

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 967**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07D 279/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2003 E 03777776 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1558762**

54 Título: **Análisis de fusión de amplicones con colorantes de saturación**

30 Prioridad:

23.10.2002 US 420717 P

14.01.2003 US 439978 P

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

21.01.2014

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION

(50.0%)

615 Arapeen Drive, Suite 10

Salt Lake City, UT 84108, US y

BIOFIRE DIAGNOSTICS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

WITWERT, CARL T.;

DUJOLS, VIRGINIE E.;

REED, GUDRUN y

ZHOU, LUMING

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 438 967 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

Análisis de fusión de amplicones con colorantes de saturación

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos para realizar análisis de ácido nucleico en presencia de un colorante de unión a ácido nucleico bicatenario.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los procedimientos para analizar la variación de la secuencia de ADN pueden dividirse en dos categorías generales: 1) determinación del genotipo para variantes de secuencia conocidas y 2) rastreo en busca de variantes desconocidas. Existen muchos procedimientos para determinar el genotipo de variantes de secuencia conocidas, y están disponibles procedimientos en tubo cerrado homogéneos de etapa única que utilizan sondas fluorescentes (Lay MJ, y otros, Clin. Chem 1997; 43: 2262-7). En contraste, la mayoría de las técnicas de rastreo en busca de variantes desconocidas requieren electroforesis en gel o separación en columna después de la PCR. Éstas incluyen polimorfismo de conformación monocatenaria (Orita O, y otros, Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos 1989; 86: 2766-70), migración de heterodúplex (Nataraj AJ, y otros, Electrophoresis 1999; 20: 1177-85), electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Abrams ES, y otros, Genomics 1990; 7: 463-75), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (Wartell RM, y otros, J Chromatogr A 1998; 806: 169-85), procedimientos de escisión enzimática o química (Taylor GR, y otros, Genet Anal 1999; 14: 181-6), así como secuenciación de ADN. La identificación de nuevas mutaciones por secuenciación también requiere múltiples etapas después de la PCR, concretamente secuenciación cíclica y electroforesis en gel. La cromatografía de líquidos de alta resolución desnaturizante (Xiao W, y otros, Hum Mutat 2001; 17: 439-74) implica inyectar el producto de PCR en una columna.

Recientemente, se han descrito procedimientos fluorescentes homogéneos para rastreo de mutaciones. SYBR[®] Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregón) es un colorante de ADN, específico de cadena doble utilizado a menudo para monitorizar la formación de producto (Wittwer CT, y otros, BioTechniques 1997; 22: 130-8) y la temperatura de fusión (Ririe KM, y otros, Anal. Biochem 1997; 245: 154-60) en PCR en tiempo real. La presencia de cambios heterocigóticos de una única base se ha detectado en productos de hasta 167 pb mediante análisis de la curva de fusión con SYBR[®] Green I (Lipsky RH, y otros, Clin Chem 2001; 47: 635-44). Sin embargo, posteriormente a la amplificación y antes del análisis de la fusión, el producto de PCR se purificó y se añadieron altas concentraciones de SYBR[®] Green I. La concentración de SYBR[®] Green I utilizada para la detección en este procedimiento inhibe la PCR (Wittwer CT, y otros BioTechniques 1997; 22: 130-1, 134-8); por lo tanto, el colorante se añadió después de la amplificación. Un colorante que pudiera utilizarse para detectar la presencia de cambios de una sola base heterocigóticos y pudiera añadirse antes de la PCR sería deseable.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son, de lejos, las variaciones genéticas más habituales observadas en el ser humano y otras especies. En estos polimorfismos, solamente una única base varía entre individuos. La alteración puede causar un cambio de aminoácidos en una proteína, alterar las velocidades de transcripción, afectar al corte y empalme de ARNm o no tener ningún efecto evidente sobre los procesos celulares. Algunas veces, cuando el cambio es silencioso (por ejemplo, cuando el aminoácido que codifica no cambia), la determinación del genotipo de SNP puede seguir siendo valiosa si la alteración está unida a (asociada con) un único fenotipo causado por otra alteración genética.

Existen muchos procedimientos para determinar el genotipo del SNP. La mayoría utilizan PCR u otras técnicas de amplificación para amplificar la plantilla de interés. Pueden emplearse técnicas analíticas contemporáneas o posteriores, incluyendo electroforesis en gel, espectrometría de masas y fluorescencia. Las técnicas de fluorescencia que son homogéneas y no requieren la adición de reactivos después del comienzo de la amplificación o el muestreo físico de las reacciones para análisis son atractivas. Las técnicas homogéneas ejemplares utilizan cebadores de oligonucleótidos para localizar la región de interés y marcas o colorantes fluorescentes para la generación de señales. Los procedimientos basados en PCR ilustrativos son completamente en tubo cerrado, utilizando una enzima termoestable que es estable a la temperatura de desnaturización del ADN, de modo que después de que haya comenzado el calentamiento, no son necesarias adiciones.

Varios procedimientos de PCR fluorescentes, homogéneos, en tubo cerrado están disponibles para determinar el genotipo del SNP. Estos incluyen sistemas que utilizan sondas de oligonucleótidos FRET con dos cromosomas que interactúan (sondas de hibridación adyacentes, sondas TaqMan, *Molecular Beacons* (balizas moleculares), sondas *Scorpion*), sondas de un único oligonucleótido con solamente un fluoróforo (sondas *G-quenching*, *Crockett*, A. O. y C. T. Wittwer, Anal. Biochem. 2001; 290: 89-97 y SimpleProbes, Idaho Technology), y técnicas que utilizan un colorante de ADNbc (ADN bicatenario) en lugar de sondas de oligonucleótidos covalentes marcadas de forma fluorescente. Las técnicas con colorantes son atractivas dado que no se requieren sondas de oligonucleótidos marcadas, permitiendo un tiempo de diseño y un coste reducidos de los ensayos.

65

Se han publicado dos técnicas para determinar el genotipo de SNP utilizando colorantes de ADNbc. La amplificación específica de alelos en presencia de colorantes de ADNbc también puede utilizarse para determinar el genotipo con PCR en tiempo real (Germer S, y otros, Genome Research 2000; 10: 258-266). En el procedimiento de la referencia de Germer, dos cebadores específicos de alelos difieren en su base 3' y amplifican de forma diferencial uno o el otro alelo en presencia de un cebador inverso común. Aunque no se necesitan oligonucleótidos marcados fluorescentemente, la determinación del genotipo requiere tres cebadores y dos pocillos para cada genotipo de SNP. Además, es necesario un instrumento de PCR en tiempo real que monitorice la fluorescencia cada ciclo.

El otro procedimiento a base de colorantes no requiere monitorización en tiempo real, necesita solamente un pocillo por genotipo de SNP, y utiliza análisis de fusión (Germer, S, y otros, Genome Research 1999; 9: 72-79). En este procedimiento, también se utiliza amplificación específica de alelos, requiriendo tres cebadores, como con el procedimiento de Germer previo. Además, uno de los cebadores incluye una cola de pinza GC para elevar la temperatura de fusión de un amplicón, permitiendo la diferenciación por temperatura de fusión en un pocillo. La fluorescencia se monitoriza después de la amplificación por PCR, y no se requiere la adquisición en tiempo real.

El documento US6346386 (Elenitoba-Johnson) describe un procedimiento adicional para analizar alteraciones del ADN utilizando un colorante de unión a ADN bicatenario y perfiles de fusión de fluorescencia.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer un procedimiento de análisis de ADN, según la reivindicación 1.

Para los fines de la presente invención, un colorante "de saturación" es un colorante que no inhibe significativamente la PCR cuando está presente a concentraciones que proporcionan una señal de fluorescencia máxima para una cantidad de ADNbc generada habitualmente por PCR en ausencia de colorante, de forma ilustrativa aproximadamente 10 ng/ μ l. Aunque los colorantes se identifican por su compatibilidad con PCR a concentraciones cercanas a la saturación, se entiende que los colorantes pueden utilizarse a concentraciones mucho más bajas. Durante o posteriormente a la amplificación, los colorantes pueden utilizarse para distinguir heterodúplex y homodúplex mediante análisis de la curva de fusión de manera similar a cuando se utilizan cebadores marcados. La identificación de heterodúplex y homodúplex puede utilizarse para diversos análisis, incluyendo rastreo de mutaciones y determinación del genotipo de SNP. El término "rastreo" se refiere al proceso en el que un fragmento de ácido nucleico se compara con un fragmento de ácido nucleico de referencia para detectar la presencia de cualquier diferencia en la secuencia. Una respuesta positiva que indica la presencia de una diferencia de secuencia puede no reflejar necesariamente la naturaleza exacta de la diferencia de secuencia o su posición en el fragmento de ácido nucleico. La expresión "determinación del genotipo" incluye la detección y determinación de diferencias de la secuencia de ácido nucleico conocidas, incluyendo, aunque sin limitarse a las mismas, SNP, deleciones de bases, inserciones de bases, duplicaciones de secuencia, reordenaciones, inversiones, mutilaciones de base, el número de repeticiones en tándem cortas; y, en el caso de un genoma diploide, ya sea el genoma un homocigoto o un heterocigoto de la diferencia de secuencia, así como la relación posicional cis/trans de dos o más diferencias de secuencia en una cadena de DNA (determinación del haplotipo).

Se identifican diversos colorantes de unión a ADNbc. Los colorantes de unión a ADNbc son capaces de existir en condiciones de saturación suficiente con respecto al ADN durante o después de la amplificación, mientras se minimiza la inhibición de PCR. Por ejemplo, a concentraciones compatibles con PCR máximas, el colorante de unión a ADNbc tiene un porcentaje de saturación de, como mínimo, el 50%. En otras realizaciones, el porcentaje de saturación es, como mínimo, del 80% y más particularmente, como mínimo, del 90%. En otras realizaciones más, el porcentaje de saturación es, como mínimo, del 99%. Se entiende que el porcentaje de saturación es el porcentaje de fluorescencia en comparación con la fluorescencia del mismo colorante a concentraciones de saturación, es decir, la concentración que proporciona la más alta intensidad de fluorescencia posible en presencia de una cantidad predeterminada de ADNbc. De forma ilustrativa, la cantidad predeterminada de ADNbc es de 100 ng/10 μ l que es la cantidad de ADN producida al final de una PCR típica en la fase de meseta. Se entiende, además, que las preparaciones de colorante pueden contener impurezas que inhiben la amplificación. Dichas impurezas deben eliminarse antes de una determinación del porcentaje de saturación. Se entiende también que la medición de la intensidad de fluorescencia para el porcentaje de saturación se realiza a la longitud de onda que corresponde bien para la detección de colorante unido a ADNbc y, si fuera posible, no a longitudes de onda que detectarían fluorescencia de fondo elevada procedente de colorante libre o formas secundarias de colorante de unión que pueden producirse a relación de colorante con respecto a pb elevada (por ejemplo, unión de colorante al complejo ADNbc-colorante o a ácidos nucleicos monocatenarios).

El colorante de unión a ADNbc puede tener más del 50% de saturación a concentraciones máximas compatibles con PCR, y tiene espectros de excitación/emisión que no sugerirían compatibilidad con instrumentos de PCR en tiempo real estándar. Los instrumentos "estándar" para análisis de PCR en tiempo real tienen un intervalo de excitación de aproximadamente 450-490 nm y un intervalo de detección de emisión de aproximadamente 510-530 nm. Se ha descubierto que ciertos colorantes "azules" son compatibles con estos sistemas, aunque sus espectros de excitación/emisión sugerirían otra cosa. Por lo tanto, en este aspecto de la presente invención, se da a conocer un procedimiento para análisis durante o posteriormente a la PCR utilizando un instrumento de PCR en tiempo real

estándar y un colorante de unión a ADNbc que tiene un máximo de excitación en el intervalo de 410-465 nm, más particularmente en el intervalo de 430-460 nm, y que tiene un máximo de emisión en el intervalo de 450-500 nm, más particularmente en el intervalo de 455-485 nm, según lo medido en tampón de PCR en presencia de ADNbc. La instrumentación adecuada puede utilizar los intervalos de excitación/detección anteriores, o puede modificarse según los máximos de excitación/emisión de los colorantes. Los intervalos adecuados para la detección de los colorantes "azules" de la presente invención, así como para la detección de colorantes tradicionales tales como fluoresceína y SYBR[®] Green I pueden incluir 440-470 nm para excitación y 500-560 para detección.

En una realización, el colorante es un colorante identificado como LightCycler Green (o de forma intercambiable, LC Green). La síntesis de LC Green se enseña a continuación, y los espectros de excitación/emisión de LC Green se muestran en la figura 11. Propiedades adicionales de LC Green se muestran en la tabla 1. Análogamente, otros colorantes identificados como operativos en la tabla 1 pueden utilizarse dentro del alcance de la presente invención. Aunque la estructura exacta de algunos de estos colorantes se desconoce hasta ahora, se cree que son cianinas asimétricas, y diversas propiedades de estos colorantes de ácido nucleico fluorescentes se muestran en la tabla 1.

Aunque los ejemplos que se dan a conocer en el presente documento se refieren al análisis de la curva de fusión, se entiende que los colorantes de la presente invención pueden utilizarse para diversos análisis por PCR cuantitativa en tiempo real, incluyendo cuantificación del ácido nucleico, determinación de la concentración inicial, ensayo en busca de la presencia de un ácido nucleico, multiplexado con sondas marcadas, y otros procedimientos a base de PCR.

Además, aunque se hace referencia a PCR, otros procedimientos de amplificación pueden ser compatibles con los colorantes de la presente invención. Dichos procedimientos adecuados incluyen amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA); amplificación por círculo rodante en cascada (CRCA), amplificación mediada por Q beta replicasa; amplificación de ácidos nucleicos iniciada por cebador isotérmica y quimérica (ICAN); amplificación mediada por transcripción (TMA), y similares. Por lo tanto, cuando se utiliza el término PCR, debe entenderse que incluye otros procedimientos de amplificación alternativos.

Adicionalmente, se entiende que los colorantes de unión a ADNbc incluyen intercaladores, así como otros colorantes que se unen a ácidos nucleicos, siempre que el colorante se una de forma diferencial a ácidos nucleicos bicatenarios y monocatenarios, o produzca de otro modo una señal diferencial basada en la cantidad de ácido nucleico bicatenario.

En otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer procedimientos para el análisis de ácidos nucleicos. En una realización, se da a conocer un procedimiento de determinación del genotipo que comprende las etapas de amplificar el ácido nucleico diana en presencia de un colorante de unión a ADNbc que tiene un porcentaje de saturación de, como mínimo, el 50%, fusionar el ácido nucleico diana amplificado para generar una curva de fusión e identificar el genotipo a partir de la curva de fusión. En otra realización, se da a conocer un procedimiento de rastreo de mutaciones que comprende las etapas de añadir un colorante de unión a ADNbc que tiene un porcentaje de saturación de, como mínimo, el 50% a una muestra que comprende un ácido nucleico diana, amplificar el ácido nucleico diana en presencia del colorante de unión a ADNbc, fusionar el ácido nucleico diana amplificado para generar una curva de fusión, repetir las etapas (b) y (c) en una segunda muestra para obtener una segunda curva de fusión, y comparar las curvas de fusión. En otra realización más, se da a conocer un procedimiento de análisis por PCR que comprende las etapas de mezclar un colorante de unión a ADNbc que tiene un porcentaje de saturación de, como mínimo, el 50% con una muestra que comprende un ácido nucleico diana y cebadores configurados para amplificar el ácido nucleico diana, amplificar el ácido nucleico diana en presencia del colorante de unión a ADNbc, y monitorizar la fluorescencia del colorante de unión a ADNbc. La monitorización puede ocurrir durante la amplificación, ser posterior a la amplificación o ambas.

Se da a conocer un procedimiento que comprende las etapas de un procedimiento de análisis por PCR que comprende las etapas de mezclar un colorante de unión a ADNbc con una muestra que comprende un ácido nucleico diana y cebadores configurados para amplificar el ácido nucleico diana, amplificar el ácido nucleico diana en presencia del colorante de unión a ADNbc, monitorizar la fluorescencia del colorante de unión a ADNbc, generar una curva de fusión para el ácido nucleico diana, normalizar la curva de fusión, repetir las etapas de mezclado, amplificación, normalización y generación con, como mínimo, un ácido nucleico diana adicional y comparar las curvas de fusión normalizadas.

Se da a conocer un procedimiento para análisis de ácido nucleicos que comprende las etapas de mezclar un ácido nucleico diana que es, como mínimo, parcialmente bicatenario con un colorante de unión a ADNbc que tiene un porcentaje de saturación de, como mínimo, el 50% para formar una mezcla, y generar una curva de fusión para el ácido nucleico diana midiendo la fluorescencia procedente del colorante de unión a ADNbc a medida que se calienta la mezcla.

Pueden utilizarse diversos colorantes de unión a ADNbc en las realizaciones de la presente invención, tal como se describe en el presente documento.

Características adicionales de la presente invención se volverán evidentes para los expertos en la materia, al considerar la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

- 5 La figura 1 muestra la determinación del genotipo del Factor V Leiden utilizando LightCycler Green. Se muestra la primera derivada negativa (-dF/dT) de la curva de fusión.
- 10 La figura 2 muestra el efecto de velocidades de enfriamiento antes del análisis de la fusión sobre la detección de heterodúplex.
- La figura 3 muestra el efecto de velocidades de calentamiento durante el análisis de la fusión sobre la detección de heterodúplex.
- 15 La figura 4 muestra un sistema modelo para detectar seis combinaciones de heterodúplex.
- Las figuras 5A-D muestran una comparación de procedimientos de determinación del genotipo; La figura 5A muestra el mapa de fibrosis quística en el que la posición de una marca opcional en un cebador está marcada (estrella), La figura 5B muestra la determinación del genotipo utilizando un cebador marcado, La figura 5C muestra la determinación del genotipo utilizando LightCycler Green y la figura 5D muestra un intento de determinar el genotipo utilizando SYBR[®] Green I (Homocigotos: ---- ts, - F508del, Heterocigotos: --- F508del, --- I507del, ---- F508C).
- 20 La figura 6 muestra la determinación del genotipo utilizando LightCycler Green en amplicones más largos (---- homocigoto (TT), - homocigoto (CC), --- heterocigoto (TC). Se muestran las curvas de fusión para tres individuos (no las derivadas).
- 25 Las figuras 7A-B muestran curvas de fusión derivadas de mezclas de ADN utilizando SYBR[®] Green I (figura 7A) y LightCycler Green (figura 7B).
- 30 La figura 8 demuestra la no linealidad del cambio de fluorescencia cuando múltiples especies de ADN están presentes. Se muestran LightCycler Green (círculos huecos) y SYBR[®] Green I (cuadrados macizos).
- 35 Las figuras 9A-B muestran valoraciones de colorante para determinar porcentajes de saturación, en la figura 9A, ◆- SYBR[®] Green, ■- SYBR[®] Gold, ▲- Pico Green, en la figura 9B, ○ LightCycler Green, ■ SYTOX[®] Green. Los intervalos de PCR ilustrativos para SYBR[®] Green I y LightCycler Green se indican mediante la caja sombreada.
- La figura 10 ilustra el efecto de las concentraciones de colorante sobre la temperatura de fusión.
- 40 Las figura 11A-B muestran los espectros de excitación y emisión para LightCycler Green (figura 11A) y SYBR[®] Green I (figura 11B).
- 45 Las figuras 12A-D muestran análisis de la curva de fusión de alta resolución de muestras por cuadruplicado de seis genotipos diferentes dentro de un fragmento de 110 pb de beta-globina (--- SS, - AA, --- CC, --- SC, AC, ---- AS); La figura 12A muestra datos sin procesar obtenidos de fusión de alta resolución de muestras por cuadruplicado de cada genotipo; La figura 12B muestra curvas de fusión de alta resolución normalizadas de las muestras por cuadruplicado de los seis genotipos; La figura 12C muestra curvas de fusión de alta resolución, normalizadas, con desplazamiento de temperatura de las muestras por cuadruplicado de los seis genotipos. Las muestras se sometieron a desplazamiento de temperatura para solapar las curvas entre el 5 y el 10% de fluorescencia; La figura 12D muestra curvas de diferencia de fluorescencia obtenidas de los datos de la figura 12C. Cada curva de diferencia se obtuvo sustrayendo cada muestra de la curva normal (AA) para obtener los datos de diferencia. Aunque se realizaron muestras por cuadruplicado, debido al solapamiento, en algunos casos aparecen menos de cuatro muestras.
- 50 La figura 13A muestra análisis de la curva de fusión de muestras por duplicado de tres genotipos de un fragmento de 544 pb del gen del receptor 2A de 5-hidroxitriptamina humano (HTR2A) (--- TC, - CC, ---- TT). Los datos han sido normalizados y la temperatura se ha desplazado utilizando la parte entre el 10 y el 20% de fluorescencia. Un mapa de fusión teórico del homodúplex se muestra como la figura 13B. La posición del polimorfismo de único nucleótido está marcada (X).
- 60 La figura 14 muestra una curva de diferencia de seis genotipos de un fragmento de 612 pb del gen regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR). Los gráficos han sido normalizados, la temperatura se ha desplazado superponiendo la parte entre el 30 y el 40% de fluorescencia, y se ha sustraído de uno de los gráficos de tipo silvestre.
- 65 La figura 15 muestra el árbol genealógico de la familia Utah 1331 referenciada como CEPH.

El genotipo de HLA-A de la familia Utah 1331 son los siguientes: A:02011; B:3101; C:2402101; D:03011; E:01011. Cada individuo está numerado. Hembra (círculo); macho (cuadrado).

Las figuras 16A y B muestran la curva de fusión de los miembros de la familia Utah 1331. Existen seis curvas de fusión diferentes que representan seis genotipos en el exón 2 de HLA-A entre 17 miembros de la familia. La figura 16A muestra la curva de fusión completa y la figura 16B muestra una parte aumentada (mostrada en el recuadro en 16A) con la designación de genotipo, y la designación de los individuos entre paréntesis.

La figura 17 muestra la determinación de genotipos de dos muestras mediante mezcla (----BM15,-- - - --BM16, - - - - BM1+BM16). Dos muestras homocigóticas BM15(0101) y BM16(0201) tienen una diferencia de 15 pb en el exón 2 de HLA-A. Las curvas de fusión de BM15 y BM16 son similares cuando se toman por separado, pero cuando se mezclan, la falta de coincidencia de 15 pb desplaza la curva de fusión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

SYBR[®] Green I es un colorante utilizado ampliamente para análisis de fusión, dado que muestra un gran cambio de fluorescencia durante PCR (Wittwer CT, y otros, *Biotechniques* 1997; 22: 130-1, 134-8; Wittwer CT, y otros, *Real-Time PCR*. En: Persing D, y otros, eds. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Press, 2004: en prensa). Posiblemente, dichos colorantes podrían utilizarse tanto para determinación del genotipo homocigótico como para rastreo en busca de alteraciones de secuencia heterocigóticas. SYBR[®] Green I se utilizó por primera vez en análisis de fusión para distinguir diferentes productos de PCR que diferían en T_m en 2°C o más (Ririe KM, y otros, *Anal Biochem* 1997; 245: 154-160). Posteriormente, SYBR[®] Green I se utilizó para identificar deleciones (Aoshima T, y otros, *Clin Chem* 2000; 46: 119-22), repeticiones dinucleotídicas del genotipo (Marziliano N, y otros, *Clin Chem* 2000; 46: 423-5), e identificar diversas alteraciones de secuencia (Lipsky RH, y otros, *Clin Chem* 2001; 47: 635-44; Pirulli D, y otros, *Clin Chem* 2000; 46: 1842-4; Tanriverdi S, y otros, *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3237-44; Hladnik U, y otros, *Clin Exp Med.* 2002; 2: 105-8). Sin embargo, la diferencia en T_m entre genotipos puede ser pequeña y puede desafiar a la resolución de los actuales instrumentos. De hecho, se sugirió que SYBR[®] Green I, "no debe utilizarse para aplicaciones de determinación del genotipo rutinarias" (von Ahsen N, y otros, *Clin Chem* 2001; 47: 1331-1332). La determinación del genotipo mediante la curva de fusión con colorantes de ADN específicos de cadena doble utilizados habitualmente puede incluir una T_m incrementada con ensanchamiento de la transición de fusión (Douthart RJ, y otros, *Biochemistry* 1973; 12: 214-20), y la compresión de la diferencia de T_m entre genotipos (figura 5D). Estos factores rebajan el potencial de SYBR[®] Green I para discriminación del genotipo.

La amplificación de ADN heterocigótico produce cuatro cadenas sencillas diferentes que crean dos productos de homodúplex y dos de heterodúplex cuando se desnaturalizan y se enfrían. Teóricamente, los cuatro productos tienen diferentes T_m y la curva de fusión debe ser un compuesto de las cuatro transiciones de bicatenario a monocatenario. Sin embargo, colorantes de ADN específicos de cadena doble pueden redistribuirse durante la fusión (Aktipis S, y otros, *Biochemistry* 1975; 14: 326-31), causando la liberación del colorante de heterodúplex de fusión a baja temperatura y redistribución a homodúplex de fusión a elevada temperatura. Dado que SYBR[®] Green I no causa saturación a concentraciones compatibles con PCR (Wittwer CT, y otros, *Biotechniques* 1997; 22: 130-1, 134-8; figura 9), dicha redistribución es plausible y consecuente con la ausencia de una transición de heterodúplex (figura 5D).

LightCycler Green y otros colorantes pueden utilizarse para aplicaciones de determinación del genotipo y rastreo. Cuando solamente un producto de PCR es amplificado y la secuencia es homocigótica, solamente se forman homodúplex. Con los colorantes de la presente invención, las diferencias de T_m entre diferentes genotipos de homodúplex no están comprimidas (figura 5C), y es posible una clara diferenciación entre genotipos. Los colorantes de la presente invención también pueden identificar y distinguir múltiples productos presentes en una reacción, homodúplex de forma ilustrativa generados a partir de amplificación de múltiples loci o múltiples dianas que son homocigóticos. En contraste, la mayor parte del tiempo solamente unos pocos productos pueden observarse con SYBR[®] Green I, presumiblemente debido a la redistribución del colorante (véase la figura 7A).

Cuando se amplifican una o más dianas heterocigóticas, los productos de heterodúplex son fácilmente observables con los colorantes de la presente invención. La capacidad de detectar e identificar heterodúplex es particularmente útil para detectar genotipos heterocigóticos, así como para rastrear mutaciones desconocidas. Esto no es posible con colorantes de ADNbc convencionales utilizados en PCR en tiempo real, tales como SYBR[®] Green I, SYBR[®] Gold y bromuro de etidio, donde los productos de heterodúplex no son observables.

Las cadenas de heterodúplex pueden reasociarse con su complemento perfecto y formar homodúplex durante la fusión. Dado que la concentración de productos al final de la PCR es elevada, esta reasociación sucede rápidamente. La reasociación puede minimizarse limitando el tiempo en que los productos están cerca de sus temperaturas de fusión, particularmente entre las T_m de los productos de heterodúplex y homodúplex. Además de la reasociación de cadena durante la fusión, la hibridación selectiva de una cadena con su contrapartida de correspondencia perfecta, o con su cadena complementaria no correspondiente, resulta influida por las velocidades de enfriamiento. En condiciones presentadas en el presente documento, la formación de heterodúplex resulta la más favorecida por el rápido enfriamiento y a menudo desaparece a velocidades más lentas de -0,1°C/s (figura 2). Esto

5 contrasta con las técnicas de HPLC desnaturizantes, donde las velocidades de enfriamiento son mucho más lentas (de $-0,01$ a aproximadamente $-0,02^{\circ}\text{C/s}$), aunque ya se forman heterodúplex eficazmente (Xiao W, y otros, Hum Mutat 2001; 17: 439-74). Quizás las velocidades relativas de formación de homodúplex y heterodúplex dependen fuertemente del tamaño del producto, y los resultados obtenidos utilizando pequeños amplicones pueden no ser habituales para los productos más grandes utilizados más habitualmente en dHPLC.

10 La discriminación entre genotipos homocigóticos puede mejorar mediante fusión a velocidades más lentas, a expensas de un mayor tiempo de análisis. Una fuente de error potencial en la determinación del genotipo mediante la curva de fusión es el efecto de la concentración de ADN sobre la T_m . Utilizando un amplicón de 100 pb aleatorio del 50% de contenido de GC en condiciones de PCR, la diferencia de T_m entre productos a $0,05 \mu\text{M}$ y $0,5 \mu\text{M}$ es de aproximadamente $0,7^{\circ}\text{C}$ (von Ahsen N, y otros, Clin Chem 2001; 47: 1956-61; Wetmur JG, Crit Rev Biochem Mol Biol 1991; 26: 227-59). Este cambio puede ser importante cuando las T_m de diferentes genotipos homocigóticos están muy cerca. Sin embargo, diferentes muestras de PCR tienden a formar una fase meseta a la misma concentración de producto, así que las diferencias de concentración post-amplificación habitualmente son mínimas. 15 Además, puede ser posible estimar las concentraciones de amplicón mediante fluorescencia en tiempo real y ajustar las T_m para una precisión de la determinación del genotipo aún mayor. Como alternativa, puede utilizarse PCR asimétrica para limitar automáticamente la concentración final de producto de PCR.

20 Con LightCycler Green, es posible distinguir todos los heterocigotos de base única de homocigotos. En la detección de heterocigotos, la temperatura de fusión absoluta y la influencia de la concentración de ADN no son tan importantes como con procedimientos que implican diferencia entre genotipos homocigóticos. Los heterodúplex afectan a la forma de la curva de fusión, particularmente en la parte "temprana", de baja temperatura de la transición. Diferentes curvas de fusión pueden hacerse corresponder con temperatura trasladando el eje X para superponer la parte "tardía", de alta temperatura de la transición. La presencia o ausencia de heterodúplex puede inferirse con mayor precisión. 25

30 Sea cual sea la precisión del instrumento, algunos genotipos serán casi idénticos en T_m . Una manera de detectar variantes homocigóticas con la misma T_m es mezclar las variantes entre sí. Los heterodúplex resultantes se fundirán a temperaturas más bajas que los homodúplex, mostrados como una caída en las curvas de fusión normalizadas antes de la transición de fusión principal.

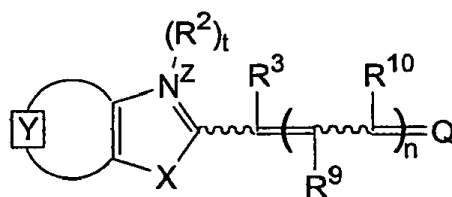
35 Por lo tanto, utilizando dispositivos de amplificación por PCR disponibles actualmente, LightCycler Green puede identificar heterodúplex en transiciones de la curva de fusión que no pueden ser identificadas actualmente utilizando SYBR[®] Green I. Una posible razón por la que SYBR[®] Green I no puede identificar fácilmente transiciones de fusión a baja temperatura se muestra en la figura 7A. Cuando varios fragmentos de ADN de estabilidad creciente están presentes, los picos de baja temperatura son muy pequeños con SYBR[®] Green I en comparación con LightCycler Green. Durante la fusión, SYBR[®] Green I puede liberarse de los dúplex de baja temperatura, solamente para unirse a dúplex que se funden a temperaturas más elevadas. Esto hace que cada pico sucesivo sea mayor que el último; con los picos a temperatura más baja siendo muy pequeños, si es que son observables en absoluto. Tal como se ve 40 en la figura 7B, los productos de fusión a baja temperatura son detectados fácilmente con LightCycler Green, pero no mediante SYBR[®] Green I.

45 Las ventajas de utilizar LC Green han conducido a la identificación de otros colorantes de ADNbc que son compatibles con PCR y son adecuados para determinar el genotipo a concentraciones compatibles con PCR. Muchos de los colorantes útiles en el procedimiento de la presente invención pertenecen a una familia de cianinas. Los colorantes de cianina son aquellos colorantes que contienen uno o más restos divalentes "-C(R)=" dispuestos en una cadena que se enlaza a dos heterociclos que contienen nitrógeno. El grupo "R" puede ser hidrógeno o cualquier sustituyente de carbono, y es ilustrativamente hidrógeno o alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} , que puede estar opcionalmente sustituido. Se entiende que, en colorantes de cianina donde hay más de un resto divalente "-C(R)=", 50 cada "R" puede seleccionarse independientemente. Dichos colorantes de cianina pueden ser monómeros o dímeros, tal como se define adicionalmente mediante las fórmulas generales ilustrativas descritas en el presente documento. Además de los colorantes de cianina, en el presente documento se contempla que otras familias de colorantes de unión a ADNbc también son útiles en las mezclas de reacción, procedimientos, y composiciones de PCR descritas en el presente documento, incluyendo aunque sin limitarse a los mismos, intercaladores de fenantridinio y 55 metalintercaladores a base de fenantroliina.

60 Los colorantes ilustrativos útiles en las presentes mezclas de reacción, procedimientos, y composiciones de PCR incluyen, PO-PRO[™]-1, BO-PRO[™]-1, SYTO[®] 43, SYTO[®] 44, SYTO[®] 45, SYTOX[®] Blue, POPO[™]-1, POPO[™]-3, BOBO[™]-1, BOBO[™]-3, LO-PRO[™]-1, JO-PRO[™]-1, YO-PRO[®]-1, TO-PRO[®]-1, SYTO[®] 11, SYTO[®] 13, SYTO[®] 15, SYTO[®] 16, SYTO[®] 20, SYTO[®] 23, TOTO[™]-3, YOYO[®]-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), GelStar[®] (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME), naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) y nuevos colorantes G5, H5, D6, E6, P6, R6, Y6, Z6 y D8 descritos en el presente documento.

65 Los colorantes de cianina ilustrativos para su utilización en las mezclas de reacción, procedimientos y composiciones de PCR descritos en el presente documento también incluyen monómeros o dímeros de cianinas

asimétricas que tienen estructuras centrales de piridinio, pirimidinio, quinolinio, isoquinolinio, o purinio, y aquellos descritos en general mediante la fórmula I:



Fórmula I

- 5 en la que
- el resto \boxed{Y} representa un anillo aromático mono o policíclico fusionado o heteroaromático que contiene nitrógeno, opcionalmente sustituido;
- 10 X es oxígeno, azufre, selenio, telurio, o un grupo seleccionado entre $C(CH_3)_2$ y NR^1 , donde R^1 es hidrógeno o alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} y alquilo C_{2-6} ;
- R^2 es alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} y alquilo C_{2-6} , cicloalquilo, incluyendo cicloalquilo C_{3-8} , arilo, arilalquilo, incluyendo aril(alquilo C_{1-2}), hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono y dialquilaminoalquilo, trialquilammonioalquilo, alquil y arilcarbonilo, alquil y arilcarboxamida, alquil y arilsulfonilo, alquilenocarboxilato, alquilenocarboxamida, alquilenosulfonato, ácido alquilenosulfónico y similares, un resto que contiene un heteroátomo cíclico, o un resto que contiene un heteroátomo acíclico, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido; restos que contienen un heteroátomo ilustrativos incluyen heteroalquilo opcionalmente sustituido, incluyendo metoximetilo, etoxietilo, y similares, heterociclilo, incluyendo piperidinilo, y similares, alquil y arilsulfonatos, incluyendo metilsulfonato, 4-clorofenilsulfonato, y similares, alcoxi, incluyendo metoxi, etoxi, y similares, amino, incluyendo metilamino, dimetilamino, y similares, derivados de carbonilo, incluyendo alquil y arilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, alcoxicarbonilo, y similares, heteroalquenoilo, incluyendo alquenalminoalquilo, alquenoiloxialquilo, alquilaminoalquenoilo, alquiloalquenoilo, alquilidenoaminoalquilo, y similares, heteroalilo, ésteres, aminas, amidas, enlaces fósforo-oxígeno y fósforo-azufre; e incluyendo restos que contienen un heteroátomo tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.658.751 y la publicación PCT No. WO 00/66664;
- 15 $t = 0$ ó 1 ;
- Z es una carga seleccionada entre 0 ó 1 ;
- 20 R^3 , R^9 , y R^{10} , se seleccionan, cada uno independientemente, entre hidrógeno y alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} y alquilo C_{2-6} ;
- 25 $n = 0, 1, \text{ ó } 2$; y
- 30 Q es un heterociclo, tal como un piridinio, un pirimidinio, un quinolinio o un purinio, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.
- 35 El término "alquilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, en general, a un resto de hidrocarburo lineal u opcionalmente ramificado que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, incluyendo de forma ilustrativa aunque sin limitarse a los mismos metilo (Me), etilo, propilo, butilo, dodecilo, 4-etilpentilo, y similares.
- 40 El término "cicloalquilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, en general, a un resto de hidrocarburo lineal u opcionalmente ramificado, como mínimo una parte del cual forma uno o dos anillos, que comprende de 3 a aproximadamente 14 átomos de carbono, incluyendo de forma ilustrativa aunque sin limitarse a los mismos ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, 4-metilciclohexilo, 2,3-dimetilciclopentilo, 3,5-dimetilciclohexiletilo, y similares.
- 45 El término "arilo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a un resto aromático cíclico, que incluye de forma ilustrativa aunque sin limitarse a los mismos fenilo (Ph), naftilo, furilo, tienilo, pirrolo, pirazolo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, tiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, quinazalinilo, y similares.
- 50 La expresión "opcionalmente sustituido", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, en general, a la sustitución opcional de uno o más átomos de hidrógeno presentes en el grupo parental, incluyendo aquellos
- 55

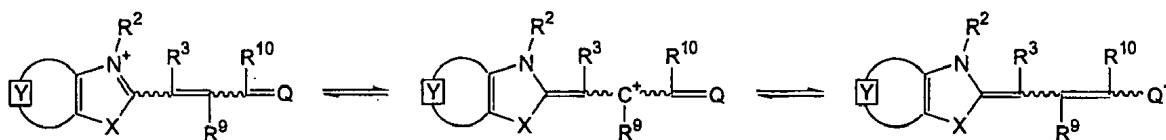
5 presentes en átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre, por un sustituyente, tal como halo; hidroxilo; amino; tio; alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, halocicloalquilo; alcoxi, cicloalcoxi, haloalcoxi; monoalquilo y dialquilamino; aminoalquilo; monoalquilo y dialquilaminoalquilo; alquiltio; alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, y arilcarbonilo; alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, y arilcarbonilo; alquilo, haloalquilo, cicloalquilo, y arilsulfonilo; y derivados de carboxilo, tales como ácidos carboxílicos, ésteres y amidas. Se aprecia que la sustitución de átomos de hidrógeno proximales, incluyendo hidrógenos geminales y vecinales, puede ser tal que los sustituyentes que sustituyen a aquellos hidrógenos proximales se toman conjuntamente para formar un anillo en espiral o un anillo fusionado, respectivamente.

10 Se aprecia que, cada uno de los términos descritos anteriormente puede utilizarse en combinación de maneras químicas relevantes para referirse a otros restos, tales como arilalquilo refiriéndose a un grupo arilo, tal como se define en el presente documento, enlazado a un grupo alquilo, tal como se define en el presente documento, para formar estructuras que incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, bencilo, fenetilo, picolinilo, 3,5-dimetoxipicolin-4-ilo, y similares.

15 Se aprecia que las estructuras de colorante de cianina descritas en el presente documento pueden contener centros quirales. En esos casos, se entiende que todos los estereoisómeros están incluidos en la descripción de estas estructuras de colorante de cianina, a menos que se indique otra cosa. Dichos estereoisómeros incluyen isómeros activos ópticamente puros, mezclas racémicas y mezclas de diastereómeros que contienen cualquier cantidad relativa de una o más configuraciones estereoisoméricas.

20 Se aprecia también que las estructuras de colorante de cianina descritas en el presente documento pueden contener centros geométricos. En esos casos, se entiende que todos los isómeros geométricos están incluidos en la descripción de las estructuras de colorante de cianina, a menos que se indique otra cosa. Dichos isómeros geométricos incluyen isómeros *cis*, *trans*, *E* y *Z*, en forma pura o en diversas mezclas de configuraciones geométricas. Se entiende también que, dependiendo de la naturaleza del doble enlace contenido en las estructuras de colorante de cianina, dichos isómeros de doble enlace pueden interconvertirse entre configuraciones *cis* y *trans*, o entre *E* y *Z* dependiendo de las condiciones, tales como composición del disolvente, polaridad del disolvente, fuerza iónica y similares.

25 Se aprecia, además, que cuando la carga Z es mayor que 0, pueden existir varios tautómeros de los compuestos de fórmula I, incluyendo mezclas de dichos tautómeros. De forma ilustrativa, la carga Z puede estar localizada formalmente en el átomo de nitrógeno tal como se representa en la fórmula I, o en uno de los átomos de carbono que forman el enlazador de polieno que conecta los dos heterociclos o, como alternativa, la carga puede estar localizada en el heterociclo Q. Los tautómeros de los compuestos cargados de fórmula I puede representarse reordenando la configuración de doble enlace-enlace sencillo de los compuestos de fórmula I, tal como las estructuras ilustrativas:



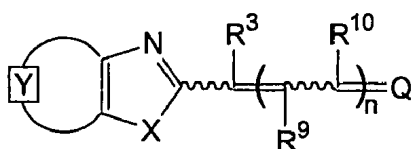
40 en las que \boxed{Y} , X, R², R³, R⁹, R¹⁰ y Q, son tal como se definen para la fórmula I, y t = 1, Z = 1 y n = 1. Los compuestos de colorante de cianina descritos en el presente documento incluyen cualquiera de los varios tautómeros posibles, o diversas mezclas en equilibrio de esos tautómeros. Se entiende que la ubicación de la carga

45 formal está influida por la naturaleza de los restos \boxed{Y} , X, R², R³, R⁹, R¹⁰ y Q. Se entiende, además, que el tautómero o la mezcla en equilibrio de tautómeros favorecidos puede depender de condiciones, tales como composición del disolvente, polaridad del disolvente, fuerza iónica, formulación y similares. Se entiende que la expresión "estructuras de resonancia" también se refiere a esas diversas ubicaciones de la carga y es igualmente descriptiva de fórmulas ilustradas anteriormente.

50 Se entiende también que, cuando los compuestos de fórmula I portan una carga neta, tal como donde Z es 1, o donde está presente en los compuestos de fórmula I un sustituyente cargado, tal como un grupo amonio, o un grupo ácido sulfónico, estos compuestos de fórmula I están acompañados por un contraión. Cualquier contraión monovalente, divalente o polivalente está incluido en la descripción de las estructuras de colorante de cianina contenidas en el presente documento. Los contraiones ilustrativos incluyen contraiones cargados negativamente tales como yoduro, cloruro, bromuro, hidróxido, óxido, acetato, trifluoroacetato, monofosfato, difosfato, trifosfato, y similares, y contraiones cargados positivamente tales como litio, sodio, potasio, cesio, amonio, polialquilamonio, y similares. Dichos contraiones pueden surgir de los procedimientos sintéticos utilizados, el protocolo de purificación u otros procesos de intercambio iónico.

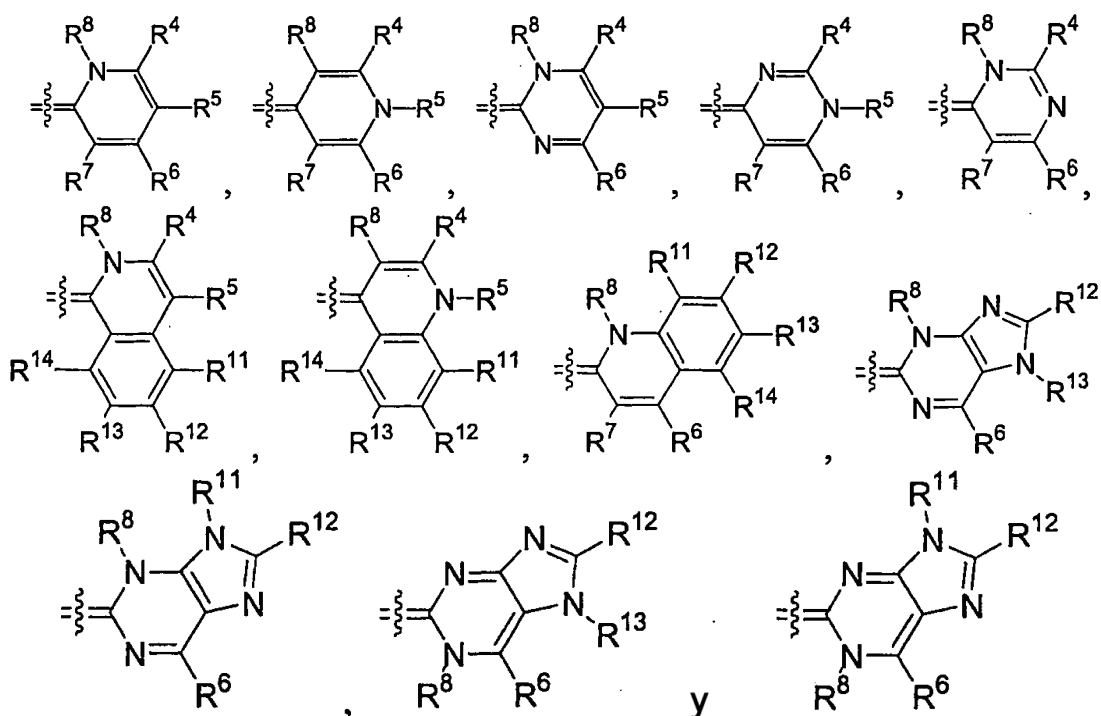
Se cree que la naturaleza o el tipo de contraiones no parecen influir en la funcionalidad de los colorantes de cianina descritos en el presente documento. Se aprecia que, cuando los colorantes descritos en el presente documento se disuelven en disolventes u otros medios utilizados para poner en práctica las mezclas de reacción, procedimientos y composiciones de PCR descritos en el presente documento, el contraión acompañante puede intercambiarse con otros contraiones que están presentes en los disolventes u otros medios. Dichos contraiones adicionales pueden ser iones de disolvente, sales, tampones y/o metales.

Se aprecia que el grupo R^2 puede ser virtualmente cualquier grupo que surge de la reacción nucleófila entre el compuesto parental de fórmula I, donde $t = Z = 0$:



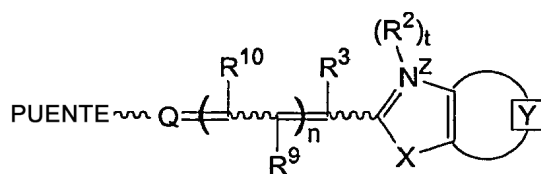
y un compuesto que tiene la fórmula R^2-L , en la que L es un grupo saliente adecuado, y R^2 es tal como se ha definido anteriormente. De forma ilustrativa, R^2 es un grupo alquilo, acilo, arilo, ácido sulfónico o sulfonilo opcionalmente sustituido, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. Los grupos salientes L ilustrativos incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, haluros, tales como cloruro y bromuro, acilatos, tales como acetato, formiato y trifluoroacetato, sulfonatos, tales como metilsulfonato, trifluorometilsulfonato y toilsulfonato, sulfatos, tales como metilsulfato y similares.

En una realización ilustrativa, Q es un heterociclo tal como, aunque sin limitarse a los mismos:



en los que $R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{11}, R^{12}, R^{13}$ y R^{14} se seleccionan, cada uno independientemente, entre el grupo que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, polialquenilo, alquinilo, polialquinilo, alquenilalquinilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio y dialquilamino, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

En otra realización ilustrativa, uno de $R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{11}, R^{12}, R^{13}$ y R^{14} es un resto que contiene un heteroátomo, tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.658.751. En otra realización ilustrativa, uno de $R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{11}, R^{12}, R^{13}$ y R^{14} es un grupo reactivo, incluyendo aunque sin limitarse a los mismos, halógenos, hidroxilo, alcóxidos, aminas, ácidos carboxílicos, haluros, alcoholes, aldehídos, tioles, alquil y ariltioles, alquil y arilsulfonilos, ésteres succinimídicos, cetonas e isotiocianatos que pueden utilizarse para unir restos a la estructura central del colorante, de forma ilustrativa a través de la formación de enlaces carbono-carbono, aminas, amidas, éteres, tioéteres, disulfuros, cetonas, tioureas y bases de Schiff. En otra realización ilustrativa, uno de $R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^{11}, R^{12}, R^{13}$ y R^{14} es un PUENTE-COLORANTE que tiene la fórmula:



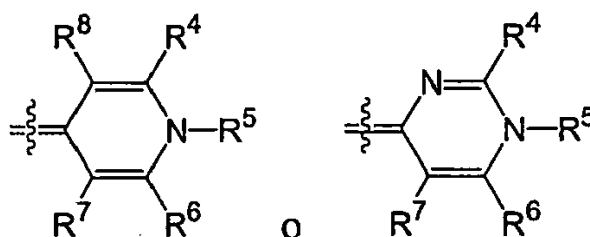
5 en la que \boxed{Y} , X, R², t, Z, R³, R⁹, R¹⁰, Q y n son tal como se definen para la fórmula I, y el PUENTE es un único enlace covalente, o una unión covalente que es lineal o ramificada, cíclica o heterocíclica, saturada o insaturada, que tiene 1-16 átomos no de hidrógeno tales como carbono, nitrógeno, fosfato, oxígeno y azufre, de modo que la unión contiene cualquier combinación de enlaces alquilo, éter, tioéter, amina, éster o amida; enlaces carbono-carbono sencillos, dobles, triples o aromáticos; enlaces fósforo-oxígeno, fósforo-azufre, nitrógeno-nitrógeno o nitrógeno-oxígeno; o enlaces aromáticos o heteroaromáticos. Se aprecia que, en algunas realizaciones, esta estructura dimérica es simétrica alrededor del PUENTE, y en otras realizaciones, esta estructura dimérica es

10 asimétrica alrededor del PUENTE, en las que por ejemplo, cualquiera de \boxed{Y} , X, R², t, Z, R³, R⁹, R¹⁰ y n se seleccionan cada uno independientemente en cada caso a cada lado del PUENTE.

Los colorantes ilustrativos para su utilización en la presente invención también incluyen colorantes de cianina de

15 fórmula I que tienen una estructura central de piridinio o pirimidinio en la que X es oxígeno o azufre; el resto \boxed{Y} representa un benzo fusionado opcionalmente sustituido, naftaleno fusionado opcionalmente sustituido, piridino fusionado opcionalmente sustituido, pirimidino fusionado opcionalmente sustituido, quinolino fusionado opcionalmente sustituido, y similares; n = 0 ó 1; t = 0 ó 1; R² es alquilo, tal como metilo y etilo, arilo opcionalmente sustituido, tal como fenilo o toliolo, un alquilenosulfonato, tal como ácido propilenosulfónico, o alquilsulfonilo, tal como CH₃(CH₂)_mSO₂, donde m es 0, 1, 2 ó 3; y Q es un heterociclo seleccionado entre el grupo de estructuras que

20 comprende:



25 en la que

R⁴ es hidrógeno, alcoxi, incluyendo metoxi, etoxi, propiloxi, y similares; alquiltio, incluyendo metiltio, etiltio y similares; heterociclilalquilo, incluyendo piperidinilo, pirrolidinilo, piperazinilo, opcionalmente sustituidos y similares; o heterociclilalquilo incluyendo un grupo cargado, incluyendo 4,4-dimetilpiperazinio-1-ilo, y similares; o un grupo reactivo, incluyendo halo, hidroxilo, alcoxi, tio, alquil y ariltio, alquil y arilsulfonilo, amino, formilo, alquil y arilcarbonilo, derivados de carboxilo, y similares;

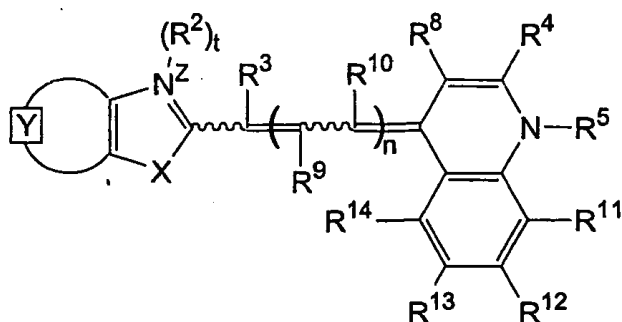
30 R⁵ es alquilo C₁₋₆, incluyendo metilo, etilo, butilo, *sec*-butilo, isobutilo, y similares; fenilo opcionalmente sustituido; o (CH₂)₃N⁺(Me)₃; y

35 R⁶, R⁷ y R⁸, son, cada uno independientemente, hidrógeno o metilo.

Los colorantes ilustrativos para su utilización en el presente documento también incluyen colorantes de cianina de

40 fórmula I que tienen una estructura central de piridinio o pirimidinio en la que X es oxígeno o azufre; el resto representa un benzo fusionado opcionalmente sustituido, que forma un anillo benzoxazolio o benzotiazolio opcionalmente sustituido, o un nafto fusionado opcionalmente sustituido, que forma un anillo naftoxazolio o naftotiazolio opcionalmente sustituido; n = 0 ó 1; t = 0 ó 1; R² es alquilo, tal como metilo, arilo, tal como fenilo o toliolo, un alquilenosulfonato, tal como ácido propilenosulfónico, o alquilsulfonilo, tal como CH₃(CH₂)_mSO₂, donde m es 0, 1, 2 ó 3; y Q es un heterociclo de 4-piridinio o 4-pirimidinio.

45 Los colorantes ilustrativos para su utilización en el presente documento también incluyen colorantes de cianina útiles en las mezclas de reacción, procedimientos, y composiciones de PCR descritas en el presente documento con estructuras centrales de quinolinio, y descritos en general mediante la fórmula II:



Fórmula II

en la que

5 el resto representa un anillo aromático mono o policíclico fusionado o heteroaromático que contiene nitrógeno, opcionalmente sustituido;

X es oxígeno, azufre o un grupo seleccionado entre $C(CH_3)_2$, y NR^1 , donde R^1 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} ;

10 R^2 es alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} y alquilo C2-6, cicloalquilo, incluyendo cicloalquilo C_{3-8} , arilo, arilalquilo, un alquilenosulfonato, un resto que contiene un heteroátomo cíclico, o un resto que contiene un heteroátomo acíclico, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

$t = 0$ ó 1 ;

15 Z es una carga seleccionada entre 0 ó 1 ;

R^3 , R^9 y R^{10} se seleccionan, cada uno independientemente, entre hidrógeno y alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} ;

$n = 0, 1$ ó 2 ; y

20 R^4 , R^5 , R^8 , R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} son tal como se describen en el presente documento para la fórmula I, siempre que R^4 sea un resto con un peso molecular de menos de aproximadamente 115, o de forma ilustrativa un peso molecular de menos de aproximadamente 105.

25 Los colorantes ilustrativos para su utilización en la presente invención también incluyen colorantes de cianina de fórmula II en la que el resto representa un benzo fusionado opcionalmente sustituido, formando de este modo un anillo benzoxazolio o benzotiazolio; X es oxígeno o azufre; $n = 0$ ó 1 ; $t = 0$ ó 1 ; R^2 es metilo;

30 R^4 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , incluyendo metilo, o fenilo opcionalmente sustituido;

R^5 es alquilo C_{1-6} , incluyendo metilo, o fenilo opcionalmente sustituido;

R^8 es hidrógeno, y

35 R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} son hidrógeno o alcoxi, incluyendo metoxi.

En otras realizaciones, los colorantes para su utilización en la presente invención también incluyen de forma
ilustrativa colorantes de cianina de fórmula II, en la que el resto \boxed{Y} representa un heterociclo opcionalmente
40 sustituido, incluyendo 1-metilpirido y 3-bromo-1-metilpirido; X es oxígeno o azufre; $n = 0$ ó 1 ; $t = z = 0$;

R^4 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} , incluyendo metilo;

R^5 es alquilo C_{1-6} , incluyendo metilo, fenilo opcionalmente sustituido o heteroalquilo, incluyendo heteroalquilo que
45 tiene un grupo cargado tal como el grupo $-(CH_2)_3N(Me)_3$;

R^8 es hidrógeno; y

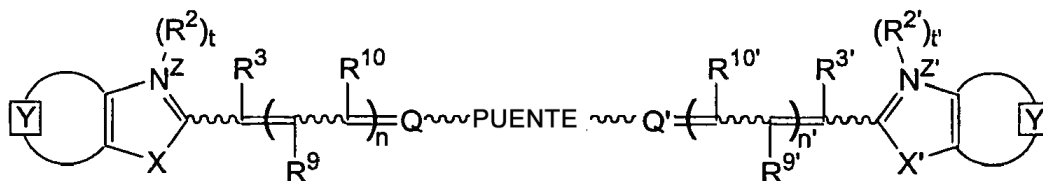
R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} son hidrógeno, alquilo, incluyendo metilo o alcoxi, incluyendo metoxi.

50 En otra realización, dos compuestos de fórmula I se toman conjuntamente para formar un dímero. Los dos compuestos se enlazan entre sí sustituyendo uno de los sustituyentes R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} , tal como se han definido anteriormente, presentes en cada uno de los compuestos de fórmula I, por un único enlazador

divalente. De forma ilustrativa, dos compuestos de fórmula I se toman conjuntamente para formar un dímero, donde los dos sustituyentes R^5 presentes en los dos compuestos de fórmula I son sustituidos por un único enlazador divalente. Se aprecia que, en el presente documento, se contemplan dímeros tanto simétricos como asimétricos de compuestos de fórmula I. En el caso de dímeros asimétricos de compuestos de fórmula I, se entiende que dicha asimetría puede surgir formando dímeros a partir de compuestos de fórmula I que tienen diferentes patrones de sustitución, o que tienen diferentes heterociclos Q. Además, dicha asimetría puede surgir formando dímeros a partir de compuestos de fórmula I donde diferentes sustituyentes se sustituyen por el enlazador divalente, tal como sustituyendo de forma ilustrativa R^5 en un primer compuesto de fórmula I y sustituyendo R^8 en un segundo compuesto de fórmula I por el enlazador divalente.

En otra realización, dos compuestos de fórmula II se toman conjuntamente para formar un dímero. Los dos compuestos se enlazan entre sí sustituyendo uno de los sustituyentes R^4 , R^5 , R^8 , R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} , tal como se han definido anteriormente, presentes en cada uno de los compuestos de fórmula II por un único enlazador divalente. De forma ilustrativa, dos compuestos de fórmula II se toman conjuntamente para formar un dímero, donde los dos sustituyentes R^5 presentes en los dos compuestos de fórmula II se sustituyen por un único enlazador divalente. Se aprecia que, en el presente documento, se contemplan dímeros tanto simétricos como asimétricos de compuestos de fórmula II. En el caso de dímeros asimétricos de compuestos de fórmula II, se entiende que dicha asimetría puede surgir formando dímeros a partir de compuestos de fórmula II que tienen diferentes patrones de sustitución, o que tienen diferentes heterociclos Q. Además, dicha asimetría puede surgir formando dímeros a partir de compuestos de fórmula II donde diferentes sustituyentes se sustituyen por el enlazador divalente, tal como sustituyendo de forma ilustrativa R^5 en un primer compuesto de fórmula II y sustituyendo R^8 en un segundo compuesto de fórmula II con el enlazador divalente.

Las estructuras de colorante de cianina diméricas formadas por compuestos de fórmula I también pueden representarse mediante la fórmula III:



Fórmula III

en la que

los restos \boxed{Y} y $\boxed{Y'}$ representan cada uno un anillo aromático mono o policíclico fusionado o heteroaromático que contiene nitrógeno, opcionalmente sustituido, seleccionado independientemente;

X y X' se seleccionan, cada uno independientemente, entre oxígeno, azufre, selenio, telurio o un grupo seleccionado entre $C(CH_3)_2$, NR^1 o $NR^{1'}$, donde R^1 y $R^{1'}$ son, cada uno independientemente, hidrógeno o alquilo C_{1-6} ;

R^2 y $R^{2'}$ se seleccionan, cada uno independientemente, entre alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} , cicloalquilo, incluyendo cicloalquilo C_{3-8} , arilo, arilalquilo, incluyendo aril(alquilo C_{1-2}), un resto que contiene un heteroátomo cíclico, o un resto que contiene un heteroátomo acíclico, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido;

$t = 0$ ó 1 ;

$t' = 0$ ó 1 ;

Z y Z' son cada uno una carga seleccionada independientemente entre 0 ó 1 ;

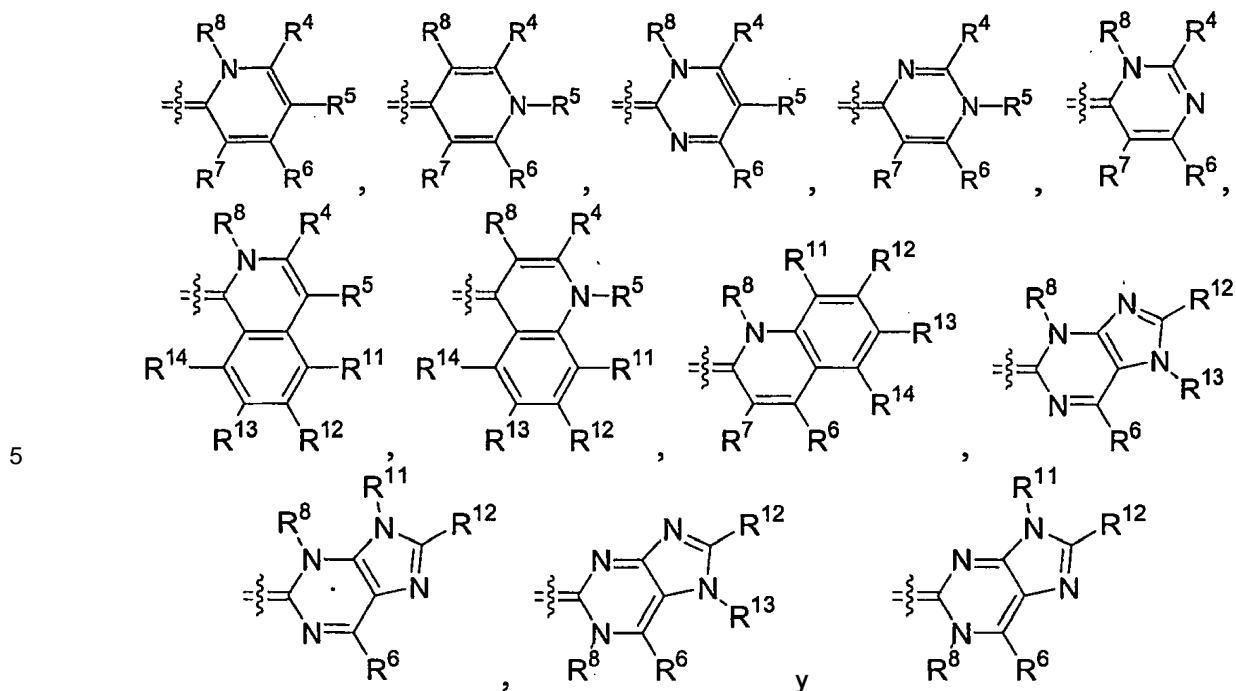
R^3 , R^9 , R^{10} , R^3' , R^9' y $R^{10'}$ se seleccionan, cada uno independientemente, entre hidrógeno y alquilo, incluyendo alquilo C_{1-6} ;

$n = 0, 1$ ó 2 ;

$n' = 0, 1$ ó 2 ;

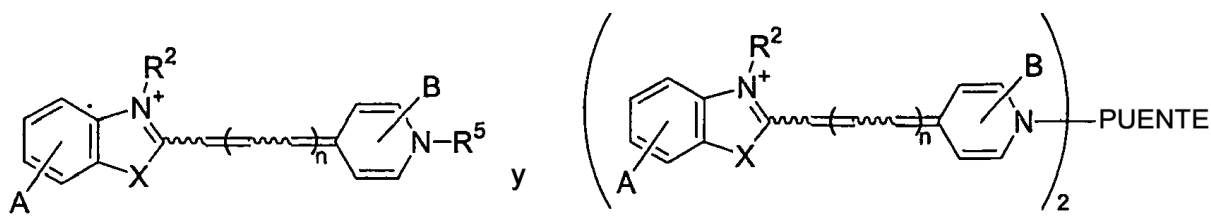
El PUENTE es un enlazador divalente que comprende de 2 a aproximadamente 30 unidades divalentes seleccionadas entre alquileno, heteroalquileno, alquilamindilo, alquilalquilamoniodiilo, y similares, tales como $(CH_2)_p$, $(CH_2)_pN^+Me_2(CH_2)_q$, $(CH_2)_pN^+Me_2(CH_2)_qN^+Me_2(CH_2)_r$, y similares, donde p, q y r se seleccionan, cada uno independientemente, entre 1, 2 y 3; y

Q y Q' son heterociclos, seleccionado cada uno independientemente entre el grupo de estructuras que comprende:



10 en las que R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ están en cada caso en compuestos de fórmula III seleccionados independientemente entre el grupo que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, polialquenilo, alquinilo, polialquinilo, alquinilalquinilo, arilo, heteroarilo, y cicloalquilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

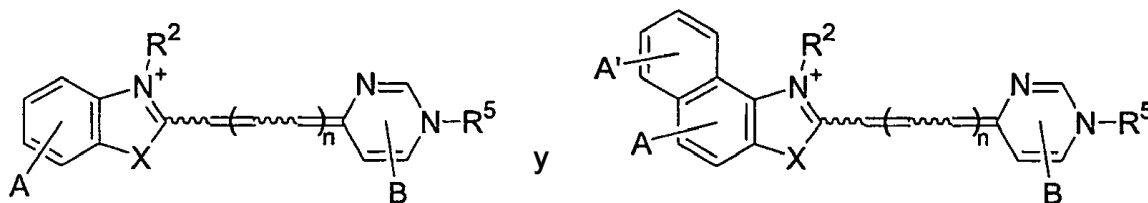
15 Los colorantes de cianina ilustrativos útiles en las presentes mezclas de reacción, procedimientos, y composiciones de PCR también incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, LightCycler Green, PO-PROTM-1, BO-PROTM-1, SYTO[®] 43, SYTO[®] 44, SYTO[®] 45, SYTOX[®] Blue, POPOTM-1, POPOTM-3, BOBOTM-1, BOBOTM-3, y otros colorantes que tienen las fórmulas generales IV:



Fórmula IVa

Fórmula IVb

20 y los colorantes G5, H5, D6, E6, P6, R6, Y6, Z6 y D8 presentados en el ejemplo 14, y otros colorantes que tienen las fórmulas generales V:



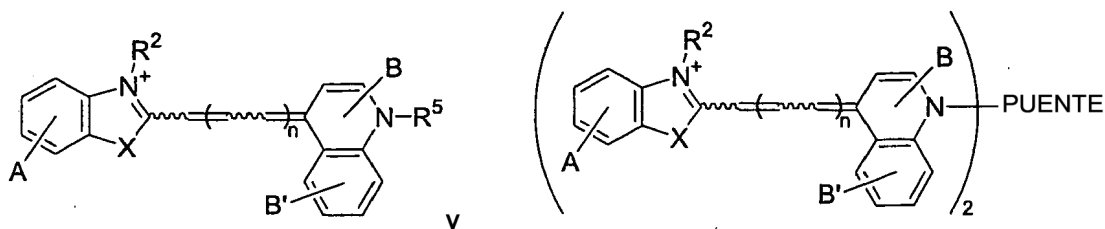
Fórmula Va

Fórmula Vb

25 en las que n es 0, 1 ó 2; R² es alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono y dialquilaminoalquilo, trialquilamonioalquilo, alquilenocarboxilato, alquilenocarboxamida, alquilenosulfonato, y similares; R⁵ es alquilo,

hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono o dialquilaminoalquilo, trialquilaminoalquilo, alquilenocarboxilato, alquilenocarboxamida, alquilenosulfonato, fenilo opcionalmente sustituido, y similares; X es oxígeno o azufre; A, A' y B representan, cada uno, uno o más sustituyentes opcionales seleccionados de forma independiente, tales como alquilo, halo, amino, haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquilo y arilsulfonilo, haloalquilsulfonilo, alquil y arilitio, formilo, alquil y arilcarbonilo, derivados de carboxilo, mono y dialquilamino, trialquilamino, dialquilaminoalquilo, trialquilaminoalquilo, o un heterociclo incluyendo pirrolidino, piperidino, piperazino, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por alquilo, amino, mono o dialquilaminoalquilo, trialquilaminoalquilo, o puede estar opcionalmente cuaternizado en el nitrógeno con un grupo alquilo, y similares; un PUENTE es un enlazador divalente que tiene la fórmula $(CH_2)_pN^+Me_2(CH_2)_q$, donde p y q son independientemente 2 ó 3, que incluye el enlazador divalente $(CH_2)_3N^+Me_2(CH_2)_3$. Se entiende que cuando estos colorantes tienen una carga neta, están acompañados por uno o más contraiones, tales como contra aniones incluyendo haluro, alcanoato, fosfato, y similares, y contra cationes incluyendo litio, sodio, potasio, cesio, amonio y similares.

Otros colorantes ilustrativos para su utilización en el presente documento incluyen, aunque sin limitarse a los mismos YO-PRO[®]-1, TO-PRO[®]-1, SYTO[®] 11, SYTO[®] 13, SYTO[®] 15, SYTO[®] 16, SYTO[®] 20, SYTO[®] 23, TOTO[™]-3, YOYO[®]-3 (Molecular Probes, Inc.), GelStar[®] (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME), naranja de tiazol (Aldrich), y otros colorantes que tienen las fórmulas generales VI:



Fórmula VIa

Fórmula VIb

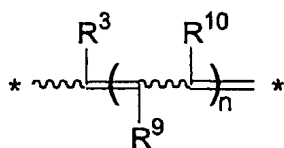
en las que n es 0, 1 ó 2; R² es alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono y dialquilaminoalquilo, trialquilaminoalquilo, alquilenocarboxilato, alquilenocarboxamida, alquilenosulfonato, y similares; R⁵ es alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono o dialquilaminoalquilo, trialquilaminoalquilo, alquilenocarboxilato, alquilenocarboxamida, alquilenosulfonato, fenilo opcionalmente sustituido, y similares; X es oxígeno o azufre; A, B y B' representan, cada uno, uno o más sustituyentes opcionales seleccionados de forma independiente, tales como alquilo, halo, amino, mono y dialquilamino, pirrolidino, piperidino, piperazino, fenilo, hidroxilo, alcoxi, tio y alquilitio, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por alquilo, amino, mono o dialquilaminoalquilo, trialquilaminoalquilo, y similares; y el PUENTE es un enlazador divalente que tiene la fórmula $(CH_2)_pN^+Me_2(CH_2)_q$, donde p y q son independientemente 2 ó 3, que incluye el enlazador divalente $(CH_2)_3N^+Me_2(CH_2)_3$. Se entiende que, cuando estos colorantes tienen una carga neta, están acompañados por uno o más contraiones, tales como contra aniones incluyendo haluro, alcanoato, fosfato y similares, y contra cationes incluyendo litio, sodio, potasio, cesio, amonio y similares.

Además, la tabla 1 (que se da a conocer en el ejemplo 13 a continuación) muestra una comparación de varios colorantes de ADNbc que se utilizan habitualmente durante o después de PCR, así como diversos colorantes que no han sido utilizados anteriormente para análisis por PCR. Los resultados iniciales han indicado que LC Green, PO-PRO[™]-1, JO-PRO[™]-1, BO-PRO[™]-1, G5, H5, D6, P6, Y6 y D8 son colorantes bastante prometedores para la detección de heterodúplex. Existen varias características sorprendentes de estos colorantes. En primer lugar, no inhiben significativamente la PCR a una saturación del 50%. De hecho, niveles de saturación bastante cercanos al 100% son compatibles con PCR con tres de estos colorantes. En segundo lugar, aunque algunos de los colorantes emiten en el intervalo del azul, estos son compatibles con la utilización en el canal de fluorescencia de diversos instrumentos disponibles actualmente. El ajuste de los componentes ópticos para corresponder mejor a los espectros de excitación/emisión de estos colorantes puede mejorar más su sensibilidad para utilización en análisis de amplificación cuantitativos o cualitativos.

Se entiende que los colorantes de cianina anteriores son ilustrativos, y otros colorantes de cianina pueden ser útiles en los procedimientos descritos en el presente documento.

Algunas cianinas asimétricas a base de quinolinio tales como, aunque sin limitarse a las mismas, SYBR[®] Green I, SYTOX[®] Green, SYTO[®] 14, SYTO[®] 21, SYTO[®] 24, SYTO[®] 25, TOTO[™]-1 y YOYO[®]-1 no han demostrado ser útiles para la detección de heterodúplex o para la detección de múltiples productos en un sistema en tubo cerrado. Cuando el colorante es un monómero de una cianina a base de quinolinio, es posible que sustituciones en masa en el carbono próximo al nitrógeno del anillo de quinolinio (posición equivalente a R⁴) interfieran en la capacidad del colorante para funcionar en los procedimientos de la presente invención. Las sustituciones en masa son, por ejemplo, restos alifáticos o aromáticos que contienen un heteroátomo ramificados de cadena larga sustituidos por restos alifáticos de cadena ramificada que son mayores que el PM de aproximadamente 105. Esta restricción, sin embargo, no se aplica a ninguna de las cianinas de piridinio o pirimidinio mencionadas anteriormente. En el caso de

dímeros de cianina a base de quinolinio, la distancia entre los sistemas de anillo izquierdo y derecho, tal como se define mediante el fragmento divalente:



también parece determinar la funcionalidad. La funcionalidad puede determinarse mediante detección de heterodúplex, tal como se enseña en el presente documento en los ejemplos 13-14. Otros colorantes descritos anteriormente como útiles en monitorización en tiempo real de PCR, tales como SYBR[®] Gold, Pico Green y bromuro de etidio también han demostrado ser ineficaces en detección de heterodúplex en un sistema de PCR en tubo cerrado.

Los colorantes para su utilización en la presente invención pueden utilizarse en un procedimiento a base de colorantes para la determinación del genotipo de SNP, que requiere solamente dos cebadores de oligonucleótidos no marcados y un pocillo para cada genotipo de SNP, y que no requieren PCR en tiempo real. Se utiliza un colorante de ADNbc de modo que los heterocigotos son identificados por la presencia de heterodúplex que alteran la forma de la curva de fusión post-amplificación. Diferentes genotipos homocigóticos se diferencian por su diferencia de T_m , o a continuación mezclando una muestra de ADN homocigótico conocido con el desconocido y buscando heterodúplex. De forma ilustrativa, el diseño del cebador de PCR se simplifica enormemente dado que pueden utilizarse amplicones muy cortos, preferentemente que flanquean inmediatamente al SNP. Dichos amplicones cortos también amplifican de forma muy eficaz, reducen el riesgo de amplificar dianas alternativas, y permiten un ciclado térmico muy rápido.

El diseño de cebadores de PCR no es una ciencia exacta, y a menudo es necesario un proceso empírico. Aunque generalmente se aceptan algunas reglas para el diseño de cebadores de PCR, la validez de estas reglas no ha sido puesta a prueba. Dado que el efecto de diferentes genotipos sobre curvas de fusión es mayor con amplicones cortos, los amplicones cortos son preferentes (≤ 100 pb), y los amplicones lo más cortos posible son a menudo los mejores, (≤ 50 pb). Por lo tanto, para diseñar cebadores para determinación del genotipo con colorantes de ADNbc, se empieza de forma ilustrativa con cada cebador flanqueante justo a continuación de la posición del SNP. Es decir, la longitud del amplicón será la longitud del cebador 1, más la longitud del cebador 2, más la longitud de la región que es necesario poner a prueba (la longitud de un SNP es 1). Para una amplificación eficaz, la temperatura de fusión (T_m) de los dos cebadores debe ser casi la misma. T_m convenientes para cebadores pueden ser de 50 a 70 grados C. Los cebadores con la T_m más alta permitirán ilustrativamente el ciclado térmico más rápido, mientras que los cebadores con T_m más baja son generalmente menos costosos y producen los amplicones más cortos, dando como resultado mayores diferencias de determinación del genotipo. Longitudes del cebador entre 12 y 30 bases se utilizan habitualmente. De forma ilustrativa, cada cebador se construye lejos del SNP hasta que la T_m calculada es la más cercana a la T_m deseada. Los procedimientos para el cálculo de la T_m se conocen bien en la técnica (por ejemplo, Clin. Chem. 2001; 47: 1956-61). En general, las longitudes de los cebadores no serán iguales cuando las T_m coinciden lo máximo posible. Por ejemplo, las longitudes de cebador utilizadas en el ensayo con Factor V SNP (figura 1) son 17 y 24 bases de largo ambas con una T_m coincidente calculada T_m cerca de 62°C.

Los parámetros de ciclado térmico para amplificación pueden ser muy cortos, dado que se requiere poca extensión del cebador para dichos amplicones cortos. Después de una desnaturalización inicial del ADN genómico antes del ciclado térmico, no es necesario mantener las temperaturas de desnaturalización e hibridación, y el tiempo de extensión puede ser de 10 s o menos. Es posible incluso reducir el tiempo de extensión programado a cero, permitiendo que cada ciclo se realice en menos de 20 s. Como alternativa, puede utilizarse un tiempo de extensión de 1 s. Debido a que el amplicón es tan corto, no se requieren grandes cantidades de polimerasa (pueden utilizarse $<0,6$ unidades por 10 μ l).

Por lo tanto, las siguientes etapas ilustrativas pueden ser seguidas por determinación del genotipo de SNP, según la presente invención:

1. Seleccionar una T_m diana y empezar con el extremo 3' de cada cebador justo adyacente a la posición del SNP. Opcionalmente, un cebador puede desplazarse alejándose ligeramente de la posición del SNP para evitar complementariedad 3' entre cebadores para reducir el riesgo de formación de dímeros del cebador.
2. Diseñar cada cebador hacia fuera hasta que la T_m calculada sea lo más cercana posible a la T_m diana.
3. Someter a un ciclo térmico rápido a la muestra en presencia de reactivos de PCR y un colorante de ADNbc que permite la detección de heterodúplex.

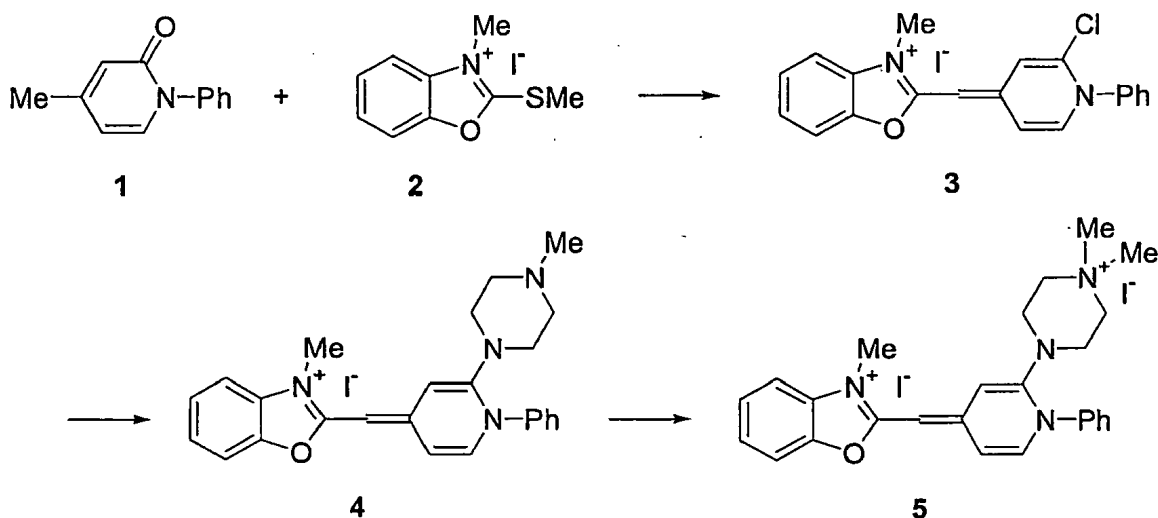
4. Formar heterodúplex mediante enfriamiento rápido a una velocidad de, como mínimo, $-0,1^{\circ}\text{C/s}$, preferentemente, como mínimo, -2°C/s y de la forma más preferente, como mínimo, -5°C/s después de la desnaturalización.

5. Calentar a de $0,1$ a $0,5^{\circ}\text{C/s}$ y adquirir una curva de fusión.

6. Si la amplificación falla, mover el extremo 3' de uno de los cebadores hacia fuera 1 base y repetir todas las etapas hasta tener éxito.

10 En un ejemplo ilustrado, todos los heterocigotos pueden detectarse mediante el efecto de los heterodúplex sobre la curva de fusión (figura 4). Además, 4 de 6 diferencias homocigóticas (A frente a C, A frente a G, C frente a T y G frente a T) se distinguen muy fácilmente mediante desplazamiento de T_m (figura 4, flechas). Sin embargo, para distinguir homocigotos de A frente a T, puede ser necesaria fusión de alta resolución y, en algunos casos, homocigotos de C frente a G no pueden ser diferenciados ni siquiera con fusión de alta resolución. En los casos en los que la diferenciación de homocigotos es difícil, una muestra de un genotipo homocigótico conocido puede mezclarse en cantidades aproximadamente iguales con el genotipo desconocido antes o después de la amplificación. La mezcla se amplifica (si no se amplificó previamente), se desnaturaliza y se fusiona. Si los genotipos son iguales, la curva de fusión de la mezcla será la misma que la curva de fusión del genotipo homocigótico conocido. Si los genotipos son diferentes, se producirán heterodúplex y se identificarán mediante la forma alterada de la curva de fusión. De forma ilustrativa, pueden utilizarse amplicones pequeños cuando se determina el genotipo para variantes de secuencia conocidas. Los amplicones grandes pueden ser preferentes cuando se rastrea en busca de variantes desconocidas.

25 Pueden prepararse colorantes de cianina asimétricos mediante un procedimiento general que une la parte de benzazolio de la molécula a la parte de piridinio (o quinolinio, pirimidinio, purinio) a través de uno o más grupos " $-\text{C}(\text{R})=$ ". Tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.436.134 y en referencias citadas en ese documento, el número de grupos " $-\text{C}(\text{R})=$ " viene determinado por los reactivos sintéticos específicos utilizados en la síntesis. En la síntesis de colorantes de monometina ($\text{R} = \text{H}$, $n = 0$) tales como LC Green, se utiliza una combinación de reactivos en la que el átomo de carbono de metina resulta de A en la sal de benzazolio o B en la sal de piridinio que es metilo y siendo el otro de A o B un grupo saliente reactivo que es habitualmente metililo, metilsulfonilo, o cloro, pero que puede ser cualquier grupo saliente que proporciona suficiente reactividad para completar la reacción. Una posible manera de preparar LC Green y otros colorantes similares es la siguiente:



35 El material de partida, el compuesto 1 se prepara calentando 4-metil-2-piridinona (Aldrich) a la temperatura de reflujo con polvo de cobre, carbonato potásico y yodobenceno durante 48 horas. La reacción se enfría a temperatura ambiente, se divide entre agua y acetato de etilo, se filtra, y la capa orgánica se seca sobre sulfato de magnesio. El producto impuro se purifica en una columna de gel de sílice, eluyendo con acetato de etilo/hexanos a 1:1 para dar el compuesto 1.

Otro material de partida, el compuesto 2, se prepara añadiendo 2-(metililo)benzoxazol a yoduro de metilo en DMF y calentando en un tubo sellado a 150°C durante una hora para obtener el compuesto 2, como la sal de yoduro.

45 Una mezcla del compuesto 1, oxiclorigo de fósforo, y una cantidad catalítica de DMF en cloruro de metileno se calienta a la temperatura de reflujo durante 24 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se añade otro volumen de cloruro de metileno, seguido por el compuesto 2 y un equivalente de trietilamina. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 horas. Un sólido se separa por filtración y se purifica utilizando una columna de gel

de sílice eluyendo con una mezcla de acetato de etilo/cloroformo/metanol. El compuesto purificado se redissuelve a continuación en metanol y se añade a un exceso de yoduro sódico en agua. El compuesto 3 se aísla por filtración como la sal de yoduro y se seca al vacío.

- 5 El compuesto 3 se mezcla a continuación con 1-metilpiperazina en 1,2-dicloroetano y se calienta a 55°C durante 2 horas. El producto resultante (compuesto 4) se cuaterniza a continuación añadiendo un exceso de yoduro de metilo y Proton Sponge (Aldrich), y se espera que produzca LightCycler Green (compuesto 5) como la sal de diyoduro.

EJEMPLO 1

- 10 Protocolo de PCR

Se obtuvieron oligonucleótidos marcados y sin marcar de IT Biochem (Salt Lake City, UT), Qiagen Operon (Alameda, CA) o Synthegen (Houston, TX). La PCR se realizó en volúmenes de 10 μ l en un LightCycler[®] (Roche Applied Systems, Indianápolis, IN) con transiciones programadas de 20°C/s a menos que se indique otra cosa. La mezcla de amplificación incluía 50 ng de ADN genómico como plantilla, 200 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 3 mM, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol 100 mM, pH 8,8, 0,04 U/ μ l de Taq polimerasa (Roche), 500 μ g/ml de albúmina de suero bovino, y 0,5 μ M de cada cebador a menos que se indique otra cosa. Se obtuvo ADN humano con el genotipo determinado de estudios anteriores (Gundry CN, y otros, Genetic Testing, 1999; 3: 365-70; Herrmann M; y otros, Clin Chem 2000; 46: 425-8) o de Coriell Cell Repositories (Camden, NJ). Se incluyó LightCycler Green en la reacción de PCR a 10 μ M a menos que se indique otra cosa. Cuando se utilizó SYBR[®] Green I como indicador, se utilizó una dilución final de 1:10.000 del material de Molecular Probes. El colorante se añadió antes de que se realizara la amplificación por PCR, y la transición de fusión del amplicón se monitoriza en el LightCycler[®] o mediante análisis de fusión de alta resolución. Se distinguen diferentes homocigotos mediante temperatura de fusión del amplicón (T_m). Los heterocigotos se identifican mediante la baja temperatura de fusión de heterodúplex que ensancha la transición de fusión global. El análisis de fusión requiere aproximadamente 1 minuto y no es necesario ningún procesamiento de la muestra después de la PCR.

Para estudiar la sensibilidad de LC Green, SYBR[®] Green I, y otros colorantes de unión a ADNbc, se analizaron genes de polimorfismos en el Factor V Leiden, fibrosis quística (F508del, F508C, I507del, I506V) y HTR2A (T102C). Además, se utilizaron plásmidos manipulados para estudiar sistemáticamente todos los posibles cambios de una única base. Los heterodúplex producidos por amplificación de ADN heterocigótico se detectaron de la mejor manera mediante enfriamiento rápido (como mínimo - 2°C/s) de los productos desnaturalizados, seguido por calentamiento rápido durante el análisis de fusión (de 0,2 a 0,4°C/s). Todos los heterocigotos se distinguieron de los homocigotos por una transición de fusión más amplia. Diferentes homocigotos podrían distinguirse a menudo por su T_m. Homocigotos con un cambio de bases de A a T podrían distinguirse solamente mediante análisis de fusión de alta resolución o mezclando homocigotos. Cambios de bases homocigóticos de G a C no podrían distinguirse de forma reproducible, ni siquiera con análisis de alta resolución, sin mezclar homocigotos. La longitud de los amplicones variaba entre 44 y 331 pb.

Aunque en los ejemplos que se dan a conocer en el presente documento se utiliza LC Green, se entiende que pueden utilizarse otros colorantes de acuerdo con la presente invención.

EJEMPLO 2

- 45 Análisis de la curva de fusión

El análisis de fusión se realizó en el LightCycler[®] inmediatamente después del ciclado, o posteriormente en un instrumento de fusión de alta resolución (HR-1, Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Sin embargo, se entiende que el análisis de la curva de fusión puede realizarse en ausencia de amplificación. Cuando se utilizó el LightCycler[®], las muestras se calentaron en primer lugar a 94°C, se enfriaron a 60°C a un ajuste de programa de -20°C/s, a continuación se fundieron a 0,2°C/s con adquisición continua de fluorescencia. Para fusión a alta resolución, las muestras se amplificaron en primer lugar en el LightCycler[®], a continuación se calentaron momentáneamente en el LightCycler[®] a 94°C y se enfriaron rápidamente (ajuste del programa de -20°C/s) a 40°C a menos que se indique otra cosa. Los capilares del LightCycler[®] se transfirieron a continuación de uno en uno al instrumento de alta resolución y se calentaron a 0,3°C/s a menos que se indique otra cosa. El HR-1 es un instrumento de una única muestra que rodea a un capilar del LightCycler[®] con un cilindro de aluminio. El sistema se calienta mediante calentamiento de Joule a través de un serpentín enrollado alrededor de la parte exterior del cilindro. La temperatura de la muestra se monitoriza con un termopar colocado también dentro del cilindro y se convierte en una señal digital de 16 bits. La fluorescencia se monitoriza mediante epi-iluminación de la punta del capilar (Wittwer CT, y otros, BioTechniques 1997; 22: 176-81) que está colocada en la parte inferior del cilindro y también se convierte en una señal de 16 bits. Aproximadamente se adquieren 50 puntos de datos para cada °C.

En algunos casos, es ventajoso no desnaturalizar el producto después de la PCR antes de la adquisición de la curva de fusión. Por ejemplo, cuando el objetivo es determinar el genotipo del número de secuencias repetidas (por

ejemplo, STR, VNTR), la amplificación puede detenerse en la etapa de extensión durante la fase exponencial de la reacción antes de la fase de meseta, y a continuación se realiza el análisis de fusión. De esta manera, pueden analizarse productos de extensión de homodúplex. Al repetir la determinación del genotipo, los productos de homodúplex pueden ser más informativos que los productos de heterodúplex, especialmente dado que pueden formarse muchos productos de heterodúplex diferentes a partir de diferente alineamiento de las repeticiones. En algunos casos, puede ser útil obtener tanto una curva de fusión de homodúplex (sin desnaturalización previa) como una curva de fusión de heterodúplex (con desnaturalización y la formación de todas las posibles combinaciones de dúplex). La diferencia entre estas dos curvas de fusión da una medida del grado de heterodúplex que pueden formarse, utilizando la misma muestra como "control de homodúplex".

Los datos de LightCycler® y de fusión de alta resolución se analizaron con software especializado redactado en LabView. Los gráficos de fluorescencia frente a temperatura se normalizaron entre el 0 y el 100 por cien definiendo en primer lugar valores de referencia lineales antes y después de la transición de fusión de cada muestra. Dentro de cada muestra, se calculó la fluorescencia de cada adquisición como el porcentaje de fluorescencia entre los valores de referencia superior e inferior a la temperatura de adquisición. En algunos casos, se calcularon gráficos de la derivada de la curva de fusión de los polinomios de Savitsky-Golay en cada punto (Press WH, y otros, eds. Numerical recipes in C, 2ª ed. Nueva York: Cambridge University Press, 1992: 650-5). El análisis de Savitsky-Golay utilizaba un polinomio de segundo grado y una ventana de datos que incluía todos los puntos en un intervalo de 1°C. Las áreas de pico y las temperaturas de fusión se obtuvieron utilizando regresión no lineal de mínimos cuadrados para ajustarse a múltiples Gaussianos. En algunos casos, el eje X para cada curva de fusión normalizada se trasladó, de modo que los trazados se solapaban dentro de cierto intervalo de fluorescencia. Este "desplazamiento de temperatura" corrige cualquier variación de temperatura entre series secundarias e incrementa la capacidad de distinguir heterocigotos de homocigotos. La diferencia entre genotipos también puede aumentarse representando gráficamente la diferencia de fluorescencia entre genotipos a cada temperatura.

EJEMPLO 3

Determinación del genotipo de polimorfismo de único nucleótido con LightCycler Green: determinación del genotipo de la mutación del Factor V Leiden

Se formó un amplicón de 43 pb a partir de cebadores de 18 y 24 bases de longitud, que flanquean inmediatamente la ubicación de la mutación del factor V Leiden. Ambos cebadores tenían una Tm estimada de 62°C. Las muestras se sometieron a un ciclo 35 veces con el siguiente protocolo: 94°C sin retención, 60°C sin retención y 72°C con una retención de 10 s. Después de la amplificación, las muestras se calentaron momentáneamente en el LightCycler® a 94°C, se enfriaron rápidamente (ajuste del programa de -20°C/s) a 60°C, y los productos de PCR se fundieron a 0,2°C/s con adquisición de fluorescencia continua.

Curvas de fusión derivadas de productos de PCR amplificados a partir de diferentes genotipos en el locus Leiden del gen del factor V se muestran en la figura 1. Se utilizó LightCycler Green para monitorización fluorescente de la transición de fusión entre productos bicatenarios y monocatenarios. La mutación de Leiden está ubicada a 19 bases desde un extremo del amplicón. Se muestran los resultados de diez genotipos de Leiden homocigóticos de tipo silvestre, dos heterocigóticos y un homocigótico. La temperatura de fusión del amplicón del mutante homocigótico es de aproximadamente 1°C menos que la temperatura de fusión del homocigótico de tipo silvestre. Las muestras heterocigóticas muestran una transición de fusión a baja temperatura secundaria atribuible a la formación de heterodúplex. Un experimento similar utilizando SYBR® Green I no consiguió detectar esta transición de fusión secundaria en heterocigotos (no se muestran los datos).

Los efectos de la velocidad de enfriamiento y la velocidad de calentamiento se estudiaron utilizando ADN del factor V Leiden heterocigótico en el LightCycler®. Para estudiar el efecto de la velocidad de enfriamiento, las muestras se amplificaron como anteriormente, se calentaron a 85°C y a continuación se enfriaron de 85°C a 60°C a una velocidad de -20; -2; -1, -0,5, o -0,1°C/s, seguido por una velocidad de calentamiento constante de 0,2°C/s para adquisición de la curva de fusión. El enfriamiento rápido era necesario para la formación significativa de heterodúplex (figura 2). No se observaron heterodúplex cuando la velocidad de enfriamiento era de -0,1°C/s o más lenta. La mayor formación de heterodúplex se producía cuando las muestras del capilar se transfirieron rápidamente de agua en ebullición a agua con hielo (no se muestran los datos). Con enfriamiento en el LightCycler®, la formación de heterodúplex parecía entrar en fase de meseta a velocidades programadas más rápidas de -5°C/s (figura 2). Sin embargo, la medición de las temperaturas reales de la muestra mostraba que la velocidad de enfriamiento se incrementaba sólo ligeramente con velocidades programadas más rápidas de -5°C/s: cuando el instrumento estaba programado para enfriar a -20°C/s, la velocidad real era de aproximadamente -6°C/s.

El efecto de la velocidad de calentamiento se estudió enfriando a una velocidad programada de -20°C/s, seguida por fusión a 0,05, 0,1, 0,3 ó 0,5°C/s. El porcentaje relativo de heterodúplex observados era mayor con velocidades más altas (figura 3). La Tm aparente también se desplaza a temperaturas más elevadas a medida que la velocidad aumenta y el proceso de fusión se desvía más del equilibrio (Gundry CN, y otros, Genetic Testing, 1999; 3: 365-70).

EJEMPLO 4

Estudio sistemático de la determinación del genotipo de SNP con plásmidos

5 Se utilizaron plásmidos manipulados para el estudio sistemático de la determinación del genotipo de la curva de fusión de todos los posibles cambios de una sola base. Los plásmidos (DNA Toolbox, Cambrex Bio Science Rockland Inc.) contenían A, C, G o T en una posición definida en medio del 40% de contenido de GC (Highsmith WE, y otros, Electrophoresis 1999; 20: 1186-94). Los cebadores con una T_m de $62 \pm 1^\circ\text{C}$ eran inmediatamente adyacentes a la posición polimórfica. Las plantillas de ADN se utilizaron a 10^5 copias y la PCR se realizó con 35
10 ciclos de 94°C sin retención, 60°C sin retención y 75°C durante 5 s. El LightCycler[®] se utilizó para el análisis de fusión.

La figura 4 demuestra que todos los posibles heterodúplex formados a partir de polimorfismos de base única pueden distinguirse de las muestras de homodúplex. En cada caso, la presencia de heterodúplex da como resultado un resalte a baja temperatura en representaciones de la curva de fusión derivada. Cuando la muestra incluye solamente homodúplex formados a partir de la amplificación de homocigotos, no está presente ningún resalte de baja temperatura. Además, homocigotos de AA o TT se distinguen claramente de homocigotos de CC o GG por su temperatura de fusión. No está claro a partir de estas representaciones gráficas de "baja resolución" (obtenidas en el LightCycler[®]) si todos los heterocigotos pueden distinguirse entre sí, o si AA puede diferenciarse de TT, y CC puede diferenciarse de GG. Sin embargo, los datos de alta resolución (no se muestran) demuestran que AA puede distinguirse de TT, y la mayoría (si no todos) los heterocigotos pueden distinguirse. La estabilidad de homocigotos de CC y GG parece ser muy similar y cualquier diferencia es difícil de resolver en la instrumentación actual, sin mezclar homocigotos.

EJEMPLO 5

Determinación del genotipo del gen de fibrosis quística con cebadores marcados: LightCycler Green o SYBR[®] Green I

30 Se utilizaron KlenTaq1 polimerasa (0,04 U/ μl , AB Peptides, St. Louis, MO), 88 ng de anticuerpo TaqStart (ClonTech, Palo Alto, CA) y Tris 50 mM, pH 8,3 en PCR en lugar de Taq polimerasa y 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol. Se amplificó un fragmento de 44 pb con los cebadores GGCACCATTAAGAAAATAT (SEC ID No. 1) y TCATCATAGGAAACACCA (SEC ID No. 2). El primer cebador se marcó en 5' con Oregon Green, o la reacción se realizó en presencia de SYBR[®] Green I o LightCycler Green. Los cebadores flanquean el punto caliente mutacional que contenía las variantes F508del, I507del y F508C. La PCR se realizó a través de 40 ciclos de 85°C y 58°C (retenciones de 0 s). Se monitorizaron seis muestras durante la adquisición de la curva de fusión en el LightCycler[®].

Curvas de fusión derivadas de productos de PCR amplificados a partir de diferentes genotipos en la región I507/F508 del gen de fibrosis quística se muestran en las figuras 5B-D. Los productos de PCR eran de 41 ó 44 bases de largo (figura 5A). Se utilizó un cebador marcado en 5' (figura 5B), LightCycler Green (figura 5C) o SYBR[®] Green I (figura 5D) para monitorización fluorescente de la transición de fusión entre productos bicatenarios y monocatenarios. Se muestran resultados de dos genotipos homocigóticos y tres heterocigóticos.

45 La estabilidad del dúplex de los diferentes genotipos sigue cálculos teóricos (von Ahlsen N, y otros, Clin Chem 2001; 47: 1956-61), con $F508\text{del} \sim I507\text{del} < \text{tipo silvestre} < F508\text{C}$. Excepto para F508del y I507del, los genotipos son distinguibles mediante las T_m de sus transiciones principales. La desviación estándar de la T_m de 10 muestras de tipo silvestre replicadas era de $0,12^\circ\text{C}$ cuando se fundían en el LightCycler[®]. Cuando estaban fusionadas en el instrumento de alta resolución, la desviación estándar de la T_m de las mismas 10 muestras era de $0,04^\circ\text{C}$.

50 Cuando se amplifica una muestra heterocigótica mediante PCR, se esperan dos proteínas de homodúplex y dos de heterodúplex (Nataraj AJ, y otros, Electrophoresis 1999; 20: 1177-85). Sin embargo, cuando se utilizó SYBR[®] Green I como indicador fluorescente, solamente un único pico de fusión era evidente para cada genotipo (figura 5D). En contraste, cuando se utilizan cebadores marcados o LightCycler Green en las mismas condiciones, aparecían dos picos claramente definidos (figuras 5B y 5C). El pico de temperatura inferior es siempre más pequeño que el pico de temperatura superior, y presumiblemente indica la transición de fusión de uno o ambos productos de heterodúplex. Tal como podría esperarse, los heterocigotos con 3 pb delecionadas (F508del y I507del) daban como resultado picos de heterodúplex que estaban más desestabilizados que picos de heterodúplex de un cambio de base única (F508C). El pico principal del heterocigoto F508C era a una temperatura superior que el tipo silvestre, lo que refleja la mayor estabilidad de la transversión de T a G (Gundry CN, y otros, Genetic Testing, 1999; 3: 365-70).

EJEMPLO 6

Rastreo de mutaciones con LC Green

65 Se estudió el polimorfismo de único nucleótido HTR2A. La PCR se realizó con KlenTaq, TaqStart y Tris tal como se ha descrito para el locus de fibrosis quística. Un fragmento de 331 pb del gen del receptor 2A de hidroxitriptamina

(HTR2A) incluía el polimorfismo común (T102C) dentro del exón 1 (Lipsky RH, y otros, Clin Chem 2001; 47: 635-44). La reacción se cicló 40 veces entre 95°C sin retención, 62°C con una retención de 2 s y 74°C con una retención de 20 s. Se obtuvo una curva de fusión de alta resolución.

5 La figura 6 demuestra que puede utilizarse LightCycler Green para rastrear en busca de variantes de secuencia. Es decir, no es necesario conocer la ubicación de variante de secuencia. La presencia de cualquier variante puede detectarse dentro de un amplicón grande. Tal como se ve en la figura 6, los tres genotipos del polimorfismo de único nucleótido en el gen HTR2A (homocigótico T, homocigótico C y heterocigótico T/C) pueden diferenciarse dentro de un amplicón de 331 pb. La precisión de la curva de fusión y la capacidad de distinguir diferentes genotipos depende
10 de la temperatura y la resolución de fluorescencia del instrumento.

EJEMPLO 7

15 Análisis de la curva de fusión de una escalera de tamaño de ADN: comparación de SYBR® Green I con LightCycler Green

Se mezclaron cien ng de una escalera de tamaño de ADN (escalera de ADN de baja masa, Gibco BRL) que tenía seis especies de ADNbc distintas con SYBR® Green I (1:10,000) o LightCycler Green (10 µM en tampón MgCl₂ 3 mM, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol 100 mM, pH 8,7. Se obtuvo una curva de fusión en el instrumento de alta resolución a 0,1°C/s.
20

Tal como se ha descrito anteriormente, LightCycler Green, a diferencia de SYBR® Green I, puede identificar heterodúplex en transiciones de curva de fusión a concentraciones compatibles con PCR. Una razón por la cual SYBR® Green I no puede identificar fácilmente transiciones de fusión a baja temperatura se ilustra en la figura 7. Cuando están presentes varios fragmentos de ADN de estabilidad creciente, los picos de baja temperatura son muy pequeños con SYBR® Green I en comparación con LightCycler Green. Una explicación es que durante la fusión, SYBR® Green I puede liberarse de dúplex a baja temperatura, solamente para unirse a dúplex que se fusionan a temperaturas más elevadas. Esto hace que cada pico sucesivo sea mayor que el último, con los picos de temperatura más baja siendo muy pequeños, si es que llegan a ser observables. LightCycler Green, que está presente a un nivel de saturación mucho mayor, tiene picos visibles incluso para dúplex a baja temperatura. Aunque LC Green estaba presente a niveles cercanos a la saturación en este ejemplo, sorprendentemente, LC Green puede detectar los picos a baja temperatura cuando está diluido a niveles de saturación del 5-20%. Por ejemplo, los datos ilustrados en la figura 13 se obtuvieron utilizando una concentración de LC Green de 1 µM. Por lo tanto, aunque no se entiende el mecanismo, LC Green y diversos otros colorantes de saturación de la presente invención no parecen redistribuirse durante la fusión.
25
30
35

Si las áreas de cada pico en la figura 7 se determinan y se dividen por la cantidad conocida de cada una de las especies de ADN, puede evaluarse la sensibilidad relativa para cada especie de ADN (figura 8). Tal como se muestra en la figura 8, con LightCycler Green, se favorecen los picos de fusión a baja temperatura, mientras que con SYBR® Green I, se observa un gran aumento de la señal a temperatura elevada.
40

EJEMPLO 8

45 Curvas de valoración de colorantes de ADNbc comunes y determinación del intervalo de concentración útil de LightCycler Green en PCR

Se mezclaron cien ng de la escalera de ADN de baja masa con diferentes concentraciones de colorantes de ADNbc comunes en presencia de MgCl₂ 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 250 µg/ml de BSA y 200 µM de cada dNTP en un volumen final de 10 µl. Las muestras se transfirieron a tubos de LightCycler® y la fluorescencia se midió a 40°C en el fluorímetro en tiempo real. La fluorescencia se normalizó a la fluorescencia máxima obtenida con cada colorante particular.
50

Se realizaron estudios de dilución utilizando un amplicón de HTR2A de 152 pb en volúmenes de 10 µl con Mg²⁺ 3 mM, Tris-HCl 50 mM, pH = 8,3, 500 µg/ml de BSA, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador, 50 ng de ADN genómico, 0,4 U de Taq Polimerasa, y 88 ng de anticuerpo TaqStart, con diluciones de LC Green que variaban de 2 µM a 100 µM. Después de una desnaturalización inicial durante 10 s a 95°C, se realizaron 40 ciclos de 95°C durante 0 segundos, 62°C durante 2 segundos y 72°C durante 20 segundos. Después de acondicionamiento de temperatura adicional en el LightCycler® (95°C durante 0 s, 55°C durante 0 s) las muestras se fundieron en el instrumento de alta resolución con una pendiente de 0,3°C/segundo.
55
60

Las figuras 9A-B muestran las concentraciones de SYBR® Green I y LC Green que son compatibles con PCR. A concentraciones compatibles con PCR, SYBR® Green I está lejos de saturar la cantidad de DNA habitualmente presente al fina de la PCR. LightCycler Green, por el contrario, puede utilizarse en una amplia gama de concentraciones, incluyendo aquellas que son de saturación. Las curvas de fusión habituales en un intervalo de 50 veces de concentración de LightCycler Green se muestran en la figura 10.
65

EJEMPLO 9

Espectros de fluorescencia de SYBR[®] Green I y LightCycler Green

Los espectros de excitación y emisión de SYBR[®] Green I y LightCycler Green unidos a ADN se midieron en un fluorímetro de Photon Technology (FL-1). Se añadió LightCycler Green (10 μ M) o SYBR[®] Green I (1:10.000) a 100 ng de ADN (escalera de ADN de baja masa) en presencia de MgCl₂ 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 250 μ g/ml de BSA y 200 μ M de cada dNTP en un volumen final de 60 μ l.

Los componentes ópticos del LightCycler[®] se corresponden bien con la excitación y emisión de SYBR[®] Green I (figura 11). Incluso aunque el LightCycler Green se corresponda mal con los componentes ópticos de LightCycler[®], la señal de fluorescencia observada en el LightCycler[®] con LightCycler Green a algunas concentraciones compatibles con PCR es mayor que la observada habitualmente de SYBR[®] Green I (no se muestran los datos).

Ejemplo 10

Determinación del genotipo del gen de beta-globina utilizando ajuste del eje X y análisis de la diferencia de fluorescencia

Un fragmento de 110 pb se amplificó a partir de la región de beta globina humana en el cromosoma 11 (Nº de entrada NG_000007). El producto de 110 pb incluía los sitios de las mutaciones de beta-globina comunes HbS y HbC. Se extrajo ADN de gotas de sangre secas de 4 individuos diferentes de cada genotipo común. Los genotipos incluían tipos 3 homocigóticos (AA, SS y CC) y 3 heterocigóticos (AS, AC y SC). Los cebadores directos e inversos fueron ACACAAGTGTGTTCACTAGC (SEC ID No. 3) y CAACTTCATCCACGTTCCACC (SEC ID No. 4), respectivamente. Cada reacción de 10 μ l contenía 50 μ g de ADN genómico, 0,50 μ M de cada cebador, 10 μ M de LC Green, MgCl₂ 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 500 μ g/ml de albúmina de suero bovino, 0,2 mM de cada dNTP, 0,04 U/ μ l de KlenTaq[™] (AB Peptides, St. Louis, MO), 88 ng de anticuerpo TaqStart[™] (CloneTech, Palo Alto, CA). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización previa al ciclado a 95°C durante 5 segundos; 35 ciclos de 94°C durante 0 segundos, 50°C durante 2 segundos, 72°C durante 2 segundos con una pendiente de 2°C por segundo. Se tomaron adquisiciones de fluorescencia individuales para cada muestra después de la extensión de 2 segundos. Después de la amplificación por PCR, las muestras se enfriaron a una velocidad programada de -20°C/segundos. Inmediatamente después del enfriamiento rápido, se realizó la fusión en un instrumento de fusión de alta resolución de 16 bits especializado de 70°C a 93°C a una velocidad de 0,30°C/segundo mientras se adquiría fluorescencia de forma continua.

Los datos de la curva de fusión de alta resolución se obtienen midiendo fluorescencia a medida que la temperatura de la muestra se incrementa. Los datos originales de muestras por cuadruplicado de 6 genotipos de beta-globina se muestran en la figura 12A. Nótese que la magnitud de la fluorescencia es variable entre diferentes muestras debido a diferencias de volumen de muestra y componentes ópticos del capilar variable.

Las diferencias de magnitud entre muestras pueden normalizarse utilizando valores de referencia lineales de cada curva antes y después de la transición principal. Específicamente, se seleccionan dos regiones lineales, una antes y una después de la transición principal. Estas regiones definen dos líneas para cada curva, una línea al 100% de fluorescencia superior y una línea al 0% de fluorescencia inferior. El porcentaje de fluorescencia dentro de la transición (entre las dos regiones) se calcula a cada temperatura como el porcentaje de distancia entre las líneas superior e inferior extrapoladas. El resultado normalizado para los datos de beta globina se muestra en la figura 12B. Las muestras por cuadruplicado de cada genotipo se agrupan claramente entre sí, visto de la forma más clara en este caso a aproximadamente 84-85°C. Sigue existiendo alguna variación dentro de cada genotipo, secundaria a desfases de temperatura entre series (nótese que existe aproximadamente una difusión de 0,2°C de cuadruplicados dentro de genotipos a aproximadamente el 10-20% de fluorescencia). Esta variación de muestra puede producirse entre dos muestras diferentes o incluso entre dos series diferentes de la misma muestra. Diferentes preparaciones, incluyendo preparaciones con diferentes concentraciones de sal, también pueden proporcionar un desfase de temperatura. Sin embargo, para como mínimo una primera aproximación, estas diferencias no afectan a la forma de la curva.

Los desfases de temperatura entre series pueden corregirse desplazando el eje de temperatura de cada curva de modo que se superpongan en un intervalo de fluorescencia dado. De forma ilustrativa, una muestra se selecciona como patrón, y los puntos dentro del intervalo de fluorescencia se ajustan a una ecuación de segundo grado. Para cada curva restante, se calcula el desplazamiento de temperatura requerido para traslación de cada punto dentro del intervalo de fluorescencia en la ecuación de segundo grado. Cada curva es trasladada a continuación mediante el desplazamiento promedio para permitir la superposición de las curvas dentro del intervalo de fluorescencia seleccionado. La amplificación de un heterocigoto produce transiciones de fusión a baja temperatura de heterodúplex así como transiciones de fusión más elevada de homodúplex. Si las curvas se desplazan para superponer su región de homodúplex de temperatura elevada (bajo porcentaje de fluorescencia), los heterodúplex

pueden identificarse por su temprana caída de fluorescencia a temperaturas más bajas, tal como se ve en la figura 12C. Sin embargo, dado que la forma de diferentes homodúplex no varía mucho, el desplazamiento de temperatura de diferentes homodúplex puede oscurecer cualquier diferencia entre ellos.

5 Finalmente, diferentes genotipos se observan de la forma más fácil representando gráficamente la diferencia de fluorescencia entre curvas de fusión normalizadas (y opcionalmente con desplazamiento de temperatura). Un genotipo estándar se selecciona en primer lugar (de forma ilustrativa, se utiliza la beta-globina de tipo silvestre AA). A continuación, la diferencia entre cada curva y el estándar se representa gráficamente frente a la temperatura, tal como se muestra en la figura 12D. El estándar (sustraído de sí mismo) es cero en todas las temperaturas. Otros
10 genotipos trazan trayectorias únicas y pueden identificarse mediante correspondencia del patrón visual. También pueden utilizarse procedimientos automatizados de extracción de características para asignar genotipos. Adicionalmente, aunque los ejemplos ilustrativos utilizan colorantes de saturación y detección de heterodúplex, se entiende que pueden utilizarse representaciones gráficas de desplazamiento de temperatura y diferencia de temperatura para la determinación del genotipo cuando no están presentes heterodúplex, de forma ilustrativa para su utilización en la determinación del genotipo viral en la que el genoma es haploide. Los ejemplos de dicha determinación del genotipo de alta resolución incluyen determinación del genotipo de hepatitis C, determinación del genotipo del virus del papiloma humano, determinación del genotipo de VIH, e identificación bacteriana mediante
15 amplificación de ADN ribosómico.

20 Pueden idearse parámetros individuales que se correlacionan con el genotipo. Por ejemplo, pueden utilizarse curvas normalizadas para determinar la temperatura a la que diferentes genotipos están, digamos fusionados al 10% (90% de fluorescencia). Esto distingue claramente algunos genotipos, pero no otro (figura 12B). Como alternativa, la pendiente máxima de la curva podría utilizarse para distinguir homocigotos de heterocigotos, pero diferentes homocigotos son, a menudo, similares en pendiente máxima. Finalmente, el área bajo las curvas de diferencia (figura 12D) podría utilizarse para definir el genotipo, pero dichas curvas pueden tener un área similar aunque tracen
25 diferentes trayectorias. Aunque una combinación de parámetros puede demostrar ser eficaz para determinación del genotipo automatizada, esta técnica es muy adecuada para correspondencia visual de patrones.

30 Se entiende que otras técnicas de normalización están disponibles y están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el HR-1 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) tiene una configuración que ajustará automáticamente el valor de fluorescencia a una temperatura predeterminada (de forma ilustrativa un valor de fluorescencia de 100 a 40°C), y curvas de fusión de todas las muestras se alinearán a partir del mismo valor de fluorescencia. La diferencia entre la normalización descrita anteriormente y esta normalización automatizada es que con la normalización automatizada, las pendientes de la curva antes y después de la transición no se aplanan.
35

EJEMPLO 11

Análisis de amplicones más grandes

40 Aunque los amplicones más cortos a menudo dan como resultado mayores diferencias en la determinación del genotipo, LightCycler Green también puede utilizarse para determinar el genotipo de amplicones más grandes. Los dominios de fusión de ADN son habitualmente de 50 a 500 pb de longitud, y amplicones más grandes, por ejemplo de 500-800 pb, tienen múltiples dominios de fusión. Una alteración de la secuencia en un dominio puede no afectar a la fusión de los otros dominios, y la variación observada dentro de un dominio puede ser independiente de la longitud del amplicón. Por lo tanto, aunque se dan a conocer ejemplos en el intervalo de 400-650 pb, puede no haber ningún límite superior al tamaño del producto de PCR que puede ser rastreado en busca de la presencia de alteraciones de secuencia.
45

Además, dado que la fusión de un dominio parece ser independiente de la fusión de otros dominios, puede utilizarse un dominio invariable como control interno para ajustar el eje X (eje de temperatura), debido a la variación del instrumento y/o la serie de muestra. Los heterocigotos son distinguibles entre sí y de homocigotos debido a que las formas de las curvas de fusión son diferentes. Las formas de las curvas de fusión se definen por la estabilidad y/o las velocidades de fusión cinética de los heterodúplex y homodúplex presentes. Dado que múltiples dominios de fusión están presentes en amplicones más grandes, la variación de forma puede producirse en cualquier parte de la curva. Ajustando la colocación del eje X de múltiples curvas para solapar la parte invariables de la curva, la parte variable de la curva es mucho más fácil de discernir. Como alternativa, solapando la parte variable de las curvas, si diversos genotipos están presentes, el resto de las curvas variará. Como alternativa, podría realizarse ajuste del eje X añadiendo (1) un ácido nucleico de control externo, o (2) un colorante con una segunda longitud de onda de emisión que no interactúa con el ácido nucleico pero cuya fluorescencia depende de la temperatura (un colorante con un buen coeficiente de temperatura tal como Cy5) a cada muestra antes de la PCR o de la fusión. El desplazamiento del eje de temperatura debe realizarse a continuación según la posición de la transición de fusión del ácido nucleico de control o el perfil de intensidad del colorante de control.
50
55
60

Las figuras 13A y 14 muestran dos ejemplos de análisis de amplicones más grandes. La figura 13A muestra la amplificación de un fragmento de 544 pb del gen del receptor 2A de 5-hidroxitriptamina humano (HTR2A), exón 2 (Nº de entrada NM_000621.1). Los cebadores directo e inverso fueron CCAGCTCCGGGAGA (SEC ID No. 5) y
65

CATACAGGATGGTTAACATGG (SEC ID No. 6), respectivamente. Cada reacción de 10 μ l contenía 50 ng de ADN genómico, 0,50 μ M de cada cebador, 1 μ M de LC Green, $MgCl_2$ 2 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 500 μ g/ml de albúmina de suero bovino, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 U de Klentaq™ (AB Peptides, St. Louis, MO) y 88 ng de anticuerpo TaqStart™ (CloneTech, Palo Alto, CA).

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 40 ciclos de 92°C durante 0 segundos, 60°C durante 2 segundos, 74°C durante 25 segundos. Después de la amplificación por PCR, las muestras se enfriaron a una velocidad programada de -20°C/segundo. Inmediatamente después del enfriamiento rápido, la fusión se realizó en un instrumento de fusión de alta resolución de 16 bits especializado de 70°C a 93°C a una velocidad de 0,30°C/segundo mientras se adquiría fluorescencia de forma continua.

Se amplificaron y analizaron muestras por duplicado de cada genotipo (CC, TC y TT), tal como se muestra en la figura 13A. Los datos se normalizaron y la temperatura se desplazó tal como se ha descrito en el ejemplo 10, excepto que las curvas se superpusieron entre el 10 y el 20% de fluorescencia. La figura 13B muestra un mapa de fusión predicho del homodúplex y la posición del polimorfismo en el dominio de fusión a temperatura más baja. Los datos experimentales muestran dos dominios de fusión aparentes. Todos los genotipos son similares en el dominio de fusión a más alta temperatura. Los genotipos difieren en el dominio de fusión a más baja temperatura, donde el heterocigoto muestra comportamiento típico de heterodúplex de fusión a baja temperatura con la curva del heterocigoto cruzando la curva del homocigoto de fusión a baja temperatura y aproximación al homocigoto de temperatura superior con el incremento de temperatura.

La figura 14 muestra curvas de diferencia para amplificación de un fragmento de 612 pb del gen regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), exón 10 (Nº de entrada M55115). Los cebadores directo e inverso fueron AGAATATACTTCTGCTTAG (SEC ID No. 7) y TATCACTATATGCATGC (SEC ID No. 8), respectivamente. Cada reacción de 10 μ l contenía 50 ng de ADN genómico, 0,50 μ M de cada cebador, 10 μ M de LC Green, $MgCl_2$ 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 500 μ g/ml de albúmina de suero bovino, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 U de Klentaq™ (AB Peptides, St. Louis, MO) y 88 ng de anticuerpo TaqStart™ (CloneTech, Palo Alto, CA). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes; 35 ciclos de 89°C durante 0 segundos, 58°C durante 8 segundos, 74°C durante 35 segundos. Se tomaron adquisiciones de fluorescencia individuales para cada muestra después de la extensión de 35 segundos. Después de la amplificación por PCR, las muestras se enfriaron a una velocidad programada de -20° C/segundo. Inmediatamente después del enfriamiento rápido, se realizó la fusión en un instrumento de fusión de alta resolución de 16 bits especializado de 60°C a 87°C a una velocidad de 0,30°C/segundo mientras se adquiere fluorescencia de forma continua. En este ejemplo, la diferencia del heterocigoto era la mejor cuando la parte media de la curva (30-40% de fluorescencia) se utiliza para ajuste del eje X. Finalmente, la fluorescencia de cada gráfico se sustrajo de uno de los gráficos de tipo silvestre para dar los diferentes gráficos mostrados en la figura 14. Cada alteración de secuencia es claramente diferente del tipo silvestre y todos los genotipos pueden diferenciarse.

EJEMPLO 12

Detección dirigida y multiplexado con LightCycler Green

Puede utilizarse LightCycler Green como donador para excitar a un colorante aceptor unido a una sonda de oligonucleótidos. Dado que el LightCycler Green puede utilizarse a o cerca de concentraciones de saturación para unirse a la sonda hibridada a una alta densidad (aproximadamente dos moléculas de colorante por cada tres pares de bases), el colorante está disponible en toda la longitud de ADN bicatenario para transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Una sonda con un colorante aceptor se añade a la reacción antes de la PCR, se amplifica y se detecta cuando se hibrida con el producto. La unión de LightCycler Green a alta densidad al dúplex proporciona excitación favorable al colorante aceptor en la sonda, produciendo un alto grado de fluorescencia del aceptor. Anteriormente, se utilizaban colorantes con una elevada relación de pb/colorante y solamente producían niveles bajos de fluorescencia del aceptor.

Pueden realizarse experimentos multicolor con múltiples sondas. Por ejemplo, la fusión total del amplicón puede monitorizarse a 470 nm, la emisión de una sonda marcada con fluoresceína podría monitorizarse a 515, una sonda marcada con HEX (que hibrida con un segmento diferente de ADN interno a los cebadores) monitorizada a una tercera longitud de onda, y una sonda marcada con TET (que hibrida con otro segmento diferente interno a los cebadores) monitorizada a una 4ª longitud de onda. La compensación de color, tal como se conoce bien en la técnica, se utiliza para desarrollar las cuatro señales solapantes. El resultado es que la primera señal puede utilizarse para rastrear en busca de mutaciones en todo el amplicón, mientras que la 2ª, 3ª y 4ª señales permiten la determinación del genotipo de regiones más pequeñas dentro del amplicón.

EJEMPLO 13

Otros colorantes de unión a ADNbc

5 La tabla 1 resume las propiedades y características de 37 colorantes diferentes. Doce de los colorantes ensayados no produjeron un pico de heterodúplex cuando se amplificó un genotipo delta F508 heterocigótico (no operativo). Un pico de heterodúplex se detectó con 25 de 37 colorantes diferentes (operativos). La señal de heterodúplex más potente se producía cuando se utilizaba LightCycler Green, con varios colorantes más mostrando también buenas señales de heterodúplex. La mayoría de los colorantes que mostraban heterodúplex fueron compatibles con PCR a concentraciones de saturación o cercanas a la saturación. Esta correlación permite una predicción razonable de los colorantes que pueden detectar heterodúplex mediante análisis de la curva de fusión. Una saturación del 50% proporciona una predicción razonable de la detección de heterodúplex. Aunque faltan algunos colorantes operativos, una porcentaje de saturación de aproximadamente el 80%, el 90% o incluso el 99% puede utilizarse para identificar colorantes capaces de detectar heterodúplex.

15 Además, muchos de los colorantes de cianina asimétricos operativos tienen una baja relación de pb/colorante a una saturación del 50%, particularmente por debajo de 4,0 pb/colorante y más particularmente por debajo de 2,0 pb/colorante. Inicialmente se creía que, debido a esta baja relación de pb/colorante, la redistribución se impedía o minimizaba durante las fases tempranas de fusión y, por lo tanto, los heterodúplex se detectaron más fácilmente. Sin embargo, tal como se ve en la tabla 1, se ha descubierto que algunos colorantes son capaces de detectar heterodúplex incluso con una relación pb/colorante sustancialmente más elevada. Además, colorantes con una baja relación de pb/colorante pueden detectar heterodúplex incluso cuando están presentes en concentraciones sustancialmente por debajo de los niveles de saturación. Por lo tanto, una baja relación de pb/colorante es justamente un factor en la identificación de colorantes adecuados para la formación de heterodúplex.

25 La fluorescencia es preferentemente más potente cuando el coeficiente de excitación molar es elevado (>30.000). Los dos colorantes superiores (en términos de detección de heterodúplex), muestran excitación máxima a 430-455 nm, y emisión máxima a 450-480 nm. Éstas son, en general, longitudes de onda más cortas que las empleadas habitualmente en el canal de fluorescencia de instrumentos en tiempo real habituales. Aún así, la señal de fluorescencia de LightCycler Green es mayor que la obtenida de SYBR® Green I, un descubrimiento sorprendente considerando que SYBR® Green I tiene una mucho mejor correspondencia de longitud de onda con los filtros empleados (figura 11).

TABLA 1.

	Características del colorante			Máxima compatible con PCR		Saturación al 50% ⁵		
	Nombre comercial	e ¹	Ex/Em ²	Colorante (µM) ³	% de Sat ⁴	relación de pb/colorante	Colorante (µM)	% de Het ⁶
No operativo	Bromuro de etidio	5.2K	518/605	16	12	0,15	97	Ninguno
No operativo	SYBR® Green I	--	489/510 ^a	1:5000 ^b	46	--	--	Ninguno
No operativo	SYBR® Gold	--	482/529 ^a	1:40960 ^b	7	--	--	Ninguno
No operativo	Pico Green	--	472/503 ^a	1:640 ^b	17	--	--	Ninguno
No operativo	SYTOX® Green	67K	484/516 ^a	0,5	17	8,8	1,7	Ninguno
No operativo	SYTOX® Orange	79K	514/539 ^a	3,9	36	4,6	3,3	Ninguno
No operativo	TOTO™-1	117K	514/533	0,4	11	17	0,9	Ninguno
No operativo	YOYO®-1	99K	491/509	0,8	67	30	0,5	Ninguno
No operativo	SYTO® 14	60K	517/549	3,9	76	6,8	2,2	Ninguno
No operativo	SYTO® 21	43K	494/517	0,5	28	15	1,0	Ninguno
No operativo	SYTO® 24	58K	490/515	1,0	68	21	0,7	Ninguno
No operativo	SYTO® 25	57K	521/556	1,0	35	8,3	1,8	Ninguno
Operativo	LC Green	--	450/469 ^a	63	99	1,5	10	13,6
Operativo	PO-PRO™-1	50K	435/455	50	100	2,3	6,5	11,2
Operativo	JO-PRO™-1	94K	530/546	12,5	100	7,1	2,1	10,5

	Características del colorante			Máxima compatible con PCR		Saturación al 50%⁵		
	Nombre comercial	e¹	Ex/Em²	Colorante (μM)³	% de Sat⁴	relación de pb/colorante	Colorante (μM)	
Operativo	BO-PRO TM -1	58K	462/481	3,1	75	4,8	3,1	10,2
Operativo	GelStar®	--	493/527	1:1280 ^b	99	--	--	8,9
Operativo	SYTO® 45	43K	455/484	125	100	1,5	10,2	8,9
Operativo	SYTO® 44	56K	446/471	31	86	1,4	10,5	8,3
Operativo	YO-PRO®-1	52K	491/509	6,3	87	8,3	1,8	7,9
Operativo	POPO TM -3	146K	534/570	6,3	100	11	1,4	7,7
Operativo	SYTO® 12	54K	499/522	63	100	1,7	8,7	7,5
Operativo	TOTO TM -3	154K	642/660	3,1	100	17	0,9	7,0
Operativo	SYTO® 16	42K	488/514	12,5	99	6,0	2,5	6,6
Operativo	Naranja de Tiazol	63K	510/525	16	27	0,34	44	6,0
Operativo	YOYO®-3	167K	612/631	3,1	100	15	1,0	6,0
Operativo	SYTO® 43	48K	436/471	125	100	0,83	18,0	5,3
Operativo	SYTO® 11	75K	508/527	16	100	4,7	3,2	4,6
Operativo	SYTO® 13	74K	488/509	1,0	50	8,8	1,7	4,6
Operativo	SYTO® 15	55K	516/546	7,8	77	4,2	3,6	4,6
Operativo	BOBO TM -3	148K	570/602	3,1	85	8,3	1,8	4,6
Operativo	LO-PRO TM -1	102K	567/580	6,3	83	6,0	2,5	4,4
Operativo	SYTO® 23	46K	499/520	3,9	70	5,4	2,8	4,3
operativo	TO-PRO®-1	63K	515/531	1,6	67	17	0,9	3,6
Operativo	SYTO® 20	64K	512/530	1,5	23	4,3	3,5	2,5
Operativo	BOBO TM -1	114K	470/535	1,6	42	8,8	1,7	0,9
Operativo	POPO TM -1	93K	434/456	1,6	48	8,8	1,7	0,3

1. Coeficiente de excitación molar, según los datos del fabricante.

2. Espectros de fluorescencia proporcionados por el fabricante, o (superíndice a) obtenidos en un fluorímetro utilizando 2,5 μM de pb (100 ng/60 μl) de ADNbc y colorante a concentración máxima compatible con PCR en tampón de PCR (MgCl₂ 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 200 μM de cada dNTP, 500 μg/ml de BSA). Ex = máximos de excitación; Em = máximos de emisión.

3. Concentración máxima de colorante que puede estar presente en una mezcla de PCR que permite la amplificación sin inhibición significativa. Algunas concentraciones de colorante se expresan como factores de dilución de material suministrado por el fabricante (superíndice b).

4. Porcentaje de fluorescencia a la máxima concentración de colorante compatible con PCR en comparación con fluorescencia del mismo colorante a concentración de saturación, es decir, la concentración que proporciona la mayor intensidad de fluorescencia posible, todo en presencia de 15 μM de pb de ADN (100 ng de ADNbc/10 μl) y tampón de PCR.

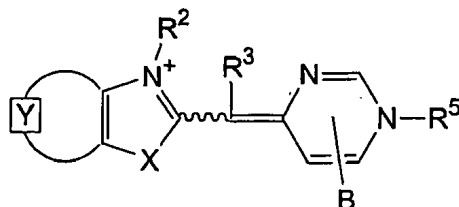
5. Concentración de colorante, o relación de pb/colorante requerida para producir el 50% de la intensidad de fluorescencia máxima que puede obtenerse, es decir, la intensidad en saturación, en presencia de 15 μM de pb de ADN.

6. Porcentaje de área de pico del pico característico de heterodúplex según lo medido con componentes ópticos de excitación a 450-490 nm y detección a 510-530 nm del instrumento de alta resolución HR-1, utilizando una curva de fusión del amplicón de 44 pb del heterocigoto del F508 del ejemplo 5, obtenida en una rampa de calentamiento de 0,3°C/s.

EJEMPLO 14

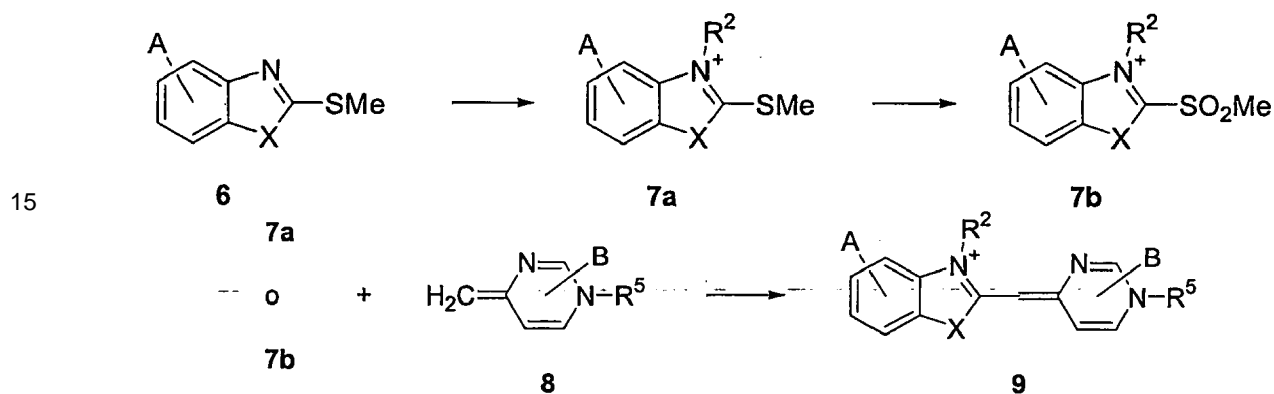
Preparación y utilización de colorantes de unión a ADN a base de pirimidinio

Se han preparado ciertas realizaciones de colorantes que tienen la siguiente estructura central de pirimidinio:



en la que \boxed{Y} , X, R², R³ y R⁵ son tal como se han definido en el presente documento para la fórmula I, y B es tal como se ha definido en las fórmulas V.

Aunque existen muchas maneras de preparar colorantes que tienen esta fórmula, un procedimiento es el siguiente:



donde los compuestos **6** están disponibles en el mercado, o pueden prepararse mediante procedimientos convencionales. Los compuestos **7a** se preparan mediante alquilación de **6** en N(3) utilizando agentes alquilantes tales como haluros de alquilo, alquilsulfatos, y similares, en condiciones neutras o básicas, incluyendo alquilitios, aminas aromáticas y alifáticas, K₂CO₃, y similares. Análogamente, los compuestos **7a** se preparan mediante arilación de **6** en N(3) mediante reacciones de acoplamiento aromático de haluros aromáticos, boronatos y similares, que son catalizadas por compuestos metálicos, tales como cobre, paladio, platino, y catalizadores similares. Los compuestos **7b** se preparan a partir de los compuestos **7a** mediante oxidación convencional, tal como reacciones que utilizan peróxido de hidrógeno, peroxiácidos, incluyendo *m*-CPBA, y similares. En algunos casos, los compuestos **7a** o los compuestos **7b** están disponibles en el mercado. Los compuestos **8** están disponibles en el mercado o se preparan mediante procedimientos convencionales, tales como alquilación o arilación en N(1), tal como se describe en el presente documento. Como alternativa, los compuestos **8** se preparan mediante condensación de 1,3-dionas y ureas o tioureas apropiadamente sustituidas. Además, los compuestos **8** que tienen grupos salientes, tal como se definen en el presente documento y que incluyen haluros, alquilsulfonilos, arilsulfonilos, y similares, en C(2) pueden modificarse introduciendo nucleófilos, tales como nucleófilos a base de nitrógeno, oxígeno y azufre, en C(2) en condiciones neutras o básicas. Además, los compuestos **8** que tienen grupos nucleófilos de oxígeno o azufre en C(2) pueden modificarse introduciendo agentes alquilantes o acilantes en el hidroxilo o tioril en C(2) en condiciones neutras o básicas. Los compuestos **9** se preparan haciendo reaccionar a los compuestos **7** y los compuestos **8** en condiciones neutras o básicas, tal como se describe en el presente documento.

Se prepararon compuestos a título de ejemplo que tienen esta fórmula tal como se ha descrito en el presente documento, se purificaron mediante HPLC utilizando acetato de trietilamina-amonio como fase móvil, y se aislaron como sus sales de acetato correspondientes. Estos compuestos a título de ejemplo se ilustran en la tabla 2.

TABLA 2.

Colorante	Y	X	R ²	R ⁵	B
G5		S	Ph		H
H5		S	Me		H
D6		S	Me		H
E6		O	Me		H
P6		S			H
R6		S	Me		H
Y6		O	Me		H
Z6		S	Me		H
D8		S	Me	Ph	2-SH 6-Me
I5		S			H
K5		S	Me		H
L5		S	Me		H
G8		S	Me	Ph	2-SCH3 6-Me
K8		S		Ph	2-SH 6-Me
L8		S	Ninguno	Ph	2-SH 6-Me

Colorante	Y	X	R ²	R ⁵	B
I8		S	Me	Ph	2-SH 6-Me
M8		S	Me	Ph	2-S-pirimidina 6-Me
N8		S	Me	Ph	2-SH 6-Ph
C8		S	Me	Ph	2-NH ₂ 6-Me
E8		S	Me	Ph	2-OH 6-Me
F7		S	Me	Ph	2-(4,4-dimetilpiperazina) 6-Me
O8		S	Me R ³ =C(O)Ph	Ph	2-SH 6-Me

5 El compuesto D6 se preparó haciendo reaccionar en primer lugar 4-metilpirimidina con bromuro de (3-bromopropil)trimetilamonio en acetonitrilo a la temperatura de reflujo. El producto resultante (compuesto A6) en acetonitrilo se hizo reaccionar con yoduro de 3-metil-2-metilsulfonilbenzotiazolio (disponible de Aldrich) en presencia de piridina anhidra y trietilamina a la temperatura de reflujo en argón.

10 El compuesto E6 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de yoduro de 3-metil-2-metilsulfonilbenzoxazolio (preparado haciendo reaccionar 2-metilsulfonilbenzoxazol con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

El compuesto G5 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de 2-metil-3-fenilbenzotiazolio (Aldrich) y el compuesto A6.

15 El compuesto H5 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de metilsulfato de 5-difluorometilsulfonil-3-metil-2-metilbenzotiazolio (preparado haciendo reaccionar 5-difluorometilsulfonil-2-metilbenzotiazol, disponible de Aldrich, con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

20 El compuesto P6 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de 5-hidróxido de cloro-2-(metiltio)-3-(3-sulfopropil)-benzotiazolio (Aldrich) y el compuesto A6.

El compuesto R6 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de metilsulfato de 6-amino-3-metil-2-metilbenzotiazolio (preparado haciendo reaccionar 6-amino-2-metilbenzotiazol, disponible de Aldrich, con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

25 El compuesto Y6 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de metilsulfato de 3-metil-2-metilsulfonilnafto[1,2-d]oxazolio (preparado haciendo reaccionar 2-metilsulfonilnafto[1,2-d]oxazol, disponible de Chem Bridge Product List, San Diego, CA, con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

30 El compuesto Z6 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de metilsulfato de 3-metil-2-metilsulfonilnafto[1,2-d]tiazolio (preparado haciendo reaccionar 2-metilsulfonilnafto[1,2-d]tiazol, disponible de Specs, Rijswijk, Países Bajos, con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

35 El compuesto D8 se preparó calentando una solución de *N*-feniltiurea y 2,4-pentanodiona en HCl/EtOH a la temperatura de reflujo. La pirimidintona resultante se hizo reaccionar con yoduro de 3-metil-2-metilsulfonilbenzotiazolio en presencia de trietilamina en cloroformo/metanol (10:1) a la temperatura de reflujo durante una noche para dar el compuesto D8.

Los compuestos I5, K5, L5, G8, K8, L8, I8, M8, N8, C8, E8, F7 y O8 pueden prepararse mediante procedimientos similares descritos anteriormente. Se espera que estos colorantes fueran útiles para la detección de heterodúplex.

Los colorantes de cianina a base de pirimidinio descritos en el presente documento, de forma ilustrativa G5, H5, D6, E6, P6, R6, Y6, Z6 y D8, son novedosos y pueden utilizarse para la detección de heterodúplex, rastreo de mutaciones y determinación del genotipo. Los resultados de la utilización de estos colorantes en la detección de heterodúplex se resumen en la tabla 3. Se observa que el heterodúplex porcentual para LC Green es mayor en la tabla 3 que en la tabla 1. Esta diferencia se debe probablemente al amplicón más grande utilizado para obtener los datos mostrados en la tabla 3.

TABLA 3.

Colorante	Ex/Em ¹	% de Sat máximo compatible con PCR ²	% de Het ³
LC Green	450/469	>99 %	20,5 %
PO-PRO™-1	438/457	100 %	19,6 %
BO-PRO™-1	438/457	100 %	17,1 %
D6	457/471	92 %	23,3 %
E6	425/454	>99 %	15,0 %
P6	464/490	100 %	21,0 %
R6	453/470	>90 %	15,0 %
G5	442-458/475	100 %	20,0 %
H5	444/459	100 %	22,5 %
Y6	439/477-515	100 %	21,0 %
Z6	469/494-526	100 %	13,4 %
D8	453-457/471	100 %	19,8 %

1. Máximos de excitación (Ex) y máximos de emisión (Em) obtenidos en un fluorímetro utilizando 2,5 μ M de pb (100 ng/60 μ l) de ADNbc y colorante a concentración máxima compatible con PCR en tampón de PCR (MgCl₂ 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 200 μ M de cada dNTP, 500 μ g/ml de BSA). Algunos colorantes tienen un intervalo debido al amplio pico de emisión o excitación.

2. Cantidad máxima de colorante que puede estar presente en una mezcla de PCR que permite la amplificación sin inhibición significativa, expresada como porcentaje de fluorescencia en comparación con fluorescencia del mismo colorante a concentración de saturación, es decir, la concentración que proporciona la mayor intensidad de fluorescencia posible, todo en presencia de 15 μ M de pb de ADN (100 ng de ADNbc/10 μ l) y tampón de PCR.

3. Porcentaje de área de pico del pico característico de heterodúplex según lo medido con componentes ópticos de excitación a 420-490 nm y detección a 450-530 nm, utilizando la curva de fusión del heterocigoto del F508 obtenida en una rampa de calentamiento de 0,3°C/s. El amplicón utilizado en este conjunto de experimentos era de 57 pb de largo generado por los cebadores GGCACCATTAAGAAAATAT (SEC ID No. 23) y TCTGTATCTATATTCATCATAGG (SEC ID No. 24) El % máximo obtenido se registró.

EJEMPLO 15

15 Análisis de la curva de fusión de alta resolución para comparación de genotipos

Los colorantes de la presente invención pueden utilizarse para determinar si dos individuos cualesquiera comparten los mismos alelos en el fragmento un gen. En los ejemplos previos, se conocía el genotipo (incluyendo el alelo exacto, heterocigosis, y haplotipo) de una muestra de referencia. En algunas aplicaciones, no es necesario que se conozca el genotipo exacto de una muestra de referencia, siempre que el análisis de la curva de fusión de alta resolución haga posible determinar si una muestra de otro individuo (o de origen desconocido) es la misma que la referencia. Un ejemplo ilustrativo es la identificación de alelos de HLA compartidos entre los miembros de la familia.

Antígenos de leucocitos humanos (HLA) son proteínas de la superficie celular de leucocitos y otros tejidos del cuerpo que desempeñan un papel clave en reconocimiento inmunitario y, por lo tanto, en la tolerancia o rechazo del trasplante. La correspondencia de alelos de HLA entre donante y receptor es importante para el trasplante de órganos. Las proteínas de HLA forman dos grupos principales: clase I y clase II. Cada grupo está codificado por múltiples genes. Las técnicas aceptadas actualmente para determinar el alelotipo de HLA de un tejido incluyen determinación del serotipo con reactivos de anticuerpos específicos, hibridación con sondas de ácido nucleico y secuenciación directa de los genes de HLA. Debido a que es necesario ensayar un gran número de genes y loci, el coste para determinar el alelotipo de HLA supera los 1.000 dólares por persona. La determinación completa del genotipo de HLA es necesaria cuando el donante y el receptor no están relacionados. Sin embargo, existe aproximadamente una probabilidad del 25% de una correspondencia de HLA perfecta entre hermanos y, por esta razón, el trasplante de órganos entre hermanos es preferente cuando las correspondencias de HLA indican que es posible. En este caso solamente es necesario demostrar que los parientes del donante y el receptor comparten los mismos alelos de HLA. No es necesario determinar la identidad exacta de los alelos compartidos.

Se obtuvieron muestras de ADN genómico de CEPH/árbol genealógico de la familia Utah 1331 del *Coriell Institute*. Hay 17 personas en tres generaciones en esta familia incluyendo cuatro abuelos internos, dos progenitores, y once niños (el árbol genealógico de la familia 1331 se muestra en la figura 15). Dos muestras más con genotipos homocigóticos bien conocidos de HLA-A BM15(0101) y BM16(0202) también se obtuvieron de Coriell.

La amplificación de dos exones del gen de HLA-A se realizó de la siguiente manera: Los genes de la clase I de HLA son tan similares en la longitud de sus exones codificantes que es difícil diseñar cebadores de PCR que amplifiquen solamente el gen de HLA-A y no los genes de clase I relacionados. Se adoptó una estrategia de PCR anidada, en la que una ronda inicial de PCR amplificaba específicamente un gran (948 pb) fragmento del gen de HLA-A seguido por amplificación secundaria de ese producto utilizando cebadores internos. Los cebadores utilizados en la primera PCR hibridaron con el intrón 1 de HLA-A (cebador directo 5'-GAAAC(C/G)GCCTCTG(C/T)GGGGAGAAGCAA (SEC ID No. 9, SEC ID No. 10, SEC ID No. 11, SEC ID No. 12)) y el intrón 4 (cebador inverso 5'-TGTTGGTCCCAATTGTCTCCCTC (SEC ID No. 13)). En las PCR secundarias, los cebadores directos 5'AGCCGCGCC(G/T)GGAAGAGGGTCG (SEC ID No. 14, SEC ID No. 15) y el cebador inverso 5'GGCCGGGGTCACTCACCG (SEC ID No. 16) se utilizaron para amplificar un segmento de 335 pb del exón 2 de HLA-A. El cebador directo 5'CCC(G/A)GGTTGGTCGGGGC (SEC ID No. 17, SEC ID No. 18) y el inverso 5'ATCAG(G/T)GAGGCGCCCGTG (SEC ID No. 19, SEC ID No. 20) se utilizaron para amplificar un fragmento de 366 pb de un exón 3 de HLA-A. En las secuencias del cebador de este ejemplo, (N/N') representa que el cebador es una mezcla de secuencias de nucleótidos que tienen porcentajes iguales de N y N' en esa posición. Por ejemplo, el cebador directo para el segmento de 335 pb del exón 2 de HLA-A contiene una mezcla igual de dos nucleótidos, con una G o una A en la cuarta posición, tal como se representa mediante la SEC ID No. 17 y la SEC ID No. 18. El cebador directo para el intrón 1 de HLA-A tiene dos de dichos sitios, y de este modo es una mezcla igual de cuatro nucleótidos, tal como se representa mediante la SEC ID No. 9, la SEC ID No. 10, la SEC ID No. 11 y la SEC ID No. 12.

Todas las PCR se realizaron en capilares de vidrio utilizando el LightCycler® de Roche. La PCR inicial contenía 0,5 µM de cebadores directo e inverso, 50 ng de ADN genómico en un tampón de Mg⁺⁺ 3 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,3, 500 µg/ml de BSA y 20 µM de colorante D6 en 10 µl. Las condiciones de ciclado fueron de 94°C durante 20 s seguido por 40 ciclos de 94°C 1 s, 62°C durante 0 s, 72°C durante 1 minuto. Las PCR anidadas secundarias contenían 0,25 µM de cebador directo e inverso, 1/10000 de primer producto de PCR en el mismo tampón que contenía Mg⁺⁺ 2 mM. Las condiciones de ciclado fueron de 94°C durante 5 s seguidos por 25 ciclos con 94°C 1 s, 65°C durante 0 s, 72°C durante 8 s.

Después de la amplificación secundaria, los capilares de vidrio se transfirieron al instrumento de fusión de alta resolución HR-1, y se realizó una fusión. La muestra se calentó de 60°C a 95°C a una velocidad de 0,3°C/s y fluorescencia (excitación a 450/emisión a 470) y se adquirieron mediciones de temperatura cada 40 s (figuras 16A-B). Los productos de secuenciación anidada se secuenciaron mediante el ABI 3700. Se utilizó la versión 4.0 del secuenciador para el análisis de la secuencia.

Se determinaron la concordancia del análisis de la curva de fusión y los resultados de secuenciación de la siguiente manera: análisis de la curva de fusión de los productos de PCR del exón 2 y el exón 3 de los 17 miembros del CEPH/árbol genealógico de la familia Utah 1331 agrupados en seis grupos diferentes (figuras 16A-B). Esto sugería que hay seis genotipos de HLA-A diferentes en esta familia. Los productos de PCR del exón 2 y el exón 3 se secuenciaron, y los resultados confirmaban el análisis de la curva de fusión, identificando los seis genotipos como: HLA-A 02011/3101 (denominado en el presente documento como genotipo AB) para los miembros de la familia 1, 4, 7, 12; HLA-A 3101/2402101 (genotipo BC) para los miembros de la familia 3, 5, 6, 11, 17; HLA-A 02011/2402101 (genotipo AC) para los miembros de la familia 2, 9, 10, 16, HLA-A 02011/03011 (genotipo AD) para los miembros de la familia 13, 14; HLA-A 02011/02011 (genotipo AA) para los miembros de la familia 8 y HLA-A 2402101/01011 (genotipo CE) para el miembro de la familia 15 (Los resultado para el exón 2 se muestran en las figuras 16A-B).

En algunos casos, los productos de amplificación de hermanos pueden mostrar curvas de fusión idénticas o casi idénticas a pesar de tener diferentes genotipos. En dichos casos la mezcla del ADN genómico de los dos hermanos antes de la PCR inicial seguida por las dos etapas de amplificación y el análisis de la curva de fusión puede diferenciar genotipos idénticos de no idénticos. En particular, si los hermanos tienen genotipos idénticos, la curva de fusión mixta será idéntica a las realizadas por separado. Si los hermanos tienen diferentes genotipos, entonces la curva de fusión mixta será diferente de las curvas de fusión individuales. Experimentos de mezcla en cada grupo confirmaron que los miembros de cada grupo compartían genotipos idénticos.

Otro ejemplo de la técnica de análisis de mezcla se demostró mediante dos muestras homocigóticas BM15 (0101) y BM16 (0201). En este caso, los dos alelos tienen un total de 15 diferencias de nucleótidos extendidas por la longitud del exón 2 de HLA-A, pero muestran curvas de fusión similares. La curva de fusión de las muestras mixtas estaba significativamente desplazada hacia la izquierda (temperatura de fusión más baja) debido a las 15 correspondencias erróneas presentes en los heterohíbridos generados en la PCR de muestra mixta del exón 2 de HLA-A (véase la figura 17).

EJEMPLO 16

Monitorización de amplificación en tiempo real con colorantes de saturación

- 5 Se amplificó un fragmento de 60 pb del gen HTR2A con cebadores directo e inverso ACCAGGCTCTACAGTAA (SEC ID No. 21) y GTTAAATGCATCAGAAG (SEC ID No. 22), respectivamente. La amplificación se realizó utilizando los reactivos descritos en el ejemplo 11 pero con modificaciones de los parámetros de ciclado, que fueron 95°C, 0 s; 62°C, 2 s; 74°C, 20 s utilizando el LightCycler®. Diversas concentraciones de SYBR® Green I, GelStar® y SYTO® 16 estaban presentes independientemente en la mezcla de reacción. Los datos de fluorescencia se adquirieron una vez cada ciclo de amplificación, hasta 40 ciclos. Los puntos de cruce de fluorescencia (Cp), calculados como el máximo de la segunda derivada del gráfico de amplificación (número de ciclo representado en el eje x frente a la intensidad de fluorescencia en el eje y), se obtuvieron de la siguiente manera:

TABLA 4.

Colorante presente en la reacción	Dilución/Concentración	Cp
SYBR® Green I	1:2.500	Sin amplificación
	1:5.000	26
	1:10.000	26
	1:20.000	Señal demasiado débil
GelStar®	1:640	Sin amplificación
	1:1.280	29
	1:2.560	28
	1:5.120	31
	1:10.240	31
SYTO® 16	1:20.480	Señal demasiado débil
	25 µM	Sin amplificación
	12,5 µM	30
	6,25 µM	29
	3,1 µM	31
	1,5 µM	33
	0,8 µM	Señal demasiado débil

- 15 Se espera que el valor de Cp, que representa el número de ciclo en el que la señal se eleva por encima del fondo, se incremente cuando los inhibidores presentes en la reacción afecten a la eficacia de amplificación. En las condiciones de estos experimentos, sin embargo, la inhibición mediante cantidades crecientes de colorante no dio como resultado un incremento gradual de Cp, sino una eliminación súbita y completa de amplificación. Debido al pequeño tamaño del amplicón (que da como resultado una señal inferior en comparación con amplicones más grandes), el colorante SYBR® Green I solamente podía utilizarse en el intervalo de dos veces la concentración para monitorización en tiempo real. En contraste, GelStar® y SYTO® 16 podían utilizarse en un intervalo de ocho veces la concentración. Se contempla que muchos colorantes de saturación tienen un amplio intervalo de concentración que puede utilizarse en monitorización en tiempo real de la amplificación.

25 LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Wittwer, Carl T. Reed, Gudrun Dujols, virginie E. Zhou, Luming
- 30 <120> ANÁLISIS DE FUSIÓN DE AMPLICONES CON COLORANTES DE SATURACIÓN
- <130> 7475-73421
- <150> US 60/439.978
- 35 <151> 14-01-2003
- <150> US 60/420.717
- <151> 23-10-2002
- 40 <160> 24
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- 45 <211> 20
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

ES 2 438 967 T3

	<400> 1 ggcaccatta aagaaaatat	20
5	<210> 2 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 2 tcatcatagg aaacacca	18
15	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 3 acacaactgt gttcactagc	20
25	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 4 caacttcatc cacgttcacc	20
35	<210> 5 <211> 14 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 5 ccagctccgg gaga	14
45	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 6 21 catacaggat ggtaacatg g	21
55	<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 7 21 agaatataca ctctgctta g	21
65	<210> 8 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 8 17 tatcactata tgcatgc	17
	<210> 9 <211> 26 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 9 gaaaccgct ctgcggggag aagcaa	26

ES 2 438 967 T3

	<210> 10	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 10	
	gaaacggcct ctgCGGGGag aagcaa	26
10	<210> 11	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 11	
	gaaacggcct ctgCGGGGag aagcaa	26
	<210> 12	
	<211> 26	
20	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	gaaacggcct ctgCGGGGag aagcaa	26
25	<210> 13	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 13	
	tgTGTctcc aattGTctcc cctc	24
	<210> 14	
35	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 14	
40	agccgcgcCG ggaagagggt cg	22
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Homo sapiens	
	<400> 15	
	agccgcgcct ggaagagggt cg	22
50	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 16	
	ggccgggggtc actcaccg	18
	<210> 17	
	<211> 17	
60	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 17	
	cccgggttg tCGgggc	17
65	<210> 18	

ES 2 438 967 T3

	<211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 18 cccaggttg tcggggc	17
10	<210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 19 atcagggagg cgccccgtg	19
20	<210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 20 atcagtgagg cgccccgtg	19
30	<210> 21 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 21 accaggctct acagtaa	17
40	<210> 22 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 22 gttaaatgca tcagaag	17
50	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 23 ggcaccatta aagaaaatat	20
	<210> 24 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 24 tctgtatcta tattcatcat agg	23

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis por PCR que comprende las etapas de:
- 5 proporcionar una mezcla de un colorante de unión a ADNbc y cebadores configurados para amplificar el ácido nucleico diana,
amplificar el ácido nucleico diana en presencia del colorante de unión a ADNbc,
monitorizar la fluorescencia del colorante de unión a ADNbc,
generar una curva de fusión para el ácido nucleico diana,
10 normalizar las diferencias de magnitud de la curva de fusión,
repetir las etapas de provisión, amplificación, normalización y generación con, como mínimo, un ácido nucleico diana adicional,
representar gráficamente una diferencia de fluorescencia entre las curvas de fusión normalizadas, en el que la curva de fusión normalizada de un ácido nucleico diana se selecciona como patrón y se representa gráficamente como patrón en temperaturas y las curvas de fusión normalizadas para ácido nucleico diana adicional se representa gráficamente como una diferencia con las temperaturas en el patrón;
15 y utilizar la diferencia representada gráficamente entre las curvas de fusión normalizadas para identificar genotipos de los ácidos nucleicos diana.
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende, además, la etapa de desplazar la temperatura de las curvas de fusión superponiendo una parte de cada curva.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el colorante de unión a ADNbc tiene un porcentaje de saturación de, como mínimo, el 90% y se selecciona entre LC Green, PO-PRO™-1, SYTO®45, POPO™-3, SYTOX® Blue y SYTO®43 y que comprende identificar el genotipo utilizando una forma de la curva de fusión.
25
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que el ácido nucleico diana es un locus de un gen de HLA de un primer individuo y el segundo ácido nucleico es el mismo locus de un gen de HLA de un segundo individuo.
- 30 5. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la etapa de monitorización se realiza utilizando un fluorímetro que tiene un intervalo de excitación de 450-490 nm y un intervalo de detección de emisión de 510-530 nm, y el colorante tiene un máximo de excitación en un intervalo de 410-465 nm y un máximo de emisión en un intervalo de 450-500 nm.
- 35 6. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la muestra comprende, además, una sonda configurada para hibridar con el ácido nucleico diana, dicha sonda marcada con un colorante aceptor para aceptar transferencia de energía por resonancia de fluorescencia del colorante de unión a ADNbc, y que comprende, además, la etapa de monitorizar la fluorescencia del colorante aceptor.
- 40 7. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la etapa de monitorización comprende, además, utilizar la curva de fusión para determinar si el ácido nucleico diana tiene la misma secuencia que un segundo ácido nucleico.

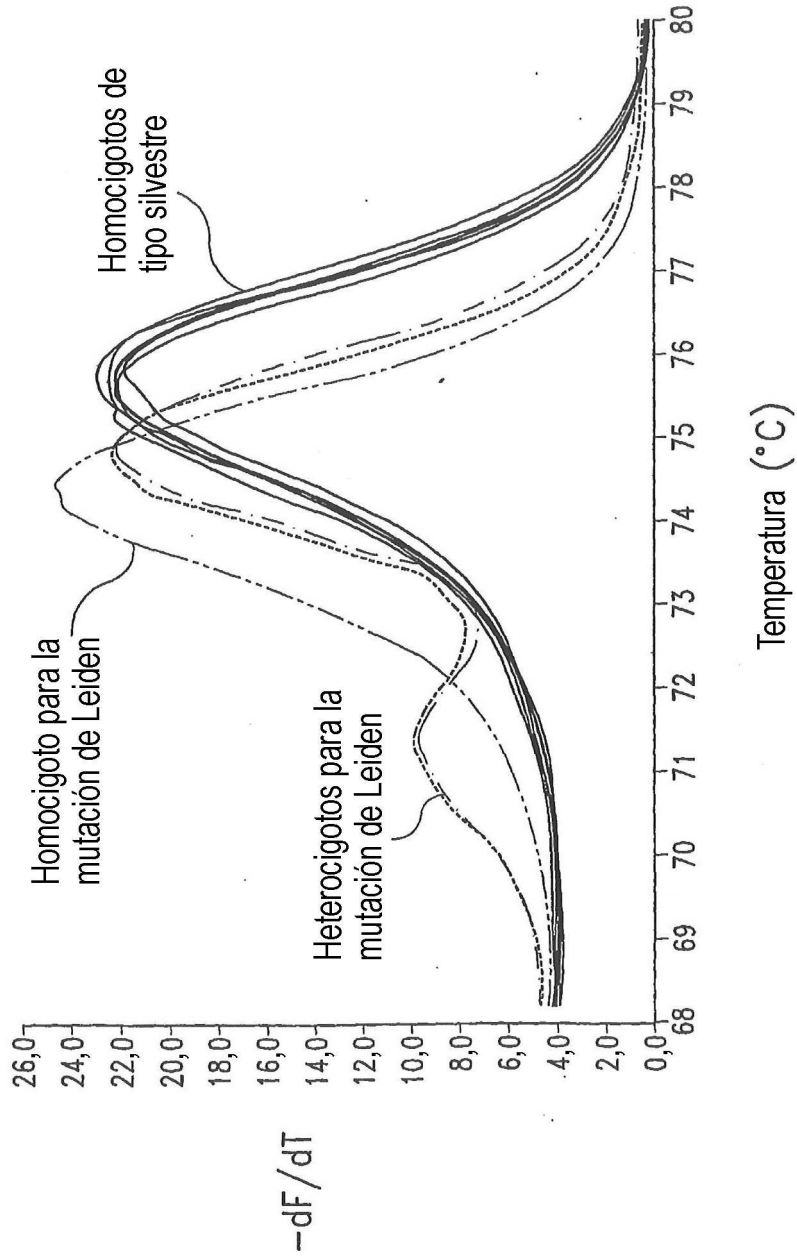


Fig. 1

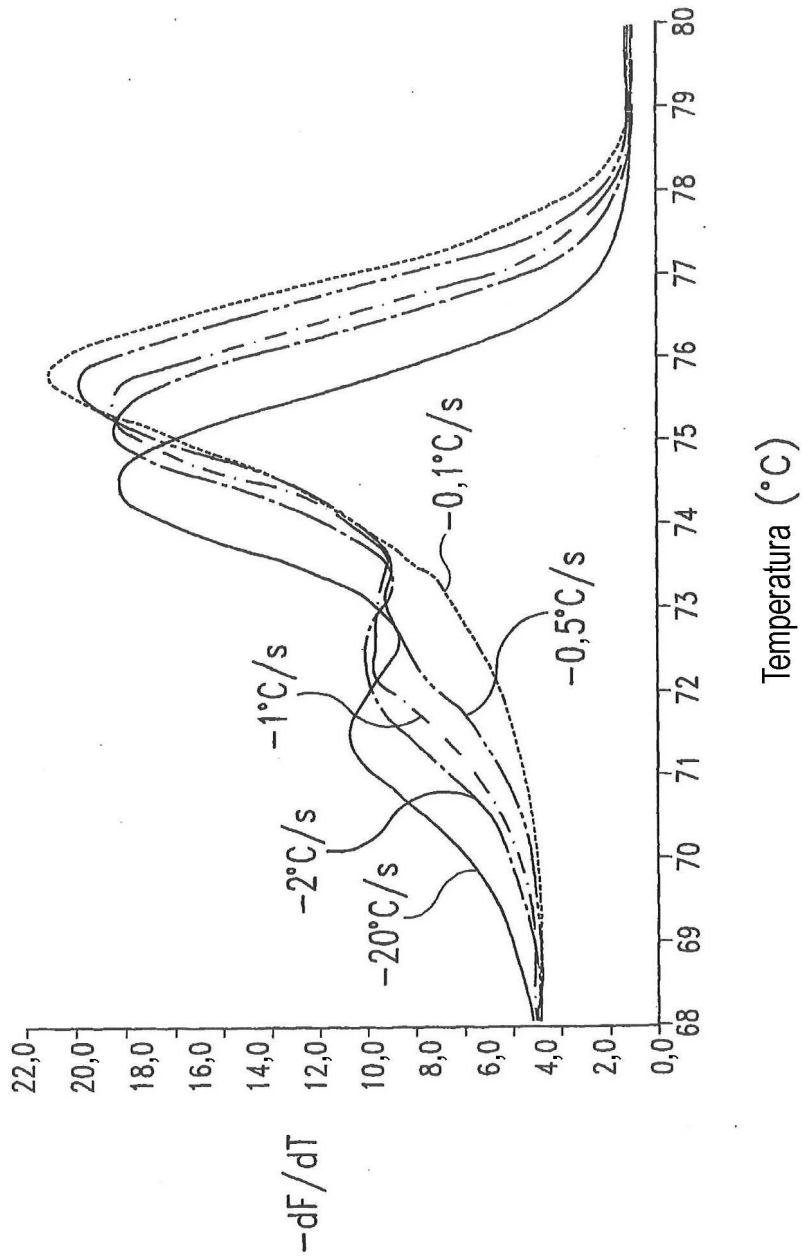


Fig. 2

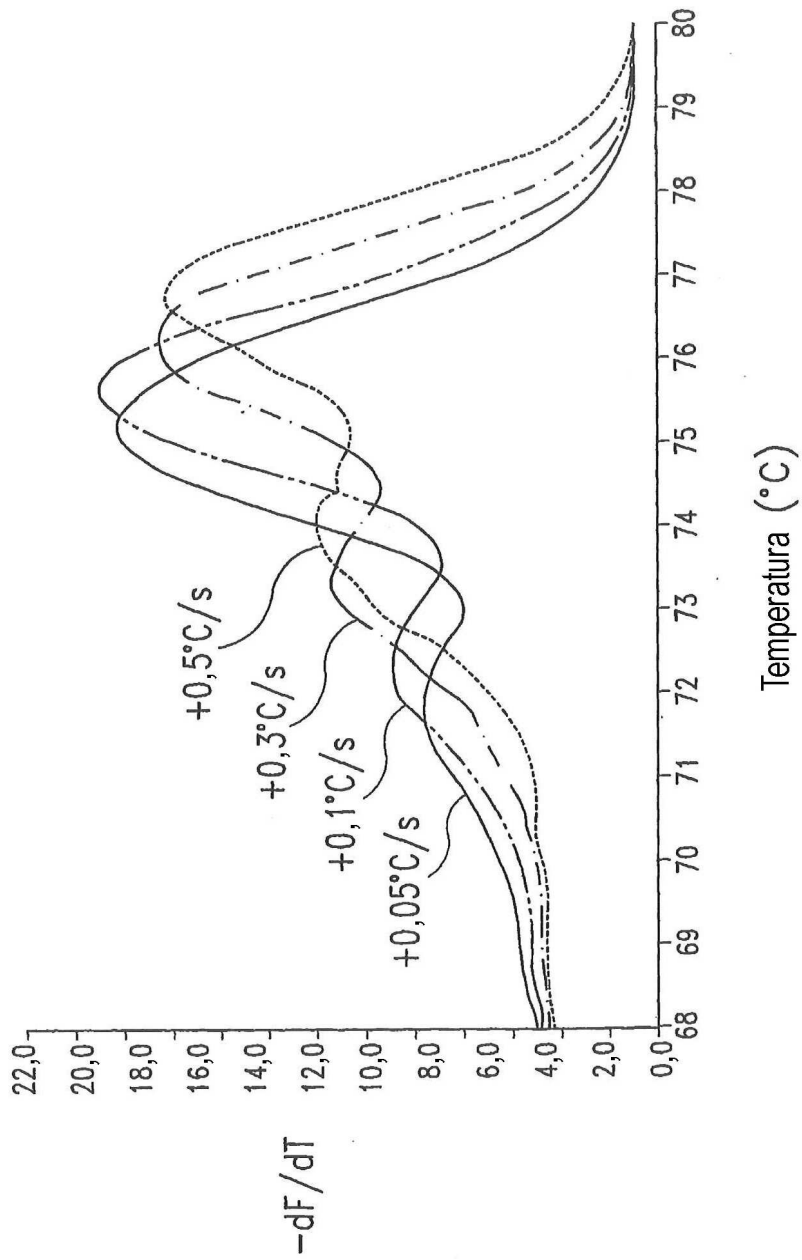


Fig. 3

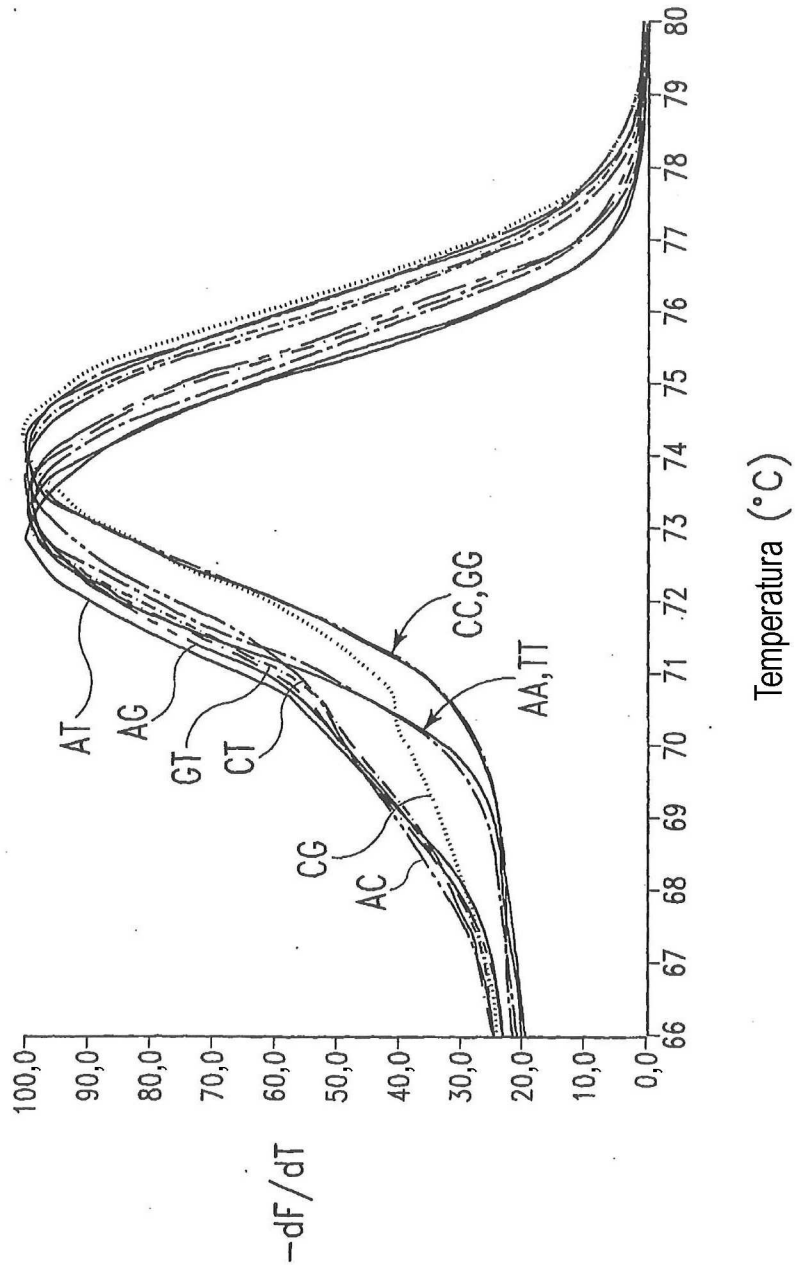


Fig. 4

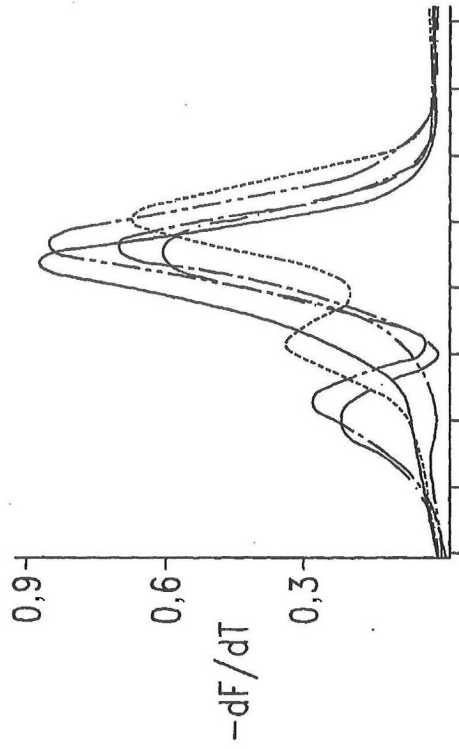


Fig. 5B

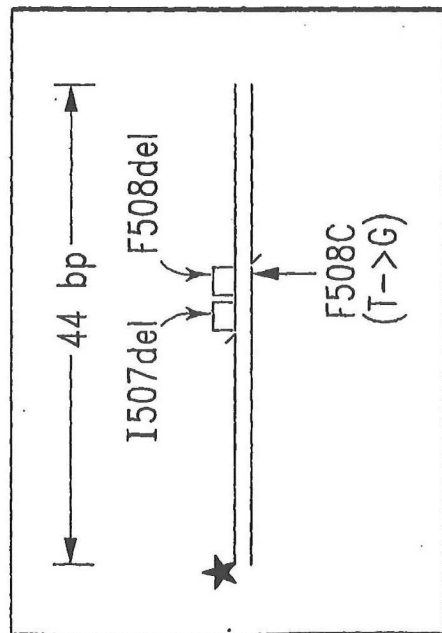


Fig. 5A

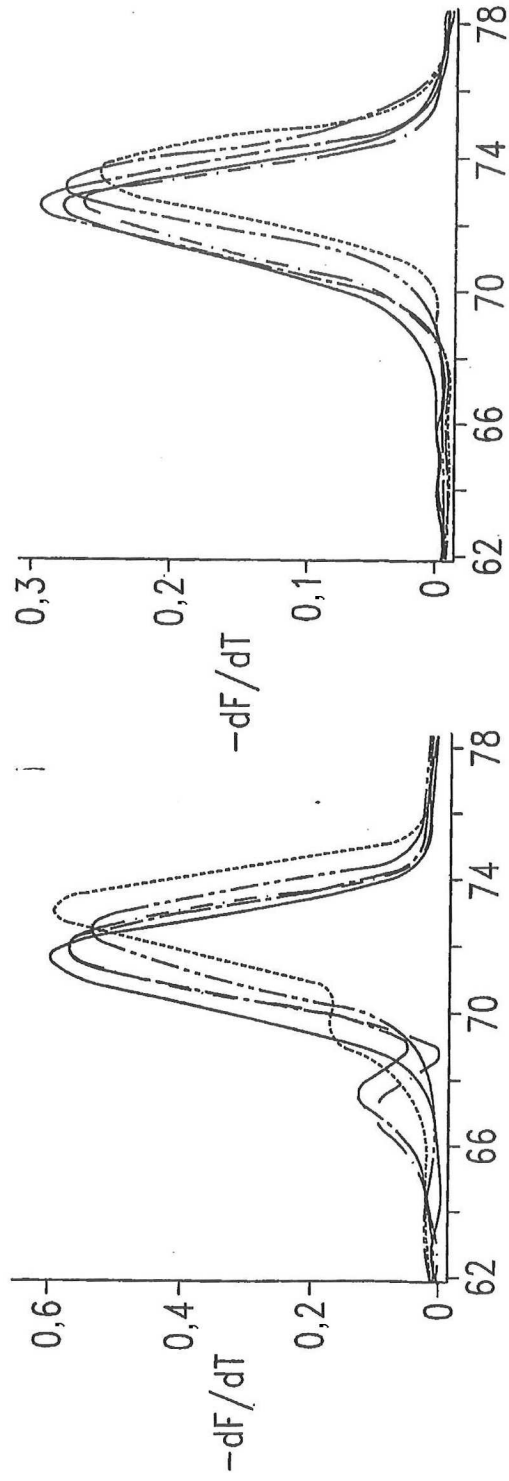


Fig. 5D

Fig. 5C

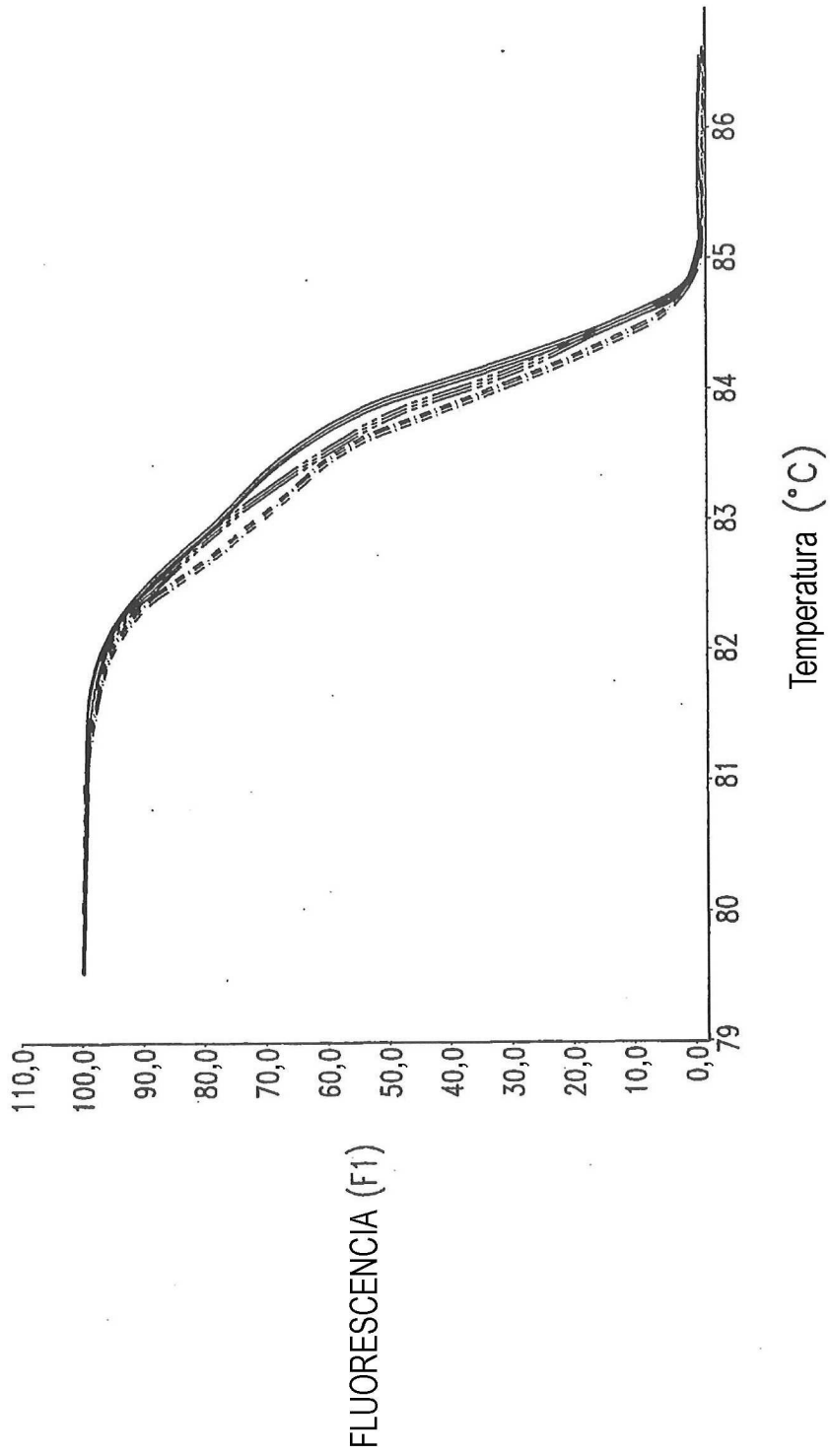


Fig. 6

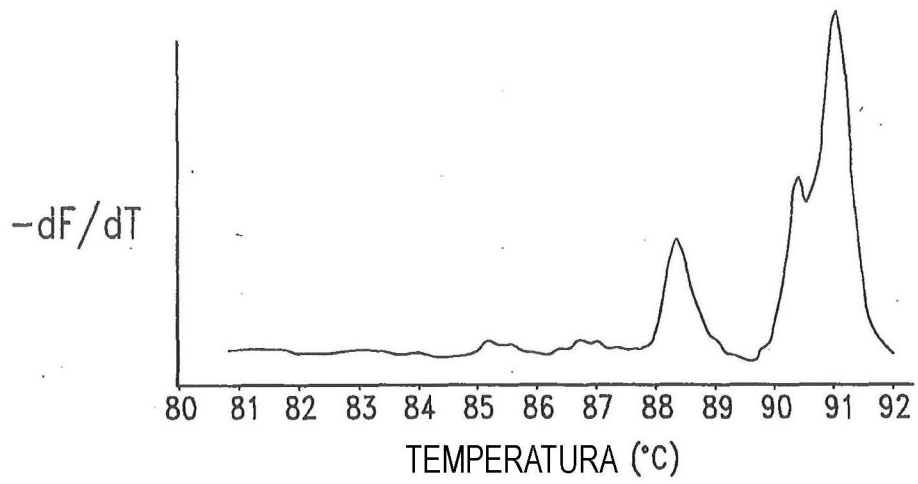


Fig. 7A

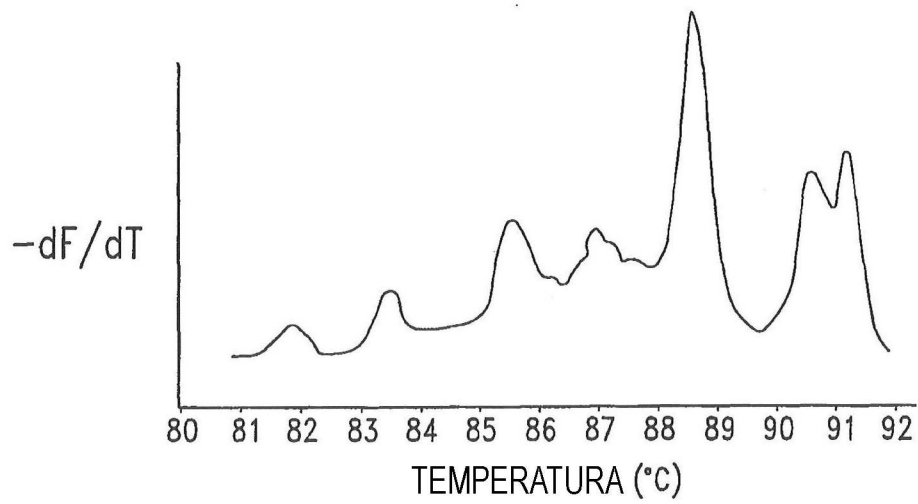


Fig. 7B

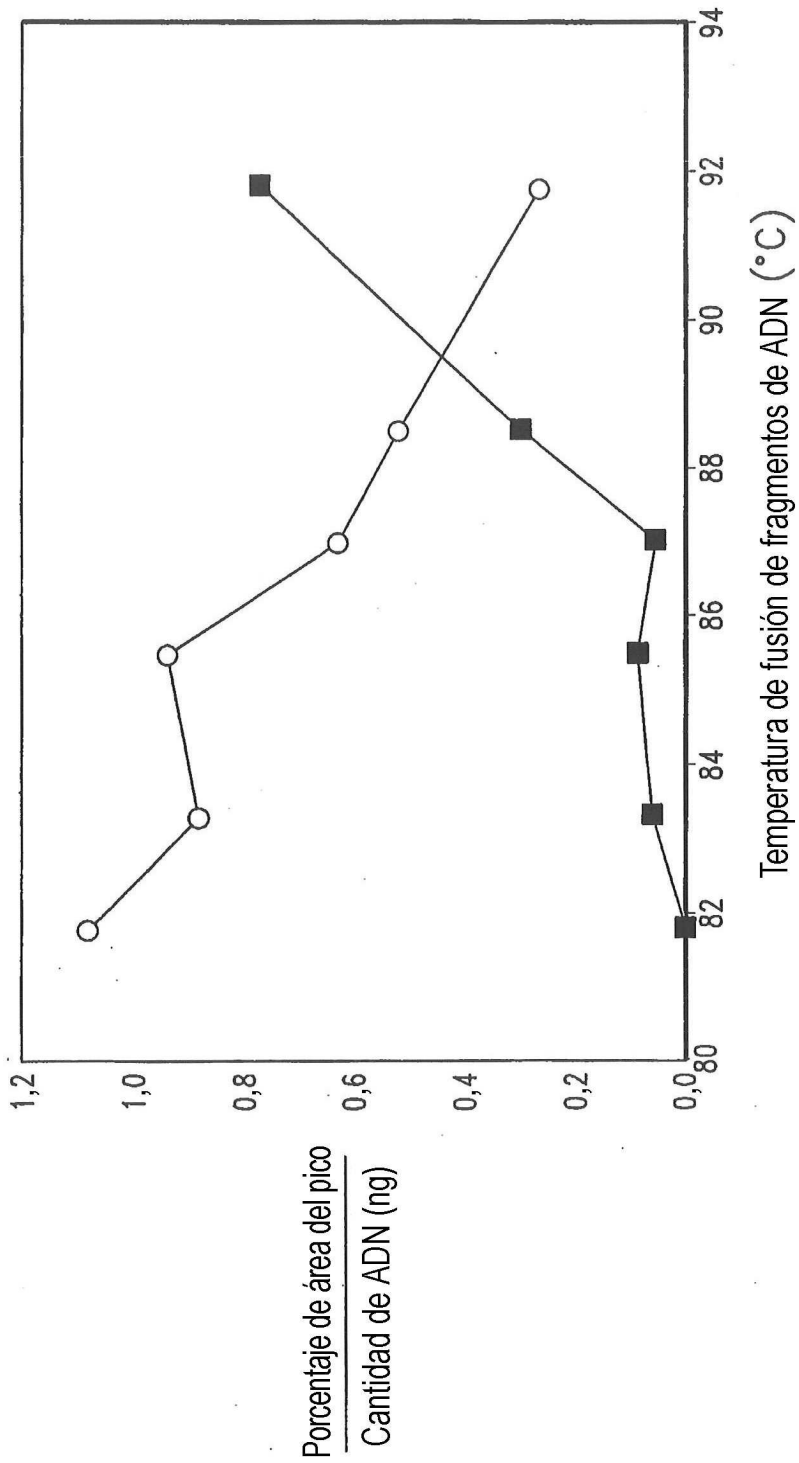


Fig. 8

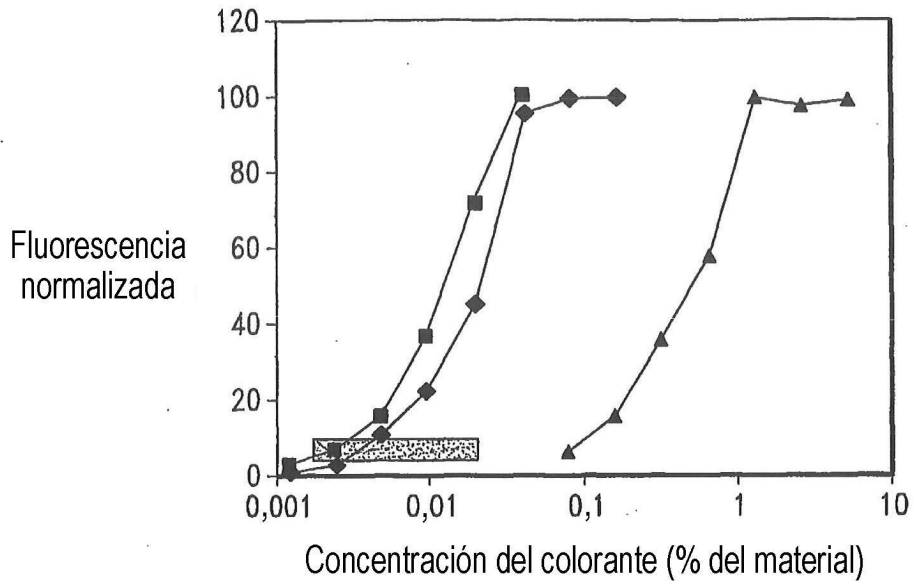


Fig. 9A

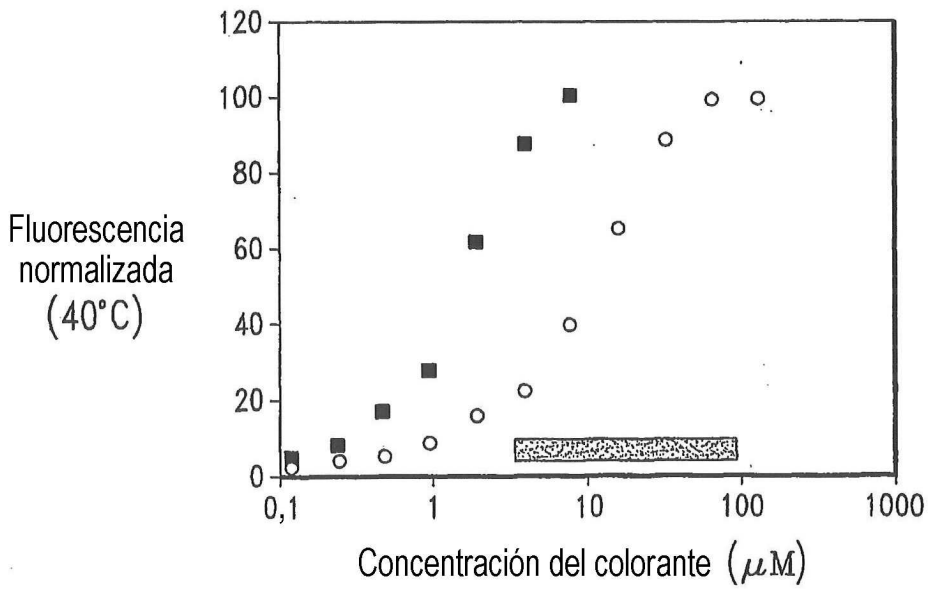


Fig. 9B

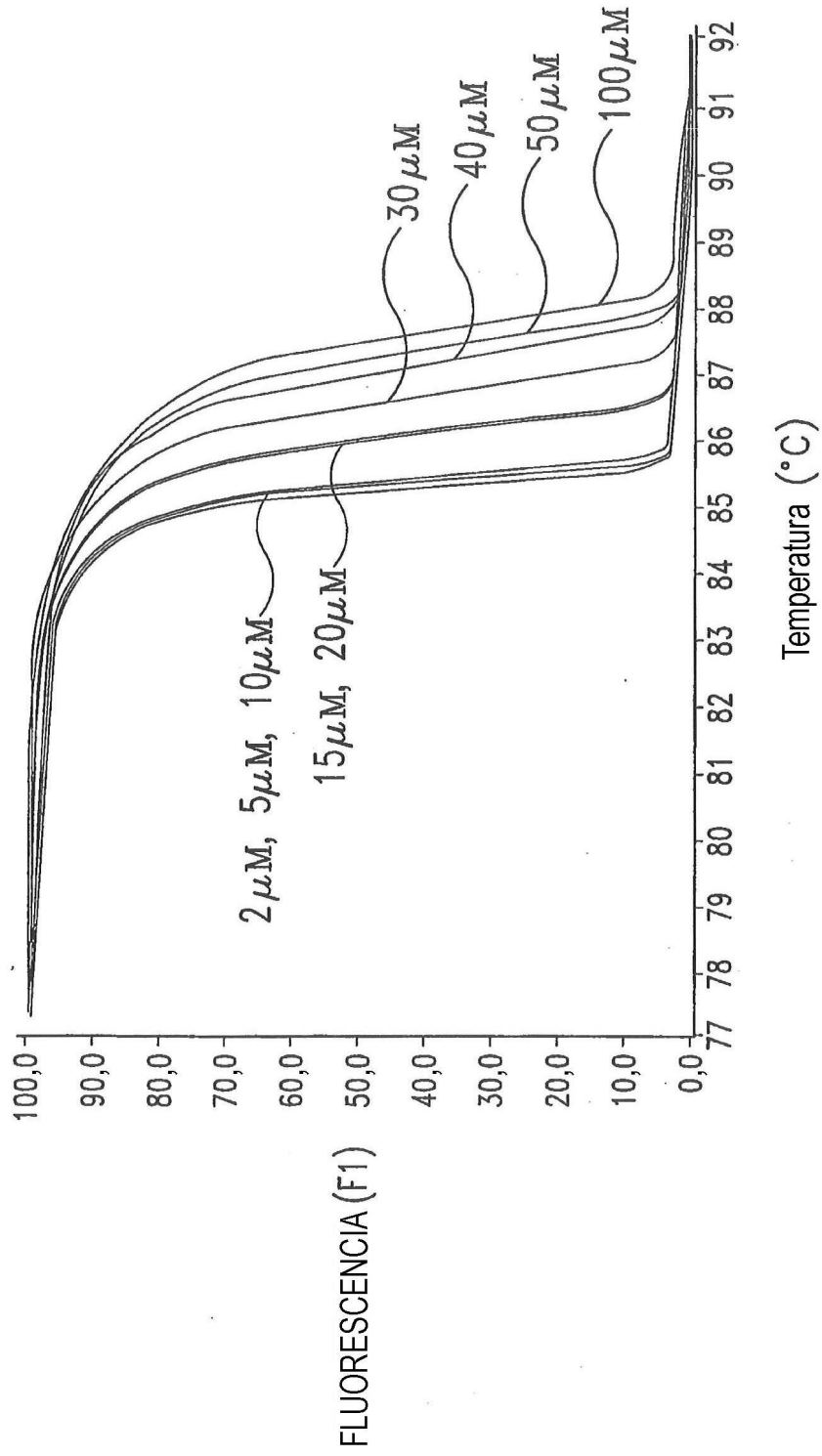


Fig. 10

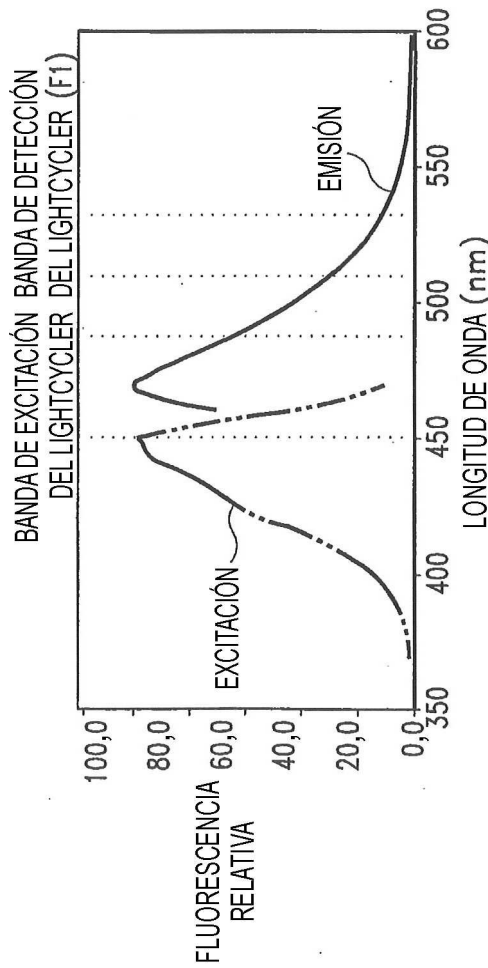


Fig. 11A

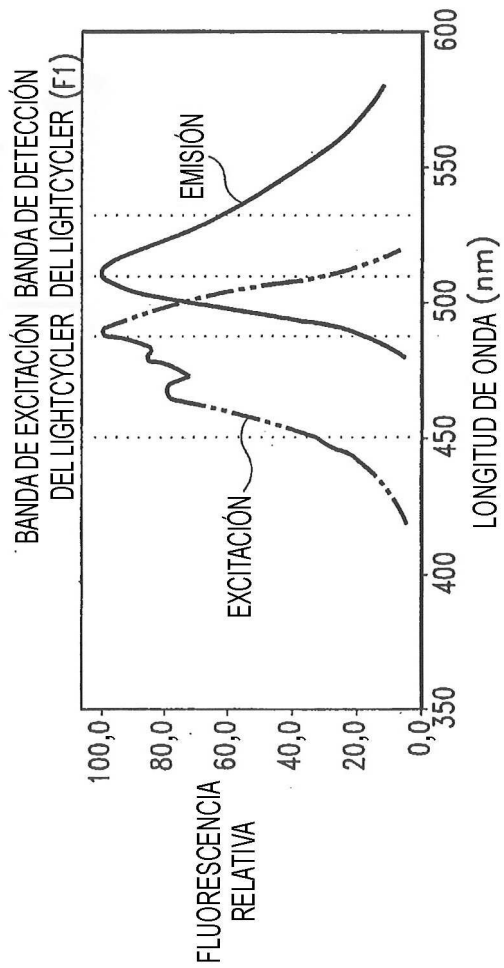


Fig. 11B

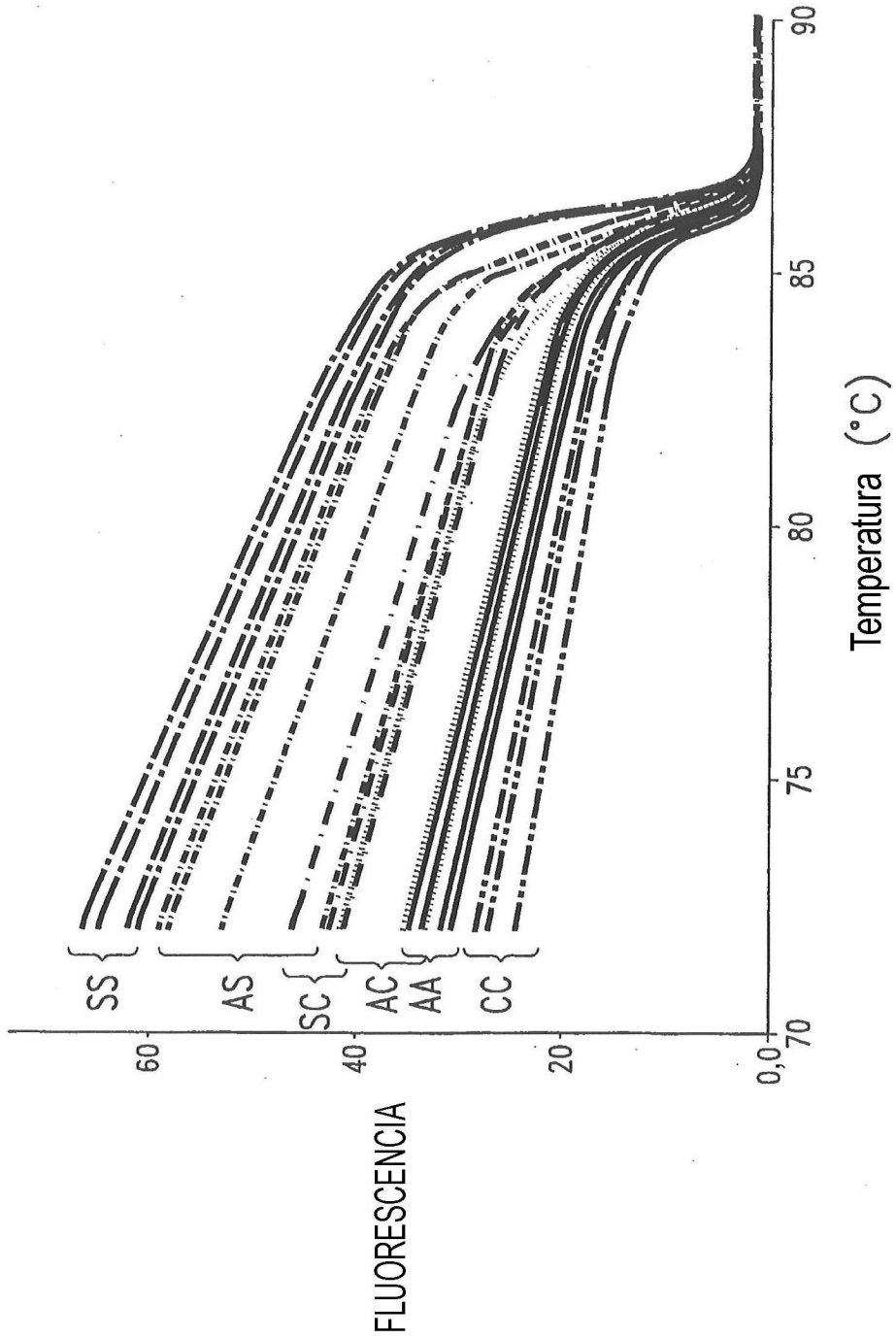


Fig. 12A

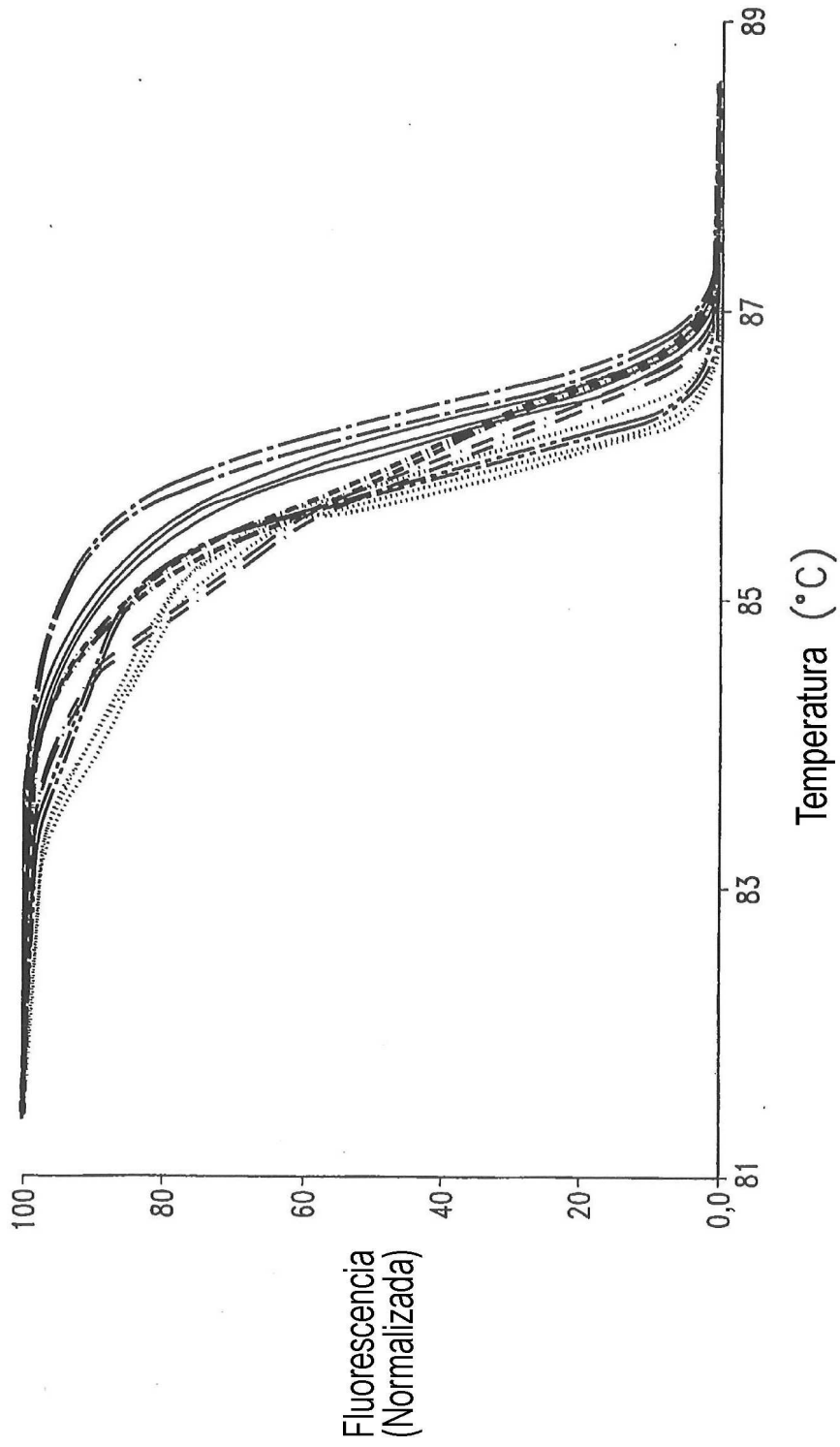


Fig. 12B

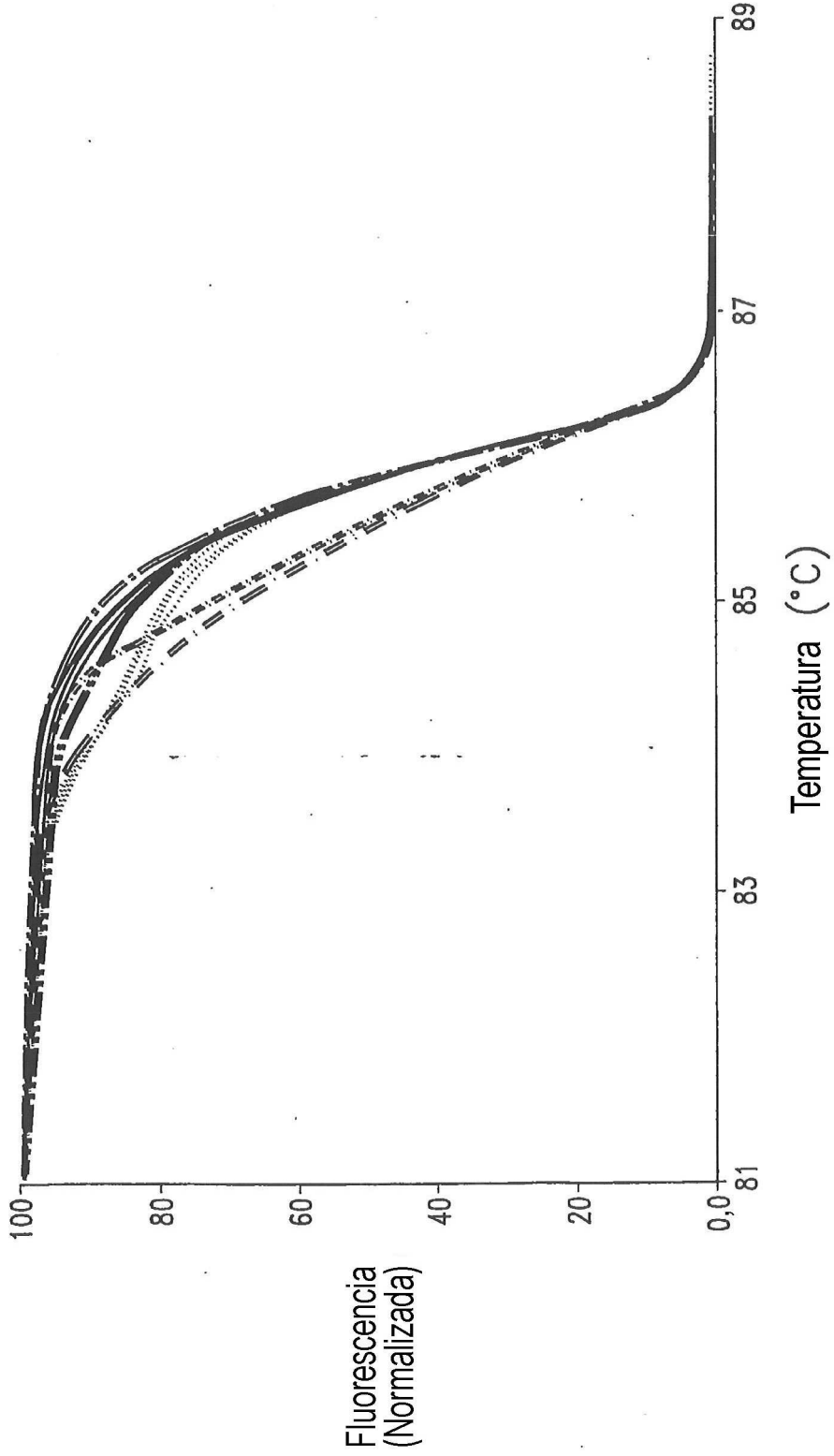


Fig. 12C

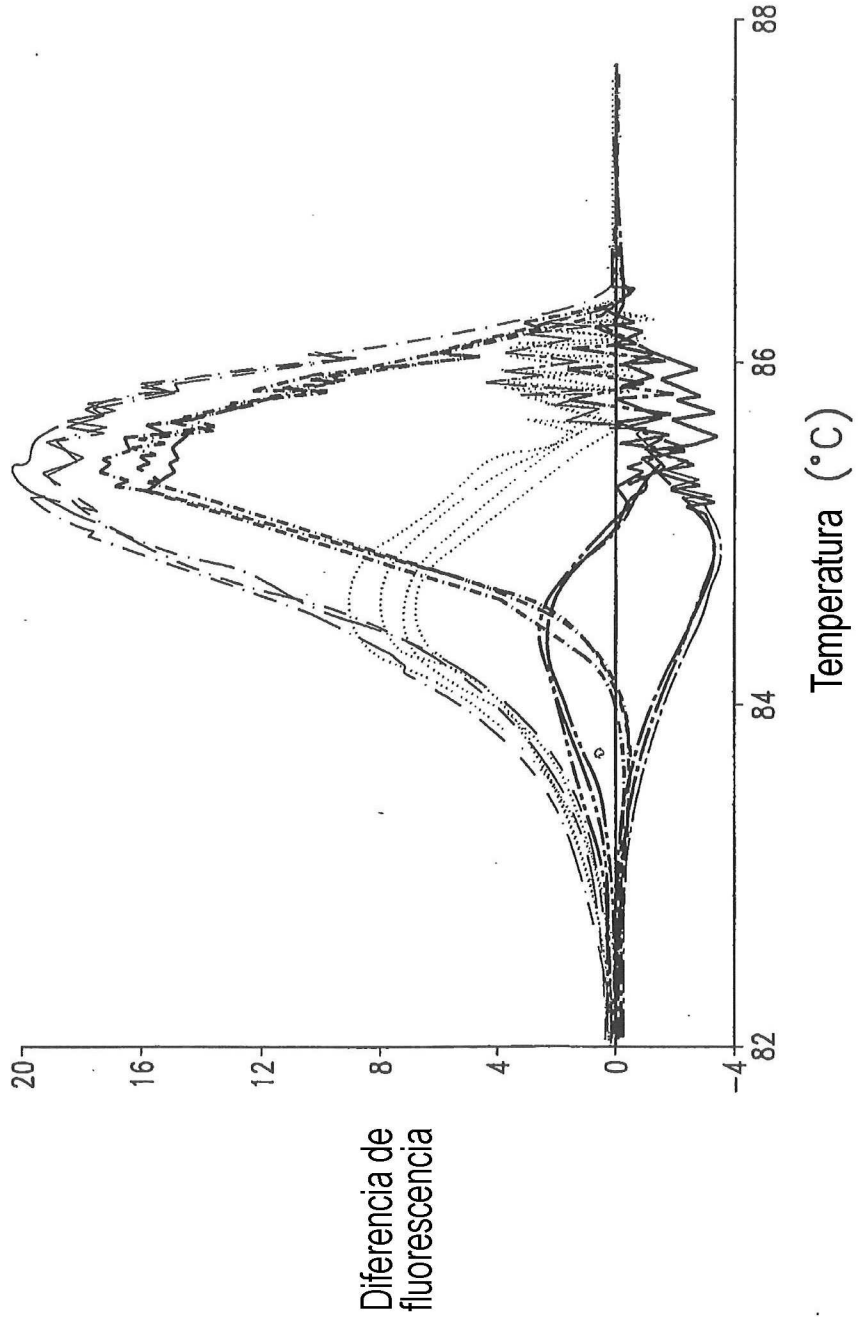


Fig. 12D

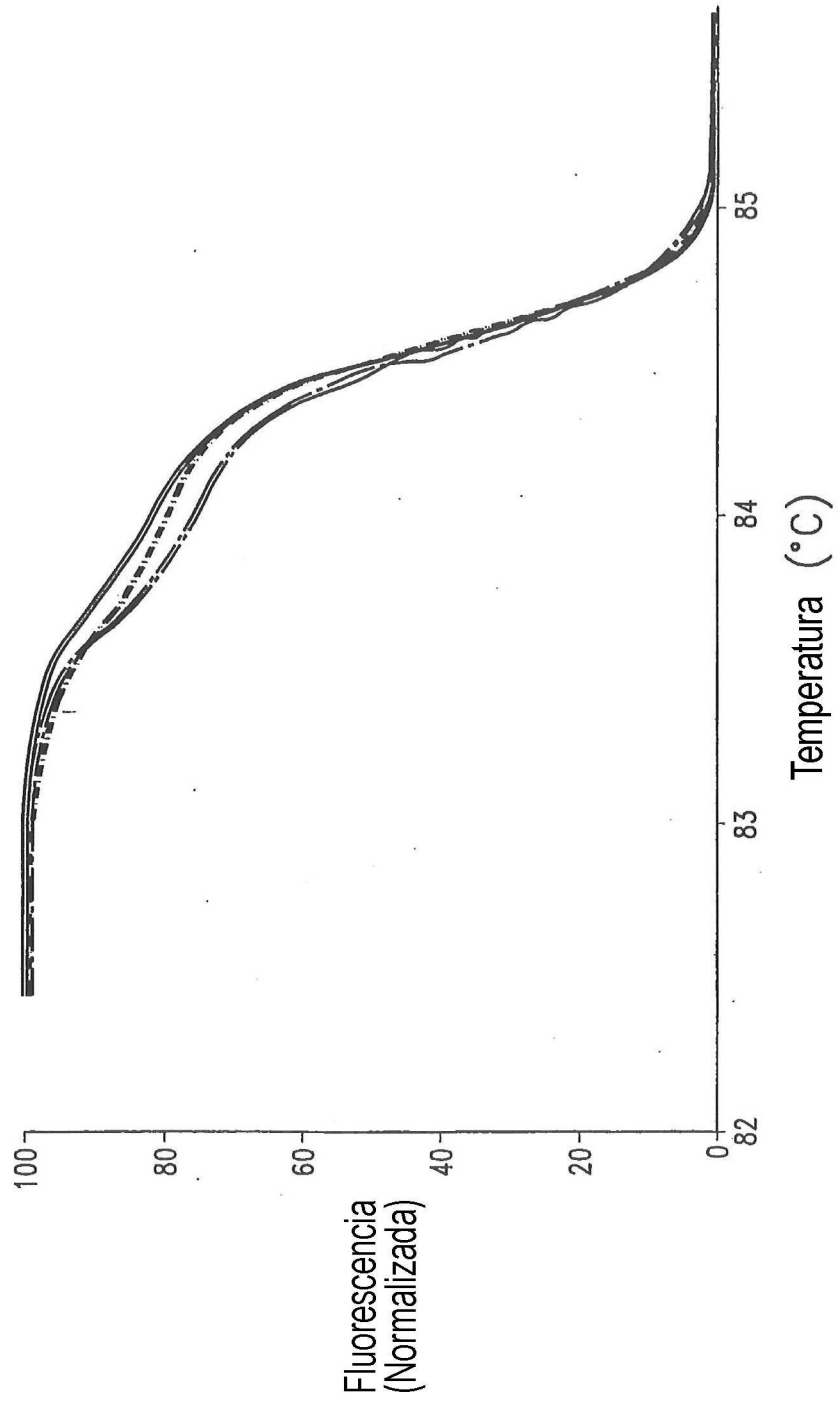


Fig. 13A

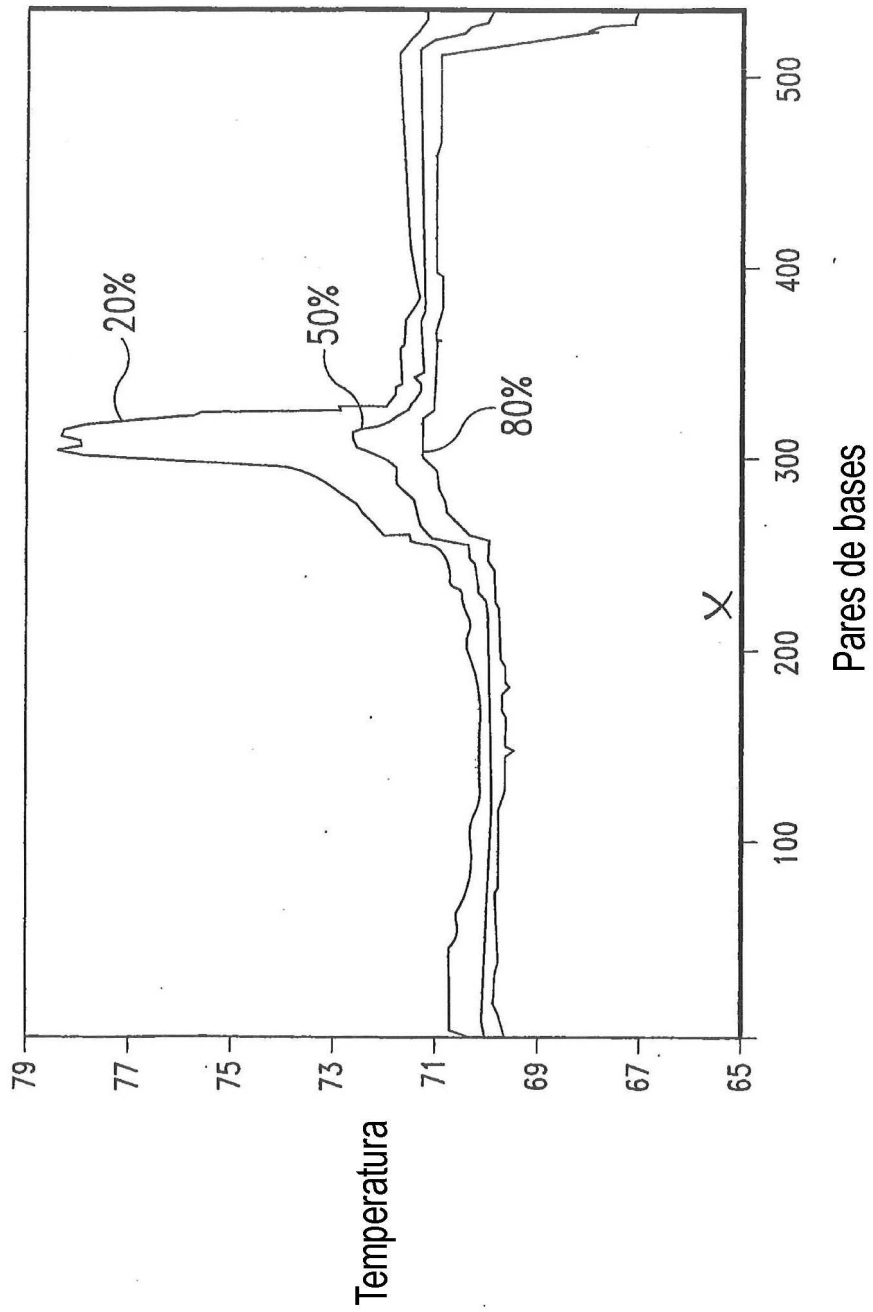


Fig. 13B

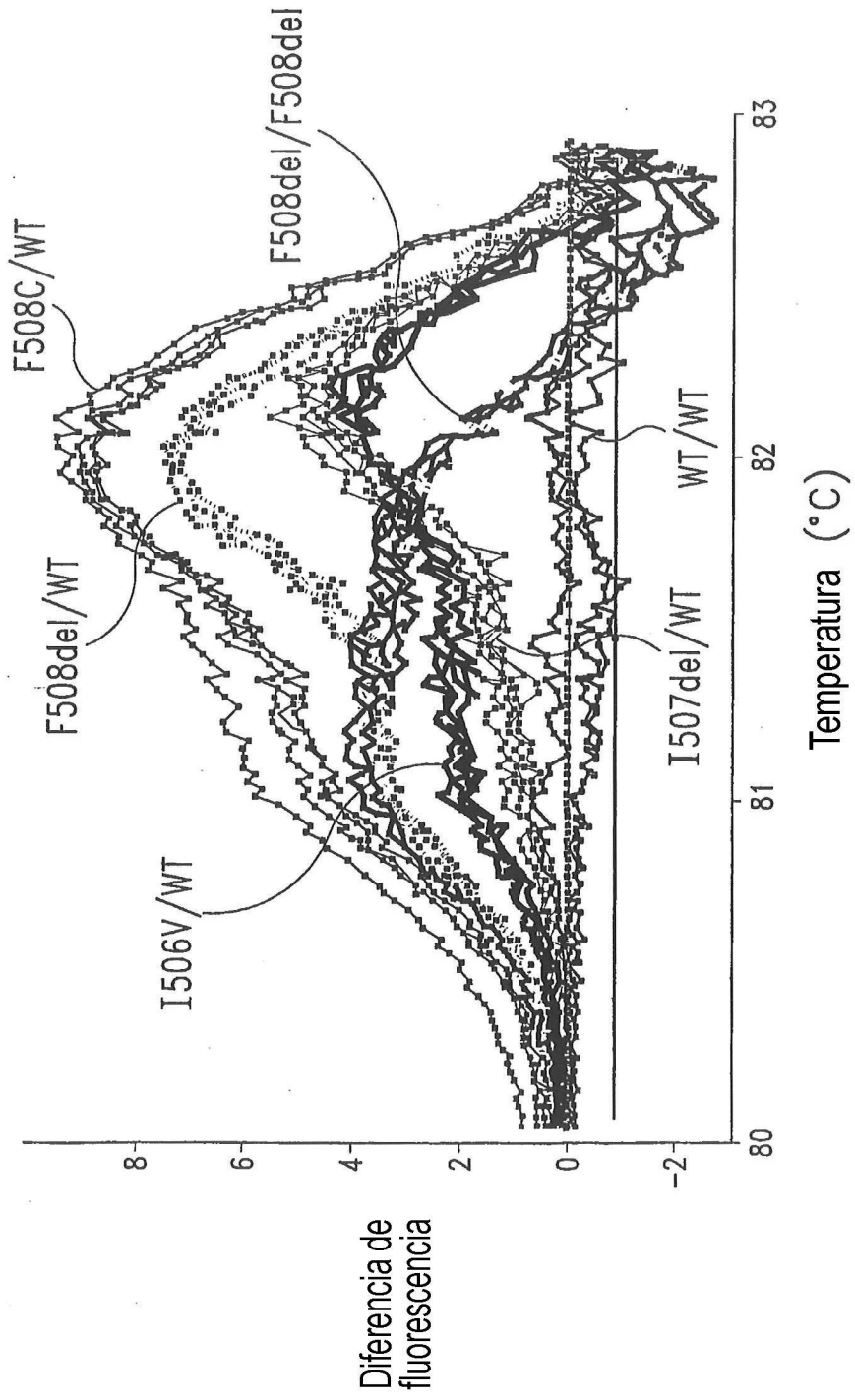


Fig. 14

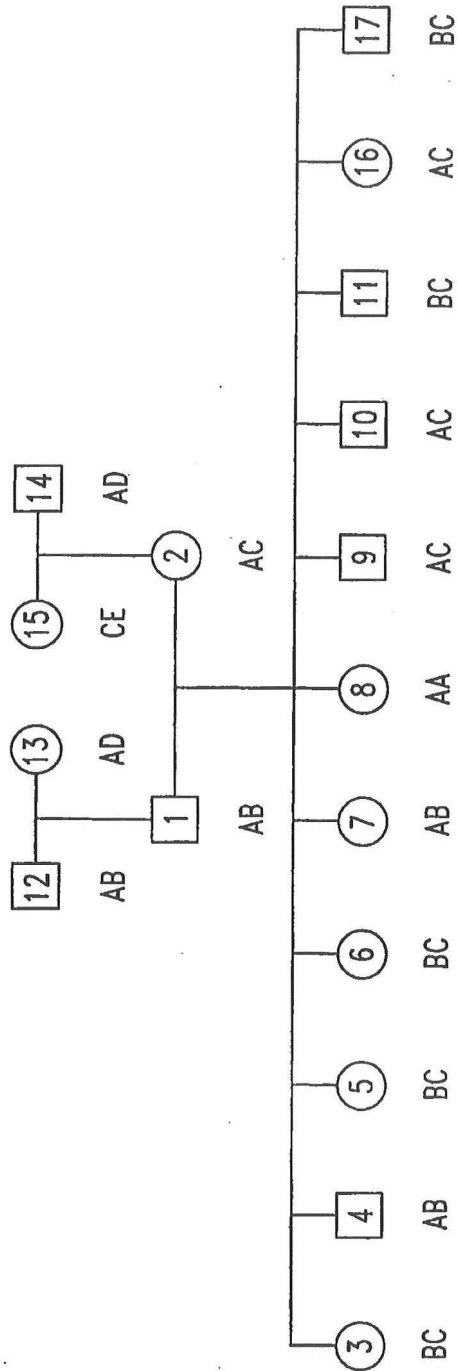


Fig. 15

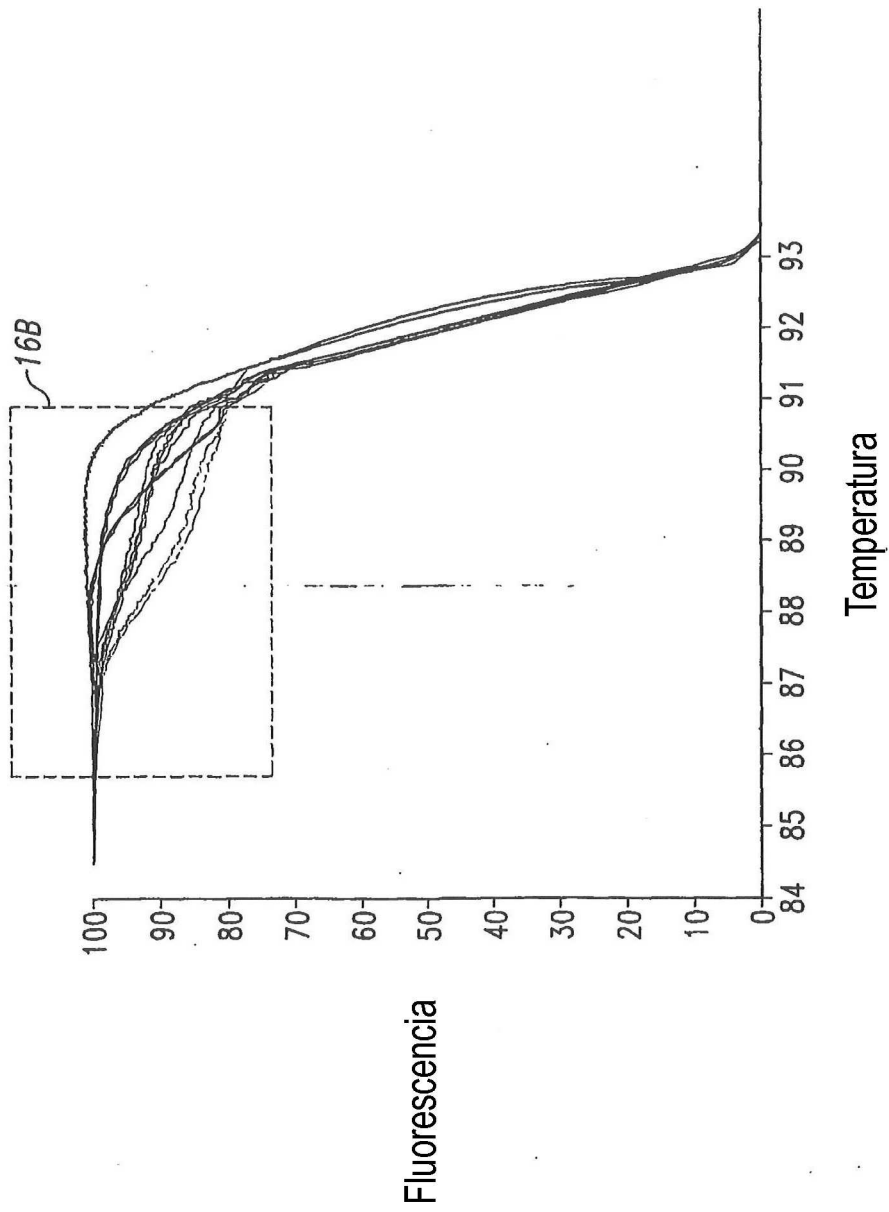


Fig. 16A

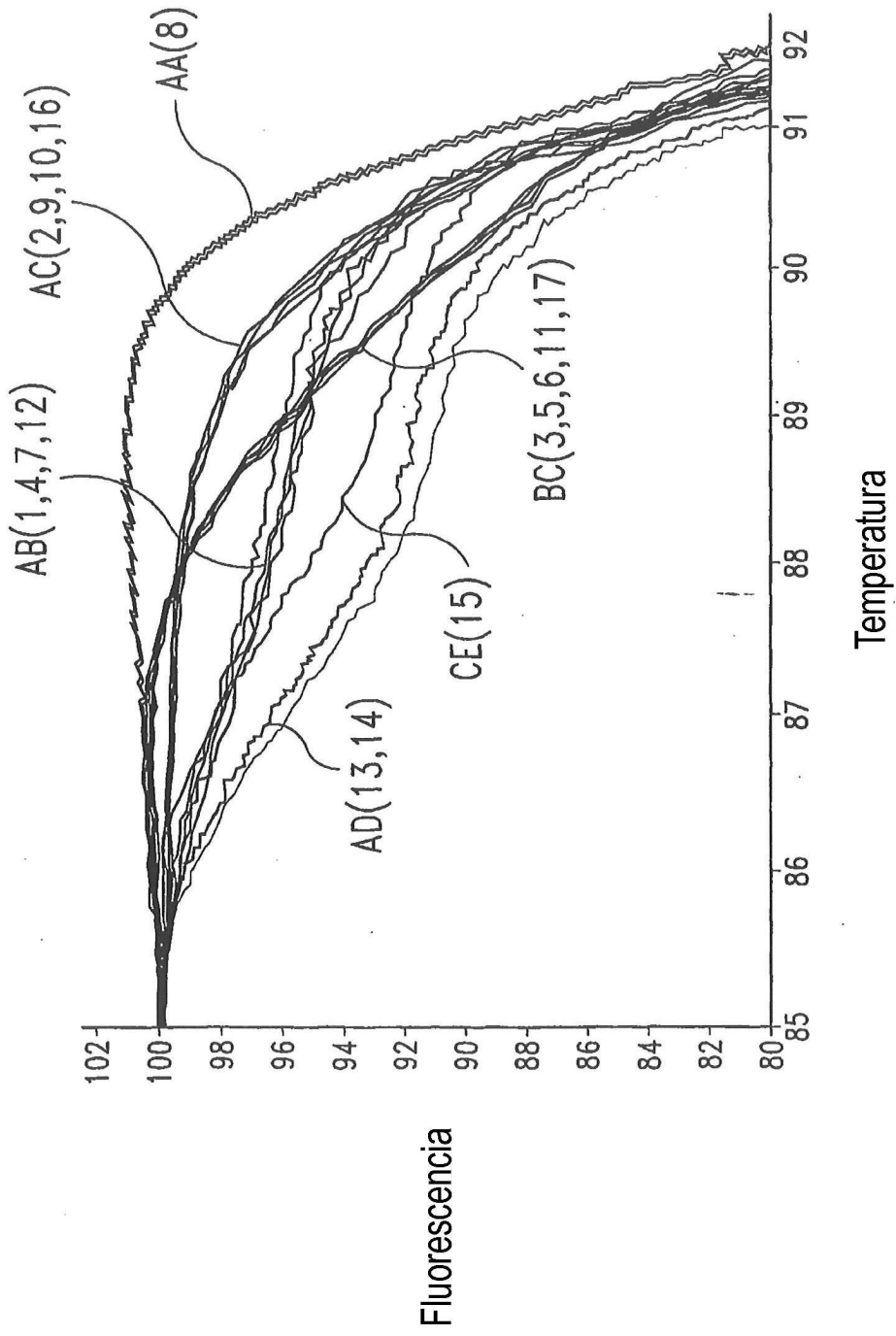


Fig. 16B

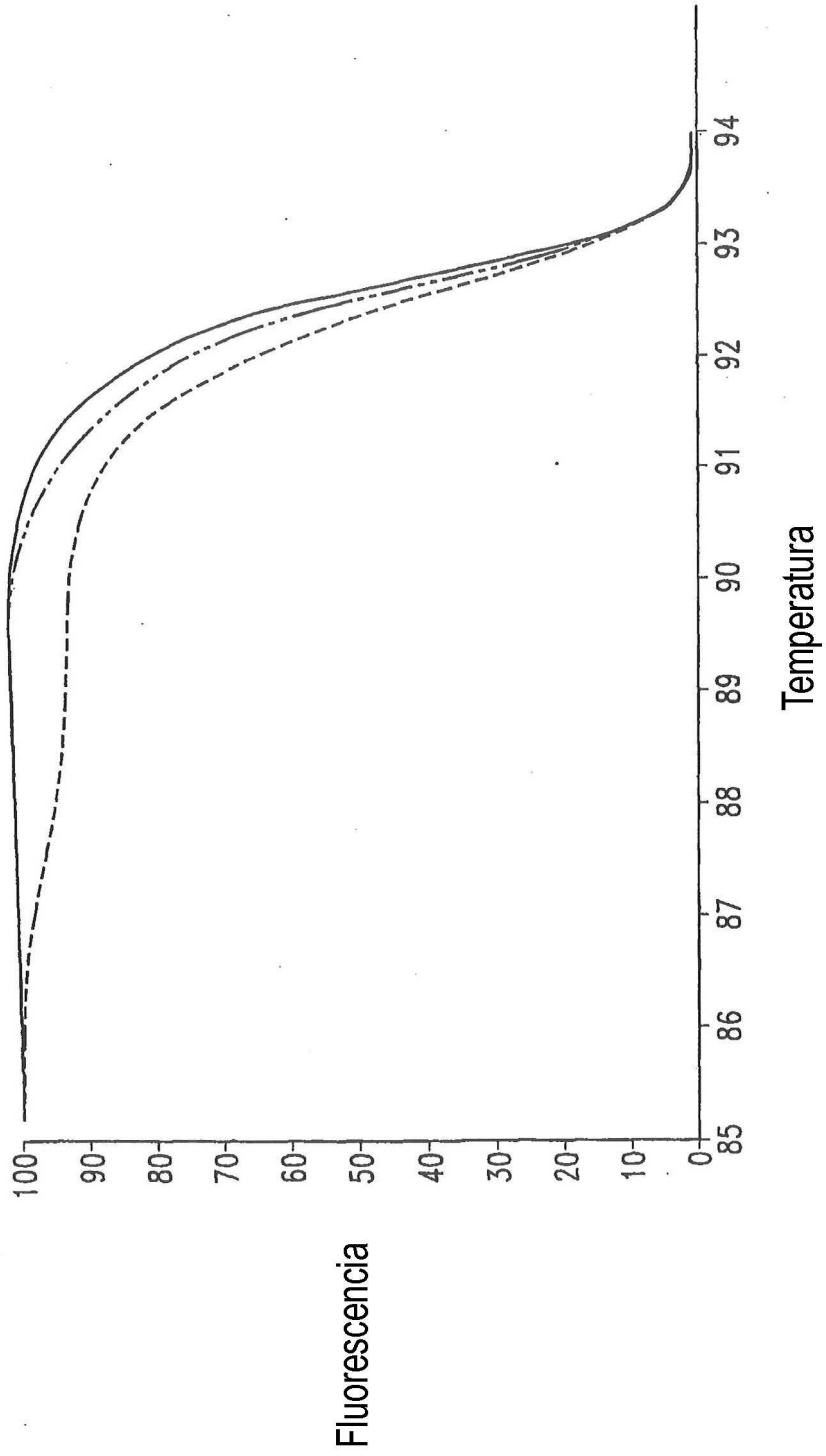


Fig. 17