conjunto de cebadores comprende un anclaje GC en el extremo 5'
- 45 del cebador, o
- b) al menos uno de los cebadores en dicho primer conjunto de cebadores comprende una secuencia 5' que incluye los nucleótidos A y T.
8. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que los extremos 3' de los cebadores del primer conjunto de cebadores son complementarios entre sí.

9. El método de la reivindicación 8, en el que un cebador del primer conjunto de cebadores es un cebador con emparejamiento erróneo que comprende al menos un nucleótido con emparejamiento erróneo adyacente al extremo 3' del cebador, en el que dicho nucleótido no es complementario al ácido nucleico diana, pero es complementario al nucleótido 3' terminal el otro cebador en el primer conjunto de cebadores.
- 5 10. El método de la reivindicación 9, en el que el producto de la extensión del cebador con emparejamiento erróneo del primer conjunto de cebadores es capaz de hibridar con el otro cebador en el primer conjunto de cebadores.
11. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que uno de los cebadores en el primer conjunto de cebadores está bloqueado para cebar el primer ácido nucleico diana.
- 10 12. El método de la reivindicación 11, en el que el cebador bloqueado para cebar el primer ácido nucleico diana comprende una base con emparejamiento erróneo en su extremo 3'.
13. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el marcador de detección es un colorante intercalante.
14. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el número de copias de un primer y un segundo ácidos nucleicos diana mide la cantidad relativa del primer ácido nucleico comparado con el segundo ácido nucleico.
15. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer ácido nucleico diana
- 15 a) comprende una secuencia de repetición en tándem, o
- b) se obtiene de una muestra.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el número de copias del primer ácido nucleico diana determina el número de secuencias de repetición en tándem presente en la muestra.
- 20 17. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de marcador de detección determinada durante la primera y dicha segunda temperaturas de adquisición de la señal se comparan con un control.

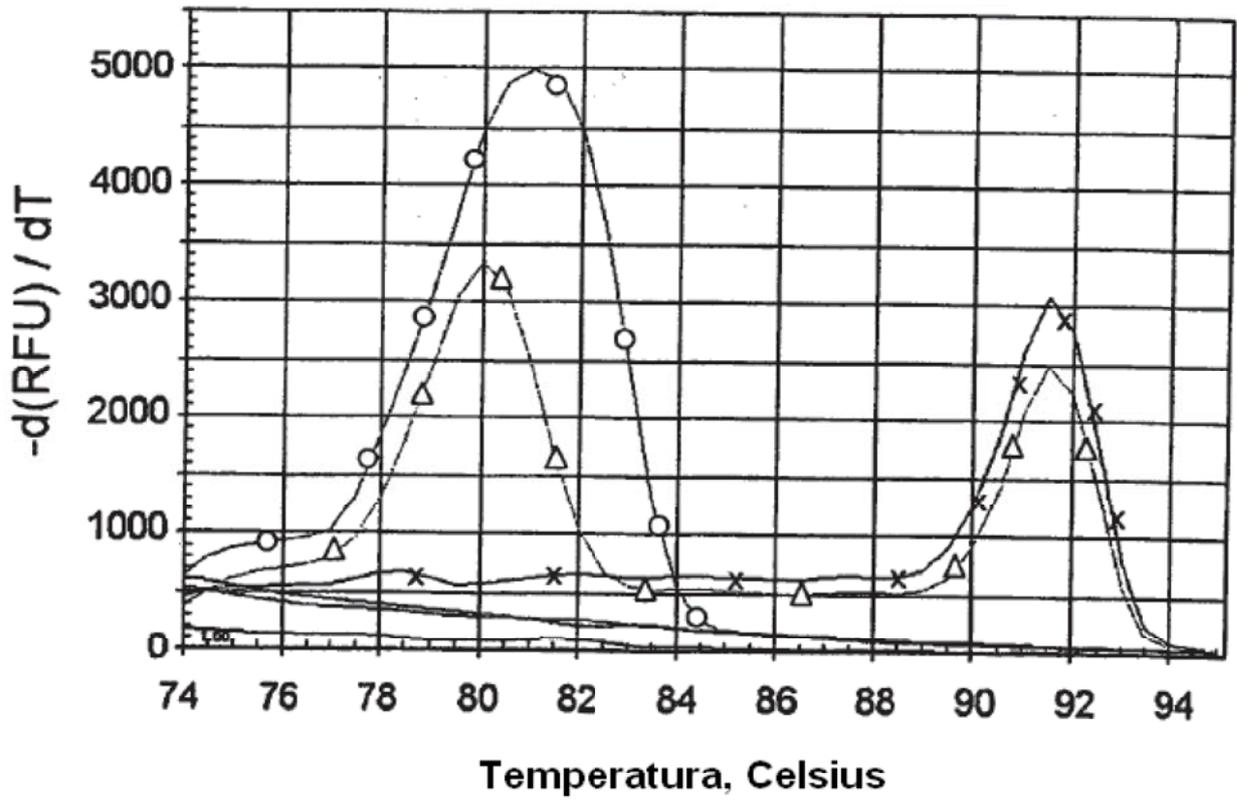


Figura 2

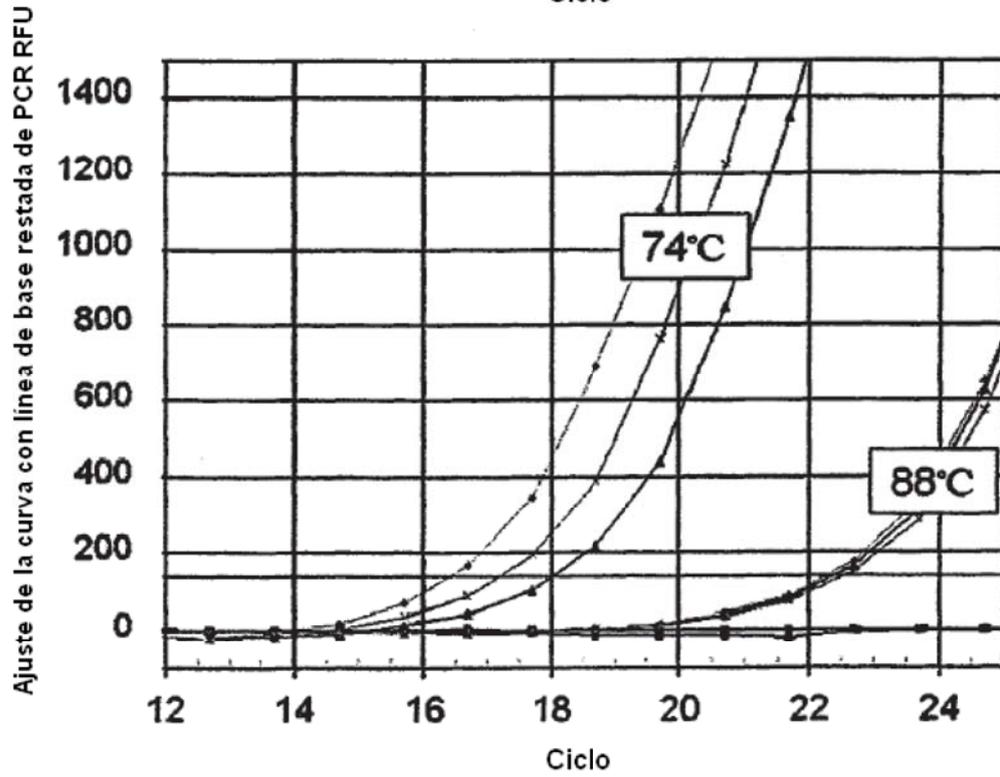
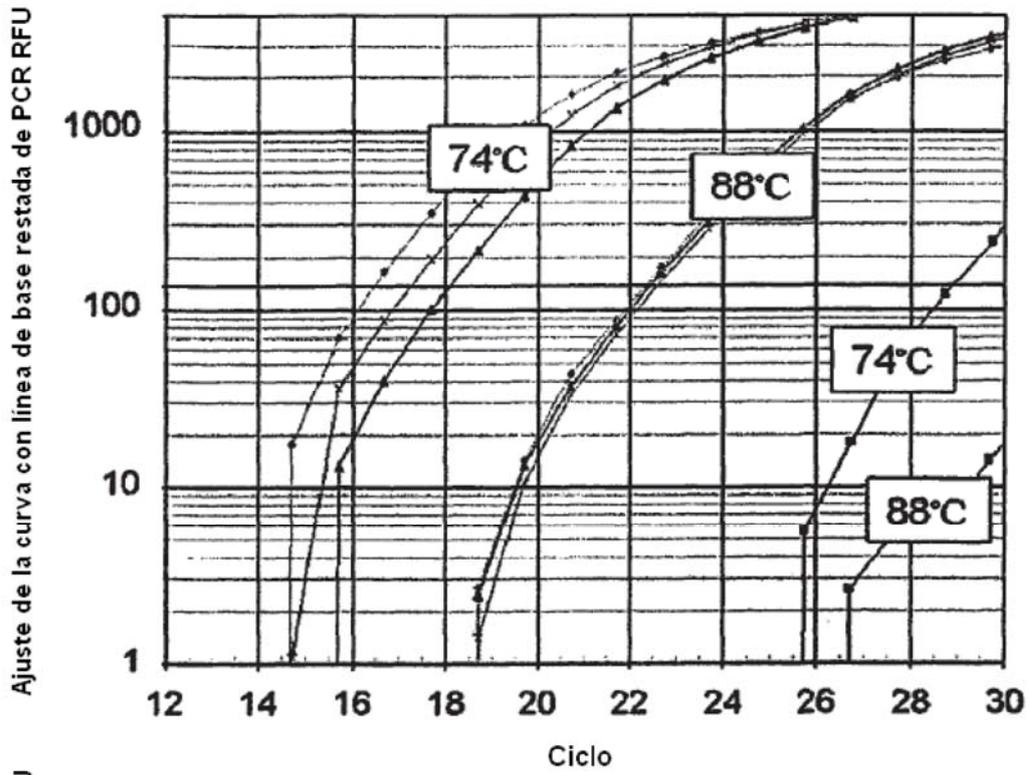


Figura 3

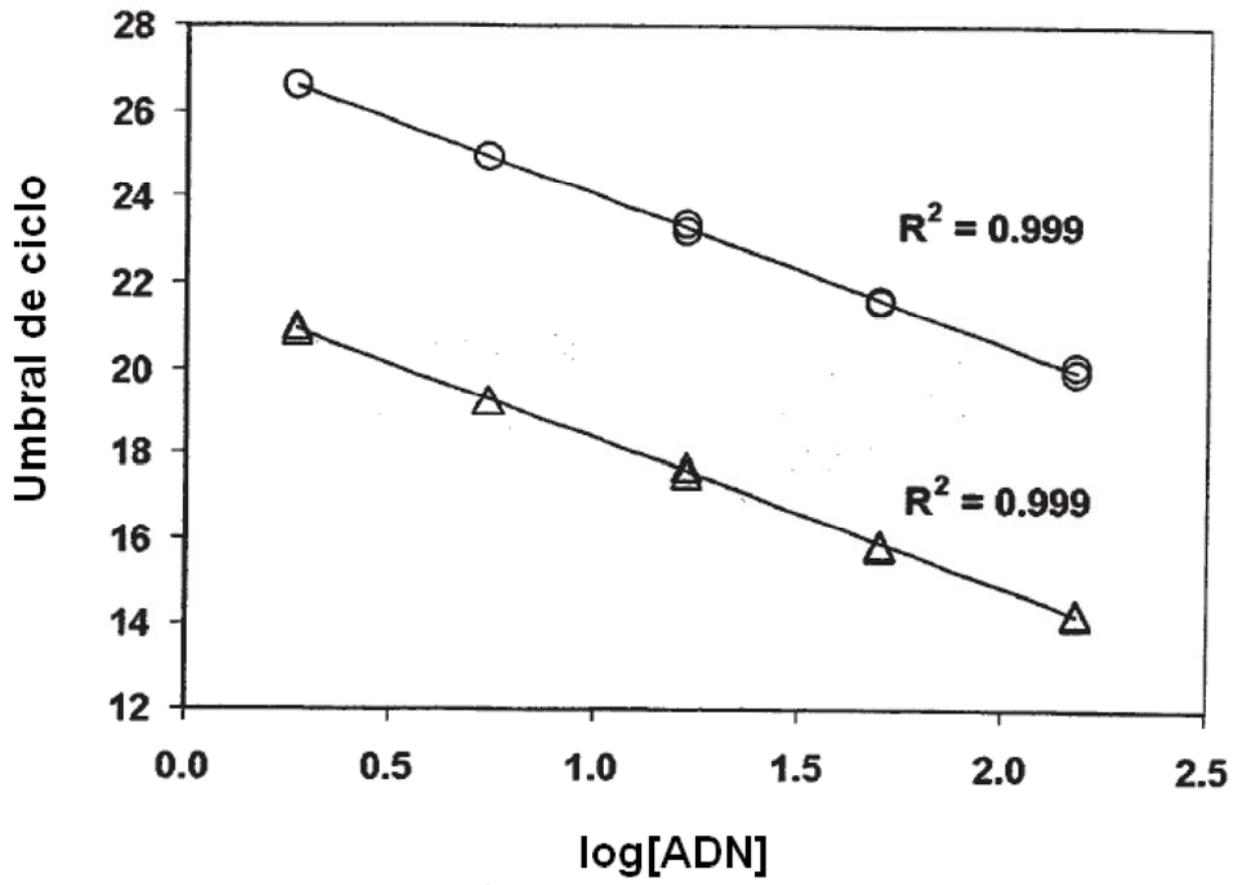


Figura 4

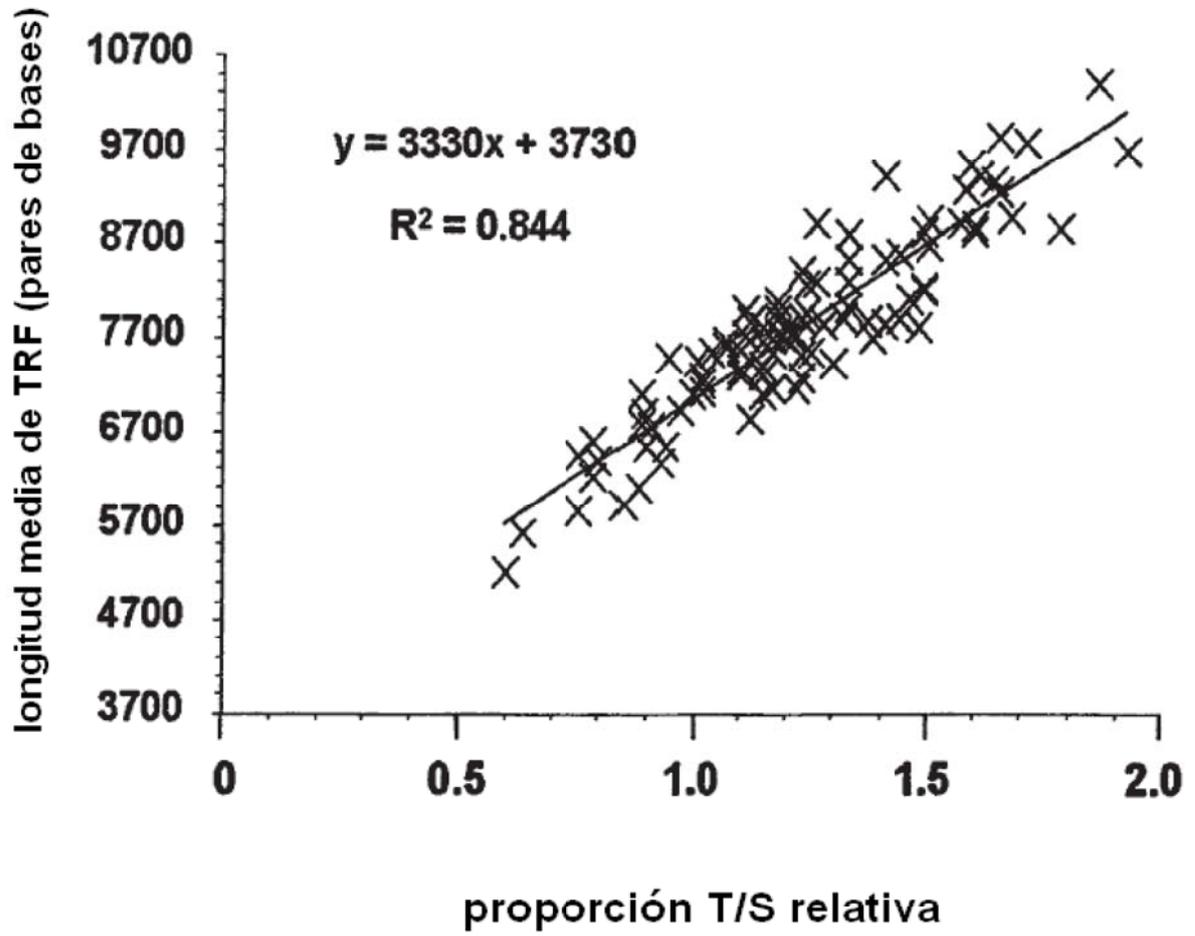


Figura 5

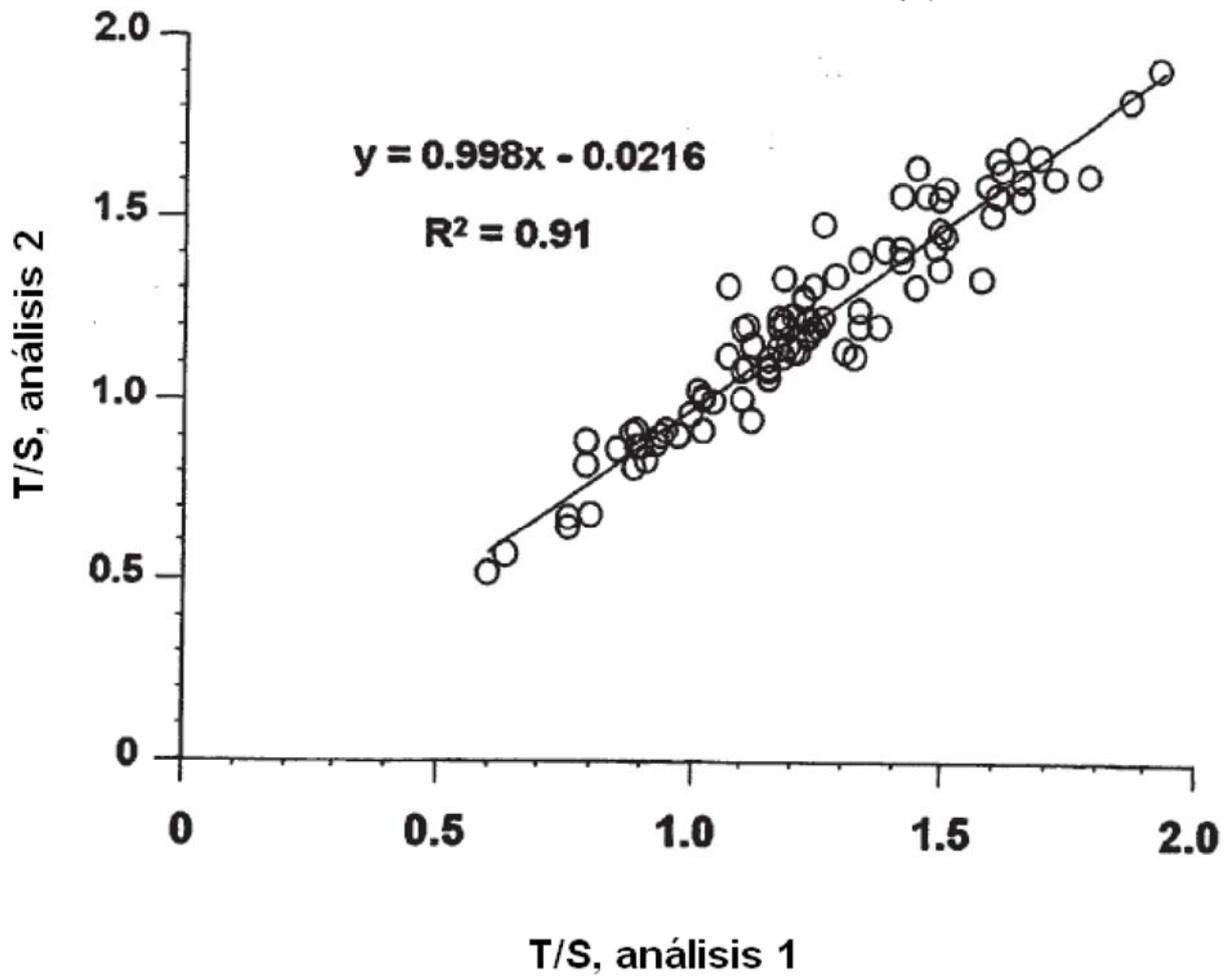


Figura 6

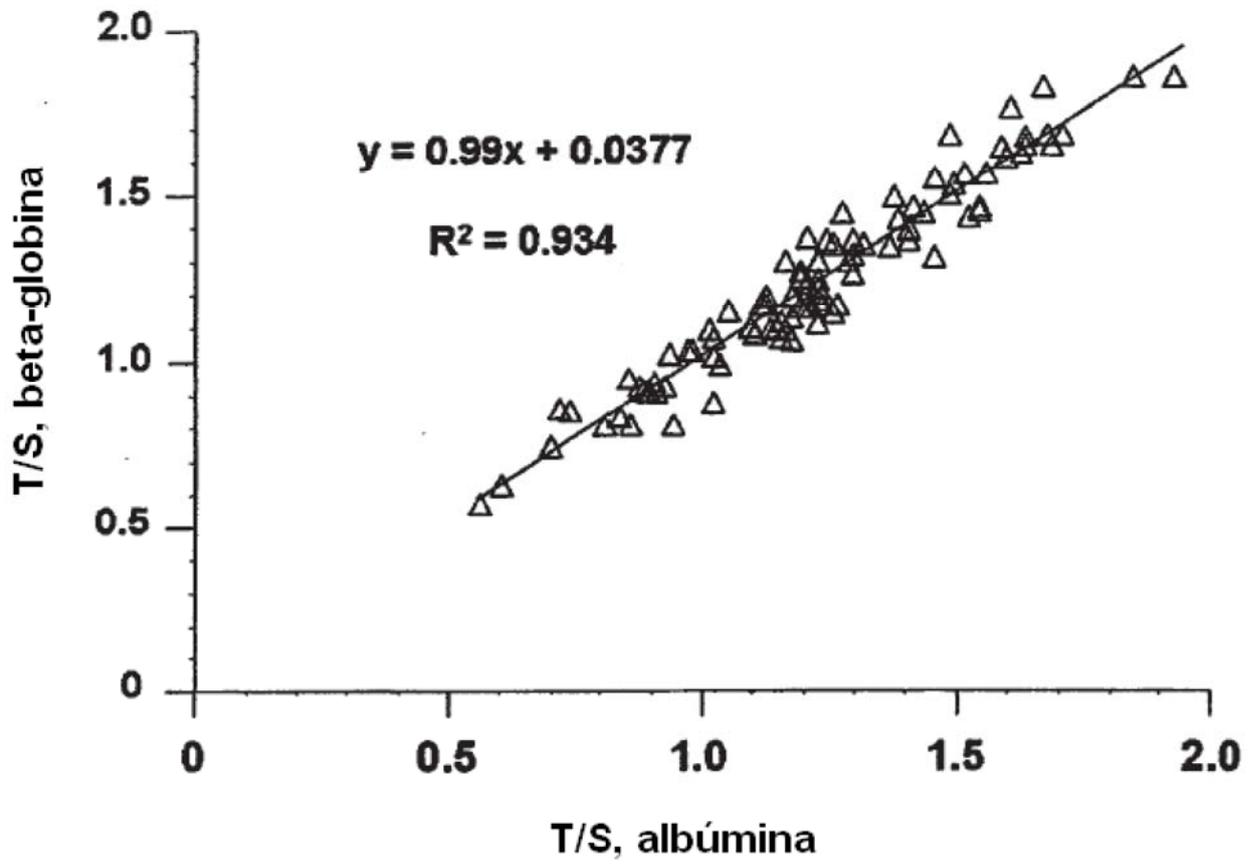


Figura 7