

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 624**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2006 E 06765048 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1907574**

54 Título: **Oligonucleótidos**

30 Prioridad:

**20.07.2005 GB 0514889**

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

**04.03.2014**

73 Titular/es:

**LGC LIMITED (100.0%)  
QUEENS ROAD  
TEDDINGTON, MIDDLESEX TW11 0LY, GB**

72 Inventor/es:

**MCDOWELL, DAVID, GORDON y  
FRENCH, DAVID, JOHN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 445 624 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

## Oligonucleótidos

- 5 La presente invención se refiere a oligonucleótidos, en particular a oligonucleótidos marcados de forma fluorescente para su uso como sondas de hibridación.

10 Se conoce una multitud de tecnologías para detectar secuencias específicas de ADN y valorar los polimorfismos conocidos de un único nucleótido. Varios de estos métodos de detección utilizan hibridación de sondas fluorescentes y dependen de la transferencia de energía entre los restos donante y aceptor.

15 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) homogénea es un método que acopla los procesos de amplificación y detección. Los beneficios de la PCR homogénea sobre los métodos tradicionales, tales como amplificación de diana seguido por electroforesis en gel, son una reducción en la duración del ensayo, las manipulaciones y el potencial de contaminación cruzada. Se emplean sondas fluorescentes con instrumentos de PCR en tiempo real, tales como el LightCycler (Roche), ABI PRISM 7700 y 7900 (Applied Biosystems), Smartcycler (Cepheid), Rotogene (Corbett Research), MX4000 (Stratagene), SynChron (Biogene) e iCycler (BioRad), para detectar e identificar productos amplificados durante (a tiempo real) o después (punto final) de la amplificación. Ejemplos de tecnologías basadas en sondas incluyen, balizas moleculares (Tyagi *et al*, 1996), el ensayo de 5'-exonucleasa (documento US 5.691.146), sondas de hibridación (documento US 6.174.670), cebadores Scorpion (Whitcombe *et al*, 1999), y ResonSense (Lee *et al*, 2002). Las sondas fluorescentes normalmente están en un estado inactivado o no excitado hasta que su hibridación con una secuencia diana provoca la desactivación, tal como por cambios conformacionales o degradación de la sonda, o excitación como resultado de interacciones de la sonda. Estos sistemas de sonda dependen de la transferencia de energía entre los restos donante (por ejemplo fluoróforo) y aceptor (por ejemplo, inactivador o fluoróforo secundario). La energía absorbida por un fluoróforo puede transferirse a un inactivador o un fluoróforo aceptor y liberarse como calor o emitirse como luz de una diferente longitud de onda. La inactivación de la señal fluorescente puede suceder por mecanismos de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET) o no FRET. La inactivación FRET requiere un solapamiento espectral entre el donante y el aceptor, donde la eficacia de la inactivación está relacionada con la distancia entre los dos restos. La inactivación no FRET sucede a través de "contactos" de corto intervalo entre el fluoróforo y el inactivador, lo que no requiere solapamiento espectral entre los restos.

35 El ensayo de 5'-exonucleasa (TaqMan™) usa inactivación FRET para detectar el ADN diana amplificado por PCR. Las sondas TaqMan son oligonucleótidos que contienen restos de fluoróforo e inactivador preferiblemente localizados en los extremos 5' y 3'. Se emite muy poca fluorescencia desde la sonda intacta debido a la inactivación intramolecular eficaz. Sin embargo, durante la amplificación por PCR, la sonda hibrida específicamente con su secuencia diana y la actividad 5'-3'-exonucleasa de la *Taq* polimerasa escinde la sonda entre los restos de fluoróforo e inactivador. La escisión enzimática de las sondas TaqMan separa espacialmente los componentes de fluoróforo e inactivador, causando aumentos significativos en la emisión de fluorescencia correlacionados con la amplificación de la diana. Un diseño cuidadoso de las sondas TaqMan permite la discriminación de dianas polimórficas, donde solamente se degradan las sondas perfectamente apareadas para generar aumentos en la señal de fluorescencia. Como las sondas TaqMan se digieren durante la amplificación por PCR en tiempo real, las sondas no están disponibles para análisis de secuencias post-amplificación.

45 Las sondas Eclipse son oligonucleótidos lineales cortos que tienen un agente de unión al surco menor (MGB) y un resto inactivador en el extremo 5' y un fluoróforo unido al extremo 3'. Se cree que el MGB evita la actividad exonucleasa de *Taq* que escinde la sonda. El enrollamiento aleatorio de la sonda sitúa a los componentes de fluoróforo e inactivador en cercana proximidad causando inactivación de fluorescencia. La hibridación con las secuencias diana causa que la sonda se enderece de modo que los restos de fluoróforo e inactivador queden separados espacialmente.

50 Las Balizas Moleculares son sondas oligonucleotídicas monocatenarias que son no fluorescentes en aislamiento, pero que llegan a ser fluorescentes tras la hibridación con las secuencias diana. Las Balizas Moleculares no hibridadas forman estructuras de tallo-bucle, que tienen un fluoróforo unido covalentemente a un extremo de la molécula y un inactivador unido al otro, de modo que la horquilla de la baliza sitúa al resto de fluoróforo en cercana proximidad del inactivador. Cuando las Balizas Moleculares hibridan con las secuencias diana, los restos de fluoróforo e inactivador quedan espacialmente separados, de modo que el fluoróforo ya no está inactivado y la Baliza Molecular emite fluorescencia. Pueden usarse Balizas Moleculares en ensayos en tiempo real y de punto final para la detección de secuencia y discriminación de SNP. La estructura secundaria de la Baliza Molecular transmite alta especificidad a la sonda, permitiendo la identificación de dianas que difieren en un único nucleótido. Sin embargo, la interacción intramolecular de la Baliza Molecular produce potencialmente una fuente de competición para la hibridación de la diana intermolecular y, como la Baliza Molecular es una sonda interna, debe competir con la hebra opuesta del amplicón por la unión con la secuencia diana. La combinación de ambas formas de competición puede reducir la eficacia de hibridación de la Baliza Molecular con algunas moléculas diana.

65

Los Scorpion son cebadores de PCR con una cola de tallo-bucle que contiene un fluoróforo y un inactivador (Whitcombe *et al*, 1999). La estructura de tallo-bucle sitúa los componentes de fluoróforo e inactivador en cercana proximidad. El componente de bucle del Scorpion contiene la secuencia de sonda y la detección de la diana sucede por un mecanismo intramolecular altamente eficaz. Durante la PCR, los Scorpion se extienden para formar productos que incluyen la secuencia diana sonda. La cola del Scorpion se pliega sobre y posibilita la hibridación de la sonda y las secuencias diana. La hibridación de la secuencia de sonda con la diana amplificada está termodinámicamente favorecida sobre la estructura de tallo-bucle y un diseño cuidadoso de la sonda posibilita la discriminación de dianas que difieren en tan solo un único nucleótido. La hibridación de la sonda causa que la estructura de tallo-bucle se disocie de modo que los componentes de fluoróforo e inactivador queden espacialmente separados y se generan grandes aumentos en la emisión de fluorescencia. La cola de tallo-bucle se separa de la secuencia cebadora de PCR por un tapón de PCR (por ejemplo, HEG) que evita que la ADN polimerasa copie la secuencia de tallo-bucle del Scorpion. El Scorpion dúplex (Solinas *et al*, 2001) utiliza dos oligonucleótidos marcados, uno que comprende el cebador, el fluoróforo y la secuencia de sonda, y el otro que contiene el resto inactivador. De nuevo, la extensión del Scorpion dúplex posibilita que la secuencia de sonda se pliegue sobre e hibride la diana amplificada, disociando de este modo los oligonucleótidos fluoróforo e inactivador y aumentando la cantidad de señal fluorescente emitida.

Las sondas de hibridación son oligonucleótidos que están marcadas individualmente con restos de fluoróforo. Se requieren dos de dichos oligonucleótidos para cada ensayo de sonda de hibridación, uno marcado con un fluoróforo donante y el otro con un fluoróforo aceptor. La fluoresceína se emplea habitualmente como el donante y Cy5, LC-RED 640 y LC-RED 705 se usan habitualmente como aceptores. La excitación del fluoróforo donante produce un espectro de emisión que solapa con el espectro de absorción del fluoróforo aceptor. Se diseñan pares de sondas de hibridación para reconocer secuencias de nucleótidos adyacentes dentro de moléculas diana. En aislamiento, el oligonucleótido aceptor no se excita y no genera una señal fluorescente. Sin embargo, durante la hibridación con las secuencias diana polinucleotídicas, las sondas donante y aceptor se sitúan en cercana proximidad, permitiendo la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia desde el donante hasta el aceptor. La señal fluorescente desde el fluoróforo aceptor se emite solamente cuando ambas sondas se hibridan con la molécula diana. Cuando se incorporan en reacciones de PCR, la fluorescencia desde la sonda aceptor se controla una vez por ciclo de amplificación, para facilitar la medición en tiempo real de la acumulación de producto, donde la cantidad de fluorescencia emitida por el aceptor es proporcional a la cantidad de diana sintetizada. Un diseño cuidadoso de las sondas y las condiciones de ensayo permite la discriminación de dianas muy relacionadas por PCR en tiempo real. Además, pueden emplearse pares de sonda de hibridación para discriminar alelos por análisis de picos de fusión y determinación de Tm. Pueden identificarse muestras homocigóticas mediante la generación de picos específicos durante el análisis de la curva de fusión y pueden identificarse muestras heterocigóticas mediante la presencia de dos picos dentro de una única huella de fusión.

Las sondas ResonSense son oligonucleótidos individualmente marcados que se unen a secuencias diana entre las posiciones de pares de cebadores. Las sondas ResonSense no producen señal detectable en aislamiento o ausencia de secuencia diana. En su lugar, se incluyen intercalantes de ADN, tales como SYBR Gold, para excitar la sonda ResonSense. El intercalante de ADN se une a ADN dúplex y, cuando se excita por el instrumento en tiempo real, transfiere la energía hasta el fluoróforo de la sonda ResonSense (Lee *et al*, 2002).

Las anteriores tecnologías de sonda utilizan FRET y marcadores inactivadores para detectar y discriminar secuencias polinucleotídicas. Sin embargo, el sistema alternativo de sonda Light-up (Svanvik *et al*, 2000) no requiere marcadores inactivadores o transferencia FRET entre los restos donante y aceptor para detectar y discriminar secuencias de ADN. Estas sondas Light-up comprenden una secuencia que reconoce oligonucleótidos, compuesta por ácido péptido-nucleico (PNA), y un único grupo indicador fluorescente, donde el indicador normalmente es un derivado del colorante de cianuro asimétrico naranja de tiazol y porta una carga positiva. El componente de colorante fluorescente de las sondas Light-up está unido al extremo de la molécula oligonucleotídica. Cuando son monocatenarias, las sondas emiten niveles significativamente inferiores de fluorescencia que cuando hibridan con secuencias de ácido nucleico complementarias. En sondas monocatenarias, los fluoróforos están libres y puede liberarse la energía excitada en forma de movimiento o calor, de modo que las sondas no emiten fluorescencia significativamente. Tras la hibridación, el fluoróforo cargado positivamente se inserta entre las bases de ADN y llega a "bloquearse" en esa posición como resultado de la interacción de cargas, de modo que la energía excitada solamente puede liberarse como luz. Midiendo la cantidad de emisión de fluorescencia, pueden emplearse sondas Light-up para detectar secuencias de ácido nucleico y diferenciar entre dianas que difieren en una única posición.

También se han descrito otras varias tecnologías de sonda que no requieren la unión de restos inactivadores para posibilitar la detección e identificación de dianas. Se ha informado de que la emisión de muchos fluoróforos cambia a través de su interacción con nucleobases (Siedel *et al*, 1996, Knemeyer *et al*, 2000, Lee *et al*, 1994, Crockett y Wittwer 2001, Nazerenko *et al*, 2002). También se ha informado de que la interacción de fluoróforos con ADN afecta a la longitud de onda de la emisión de fluorescencia. El mayor efecto sobre la fluorescencia se ha atribuido a la guanina, que es un donante eficaz de electrones. Se cree que la inactivación surge de la transferencia de electrones de la nucleobase guanina al colorante fluorescente. Se ha informado de que el grado de inactivación depende de la proximidad de los fluoróforos a las guaninas en la sonda y las hebras diana (Xu *et al*, 1994, Hawkins *et al*, 1997, Norlund *et al*, 1989). Se ha informado de que la magnitud y la dirección del cambio de emisión en sondas marcadas

fluorescentes dependen de la localización de los restos de guanina en la sonda y las secuencias diana. Los cebadores LUX (Invitrogen) emplean estructuras de horquilla para inactivar fluoróforos unidos cerca del extremo 3' de la horquilla (Nazerenko *et al*, 2002). La estructura de horquilla de los cebadores LUX frecuentemente sitúa a los restos de fluoróforo en cercana proximidad a la región de G, inactivando de este modo la fluorescencia. Cuando el cebador llega a incorporarse en un producto bicatenario de PCR, la estructura de horquilla se disocia causando que el fluoróforo llegue a reactivarse. Se ha informado de que la presencia de restos de guanina en proximidad al marcador afecta a la funcionalidad de los cebadores LUX. Los cebadores LUX producen una señal fluorescente cuando se incorporan en cualquier molécula bicatenaria y detectarán, por lo tanto, productos de amplificación no específicos y dímeros de cebador.

Las sondas GenePin (Atto-tec GmbH) o las sondas Smart (Knemeyer *et al*, 2000, Heinlein *et al*, 2003) son estructuras de tallo-bucle similares a las Balizas Moleculares. El bucle es el componente de sonda y el tallo se emplea para inactivar la fluorescencia en el estado monocatenario (documento WO 01/36668). El fluoróforo en las sondas GenePin está unido al componente poli(C) del tallo y la fluorescencia se inactiva de forma eficaz mediante el componente de tallo poli(G) complementario. Tras la hibridación con la diana, los componentes poli(C) y poli(G) quedan separados, se retira el efecto de la inactivación por guanina y aumenta el nivel de emisión de fluorescencia.

Las sondas Simple son oligonucleótidos individualmente marcados que muestran cambios en la emisión de fluorescencia tras la hibridación con la diana (documento US 6.635.427). Los fluoróforos normalmente están unidos en el extremo, donde las sondas marcadas en 5' también incluyen preferiblemente un fosfato 3'. La magnitud y dirección del cambio de fluorescencia en las sondas Simple depende de la secuencia de ADN sonda que flanquea la posición de la unión del fluoróforo y la secuencia de ADN diana con que el fluoróforo interacciona tras la hibridación. Se ha informado de la inactivación de la fluorescencia de las sondas Simple tras la hibridación cuando los fluoróforos se ponen en proximidad a nucleótidos de desoxiguanosina en la hebra diana (Crockett y Wittwer 2001). En contraste, se ha informado de potenciación de la fluorescencia cuando los fluoróforos terminales, unidos a o cerca de restos G, se hibridan con secuencias diana complementarias (documento US 6.635.427). En un ejemplo específico, cuando fluoróforo reemplaza una base interna ("nucleótido virtual"), se ha demostrado que la fluorescencia de una sonda Simple se potencia y también se inactiva tras la hibridación con la diana, cuando el fluoróforo se sitúa en oposición a nucleótidos A y G respectivamente en alelos diana polimórficos. Las muestras heterocigóticas no mostraron un aumento o disminución significativa en la fluorescencia tras la hibridación de la sonda/diana.

Las balizas de hibridación (también llamadas HyBeacons®) son oligonucleótidos marcados de forma interna que emiten mayores cantidades de fluorescencia cuando hibridan con secuencias diana que cuando están en estado monocatenario (documento WO 01/73118). Los HyBeacons no requieren un resto inactivador para la generación de señal fluorescente, y no dependen de estructuras secundarias de la sonda, escisión enzimática o FRET con otro fluoróforo. En ausencia de un marcador inactivador, las propiedades inactivadoras presentadas del ADN son responsables de la alteración en la emisión de fluorescencia tras la hibridación. A diferencia de las otras tecnologías de sonda marcadas individualmente descritas anteriormente, la dirección del cambio de fluorescencia no se ve afectada por la secuencia de nucleótidos de la sonda o las hebras diana.

Dobson *et al* (2003) Chem: Comm. 11, 1234-1235 describe la síntesis de sondas TaqMan marcadas de forma doble. El documento WO 94/02640 describe sondas de ácido nucleico con colorantes fluorescentes unidos covalentemente a átomos fosfato en la estructura.

La enumeración o el análisis de un documento publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es conocimiento general común.

Los inventores han descubierto que, sorprendentemente, oligonucleótidos con múltiples fluoróforos internos, preferiblemente especiados de forma definida entre sí, dan señales fluorescentes inesperadamente grandes sobre la unión de una secuencia polinucleotídica diana cuando se comparan con versiones marcadas individualmente equivalentes de otro modo.

Un primer aspecto de la invención proporciona un oligonucleótido monocatenario que no tiene una secuencia que contenga partes hechas de cuatro o más restos nucleotídicos consecutivos que son el complemento inverso de cada uno de los otros que permite un apareamiento de bases intramolecular, y que está formado de restos nucleotídicos donde las bases de dos o más restos nucleotídicos internos están marcados con un fluoróforo sin un inactivador asociado, donde al menos dos de los restos nucleotídicos marcados con un fluoróforo están separados por al menos dos restos nucleotídicos no marcados, donde el resto nucleotídico 3' no contiene un hidroxilo 3' y donde cada fluoróforo es el mismo fluoróforo.

Como se analiza en detalle a continuación, los oligonucleótidos de la invención son particularmente útiles como sondas de hibridación.

Los oligonucleótidos de la invención, como los HyBeacons® descritos en el documento WO 01/73118, no dependen de estructuras secundarias oligonucleotídicas, acción enzimática o restos inactivadores unidos al oligonucleótido

para que sean eficaces como sondas de hibridación fácilmente detectables. La interacción entre estos oligonucleótidos y sus secuencias diana (como se analiza a continuación) genera alteraciones significativas en la emisión de fluorescencia que posibilitan una detección fiable de la diana. Variaciones en la estabilidad de la sonda posibilitan la discriminación de dianas que difieren en tan solo un único nucleótido a través de la medición de la temperatura de fusión del dúplex como se analiza en más detalle a continuación.

En contra de los datos dependientes de secuencia presentados en el documento US 6.635.427, que sugiere que se esperaría que fluoróforos unidos a oligonucleótidos estuvieran inactivados tras la hibridación de la sonda/diana debido a que los fluoróforos están flanqueados por restos C y las hebras de la diana tienen una abundancia de restos G en la región del fluoróforo, los oligonucleótidos de la invención muestran niveles potenciados de fluorescencia cuando hibridan con secuencias diana completamente complementarias y (parcialmente) desapareadas (es decir, parcialmente complementarias), independientemente de las secuencias de la sonda y la diana.

Los datos demuestran que los fluoróforos de los oligonucleótidos de la invención interactúan con el propio oligonucleótido monocatenario, pero no con ADN dúplex en el híbrido formado tras la hibridación. Por lo tanto, aunque la secuencia de la sonda puede afectar a la magnitud del cambio de fluorescencia, las sondas no llegan a inactivarse tras la hibridación. Incluso cuando las bases marcadas con fluoróforo de los oligonucleótidos de la invención se sitúan en proximidad a una región diana rica en G tras la hibridación, se observa reactivación y picos de fusión positivos ( $-dF/dT$  produce un valor positivo) como se demuestra en este documento, particularmente con sondas oligonucleotídicas donde los restos nucleotídicos marcados directamente con fluoróforo están separados por dos o más restos nucleotídicos no marcados. La independencia de secuencia de los oligonucleótidos de la invención contrasta con lo presentado por Nazerenko *et al*, (2002b), donde la emisión dT de fluoresceína interna se potenciaba o inactivaba tras la hibridación dependiente de la localización del fluoróforo dentro de la sonda y la proximidad de guaninas al fluoróforo. Se informó de que al menos una base de guanina era necesaria en cuatro nucleótidos del marcador para posibilitar la potenciación de fluorescencia tras la hibridación.

Como con los HyBeacons® del documento WO 01/73118, los oligonucleótidos con marcaje múltiple de la invención descritos en este documento producen niveles aumentados de potenciación de fluorescencia independientemente de las secuencias de la sonda y la diana y no requieren guaninas en localizaciones definidas para facilitar la potenciación de la fluorescencia tras la hibridación con la diana. Aunque sin limitarse por la teoría, se cree que los fluoróforos unidos a los oligonucleótidos de la invención interactúan con ADN sonda (oligonucleótido) cuando es monocatenario (por ejemplo, estando enterrado en un bolsillo hidrófobo monocatenario) causando de este modo inactivación de la fluorescencia (por ejemplo, mediante un apilamiento de bases que causa inactivación por colisión). Sin embargo, se cree que los fluoróforos no interactúan con ADN dúplex cuando las sondas hibridan con una diana, de modo que los fluoróforos unidos a los oligonucleótidos de la invención se proyectan en solución y muestran niveles elevados de emisión, donde dichos aumentos son independientes de la secuencia de la diana. El modelado molecular e informático descrito en Marks *et al* (2005), es relevante para este punto.

Mediante "oligonucleótido monocatenario que no tiene sustancialmente estructura secundaria" incluimos el significado de que el oligonucleótido no tiene una secuencia mediante la cual halla parte sustanciales que son el complemento inverso de cada una de las otras que permita apareamiento de bases intramolecular. Por "partes sustanciales" se entienden cuatro o más restos nucleotídicos consecutivos. En particular, a diferencia de las sondas oligonucleotídicas de la técnica previa tales como Balizas Moleculares, Scorpions, sondas LUX y Smart que están diseñadas para contener regiones sustanciales de complementariedad inversa, las sondas de la invención normalmente se diseñan para evitar dicha complementariedad inversa. Las sondas oligonucleotídicas de la invención solamente emplean el complemento inverso de la diana y no incluyen secuencias adicionales para generar estructura secundaria.

La estructura secundaria potencial de un oligonucleótido puede predecirse usando software de plegamiento de ácidos nucleicos tal como Mfold (Zucker (2003)). La estabilidad de la estructura secundaria frecuentemente se representa por su energía libre ( $\Delta G$ ), es decir, la energía necesaria para romper la estructura secundaria, donde grandes valores  $\Delta G$  negativos indican estructuras estables. Las sondas de la invención normalmente poseen valores  $\Delta G$  positivos o negativos pequeños, preferiblemente menos negativos que  $-2$  kcal/mol y más preferiblemente menos negativos que  $-1$  kcal/mol. Las tecnologías de sonda que dependen de la estructura secundaria, tales como Scorpions, normalmente muestran valores  $\Delta G$  negativos mucho mayores. Las sondas Scorpion descritas por Thelwell *et al* (2000) poseen valores  $\Delta G$  que varían de  $-7,7$  kcal/mol a  $-12,2$  kcal/mol.

La estructura secundaria surge cuando una región de un oligonucleótido hibrida con otra, por ejemplo, formando un bucle (como en Balizas Moleculares convencionales) que disminuye la eficacia de la hibridación del oligonucleótido con su diana. En los oligonucleótidos de la invención no existe tendencia sustancial de que una región del oligonucleótido hibride con otra, y esto puede evaluarse, por ejemplo, usando el software Mfold mencionado anteriormente.

Se unen grupos fluorescentes (fluoróforos) a bases internas en el oligonucleótido de la invención, en oposición a los extremos 5' ó 3', y se cree que se inactivan a un grado mayor cuando son monocatenarios que cuando están en forma de dúplex (es decir, tras la hibridación con la diana), ya que se propone que las bases de ADN son capaces de apilarse sobre el fluoróforo cuando no están formando pares de bases. En el estado monocatenario, el fluoróforo puede emparejarse entre dos bases de ADN formando una estructura hidrófoba estable. Esta estructura se abrirá tras la formación de dúplex ya que los nucleótidos participan en el apareamiento de bases.

Con marcadores terminales, el apilamiento de bases aún sucederá solamente en un lado del fluoróforo en hibridación. Cuando los oligonucleótidos de la invención hibridan, el fluoróforo no se posicionará entre bases de ADN, pero es capaz de extenderse sin impedimentos desde la base. Sondas marcadas de forma terminal tales como las sondas Simple llegarán a inactivarse tras la formación de dúplex si el fluoróforo está en proximidad más cercana a más guaninas en el dúplex que en el estado monocatenario. Sin embargo, si los marcadores terminales están unidos a la sonda en una región de alta abundancia en guanina, la fluorescencia se potenciará tras la formación del dúplex (documento US 6.635.427). Esta dependencia de la secuencia de la inactivación y potenciación de la fluorescencia, de acuerdo con la localización y abundancia de guaninas en la sonda y la hebra diana, no se observa en los oligonucleótidos de la invención.

Todas las bases de ADN son capaces de inactivar la fluorescencia en algún grado, donde la G es la que tiene mayor capacidad de hacerlo. Para evitar dudas, la expresión "inactivador asociado" no incluye bases de ADN que forman parte del oligonucleótido. Los fluoróforos en los oligonucleótidos de la invención interactuarán con las bases de sondas monocatenarias de modo que se inactive la fluorescencia. Como se espera que los fluoróforos se proyecten en solución tras la hibridación con la diana y no interactúen con ADN dúplex, la secuencia de la diana puede no afectar a la dirección del cambio de la fluorescencia, es decir, las guaninas en la diana pueden no inactivar la fluorescencia tras la hibridación. Por lo tanto, los oligonucleótidos de la invención muestran niveles aumentados de fluorescencia cuando hibridan con secuencias diana. Las G pueden modular la potencia de la fluorescencia pero todas se reactivan significativamente en hibridación. La fluorescencia procedente de fluoróforos unidos de forma interna de los oligonucleótidos de la invención siempre se potencia tras la formación de dúplex independientemente de la localización y abundancia de guaninas en la sonda y hebra diana.

Los oligonucleótidos con marcaje doble y múltiple de la invención emiten cantidades significativamente mayores de fluorescencia cuando hibridan con secuencias de ácido nucleico complementarias en comparación con la conformación monocatenaria (no hibridada) a pesar de la ausencia de un componente inactivador aunque normalmente se siguen las restricciones de espaciado desveladas en este documento para evitar interacciones adversas que conduzcan a alturas de picos reducidas o picos negativos como se muestra en la Figura 11.

La proporción de señal-a-ruido es la proporción de la intensidad de señal de un híbrido bicatenario que comprende un oligonucleótido de la invención a la intensidad de señal de la sonda monocatenaria y es preferiblemente lo más grande posible, por ejemplo, 2 o más. Las proporciones de señal-a-ruido en los oligonucleótidos de la invención son significativas y útilmente mayores de 1 a pesar de la ausencia de restos inactivadores asociados. Se cree que los restos de fluoróforo emiten significativamente más señal fluorescente cuando las sondas hibridan con moléculas diana que cuando están en estado monocatenario debido a alguna forma de interacción con las secuencias de ADN. Las sondas oligonucleotídicas con marcaje doble o múltiple de la invención poseen proporciones que son mayores de las esperadas a partir de oligonucleótidos marcados individualmente de secuencia idéntica.

La potenciación de la fluorescencia sucede tras la hibridación con la diana cuando los restos marcados con fluoróforo se sitúan en todos los entornos de secuencia. La colocación de restos marcados con fluoróforo adyacentes a G puede producir los mayores niveles de potenciación de fluorescencia en el estado dúplex. Sin embargo, la potenciación de la fluorescencia tras la hibridación con la diana también sucederá cuando los restos marcados con fluoróforo se localizan dentro de regiones de alta abundancia en C. En una realización de esta invención, los restos en la hebra diana no son responsables de la inactivación o potenciación de la fluorescencia de la sonda tras la hibridación. La naturaleza de la interacción del fluoróforo con el oligonucleótido difiere entre el oligonucleótido libre e hibridado de modo que los oligonucleótidos de la invención muestran niveles mayores de emisión de fluorescencia cuando en forma de dúplex que cuando son monocatenarios lo que demuestra que no hay restricciones aparentes de secuencia en la funcionalidad, aunque la secuencia puede afectar a la magnitud de la potenciación de la fluorescencia.

Normalmente, el oligonucleótido tiene 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 ó 7 u 8 ó 9 ó 10 restos internos marcados con un fluoróforo. La cantidad puede depender de la longitud del oligonucleótido. Normalmente, se marcan hasta aproximadamente un tercio de los restos internos con un fluoróforo, pero puede haber menos.

La longitud del oligonucleótido de la invención es preferiblemente una que sea adecuada para hibridar con una diana polinucleotídica complementaria, para proporcionar un híbrido estable cuya temperatura de fusión dependa de la secuencia exacta de la diana. Los oligonucleótidos que contienen menos de 15 restos nucleotídicos en muchos casos no forman híbridos suficientemente estables, particularmente cuando las dos secuencias de hibridación no son completamente complementarias, aunque pueden usarse en algunas circunstancias. Los oligonucleótidos, que son más largos de aproximadamente 30 restos nucleotídicos pueden formar híbridos cuya temperatura de fusión es

relativamente insensible a la posible presencia de un desapareamiento de un único nucleótido, aunque pueden usarse en algunas circunstancias.

5 Normalmente, el oligonucleótido es de 10 a 50 restos nucleotídicos de longitud, preferiblemente de 15 a 30 restos nucleotídicos de longitud. Por tanto, normalmente, el oligonucleótido es de 10 u 11 ó 12 ó 13 ó 14 ó 15 restos nucleotídicos de longitud hasta (e incluyendo) 25 ó 26 ó 27 ó 28 ó 29 ó 30. Por lo tanto, la invención incluye oligonucleótidos dentro de cualquiera de los intervalos de tamaño mencionados.

10 Un oligonucleótido dentro del intervalo de tamaño de 15 a 30 nucleótidos puede tener hasta aproximadamente 10 de sus restos nucleotídicos internos marcados con un fluoróforo, pero convenientemente un oligonucleótido en este intervalo de tamaño tiene 2 ó 3 ó 4 ó 5 de sus restos internos marcados con un fluoróforo.

15 Se prefiere que al menos dos (o los dos según pueda ser el caso) de los restos nucleotídicos marcados con un fluoróforo estén separados por al menos dos restos nucleotídicos no marcados. Normalmente, hay 2 ó 3 ó 4 ó 5 ó 6 restos nucleotídicos no marcados que separan los restos nucleotídicos marcados. Se prefiere particularmente que dos restos no marcados separen los restos marcados. También se prefiere particularmente que todos los restos nucleotídicos marcados estén separados por al menos dos restos nucleotídicos no marcados. Preferiblemente, los fluoróforos están separados de tal modo que se evite la inactivación 'por contacto' directo entre los fluoróforos. La inactivación por contacto surge del contacto físico de los fluoróforos y normalmente se evita por separación física (es decir, al menos dos restos nucleotídicos entre las bases marcadas con fluoróforo).

20

25 Los restos nucleotídicos habitualmente derivan de los nucleósidos de origen natural A, C, G, T y U. Sin embargo, pueden usarse análogos de nucleótidos en una o más localizaciones del oligonucleótido de la invención, estando modificados dichos análogos de nucleótidos, por ejemplo, en la parte de la base y/o la parte del azúcar y/o el enlace fosfato. Las modificaciones de bases, tales como propinil dU (análogo de dT) y 2-amino dA (análogo de dA), generalmente alteran las propiedades de hibridación y pueden hacer atractivo el uso de oligonucleótidos que tengan menos de 15 restos nucleotídicos. En el caso de oligonucleótidos que contengan propinil dU, puede haber aproximadamente 10 restos de longitud dependiendo de la temperatura de fusión con la secuencia diana requerida.

30 Como alternativa, los oligonucleótidos compuestos de o que comprenden ácido péptido-nucleico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), 2'-O-metil ARN, ADN fosforamidita, ADN fosforotioato, ADN metil fosfonato o ADN fosfotriéster pueden emplearse para formar interacciones química o enzimáticamente más estables con las secuencias diana.

35 Puede usarse cualquier fluoróforo que pueda unirse a un resto nucleotídico, con la condición de que no evite la hibridación del oligonucleótido con su secuencia diana.

40 Los fluoróforos adecuados incluyen fluoróforos basados en fluoresceína tales como FAM (6-carboxifluoresceína), TET (tetraclorofluoresceína), HEX (hexaclorofluoresceína); fluoróforos basados en rodamina tales como ROX (6-carboxi-X-rodamina) y TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina); la familia Cy de colorantes, especialmente Cy3 y Cy5, todos disponibles en Glen Research, 22825 Davis Drive, Sterling, VA 20164, Estados Unidos.

45 Pueden usarse otros colorantes de fluoresceína, por ejemplo aquellos con diferentes espectros de emisión, tales como NED y JOE. También pueden usarse otros fluoróforos, tales como aquellos de las familias de colorantes Alexa, Atto, Dyomics Megastokes y Thilyte como se detalla en las siguientes Tablas 9 a 15.

50 En una realización preferida de la invención, los oligonucleótidos se marcan en la posición 5 de bases internas de uracilo/timina usando C6 FAM dU (disponible en la University of Southampton, R.U.) o fluoresceína dT (disponible en Glen Research, Sterling, VA) respectivamente (en este contexto, la estructura de dT y dU son idénticas y los términos por lo tanto son intercambiables). Pueden incorporarse fosforamiditas protegidas con FMOC en posiciones internas dT dentro de los oligonucleótidos y pueden usarse como punto de unión para una diversidad de colorantes fluorescentes, incluyendo, aunque sin limitación, FAM, TET, HEX, ROX, TAMRA, Cy3 y Cy5, todos disponibles en Glen Research. Tras la síntesis del oligonucleótido, el grupo FMOC puede retirarse de la uridina protegida en 2' y puede acoplarse un fluoróforo fosforamidita, tal como una 6-carboxifluoresceína fosforamidita protegida, al grupo 2'-hidroxi libre. En otra realización más, los oligonucleótidos pueden marcarse en posiciones internas de A, C o G, donde los nucleótidos marcados se incorporan como fosforamiditas durante la síntesis en fase sólida del oligonucleótido o como fluoróforos unidos tras la síntesis del oligonucleótido usando fosforamiditas protegidas (por ejemplo, 8-aminoalquil-dA, 7-aminoalquil 7-desaza-dA, N(4)-aminoalquil dC y 5-aminoalquil-dC).

60 Se prefiere que el fluoróforo no se intercale en ADN bicatenario. Se prefiere que el fluoróforo no sea naranja de tiazol (TO).

65 Puede esperarse que los oligonucleótidos con marcaje doble de la invención muestren señales fluorescentes y ruido de fondo que sean el doble de los observados con sondas marcadas individualmente, de modo que la proporción de señal-a-ruido se mantenga (es decir, se esperaría un efecto aditivo). Sin embargo, sorprendentemente, las proporciones de señal-a-ruido de sondas con marcaje doble son mayores que las observadas con sondas marcadas

individualmente de secuencia idéntica. Un aumento inesperado similar en la proporción de señal-a-ruido también se observa con otros oligonucleótidos con marcaje múltiple de la invención.

Además, como se describe en más detalle en los Ejemplos, se ha demostrado que sondas con marcaje doble, triple, cuádruple, y múltiple adicional generan picos de fusión considerablemente más grandes que los esperados del efecto cumulativo de las sondas individuales marcadas individualmente de secuencia nucleotídica idéntica si el efecto fuera simplemente aditivo.

Normalmente, el oligonucleótido de la invención tiene una complementariedad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de la diana. Por tanto, el oligonucleótido es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica de la diana en condiciones apropiadas. Por lo tanto, salvo que el contexto indique otra cosa, por "complementario" incluimos el significado de que el oligonucleótido es capaz de hibridar con una secuencia polinucleotídica diana. El oligonucleótido puede ser completamente complementario a la secuencia polinucleotídica diana (es decir, hay un apareamiento perfecto en términos de apareamiento de bases entre los oligonucleótidos), o el oligonucleótido puede ser parcialmente complementario a la secuencia polinucleotídica diana (es decir, hay uno o más desapareamientos entre el oligonucleótido y la secuencia polinucleotídica diana, pero el oligonucleótido aún es capaz de hibridar). Normalmente, cuando el oligonucleótido es parcialmente complementario al polinucleótido diana, hay menos de 5 desapareamientos, preferiblemente 1 ó 2 ó 3 ó 4 desapareamientos, más preferiblemente un desapareamiento. Convenientemente, el oligonucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 % con el complemento de su diana, más preferiblemente de al menos el 80 % o al menos el 85 % o al menos el 90 % o al menos el 95 %. Por ejemplo, para un oligonucleótido de 20 restos, puede haber 6 ó 4 ó 3 ó 2 ó 1 desapareamiento con la diana.

Normalmente, la secuencia polinucleotídica diana se selecciona entre el grupo compuesto por el genoma humano incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, el genoma del ratón incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, y el genoma de cualquier agente infeccioso incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo. Preferiblemente, el oligonucleótido es uno que tiene una secuencia complementaria a uno cualquiera de los siguientes genes humanos o un alelo de los mismos:

30	N-acetiltransferasa 2	X14672
	Factor V Leiden	AY364535
	Factor II	AF493953
	MTHFR	NM_005957
	Anemia falciforme	AY356351

El gen PrP de oveja (NM\_001009481) también es un gen preferido para el análisis.

Preferiblemente también el oligonucleótido es uno que tiene una secuencia complementaria al genoma o cualquier gen en el mismo o alelo del mismo de los siguientes agentes infecciosos:

40	<i>Chlamydia trachomatis</i>	X07547
	Adenovirus	AJ293905
	Influenza A	AY130766
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	X52474
	MRSA	AJ810121

Como se describe adicionalmente en los Ejemplos, el oligonucleótido puede ser uno que tiene una secuencia complementaria a un alelo de un gen. Por ejemplo, puede ser complementario a un alelo mutante de un gen que, en seres humanos, puede estar asociado a una enfermedad genética particular (por ejemplo, fibrosis quística), o puede ser complementario al alelo de tipo silvestre. Es preferible que la secuencia complementaria a la diferencia de la secuencia nucleotídica del alelo dado en comparación con otro alelo del gen esté localizada hacia el centro del oligonucleótido (por ejemplo, dentro de la mitad central a un tercio de los restos nucleotídicos). Esto permite una buena discriminación en las temperaturas de fusión para uno de estos oligonucleótidos dado (que puede hibridar con ambos alelos pero con diferentes Tm).

En una realización preferida, el oligonucleótido de acuerdo con la invención preferiblemente tiene una secuencia completamente complementaria a un alelo de una diana polinucleotídica conocida que tiene un polimorfismo conocido, por ejemplo, una mutación puntual o una inserción o delección de una única base (SNP). El sitio de polimorfismo está preferiblemente, aunque no esencialmente, localizado de forma central dentro de la sonda oligonucleotídica. Como alternativa, el oligonucleótido puede ser complementario a una secuencia polinucleotídica no polimórfica conocida y puede simplemente usarse para detectar esa diana, por ejemplo, para una rápida detección de patógenos. Además, el polinucleótido puede usarse para estudiar dianas potencialmente polimórficas con polimorfismos desconocidos o no caracterizados. La posibilidad se concibe mapeando la posición y/o naturaleza de polimorfismos desconocidos por hibridación diferencial de oligonucleótidos y diferencias en la Tm del pico de fusión. Cuando se provoca que el oligonucleótido de la invención hibride con una diana polinucleotídica, todas las anteriores características contribuyen a la formación de un híbrido estable con una temperatura de fusión óptima y una diferencia sustancial en las temperaturas de fusión ( $\Delta T_m$ ) entre hebras que aparean perfectamente y hebras



que tienen una única posición o múltiples posiciones de desapareamiento.

- 5 Como se analiza en más detalle a continuación, particularmente cuando el oligonucleótido de la invención se usa como sonda de la producción de una secuencia polinucleotídica diana en una reacción de amplificación de ácido nucleico, el oligonucleótido es uno en que el resto nucleotídico 3' no contiene un grupo hidroxilo 3'. El oligonucleótido no es capaz de actuar como cebador para una ADN polimerasa y no es capaz de ligar mediante una ADN ligasa. Convenientemente, el resto nucleotídico 3' es un resto 3' desoxi. También convenientemente, el resto nucleotídico 3' puede tener un fosfato 3', u otros grupos 3' que evitarían la extensión de cadena.
- 10 Un aspecto adicional de la invención proporciona un oligonucleótido de la invención inmovilizado en un soporte sólido. El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido adecuado. Las técnicas y enlazadores para inmovilizar oligonucleótidos usando soportes en formatos que los dejan libres de hibridar con dianas complementarias en solución están bien descritos en la bibliografía.
- 15 Un aspecto adicional más de la invención proporciona una serie de oligonucleótidos de la invención. La serie puede comprender dos o más sitios individualmente abordables de oligonucleótido inmovilizado en un soporte sólido. Normalmente, la serie contendrá al menos 10, o al menos 100, o al menos 1000 de estos sitios. Normalmente, la serie comprende oligonucleótidos con diferentes secuencias, normalmente cada sitio diferente está asociado con un oligonucleótido con una secuencia de diferencia. En una realización preferida, la serie es una serie de las sondas oligonucleotídicas inmovilizadas en localizaciones espaciadas usando un soporte, donde las diferentes sondas oligonucleotídicas son diferentes oligonucleótidos de acuerdo con esta invención. Además, los oligonucleótidos de la invención pueden emplearse para analizar dianas de ADN inmovilizadas sobre o dentro de un soporte, donde las distintas dianas pueden posicionarse en localizaciones espaciadas en formatos de tipo serie.
- 20 Los métodos para inmovilizar oligonucleótidos y preparar series de oligonucleótidos son bien conocidos en la técnica.
- 25 En un aspecto adicional más de la invención, se proporciona un método para investigar una secuencia polinucleotídica diana en una muestra que contiene secuencias polinucleotídicas, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un oligonucleótido de la invención que es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica diana, y determinar si sucede hibridación.
- 30 La muestra puede ser cualquier muestra adecuada, y puede ser una que se sabe que contiene la secuencia polinucleotídica diana, o puede ser una donde no se sabe que contiene la secuencia polinucleotídica diana, y el propósito de la investigación es determinar si lo hace o no.
- 35 Como el oligonucleótido está marcado de forma fluorescente, y como hay un aumento en la fluorescencia tras la unión del oligonucleótido con la diana, se usa convenientemente un aumento en la fluorescencia para determinar si ha sucedido hibridación entre el oligonucleótido y la secuencia polinucleotídica diana.
- 40 Se apreciará que, en condiciones dadas, el oligonucleótido es capaz de hibridar con su diana a ciertas temperaturas. Como se analiza en más detalle a continuación, puede ser deseable variar la temperatura de la hibridación y detectar fluorescencia a diferentes temperaturas para investigar la secuencia polinucleotídica diana. Por tanto, en una realización preferida de la invención, el método se realiza a una temperatura predeterminada, o sobre un intervalo de temperaturas, cerca del punto de fusión (T<sub>m</sub>) del híbrido formado entre la secuencia polinucleotídica diana y dicho oligonucleótido. Las T<sub>m</sub> se determinan normalmente mediante análisis de la curva de fusión donde el 50 % de la sonda hibrida con la secuencia diana y el 50 % está disociada y libre en solución.
- 45 El oligonucleótido puede ser completamente complementario a la secuencia polinucleotídica diana, y ese oligonucleótido tendrá una T<sub>m</sub> característica en condiciones de hibridación dadas. Como alternativa, el oligonucleótido puede no ser completamente complementario a la secuencia polinucleotídica diana, pero no obstante es capaz de hibridar con ella (es parcialmente complementario), y ese oligonucleótido tendrá una T<sub>m</sub> característica (pero casi seguramente distinta).
- 50 El método de la invención es particularmente adecuado para el análisis de polimorfismos de un gen y similares. En una realización, la secuencia polinucleotídica diana investigada son uno o más alelos de un gen. Uno (o el) oligonucleótido usado en el método es convenientemente uno que es capaz de hibridar con más de un alelo del gen, y normalmente tiene diferentes T<sub>m</sub> en condiciones de hibridación dadas con respecto a los diferentes alelos.
- 55 El método puede usarse para detectar la presencia de la secuencia diana, por ejemplo en una muestra en que se desconoce si está presente. El método también puede usarse para identificar la secuencia diana o puede usarse para cuantificar la cantidad de la secuencia polinucleotídica diana en la muestra. Normalmente, el aumento en la fluorescencia tras la unión del oligonucleótido al polinucleótido diana se usa para esto.
- 60 Es particularmente conveniente que la muestra contenga secuencias polinucleotídicas producidas por amplificación ya que a menudo una fuente inicial de material biológico (tal como saliva, un raspado bucal, cantidades pequeñas de
- 65

sangre seca, etc.) contienen solamente una pequeña cantidad de ácido nucleico que puede contener el polinucleótido diana.

5 Adecuadamente, las secuencias polinucleotídicas se producen mediante una cualquiera o más de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, incluyendo amplificación por PCR asimétrica), PCR de transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por círculo rodante (RCA) o amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).

10 En una realización preferida, la amplificación de las secuencias polinucleotídicas en la muestra se realiza en presencia del oligonucleótido que es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica diana. El resto nucleotídico 3' del oligonucleótido no contiene un hidroxilo 3'. El oligonucleótido de la invención presente en la reacción no tiene capacidad de extensión de cadena mediante una ADN polimerasa y no tiene capacidad de ligamiento por ADN ligasa. En esta realización, se prefiere que la observación de la fluorescencia se haga durante la amplificación de las  
15 secuencias polinucleotídicas en la muestra.

Puede no haber necesidad de extraer el ácido nucleico de la fuente biológica antes de la amplificación, ya que el proceso de amplificación puede tener capacidad de dicha extracción. Por tanto, por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas en la muestra pueden producirse por amplificación de una fuente biológica tal como saliva sin  
20 extracción previa del ácido nucleico.

La invención proporciona un método para investigar una diana polinucleotídica que tiene un polimorfismo conocido, comprendiendo dicho método proporcionar una sonda oligonucleotídica que comprenda restos nucleotídicos marcados con fluoróforo. La diana polinucleotídica se incuba con la sonda oligonucleotídica para formar un híbrido,  
25 mostrando la sonda oligonucleotídica un nivel mayor de fluorescencia cuando está en forma de híbrido que cuando está en forma monocatenaria. El nivel de fluorescencia emitida por la sonda oligonucleotídica se observa a una temperatura predeterminada o se controla sobre un intervalo de temperaturas.

30 Convenientemente, si se usa una única sonda oligonucleotídica en una investigación en que el oligonucleótido puede hibridar con dos alelos diferentes con diferentes  $T_m$ , puede usarse una temperatura intermedia a las dos  $T_m$ , o el ensayo puede realizarse sobre un intervalo de temperaturas (es decir, por análisis de fusión).

Se apreciará que el método puede incluir dos o más sondas oligonucleotídicas de la invención que hibridan con diferentes secuencias diana (por ejemplo, diferentes alelos del mismo gen). Convenientemente, estas pueden distinguirse mediante el uso de fluoróforos con diferentes propiedades fluorescentes, o los dos o más oligonucleótidos tienen diferentes características de fusión (por ejemplo,  $T_m$ ) cuando hibridan con (o que hibridan con) sus respectivas secuencias polinucleotídicas diana.

40 Normalmente, cuando se usa un intervalo de temperaturas, el intervalo abarca la  $T_m$  del híbrido formado entre el oligonucleótido y su diana polinucleotídica. Convenientemente, el intervalo de temperatura es  $\pm 10$  °C, normalmente  $\pm 5$  °C en comparación con la  $T_m$ .

45 Convenientemente, si se incluyen dos sondas oligonucleotídicas diferentes en una investigación, el ensayo se realiza sobre un intervalo de temperaturas (es decir, por análisis de fusión).

Es particularmente útil realizar el método de la invención de modo que se haga una observación de la tasa de cambio de la señal fluorescente con la temperatura.

50 Normalmente, los oligonucleótidos de la invención son unos que forman un híbrido con su secuencia polinucleotídica diana donde el híbrido tiene una  $T_m$  de 20 °C a 90 °C, preferiblemente de 40 °C a 70 °C.

55 En una situación en que se usa una sonda oligonucleotídica de la invención para detectar una secuencia diana completamente complementaria y una secuencia diana parcialmente complementaria, puede suceder hibridación preferencial con la secuencia completamente complementaria si la concentración de diana excede a la concentración de sonda ya que las secuencias desapareadas son menos estables. En casos extremos, la hibridación preferencial puede detectar solamente la forma completamente complementaria de la diana. El aumento en la concentración de la sonda puede, por lo tanto, emplearse para promover la hibridación con dianas desapareadas y mejorar el equilibrio de las alturas de pico.

60 En una realización de este aspecto de la invención, se incluyen uno o más oligonucleótidos de la invención en ensayos de PCR y emiten cantidades mayores de fluorescencia cuando hibridan con secuencias dianas complementarias que cuando están en estado monocatenario. Tras la amplificación, se determina la presencia e identidad de secuencias diana por análisis de curva de fusión (French *et al*, 2001, French *et al*, 2002). La estabilidad y temperatura de fusión de las sondas hibridadas depende del grado de homología entre la sonda y la secuencia  
65 diana. El aumento de la temperatura de reacción por encima de la  $T_m$  del oligonucleótido de la invención causa que se disocien dúplex sonda/diana y disminuya la cantidad de emisión de fluorescencia. Pueden detectarse secuencias

que difieren en tan sólo un único nucleótido y diferenciarse basándose en la  $T_m$  del pico de fusión. Pueden completarse cincuenta ciclos de amplificación y análisis de fusión en tan sólo 16 minutos. Una ventaja de usar los oligonucleótidos de la invención para análisis de secuencia homogénea deriva de su capacidad de identificar de forma fiable muestras homocigóticas y heterocigóticas usando una única sonda oligonucleotídica.

5 La diana polinucleotídica puede ser ADN, ARN o ADNc, y se usa en forma monocatenaria, o puede sondearse un dúplex de ADN para formar una triple hélice. En una realización, la diana polinucleotídica tiene un polimorfismo conocido, preferiblemente un polimorfismo de un único nucleótido (SNP). La diana se incuba en condiciones de hibridación con una sonda oligonucleotídica de la invención. Es necesario que el híbrido genere una señal de fluorescencia más fuerte que la sonda oligonucleotídica monocatenaria. La temperatura de fusión del híbrido dependerá, entre otras cosas, de si la diana polinucleotídica y la sonda oligonucleotídica son completamente complementarias o si existe un apareamiento único o incluso doble que surge en o cerca de la localización del SNP. El método implica observar el nivel de señal de fluorescencia, emitida por la sonda oligonucleotídica, a una temperatura predeterminada cerca de la temperatura de fusión del híbrido, o sobre un intervalo de temperaturas. Se describen dos alternativas, aunque son posibles otras:

20 a) La temperatura de una solución que contiene el híbrido se eleva lentamente, observando continuamente una señal de fluorescencia, para construir un gráfico de la derivada negativa de la intensidad de la señal de fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ) frente a la temperatura. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) del híbrido aparece como un pico, y proporciona información acerca de la secuencia de la diana polinucleotídica. Las  $T_m$  generadas a través de análisis de fusión del oligonucleótido de la invención pueden usarse para distinguir dianas polimórficas. Así mismo, el análisis puede realizarse enfriando la solución lentamente desde una elevada temperatura y determinando la temperatura de hibridación.

25 b) Una solución del híbrido se mantiene a una temperatura predeterminada y se observa el nivel de fluorescencia. Generalmente, la temperatura predeterminada se elige para que sea intermedia entre la temperatura de fusión de un híbrido perfectamente apareado y la temperatura de fusión de un híbrido con uno o dos desapareamientos. El nivel de señal de fluorescencia observado proporciona una indicación de si se ha disociado el híbrido o no, y así proporciona información acerca de la secuencia de la diana polinucleotídica. Pueden distinguirse dianas polimórficas en formatos de punto final y tiempo real.

30 Convenientemente, la diana polinucleotídica puede ser un amplímero de PCR, formado mediante el uso de cebadores adecuados para amplificar una parte deseada de ADN genómico. Puede ser conveniente realizar la amplificación y la investigación de la diana en un modo homogéneo, por ejemplo, en un único recipiente de reacción añadiendo la sonda oligonucleotídica antes, durante o después del procedimiento del ciclo de amplificación. También puede ser conveniente realizar la amplificación de la diana y la investigación de la secuencia directamente a partir de las muestras, tales como saliva, sin extracción previa de ADN, ARN o ADNc. La sonda oligonucleotídica se modifica en su extremo 3' para evitar la extensión de cadena durante la amplificación por PCR. En otro aspecto, la amplificación de la diana puede realizarse usando PCR asimétrica para generar una abundancia de la diana monocatenaria. La hibridación de la sonda preferencial con secuencias diana completamente complementarias sobre dianas desapareadas puede evitarse aumentando la concentración de la sonda. La amplificación de la diana para ensayos usando el oligonucleótido de la invención también puede realizarse usando técnicas alternativas tales como reacción en cadena de ligamiento (LCR), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA). Normalmente, se usan concentraciones de sonda mayores de 150 nM en ensayos asimétricos.

35 Puede ser conveniente proporcionar dos o más de los oligonucleótidos de la invención, uno completamente complementario a cada alelo del SNP en investigación. Cuando cada oligonucleótido de la invención porta un diferente fluoróforo, puede ser conveniente mezclar las sondas en solución para el análisis de dianas homocigóticas y heterocigóticas. Del mismo modo, puede usarse una mezcla de oligonucleótidos de la invención complementarios a los diversos alelos de varios SNP diferentes juntos en solución para análisis múltiple, con la condición de que cada uno está marcado con un fluoróforo espectralmente distinto. Dicho análisis múltiple también puede realizarse usando un único tipo de colorante indicador (fluoróforo), empleando dos o más oligonucleótidos de la invención que muestren diferentes  $T_m$  apareadas y desapareadas, de modo que las múltiples dianas y alelos puedan detectarse e identificarse simultáneamente basándose en la temperatura de fusión.

45 El método de la invención puede realizarse donde el oligonucleótido que es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica diana, la muestra que puede contener la secuencia diana polinucleotídica o ambos están inmovilizados sobre o dentro de un soporte.

60 La secuencia polinucleotídica diana se selecciona preferiblemente entre el grupo que consiste en el genoma humano incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, el genoma de ratón o cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, y el genoma de cualquier agente infeccioso incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo. Las secuencias diana preferidas son las descritas anteriormente.

65

También se desvela un proceso para preparar un oligonucleótido de la invención, comprendiendo el proceso seleccionar una secuencia polinucleotídica diana y sintetizar un oligonucleótido que tiene una complementariedad de secuencia con el polinucleótido diana y que tiene las propiedades expuestas en el primer aspecto de la invención. Normalmente, el oligonucleótido es uno que es capaz de hibridar con la secuencia diana. El oligonucleótido puede ser uno que es completamente complementario a la secuencia diana o puede ser uno que esté desapareado como se ha descrito anteriormente.

Preferiblemente, la secuencia polinucleotídica diana se selecciona entre el grupo que consiste en el genoma humano incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, el genoma de ratón incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, y el genoma de cualquier agente infeccioso incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo como se ha descrito en más detalle anteriormente.

Los oligonucleótidos de la invención producidos por este método pueden situarse en una serie, por tanto también se desvela un proceso para producir una serie de oligonucleótidos colocando dos o más oligonucleótidos de la invención en un soporte sólido. Normalmente, los sitios donde se han colocado (unido) los oligonucleótidos están uniformemente distribuidos sobre el soporte.

La invención se describirá ahora en más detalle por referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes y Figuras.

La Figura 1 muestra las estructuras químicas de los marcadores C6 FAM dU y Fluoresceína dT Glen empleados en los oligonucleótidos de la invención.

La Figura 2 muestra que se empleó un oligonucleótido marcado individualmente (HYBA1928C) para analizar directamente muestras de saliva con respecto al polimorfismo A1928C de la 5, 10-metilenotetrafolato reductasa (MTHFR). La derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT sobre el eje y) se representó frente a la temperatura de la muestra (eje x) para generar picos de fusión. El oligonucleótido produce picos de fusión con Tm de aproximadamente 51,5 °C y 61 °C en presencia de los alelos A y C respectivamente. Las muestras heterocigóticas generan ambos picos de fusión de 51,5 °C y 61 °C.

La Figura 3 muestra los picos de fusión derivados de los oligonucleótidos marcados individualmente (FVG1) y con marcaje doble (FVG11) del factor V. El fluoróforo adicional causa que la altura del pico de fusión aumente en 4-5 veces y reduce la Tm de la sonda en aproximadamente 5 °C.

Figura 4. A) Picos de fusión de la sonda HYBCH2 obtenidos con ADN purificado de *Chlamydia trachomatis* (LGV-II, cepa 434, ATCC VR-920B, Advanced Biotechnologies, Maryland, EE.UU.) y muestras de hisopo clínico procesadas. Se genera un único pico de fusión, con una Tm de aproximadamente 60 °C, en presencia de ADN diana de Chlamydia. B) PCR en tiempo real y datos de los picos de fusión obtenidos con la sonda HYBCH6 de Chlamydia. La sonda con marcaje triple de Chlamydia produce picos de fusión que son aproximadamente 6 veces la magnitud del oligonucleótido HYBCH2 marcado individualmente.

La Figura 5 muestra los picos de fusión de HYBNG (un oligonucleótido con marcaje doble de la invención) obtenidos con ADN purificado de *Neisseria gonorrhoeae*. Se genera un único pico de fusión con una Tm de aproximadamente 59 °C.

Figura 6. A) Picos de fusión obtenidos de una serie de ADN genómicos humanos purificados, usando la sonda FVG11 con marcaje doble para tipar muestras con respecto al polimorfismo del factor V Leiden. Las muestras de tipo silvestre homocigóticas generan un único pico de fusión con una Tm de aproximadamente 55 °C. Las muestras heterocigóticas producen simultáneamente picos de fusión apareados y desapareados que poseen Tm de aproximadamente 55 °C y 45 °C respectivamente. Las muestras 'mutantes' homocigóticas producirían solamente los picos de fusión de 45 °C. Las reacciones de control negativo no generan ningún pico de fusión. B) El software LightCycler puede emplearse para tipar muestras con respecto al polimorfismo del Factor V basándose en la cantidad y Tm de los picos de fusión.

La Figura 7 muestra un método para calcular la proporción de señal-a-ruido de la sonda. Las lecturas de fluorescencia se miden a Tm más y menos 10 °C para estados de sonda disociada e hibridada respectivamente. La proporción de señal-a-ruido puede calcularse como la señal hibridada dividida por la señal disociada.

Figura 8. A) La sonda FVG11 con marcaje doble muestra aproximadamente dos veces la cantidad de fluorescencia de fondo (por encima de 70 °C) en comparación con la sonda FVG1 marcada individualmente. Sin embargo, B) la sonda con marcaje doble del factor V produce picos de fusión que son aproximadamente 5-6 veces el tamaño de los picos generados con la sonda marcada individualmente. Esto demuestra que la proporción de señal-a-ruido es ~3 veces mejor con FVG11 en comparación con FVG1 en comparación con el resultado esperado que es dos veces el que produciría el fluoróforo dos veces el de fondo y dos veces la señal, por lo tanto una proporción señal-a-ruido sin cambios. Las sondas FVG1 y FVA11 muestran aumentos del 33 % y el 82 % en la fluorescencia tras la hibridación, respectivamente.

La Figura 9 muestra una comparación de las sondas con marcaje individual (FVG1) y doble (FVG11) del factor V usando muestras genómicas purificadas. Los picos de fusión se analizaron usando 10 °C para suavizar el promedio de los datos y el polinómico con la función LightCycler de corrección del fondo. Las reacciones de control negativo (NC) no producen picos de fusión con las sondas FVG1 o FVG11. 1 ng/μl de ADN 'de tipo silvestre' homocigótico produce picos de fusión individuales con Tm de aproximadamente 59 °C y 54,6 °C para las sondas con marcaje individual y doble respectivamente. Las muestras genómicas heterocigóticas (HET) producen picos de fusión tanto apareados como desapareados. Las alturas de los picos de fusión con marcaje son aproximadamente 3-4 veces mayores que los generados con la sonda marcada individualmente.

La Figura 10 muestra una comparación de sondas con marcaje 3', 5' e interno de secuencia idéntica. La sonda con marcaje 5' mostró inactivación de la fluorescencia tras la hibridación con la diana y generó picos invertidos en las huellas -dF/dT. La sonda con marcaje 3' no presentó ni potenciación de fluorescencia ni inactivación tras la hibridación. El oligonucleótido con marcaje interno presentó potenciación de la fluorescencia tras la hibridación con la diana y picos de fusión positivos en huellas -dF/dT. Tanto la sonda con marcaje individual como la sonda con marcaje doble son independientes de la secuencia diana y siempre muestran niveles potenciados de fluorescencia cuando hibridan.

Figura 11. A) Comparación de las sondas HYBCH (1), HYBCH2 (2), HYBCH3 (3) y HYBCH4 (4) de Chlamydia. Las sondas marcadas con 3 y 4 colorantes FAM emiten niveles considerablemente inferiores de fluorescencia en comparación con las sondas con marcaje individual y doble debido a la cercana proximidad de los marcadores. La sonda con marcaje triple (3) muestra niveles aumentados de emisión tras la disociación del dúplex. B) Picos de fusión derivados de las cuatro sondas de Chlamydia. La sonda con marcaje triple produce pequeños picos de fusión invertidos a una Tm superior que la variante con marcaje doble. La sonda marcada con 4 colorantes FAM produce un pequeño pico de fusión positivo con una Tm aproximadamente igual a la generada con la sonda con marcaje doble. C) Comparación de los oligonucleótidos con marcaje doble HYBCH (1), con marcaje individual HYBCH2 (2), y con marcaje triple HYBCH5 (5) y HYBCH6 (6).

La Figura 12 muestra los picos de fusión derivados de las sondas oligonucleotídicas marcada individualmente (1), con marcaje doble (2) y con marcaje triple (3) del factor V.

La Figura 13 muestra los oligonucleótidos marcado individualmente (1) y con marcaje doble (2) de la invención que contienen A) FAM dA y B) FAM dC.

Figura 14. A) Comparación de protocolos de PCR simétrica y asimétrica para la detección de *Chlamydia trachomatis* usando la sonda HYBCH2. B) Comparación de PCR simétrica y sonda marcada individualmente (1) con amplificación asimétrica y sonda marcada individualmente (2) y PCR asimétrica con la variante de sonda con marcaje doble (3). La altura de los picos de fusión de Chlamydia se potencia en más de 7 veces usando PCR asimétrica y la sonda con marcaje doble HYBCH.

Figura 15. Se hibridaron 150 nM de FVG11 con 75 nM de FVG y 75 nM de dianas oligonucleotídicas FVA (1). Se hibridaron 300 nM de la sonda con 150 nM de FVG y 150 nM de FVA (2). También se hibridaron 150 nM de sonda con 500 nM de FVG y 500 nM de FVA. A elevada concentración de la diana, la hibridación preferencial de la sonda con la secuencia diana completamente complementaria evita la detección de la variante de diana desapareada (3).

Figura 16. A) Después de 60 ciclos de amplificación asimétrica de la diana, las alturas de los picos de fusión apareado y desapareado del factor V están desequilibrados cuando se emplea 150 nM de sonda FVG11. El aumento de la concentración de la sonda hasta 500 nM mejora el equilibrio de las alturas de los picos de fusión. B) Las alturas de los picos de fusión de FVG11 se midieron tras 50, 60 y 70 ciclos de amplificación simétrica y asimétrica de la diana usando 150 nM, 300 nM y 500 nM de la sonda FVG11.

La Figura 17 muestra detección múltiple de secuencias diana usando las sondas oligonucleotídicas poliT (1), HYBINF (2), HYBCH2 (3) y HyBAdC (4). La detección múltiple fue basándose en la Tm del pico de fusión y empleó FAM en todas las sondas.

La Figura 18 muestra los picos de fusión obtenidos con la sonda con marcaje triple HYBCH6 que detecta secuencias diana apareadas y desapareadas amplificadas a partir de ADN purificado de Chlamydia y plásmido mímico respectivamente. La sonda presenta Tm de aproximadamente 60,3 °C y 51,8 °C con dianas de ADN de Chlamydia y mímicas respectivamente. No se generaron picos en ausencia de diana.

La Figura 19 muestra la sonda FVG11 con marcaje doble que se empleó para generar una curva patrón en tiempo real usando diluciones de ADN genómico humano. La serie de dilución comprendió 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0,1 ng/μl y 0,01 ng/μl de ADN genómico.

La Figura 20 muestra las curvas de fusión para sondas derivadas FVG11 con marcaje doble marcadas con A.

TAMRA, B. ROX, C. Cy5, D. ROX y FAM y las inflexiones en las mismas que indican cambios en la fluorescencia como resultado del estado de hibridación.

### Materiales y métodos referentes a los Ejemplos

5

#### *Diseño y síntesis de la sonda oligonucleotídica*

Las sondas oligonucleotídicas de la invención se diseñan normalmente para que sean de aproximadamente 18-25 nucleótidos de longitud y posean  $T_m$  de aproximadamente 55-60 °C cuando hibridan con secuencias diana completamente complementarias. Los fluoróforos se unen a restos internos en la secuencia de la sonda usando C6 FAM dU (University of Southampton, R.U.) o Fluoresceína dT (Glen Research, Sterling, VA). En el caso de C6 FAM dU (Figura 1), se une 6-carboxifluoresceína (FAM) a la posición 5 de bases de uracilo a través de métodos de síntesis de ADN que son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Los fluoróforos pueden incorporarse en sondas en forma de fosforamiditas durante la síntesis en fase sólida de los oligonucleótidos (Brown *et al*, 2001, Brown *et al*, 2003). También pueden hacerse otras modificaciones fluorescentes tras la síntesis usando monómeros tales como 8-aminoalquil-dA y 5-aminoalquil-dC de Glen Research. Los oligonucleótidos de la invención pueden poseer un componente fosfato 3' u otro agente de bloqueo para evitar la extensión mediada por *Taq* cuando las sondas se incorporan en ensayos de PCR en tiempo real. La cantidad de sonda obtenida de la síntesis se determina disolviendo una alícuota de la sonda oligonucleotídica en un volumen específico de agua y midiendo la absorbancia UV a 260 nm. La concentración de la sonda se calcula a partir de la absorbancia UV del oligonucleótido y su coeficiente de extinción a 260 nm. El coeficiente de extinción del oligonucleótido se calcula a partir de la suma de los coeficientes individuales de extinción de los nucleósidos no modificados y marcados con fluorescencia de los cuales está compuesto.

Los sitios polimórficos se posicionan convenientemente hacia el centro de los oligonucleótidos para maximizar la  $\Delta T_m$ . El nucleótido en el sitio del polimorfismo se selecciona normalmente de modo que sucedan interacciones altamente desestabilizantes cuando las sondas hibriden con dianas desapareadas. Las sondas que muestran desapareamientos C/A, C/T y C/C se emplean de forma preferencial mientras que se evitan los desapareamientos G/T, G/A y G/G. Como se ha analizado anteriormente, la sonda oligonucleotídica puede tener una identidad de secuencia del 70 % u 80 % u 85 % ó 90 % ó 95 % con el complemento de su diana.

#### *Reacción en cadena de la polimerasa*

Los volúmenes de PCR son normalmente de 20  $\mu$ l, que comprenden 2  $\mu$ l de muestra, tampón de PCR 1x, cebadores 0,5  $\mu$ M, 1 unidad de *Taq* polimerasa (Amersham Pharmacia Biotech),  $MgCl_2$  total 3 mM, 5 ng/ $\mu$ l de BSA (Roche Diagnostics), dNTP 1 nM (Amersham Pharmacia Biotech) y 150 nM de sonda. Los tampones empleados en los ensayos usando los oligonucleótidos son tampón de PCR 10x (TaKaRa, contiene  $MgCl_2$  1,5 nM), HEPES N°7 10x (HEPES 100 mM pH 8,3, KCl 250 mM) para análisis directo de orina y HEPES N°8 10x (HEPES 100 mM pH 8,3, KCl 500 mM) para análisis directo de saliva y muestras purificadas/procesadas. La amplificación homogénea y detección de las dianas puede realizarse usando un instrumento LightCycler (Roche Diagnostics). La detección por PCR a tiempo real y la cuantificación de la diana pueden conseguirse con un protocolo térmico de 3 fases donde, tras una etapa de reacción de desnaturalización inicial (95 °C 1 min.), las dianas se amplifican usando 50 ciclos que comprenden desnaturalización (95 °C 5 s), hibridación de cebador (55 °C 10 s) y extensión de productos (72 °C 10 s). La adquisición de la fluorescencia se realiza una vez por ciclo, en ensayos de 3 fases, al final de cada etapa de hibridación del cebador. Como alternativa, las dianas pueden amplificarse rápidamente usando un protocolo térmico de 2 fases donde, tras una etapa de desnaturalización inicial (95 °C 1 min.), las dianas se amplifican usando 50 ciclos que comprenden desnaturalización (95 °C 5 s) y una fase combinada de hibridación/extensión (65 °C 10 s). La fluorescencia no se adquiere durante la amplificación de 2 fases.

#### *Detección e identificación de la diana*

Tras amplificación de 3 fases y 2 fases, las reacciones se desnaturalizan inmediatamente (95°C 0 s) y se enfrían (35°C 30 s) antes del análisis de la curva de fusión (35-95°C con una velocidad de transición de 0,2°C/s) donde la fluorescencia se adquiere de forma continua. Los picos de fusión se construyen usando el software LightCycler (versión 3.5) representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$  en el eje y) frente a la temperatura (eje x). Las dianas pueden detectarse de forma fiable e identificarse usando las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de los picos de las sondas oligonucleotídicas.

### **Ejemplo 1: Sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente a modo de ejemplo**

60

Lo siguiente son ejemplos de sondas que se han usado para la detección de secuencias diana y la identificación de dianas polimórficas. Se proporcionan las secuencias cebadoras usadas para amplificar las dianas correspondientes. Este ejemplo contiene sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente para su comparación con las sondas con marcaje doble y múltiple de la invención.

65

El análisis del polimorfismo NAT2\*5A (C481T) puede realizarse por análisis de fusión usando sondas

oligonucleotídicas tales como 2303002 (5'GAGAGGAATCFGGTACCTGGACC (SEC ID N° 1)), donde F es un nucleótido marcado fluorescente y las bases subrayadas representan la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana que contiene el SNP NAT2\*5A puede amplificarse usando cebadores tales como 195993 (5'CCTCTAGAATTAATTTCTGGG (SEC ID N° 2)) y 195991 (5'CTGCTCTCTCCTGATTTGGTCC (SEC ID N° 3)). Los alelos \*4 completamente complementario y \*5A desapareado (C:A) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (tabla 1). La sonda 2303002 está diseñada para hibridar con una sección del gen NAT2 (acceso a Genbank X14672) que tiene una secuencia de:

10 NAT2\*4 5'GGTCCAGGTACCAGATTCCTCTC (SEC ID N° 4)  
 NAT2\*5<sup>a</sup> 5'GGTCCAAGTACCAGATTCCTCTC (SEC ID N° 5)

El análisis del polimorfismo NAT2\*5C (A803G) puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como DdeFL1\*4 (5'GAAGTGCFGAAAAAATATATTTAAG (SEC ID N° 6)), donde F es un nucleótido marcado fluorescente y las bases subrayadas representan la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana que contiene el SNP NAT2\*5C puede ampliarse usando cebadores tales como DdeF2 (5'CCTATAGAAAATTCAATTATAAAG (SEC ID N° 7)) y DdeR (5'CACGAGATTTCTCCCAAGG (SEC ID N° 8)). Los alelos \*4 completamente complementario y \*5C desapareado (A:C) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (tabla 1). La sonda DdeFL1\*4 está diseñada para hibridar con una sección del gen NAT2 (acceso a Genbank X14672) que tiene una secuencia de:

20 NAT2\*4 5'CTTAAATATATTTTTCAGCACTTC (SEC ID N° 9)  
 NAT2\*5C 5'CTTAAATATATTTCTCAGCACTTC (SEC ID N° 10)

El análisis del polimorfismo NAT2\*7 (G857A) puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como BamFL1\*7 (5'CCTGGTGAFGATCCCTTAC (SEC ID N° 11)), donde F es un nucleótido marcado fluorescente y las bases subrayadas representan la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana que contiene el SNP NAT2\*7 puede amplificarse usando cebadores tales como BamF2 (5'CCTATAGAAAATTCAATTATAAAG (SEC ID N° 12)) y BamR (5'CACGAGATTTCTCCCAAGG (SEC ID N° 13)). Los alelos \*7 completamente complementario y \*4 desapareado (A:C) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda DdeFL1\*7 está diseñada para hibridar con una sección del gen NAT2 (acceso a Genbank X14672) que tiene una secuencia de:

35 NAT2\*4 5'GTAAGGGATTCATCACCAGG (SEC ID N° 14)  
 NAT2\*7 5'GTAAGGGATCCATCACCAGG (SEC ID N° 15)

El análisis de dos SNP NAT1\*10 puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBNAT3S (5'CTTTAAAAATACAFTTTTATTATTA (SEC ID N° 16)), donde F es un nucleótido marcado fluorescente y los nucleótidos subrayados representan las posiciones del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. Los alelos completamente complementario, desapareado y doblemente desapareado pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La funcionalidad de esta sonda se ha demostrado usando oligonucleótidos complementarios que poseen todas las combinaciones posibles de bases en las posiciones del polimorfismo. La sonda HYBNAT3S está diseñada para hibridar con una sección del gen NAT1 (acceso a Genbank AY3 76850) que tiene una secuencia de:

50 NATRAA TAATAATAAAAAATGTATTTTAAAGATGGC (SEC ID N° 17)  
 NATRTA TAATAATAATAAATGTATTTTAAAGATGGC (SEC ID N° 18)  
 NATRTC TAATAATAATAAATGTCTTTTAAAGATGGC (SEC ID N° 19)  
 NATRAC TAATAATAAAAAATGTCTTTTAAAGATGGC (SEC ID N° 20)

El análisis del polimorfismo del Factor V Leiden (G1691A) puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como FVG1, (5'CTGTAFTCCTCGCCTGTCC (SEC ID N° 21)), donde F es un nucleótido marcado fluorescente y el nucleótido subrayado es la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana que contiene el SNP del factor V puede amplificarse usando cebadores tales como FVF1.3 (5'GGACTACTTCTAATCTGTAAAGAGCAGATC (SEC ID N° 22)) y FVR3.5 (5'GCCCCATTATTTAGCCAGGACCTAACATG (SEC ID N° 23)). Los alelos completamente complementario 'de tipo silvestre' y desapareado (C:A) 'mutante' pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda FVG1 está diseñada para hibridar con una sección del gen del Factor V (acceso a Genbank AY364535) que tiene una secuencia de:

65 FVG 5'GGACAGGCGAGGAATACAG (SEC ID N° 24)  
 FVA 5'GGACAGGCAAGGAATACAG (SEC ID N° 25)

El análisis simultáneo de los polimorfismos HbS y HbC de anemia falciforme puede realizarse por análisis de fusión

usando una sonda oligonucleotídica marcada individualmente tal como SCT1 (5'GTGCACCTGACFCCT**GTGG** (SEC ID N° 26)), donde F es un nucleótido marcado fluorescente y los nucleótidos subrayados son las posiciones del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana que contiene los polimorfismos de células falciformes puede amplificarse usando cebadores tales como SCF1 (5'AGGGCAGAGCCATCTATTGCT (SEC ID N° 27)) y SCR2 (5'CATCCACGTTACCTTGCC (SEC ID N° 28)). Los alelos HbS completamente complementario (GT:CA), desapareado (GT:CT) de tipo silvestre y HbC doblemente desapareado (GT:TT) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (tabla 1). La sonda SCT1 está diseñada para hibridar con una sección del gen de la β-globina (acceso a Genbank AY356351) que tiene una secuencia de:

HbS 5'**CCAC**AGGAGTCAGGTGCAC (SEC ID N° 29)  
 HbWT 5'**CCTC**AGGAGTCAGGTGCAC (SEC ID N° 30)  
 HbC 5'**CCTI**AGGAGTCAGGTGCAC (SEC ID N° 31)

La detección del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBCH2 (5'CAAGCCTGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 32)), donde F es un nucleótido marcado fluorescente. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana del plásmido críptico puede amplificarse usando cebadores tales como CHF3-1 (5'GGGTTTCGTTGTAGAGCCATGTCCTATCTTG (SEC ID N° 33)) y CHR4-1 (5'CGCAGCTGCTGTAATCACCCAGT CGATAAA (SEC ID N° 34)). El plásmido críptico de *Chlamydia* y un control de amplificación positiva desapareado (C:A) (véase a continuación) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda HYBCH2 está diseñada para hibridar con una sección del plásmido críptico (acceso a Genbank X07547) que tiene una secuencia de:

HYBCHRC 5'CTTGGTATACATTT**G**CAGGCTTG (SEC ID N° 35)  
 Mímico 5'CTTGGTATACATTT**A**CAGGCTTG (SEC ID N° 36)

Se describen ensayos adicionales empleando sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente para analizar dianas tales como SNP CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, CYP2C19m1, CYP2C19m2, CYP2C9\*2 y CYP2C9\*3 en el documento WO 01/73118 A2.

TABLA 1 - Tm de las sondas oligonucleotídicas, en MgCl<sub>2</sub> 3 mM, con dianas completamente complementarias y desapareadas. Los picos de fusión y las Tm se obtuvieron de oligonucleótidos complementarios y secuencias diana amplificadas por PCR. Se incluyen los números de identificación de secuencia para las sondas y las dianas.

Sonda	SEC ID	Secuencia	Tm apareada	Tm desapareada
PoliT	37, 38	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	49,6	-
C19m1A	39-41	GATTATTFCCAGGAACCC	56,6	51,5
HYBNAT3S	16-19	CTTTAAAATACAFTTTTTATTATTA	49,7	42,8
C19m2G	42-44	TACCFGGATCCAGGGGGTG	57,5	47
FVG1	21,24-25	CTGTAFTCCTCGCCTGTCC	59,0	49,5
HEPB	45-46	AAGAACTCCCFCGCCTCGCA	62,3	-
PJ18S	47-48	GAGACGAACAACFCGAAAGC	58,6	-
HYBCH2	32, 35	CAAGCCTGCAAFFGTATACCAAG	60,6	-
NAT2*5	124, 4-5	GAGAGGAATCFGGTACTTGGACC	61,3	57,1
2303002	1,4-5	GAGAGGAATCFGGTACTTGGACC	52,4	42,3
BamFL1*7	11, 14-15	CCTGGTGAFGAATCCCTTAC	56,7	48,9
HSV1	49-50	GGACACCGGCGFACTTCACCT	66,0	-
DdeFL1*4	6,9-10	GAAGTGCFGAAAAATATATTTAAG	53,5	45,5
2D64C*	51-53	GGGCGFCCTGGGGGGTG	60,4	49,3
C9*2T	54-56	CATTGAGGACTGFGTTCAAG	54,8	52,1
C9*2C	55-57	CATTGAGGACCGFGTTCAAG	57,8	48,2
SCT1	26, 29-31	GTGCACCTGACFCCTGTGG	57,9	52,2, 47,6
HYBNG	58-59	TCTGCFTCCGCFACGGCTTC	59,0	-
FVG11	60, 24-25	CTGTAFTCCTCGCCFGTCC	55,0	45,0
FVG111	127, 24	CTGTAFTCCFCGCCFGTCC	55,0	-
HYBCH	61, 35	CAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG	56,0	-
G08377	62-63	ATGGGAFFGGGAFCCAAATAA	50,8	-
SP1	64-65	GGGTCTFCCACTFGGAGAAAGCTATC	56,8	-
HYBINF	66-67	GGGAFCCAAFAACATGGACAGAGCT	52,3	-
HYBAdC	68-70	GACGTGGFCCGTGFGACCAGCCT	65,5	52,5
HYBAdD	69-71	GACGTGGFCAGAGFGACCAGCCT	62,3	55,4
FVG1ALT	101,24	CTGTATTCCTCGCCFGTCC	61,1	-
HYBCH5	102-103	CAAGCCFGCAAFFGTAFACCAAG	55,2	-
HYBCH6	104, 103	GTAAFCAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG	60,6	-
HYBCH7	105, 103	CAAGCCFGCAAATGTATACCAAG	61,7	-



HYBCH8	106, 103	<b>CAAGCCTGCAAATGTAFAACCAAG</b>	60,3	-
HYBCH9	107, 103	<b>C AAGCCTGCAAATGTAFAACCAAG</b>	57,8	-
HYBCH10	108, 103	<b>CAAGCCFGCAAATGTAFAACCAAG</b>	58,3	-
HYBCH11	126, 103	<b>GTAAFCAAGCCFGCAAATGTAFAACCAAG</b>	57,9	-
HYBMTH	109-111	<b>GTCFGCGGGAGCCGAFTTCATC</b>	63,0	54,5
HYBA1928C	112-114	<b>GACCAGFGAAGCAAGFGTCTTTG</b>	61,0	51,5
HYBFII	115-117	<b>GCATFGAGGCTCGCFGAGAGTC</b>	63,5	54,5

### Ejemplo 2: Sondas oligonucleotídicas con marcaje doble a modo de ejemplo de la invención

5 El análisis del polimorfismo del Factor V Leiden (G1691A) puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como FVG11 (5'CTGTAFCTCCTCGCCFGTCC (SEC ID N° 60)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes y el nucleótido subrayado es la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana que contiene el SNP del factor V puede amplificarse usando cebadores tales como FVF1.3 (5'GGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATC (SEC ID N° 22)) y FVR3.5 (5'GCCCCATTATTTAGCCAGGAGACCTAACATG (SEC ID N° 23)). Los alelos completamente complementario 'de tipo silvestre' y desapareado (C:A) 'mutante' pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda FVG1 está diseñada para hibridar con una sección del gen del factor V (acceso a Genbank AY364535) que tiene una secuencia de:

15 FVG 5'GGACAGGCGAGGAATACAG (SEC ID N° 24)  
FVA 5'GGACAGGCAAGGAATACAG (SEC ID N° 25)

20 La detección del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBCH (5'CAAGCCFGCAAATGTAFAACCAAG (SEC ID N° 61)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana del plásmido críptico puede amplificarse usando cebadores tales como CHF3-1 (5'GGGTTTCGTTGTAGAGCCATGTCCTATCTTG (SEC ID N° 33)) y CHR4-1 (5'CGCAGCTGCTGTAATCACCCAGT CGATAAA (SEC ID N° 34)). El plásmido críptico de *Chlamydia* y un control de amplificación positiva desapareado (C:A) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda HYBCH2 está diseñada para hibridar con una sección del plásmido críptico (acceso a Genbank X07547) que tiene una secuencia de:

25 HYBCHRC 5'CTTGGTATACATTTGCAGGCTTG (SEC ID N° 35)  
Mímico 5'CTTGGTATACATTTACAGGCTTG (SEC ID N° 36)

30 La detección del plásmido críptico de *Neisseria gonorrhoeae* puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBNG (5'TCTGCFTCCGCFACGGCTTC (SEC ID N° 58)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana del plásmido críptico puede amplificarse usando cebadores tales como NGF1 (5'ACTTTGGCGATATTGCTCGG (SEC ID N° 74)) y NGR1 (5'TACCGAGAACGAAACGCGACA (SEC ID N° 75)). El plásmido críptico gonorrhoeae puede detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (tabla 1). La sonda HYBNG está diseñada para hibridar con una sección del plásmido críptico (acceso a Genbank M10316) que tiene una secuencia de:

40 HYBNGRC 5'GAAGCCGTAGCGGAAGCAGA (SEC ID N° 59)

45 La detección del gen del hexón en cepas de Adenovirus C y Adenovirus D puede realizarse por análisis de fusión usando los oligonucleótidos de la invención tales como HyBAc (5'GACGTGGFCCGTGFGCACCAGCCT (SEC ID N° 68)) y HyBAcD (5'GACGTGGFCAGAGFGCACCAGCCT (SEC ID N° 71)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes. La extensión por PCR a partir de estas sondas está bloqueada con fosfatos 3'. La secuencia diana del hexón puede amplificarse usando cebadores tales como ADRJC1 (5'GACATGACTTTTCGAGTCCGATCCCATGGA (SEC ID N° 76)) (Elnifro *et al.*, 2000) y PB00432 (5'GCCGAGAAGGGCGTGCGCAGGTA (SEC ID N° 77)) obtenidas de la base de datos VirOligo. Las cepas de Adenovirus pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda HyBAc es completamente complementaria a la secuencia de Adenovirus C y muestra desapareamientos tanto C:T como T:T cuando hibrida con la secuencia de Adenovirus D. La sonda HyBAcD es completamente complementario a la secuencia de Adenovirus D y muestra desapareamientos tanto A:G como A:A cuando hibrida con la secuencia de Adenovirus C. Se obtienen variaciones mayores en la temperatura de fusión de la sonda con la sonda HyBAc (tabla 1). Las sondas de Adenovirus están diseñadas para hibridar con una sección del gen del hexón (acceso a Genbank AJ293905) que tiene una secuencia de:

55 HyBAcCRC 5'AGGCTGCTGCACACGGACCACGTC (SEC ID N° 69)  
HyBAcDRC 5'AGGCTGGTGCACCTTGACCACGTC (SEC ID N° 70)

La detección del gen de la matriz de Influenza A puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBINF (5'GGGAFCCAAFAACATGGACAGAGCT (SEC ID N° 66)), donde F son

nucleótidos marcados fluorescentes. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana de la matriz puede amplificarse usando cebadores tales como INFA-1 (5'GGACTGCAGCGTAGACGCTT (SEC ID N° 78)) y FLU-4 (5'ATTTCTTTGGCCCCATGGAATGT (SEC ID N° 79)). Como la Influenza es un virus ARN, se necesita una etapa de transcripción inversa (RT) para la amplificación de la diana. La producción de ADNc, la amplificación por PCR y la detección de la diana pueden realizarse todas en un único recipiente de reacción usando un kit de RT-PCR LightCycler de una etapa de Roche. La Influenza A puede detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (tabla 1). La sonda HYBINF está diseñada para hibridar con una sección del gen de la matriz (acceso a Genbank AY130766) que tiene una secuencia de:

10                    INFR                    5'AGCTCTGTCCATGTTATTTGGATCCC (SEC ID N° 67)

La detección del gen de la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como SP1 (5'GGGGTCTFCCACTFGGAGAAAGCTATC (SEC ID N° 64)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes. También se investigó una versión marcada individualmente de la sonda de *Streptococcus* (5'GGGGTCTFCCACTTGGAGAAAGCTATC (SEC ID N° 80)). La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana de la neumolisina puede amplificarse usando cebadores tales como SPF2 (5'CTTGCGGTTGATCGTCTCCGATGAC (SEC ID N° 81)) y SPR2 (5'CATTATTGACCTGACCATAATCTTGATGCC (SEC ID N° 82)). El *Streptococcus pneumoniae* puede detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (tabla 1). La sonda SP1 está diseñada para hibridar con una sección del gen de la neumolisina (acceso a Genbank X52474) que tiene una secuencia de:

15                    SP1RC                    5'GATAGCTTTCTCCAAGTGAAGACCCC (SEC ID N° 65)

La detección del SNP del Factor II (G20210A) puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBFII (5'GCATFGAGGCTCGCFGAGAGTC (SEC ID N° 115)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes y el nucleótido subrayado es la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana del Factor II puede amplificarse usando cebadores tales como FIIF2 (5'CTGGGCTCCTGGAACCAATC (SEC ID N° 118)) y FIIR1 (5'GCTGCCCATGAATAGCACTGG (SEC ID N° 119)). Los alelos completamente complementario y desapareado (C:A) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda HYBFII está diseñada para hibridar con una sección del gen del factor II (acceso a Genbank AF493953) que tiene una secuencia de:

25                    FIIRC                    5'GACTCTCAGCGAGCCTCAATGC (SEC ID N° 116)

30                    FIIMM                    5'GACTCTCAGCAAGCCTCAATGC (SEC ID N° 117)

La detección del SNP MTHFR (A1928C) puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBA1928C (5'GACCAGFGAAGCAAGFGTCTTTG (SEC ID N° 112)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes y el nucleótido subrayado es la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana de A1928C puede amplificarse usando cebadores tales como 1928F (5'CCCAAGGAGGAGCTGCTGAA (SEC ID N° 120)) y 1928R (5'CCATTCCGGTTTGGTTCTCC (SEC ID N° 121)). Los alelos completamente complementario y desapareado (C:T) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda HYBA1928C está diseñada para hibridar con una sección del gen de la 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (acceso a Genbank NM\_005957) que tiene una secuencia de:

40                    FIIRC                    5'CAAAGACACTTGCTTCACTGGTC (SEC ID N° 113)

45                    FIIMM                    5'CAAAGACACTTTCTTCACTGGTC (SEC ID N° 114)

La detección del SNP MTHFR (C677T) puede realizarse por análisis de fusión usando una sonda oligonucleotídica tal como HYBMTH (5'GTCFGCGGGAGCCGAFTTCATC (SEC ID N° 112)), donde F son nucleótidos marcados fluorescentes y el nucleótido subrayado es la posición del polimorfismo. La extensión por PCR a partir de la sonda está bloqueada con un fosfato 3'. La secuencia diana de C677T puede amplificarse usando cebadores tales como MTHF2 (5'CTGACCTGAAGCACTTGAAGGAG (SEC ID N° 122)) y MTHR2 (5'GCGGAAGAATGTGTCAGCCTC AAAG (SEC ID N° 123)). Los alelos completamente complementario y desapareado (C:A) pueden detectarse de forma fiable e identificarse basándose en la Tm de la sonda (véase la tabla 1). La sonda HYBMTH está diseñada para hibridar con una sección del gen de la 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa (acceso a Genbank NM\_005957) que tiene una secuencia de:

50                    FIIRC                    5'CAAAGACACTTGCTTCACTGGTC (SEC ID N° 110)

55                    FIIMM                    5'CAAAGACACTTTCTTCACTGGTC (SEC ID N° 129)

### Ejemplo 3: Análisis directo de muestras de saliva

Se analizó una serie de muestras de saliva con los cebadores de MTHFR (A1928C) y la sonda, como se ha descrito anteriormente, sin purificación de ADN. Se incluyeron enjuagados bucales, que comprenden aproximadamente el 50 % de saliva en agua, directamente en los ensayos. También pueden analizarse directamente hisopos bucales

expresados en agua. La sonda HYBA1928C genera picos individuales de fusión con Tm de aproximadamente 51,5 °C y 61 °C con muestras homocigóticas para los alelos A y C respectivamente (Figura 2). Las muestras de saliva que son heterocigóticas para los alelos A y C se identifican claramente mediante la generación de picos tanto de 51,5 °C como de 61 °C. La detección e identificación de las dianas polinucleotídicas también se ha conseguido directamente a partir de sangre sin la necesidad de purificación de ADN.

#### **Ejemplo 4: Detección rápida de la diana usando sondas con marcaje doble y triple**

Las dianas del plásmido críptico de Chlamydia pueden amplificarse usando los cebadores CHF3-1 (SEC ID N° 33) y CHR4-1 (SEC ID N° 34). Los ensayos emplean protocolos LightCycler de 3 fases que consisten en una desnaturalización inicial (95 °C 1 min.) seguida de 50 ciclos de PCR que comprenden desnaturalización (95 °C 5 s), hibridación de cebador (55 °C 10 s) y extensión de productos (72 °C 10 s). La diana amplificada se detecta y caracteriza a través de la inclusión de las sondas HYBCH (SEC ID N° 61) o HYBCH6 (SEC ID N° 104) y del análisis de la curva de fusión que comprende desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hacia 95 °C usando una velocidad de transición de 0,2 °C/s. En presencia de ADN de Chlamydia, las sondas HYBCH y HYBCH6 generar claros picos de fusión con Tm de aproximadamente 56 °C y 60,5 °C respectivamente. Los ensayos usando los oligonucleótidos de la invención han detectado la presencia de Chlamydia en ADN purificados, orinas netas, orinas procesadas (Becton Dickinson, Oxford, R.U.) e hisopos y muestras líquidas pipeteadas directamente de los frotis (Figura 4).

Las dianas del plásmido gonorrhoeae se amplifican usando los cebadores NGF1 (SEC ID N° 74) y NGR1 (SEC ID N° 75). Los ensayos emplean protocolos LightCycler de 3 fases que consisten en una desnaturalización inicial (95 °C 1 min.) seguida de 50 ciclos de PCR que comprenden desnaturalización (95 °C 5 s), hibridación de cebador (55 °C 10 s) y extensión de productos (72 °C 10 s). La diana amplificada se detecta y caracteriza a través de la inclusión de la sonda HYBNG (SEC ID N° 58) y el análisis de la curva de fusión que comprende desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hacia 95 °C usando una velocidad de transición de 0,2 °C/s. En presencia de ADN de gonorrhoeae, la sonda HYBNG genera claros picos de fusión con Tm de aproximadamente 59 °C (Figura 5).

#### **Ejemplo 5: Comparación de sondas marcadas individualmente y con marcaje doble**

Las dianas del Factor V se amplifican directamente de muestras de saliva, sin purificación de ADN, usando los cebadores FVF1.3 (SEC ID N° 22) y FVR3.5 (SEC ID N° 23). Los ensayos emplean protocolos LightCycler de 2 fases que consisten en una desnaturalización inicial (95 °C 1 min.) seguida de 50 ciclos de PCR que comprenden desnaturalización (95 °C 1 s) y fases combinadas de hibridación/extensión (65 °C 5 s). La diana amplificada se detecta y caracteriza a través de la inclusión de las sondas oligonucleotídicas FVG1 (SEC ID N° 21) o FVG11 (SEC ID N° 60) y el análisis de la curva de fusión que comprende desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hacia 95 °C usando una velocidad de transición de 0,2 °C/s. Los ensayos del Factor V pueden completarse en tan solo 16 minutos. Las muestras de tipo silvestre homocigóticas producen picos de fusión individuales que poseen Tm de aproximadamente 59 °C y 55 °C cuando se emplean las sondas FVG1 y FVG11 respectivamente. Las muestras mutantes homocigóticas generan picos de fusión individuales que poseen Tm de aproximadamente 49,5 °C y 45 °C cuando se emplean las sondas FVG1 y FVG11 respectivamente. Las muestras heterocigóticas de Factor V producen picos de fusión tanto de 59 °C como de 49,5 °C cuando se usa la sonda FVG1 marcada individualmente y generan picos tanto de 55 °C como de 45 °C cuando se emplea la sonda FVG11 con marcaje doble (Figura 6). Los ensayos funcionan de forma eficaz con ADN purificados, muestras de frotis y lavados bucales. Se ha tipado de forma fiable más de 450 muestras genómicas, con respecto al polimorfismo del Factor V, usando las sondas FVG1 y FVG11.

La sonda con marcaje doble no muestra niveles mayores de señales de fondo, en comparación con la sonda marcada individualmente, en estado monocatenario. Sin embargo, la sonda FVG11 con marcaje doble produce picos de fusión que son aproximadamente cuatro veces el tamaño de los generados con la sonda FVG1 marcada individualmente, lo que es significativamente mayor que lo que se esperaría si el efecto del fluoróforo adicional fuera simplemente aditivo. El fluoróforo adicional en FVG11 reduce la Tm de la sonda en aproximadamente 4,5 °C en comparación con la sonda FVG1 marcada individualmente (Figura 3). Se observa una reducción similar en la Tm con las sondas HYBCH2 marcada individualmente (SEC ID N° 32) y HYBCH con marcaje doble (SEC ID N° 61) de Chlamydia (Figura 11).

#### **Ejemplo 6: Señal de la sonda-a-ruido**

La cantidad de emisión de fluorescencia desde los oligonucleótidos de la invención se midió en estado monocatenario y bicatenario para investigar el efecto de la secuencia de la sonda, la colocación del fluoróforo y el marcaje doble/triple. Normalmente se hibridaron 150 nM de la sonda con 150 nM del oligonucleótido completamente complementario, en tampón TaKaRa, para determinar la proporción de señal-a-ruido de los oligonucleótidos de la invención. Las mediciones de la fluorescencia se hicieron usando un protocolo de curva de fusión LightCycler que comprende desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C usando una velocidad de transición de 0,2 °C/s. Los valores de fluorescencia se obtuvieron de las curvas de fusión a

temperaturas de Tm de sonda más y menos 10 °C para los estados disociado e hibridado respectivamente (Figura 7). Las mediciones de fluorescencia se hicieron sobre este intervalo de temperatura definido en un intento de eliminar algunos de los efectos que la temperatura tiene sobre la cantidad de emisión. Los valores de fluorescencia hibridada y disociada proporcionan una medida de la proporción de señal-a-ruido y una indicación del efecto de la hibridación de la sonda sobre la emisión (tabla 2), donde la proporción de señal-a-ruido se calcula como la señal hibridada dividida por la señal disociada. Se ha descubierto que las proporciones de señal-a-ruido son muy reproducibles y muestran baja variación entre ejecuciones y entre instrumentos.

La sonda FVG1 marcada individualmente (SEC ID N° 21) posee una Tm de aproximadamente 59 °C cuando hibrida con la secuencia diana completamente complementaria (SEC ID N° 24) y muestra niveles de fluorescencia de 8 y 6 (unidades arbitrarias de fluorescencia LightCycler) a 49 °C y 69 °C respectivamente. La sonda FVG11 con marcaje doble (SEC ID N° 60) posee una Tm de aproximadamente 55 °C cuando hibrida con la secuencia diana completamente complementaria y muestra niveles de fluorescencia de 21,8 y 12 a 45 °C y 65 °C respectivamente. Las proporciones de señal-a-ruido de las sondas con marcaje individual y doble del factor V se calculan como 1,33 y 1,82 respectivamente.

Las sondas con marcaje doble pueden mostrar niveles mayores de ruido de fluorescencia de fondo en comparación con las sondas marcadas individualmente equivalentes. Sin embargo, a pesar del elevado ruido de fondo, las sondas con marcaje doble producen coherentemente proporciones de señal-a-ruido y alturas de pico de fusión considerablemente mayores. Con dianas oligonucleotídicas, las sondas marcadas individualmente han producido aumentos de emisión entre el 20 % y el 92 %. Mientras que las sondas con marcaje doble han demostrado aumentos de fluorescencia entre el 71 % y 199 %. La hibridación de sonda FVG11 150 nM con el oligonucleótido complementario FVG (SEC ID N° 24) produce una fluorescencia de fondo aproximadamente dos veces mayor (a 90 °C) que la hibridación de sonda FVG1 150 nM (Figura 8). Sin embargo, la función de corrección del fondo del software LightCycler demuestra que el pico de marcaje doble es aproximadamente cinco veces mayor en altura que el pico de la sonda marcada individualmente equivalente con dianas oligonucleotídicas (Figuras 3 y 8). Los datos corregidos del fondo derivados de muestras de ADN portadoras de Factor V heterocigótico demuestran que la sonda con marcaje doble produce dos picos de fusión que son cada uno aproximadamente tres veces la altura de los picos generados con la sonda marcada individualmente en ensayos de amplificación de diana (Figura 9).

#### *Fluoróforos flanqueados por nucleótidos de guanina*

Dado que las bases de guanina son inactivadores eficaces de la fluorescencia, puede esperarse que fluoróforos flanqueados por G estén inactivados de forma eficaz cuando las sondas estén en estado disociado y puede esperarse que la emisión de fluorescencia se aumente considerablemente tras la hibridación de la sonda. Todas las sondas que contienen fluoróforos internos adyacentes a G (5', 3' o ambas posiciones) han mostrado potenciación de la señal tras hibridación con la diana (tabla 2). Las sondas oligonucleotídicas C9\*2C (SEC ID N° 55), 136A (SEC ID N° 83) y HYBA1928C (SEC ID N° 112) son buenos ejemplos de sondas con marcadores fluorescentes posicionados entre dos nucleótidos G. La proporción de señal-a-ruido de C9\*2C es comparable a la sonda 2D64C\* (SEC ID N° 51), cuyo fluoróforo está adyacente a una única G pero es muy rica en G en general. La sonda DdefL1\*4 rica en AT (SEC ID N° 6) también muestra una proporción similar de señal-a-ruido y posee un único nucleótido G adyacente al fluoróforo. La colocación de fluoróforos adyacentes a restos G es muy probable, aunque no es necesario, que genere grandes alturas de pico y proporciones de señal-a-ruido. La ausencia de restos G en localizaciones adecuadas dentro de la sonda no es problemática ya que las sondas producen señales de hibridación eficaces cuando los fluoróforos se colocan en todos los entornos de secuencia. Aunque este ejemplo muestra oligonucleótidos marcados individualmente, así como oligonucleótidos de la invención, no obstante demuestra que es la independencia de la secuencia diana, y no una interacción entre fluoróforos, lo que causa la potenciación independiente de secuencia de la fluorescencia tras la hibridación con la diana.

#### *Fluoróforos flanqueados por nucleótidos de citosina*

Si los restos de guanina en secuencias diana tienen la capacidad de causar inactivación de la fluorescencia, puede esperarse que la emisión desde fluoróforos flanqueados por restos C disminuya tras la hibridación con la diana. Sin embargo, todas las sondas oligonucleotídicas con fluoróforos adyacentes a restos C, tales como HYBNG (SEC ID N° 58), 171R (SEC ID N° 85), C19m1A (SEC ID N° 39), SCT1 (SEC ID N° 26) y SP2 (SEC ID N° 80), han mostrado potenciación de la fluorescencia tras la hibridación con la sonda. Incluso sondas oligonucleotídicas altamente ricas en C, tales como HEPB (SEC ID N° 45) y FVG2 (5'GTATFCCTCGCCTGTCCAG (SEC ID N° 87)), emiten niveles mayores de fluorescencia cuando hibridan con las dianas que cuando son monocatenarias. La potenciación de la fluorescencia tras la hibridación de la sonda parece ser independiente de la presencia de nucleótidos de guanina en la secuencia diana, como se había predicho por modelado molecular, lo que indica que los fluoróforos no interactúan con ADN dúplex.

#### *Fluoróforos flanqueados por nucleótidos de adenina y timina*

Las sondas oligonucleotídicas con fluoróforos situados entre restos A y T también muestran potenciación de la emisión de fluorescencia tras la hibridación con la diana. Las sondas NAT2\*6 (SEC ID N° 88), HYBNAT3S (SEC ID

Nº 16) y FVG1 (SEC ID Nº 21) son buenos ejemplos de sondas cuyas bases marcadas con fluoróforo están rodeadas por nucleótidos de A y T. Una sonda PoliT construida artificialmente (5'TTTTTTTTTTTFTTTTTTTTTTTT (SEC ID Nº 37)) presenta niveles aumentados de emisión de fluorescencia cuando hibridan con secuencias diana, en comparación con el estado monocatenario, a pesar de la ausencia completa de nucleótidos de G tanto en la sonda como en la hebra diana. Estos oligonucleótidos contienen un único fluoróforo y por esto no son oligonucleótidos de la invención. No obstante, demuestra la independencia de secuencia de la naturaleza fluorescente de las sondas.

*Potencia de la señal y contexto de secuencia de la unión del fluoróforo*

Los datos de la tabla 2 demuestran que la funcionalidad de la sonda no es dependiente de la presencia de restos de guanina en la sonda o las secuencias diana. Hay, sin embargo, una posible asociación entre las mayores proporciones de señal-a-ruido y la presencia de G en posiciones de la sonda inmediatamente adyacentes al fluoróforo. Para sondas marcadas individualmente, muchas de las grandes proporciones de señal-a-ruido derivan de sondas con fluoróforos flanqueados por bases de guanina. Sin embargo, la mayor proporción de señal-a-ruido con marcaje individual se obtuvo de un oligonucleótido que poseía un fluoróforo flanqueado por nucleótidos de A y C (SEC ID Nº 85).

Las sondas con fluoróforos flanqueados por bases A, C y T han producido mayores señales que varias sondas con nucleótidos G directamente adyacentes a la base marcada con fluoróforo. Además, todas las sondas oligonucleotídicas con marcaje individual, doble, y múltiple han mostrado niveles potenciados de emisión de fluorescencia tras la hibridación con la diana independientemente de la secuencia flanqueante de los fluoróforos internos. Por lo tanto, aunque pueden obtenerse picos de fusión más grandes situando nucleótidos marcados con fluoróforo adyacentes a restos de guanina, pueden obtenerse picos de fusión de alta calidad sin la necesidad de restos G en sitios específicos en la secuencia de la sonda. Aunque estos oligonucleótidos contienen un único fluoróforo, demuestran la independencia de secuencia y también ayudarán al espaciado óptimo en ciertos contextos de secuencia.

*Independencia de secuencia diana*

El análisis de la curva de fusión LightCycler sugiere firmemente que la secuencia de la diana tiene poco o ningún efecto sobre la funcionalidad de las sondas oligonucleotídicas. Si los fluoróforos de las sondas oligonucleotídicas se proyectan en solución tras la hibridación, de modo que no interaccionen con ADN dúplex, los fluoróforos pueden posicionarse en regiones altamente ricas en C de la sonda sin inactivarse por los nucleótidos G de la diana. Todas las sondas oligonucleotídicas con marcaje individual y doble diseñadas hasta la fecha muestran niveles potenciados de fluorescencia tras la hibridación relativos al estado monocatenario independientemente de la secuencia de la sonda y los nucleótidos que flanquean las bases marcadas con fluoróforo.

TABLA 2 - Proporciones de señal-a-ruido obtenidas de la hibridación de sondas oligonucleotídicas 150 nM con oligonucleótidos completamente complementarios. Se proporcionan los números de identificación de secuencia para las sondas y las dianas. Las proporciones de señal-a-ruido se clasifican desde la más baja hasta la más alta. Las curvas de fusión se generaron todas usando un único instrumento LightCycler (LC2).

Sonda	SEC ID	Secuencia	Proporción de señal-a-ruido
NAT2*6	88, 89	<b>CTTCAAFGTGTTGAGGTTCAAG</b>	1,26
poliT	37-38	<b>TTTTTTTTTTTFTTTTTTTTTT</b>	1,27
C19m1A	39-40	<b>GATTATTFCCCAGGAACCC</b>	1,29
HYBNAT3S	16-17	<b>CTTTAAAATACAFTTTTTATTATTA</b>	1,28
C19m2G	42-43	<b>TACCFGGATCCAGGGGGTG</b>	1,33
FVG1	21, 24	<b>CTGTAFTCCTCGCCTGTCC</b>	1,33
HYBCH8	106, 103	<b>CAAGCCTGCAAATGTAPACCAAG</b>	1,33
HEPB	45-46	<b>AAGAACTCCFCGCCTCGCA</b>	1,36
SP2	80, 65	<b>GGGTCTFCCACTTGGAGAAAG</b>	1,36
PJ18S	47-48	<b>GAGACGAACAACFGCGAAAGC</b>	1,42
HYBCH2	32, 35	<b>CAAGCCTGCAAATGTATACCAAG</b>	1,44
FVG1ALT	101,24	<b>CTGTATTCTCGCCFGTCC</b>	1,48
FVG1ALT2	128, 24	<b>CTGTATTCFCGCCTGTCC</b>	1,50
NAT2*5	124, 4	<b>GAGAGGAATCFGGTACTTGGACC</b>	1,52
BamFL1*7	11, 14	<b>CCTGGTGAFGAATCCCTTAC</b>	1,53
HYBCH7	105, 103	<b>CAAGCCFGCAAATGTATACCAAG</b>	1,54
HSV1	49-50	<b>GGACACCGGCGFACTTCACCT</b>	1,56
DdeFL1*4	6, 9	<b>GAAGTGCFGAAAAATATATTTAAG</b>	1,56
2D64C*	51-52	<b>GGCGFCCTGGGGGTG</b>	1,63
C9*2T	54-55	<b>CATTGAGGACTGFGTTCAAG</b>	1,63
C9*2C	56-57	<b>CATTGAGGACCGFGTTCAAG</b>	1,67
HYBSTR	91, 86	<b>GGTGATAGAFAGATAGAFAG</b>	1,71

		ATAGATAGATAGATAGATAGA	
		TAGATAGATAGATAGATA	
HYBCH10	108, 103	CAAGCCFGCAAATGTAFACCAAG	1,74
HYBNG	58-59	TCTGCFTCCGCFACGGCTTC	1,78
FVG11	60, 24	CTGTAFTCCTCGCCFGTCC	1,82
136A	83-84	GGGAAGFGCCATGAGCAG	1,83
HYBMTH	109-110	GTCFGCGGGAGCCGAFTTCATC	1,84
HYBCH	61, 35	CAAGCCFGCAAATGTAFACCAAG	1,91
HYBCH9	107, 103	CAAGCCTGCAAATGTAFACCAAG	1,92
171R	85-86	CAGTGGAFCCGTATAGTAAC	1,92
G08377	62, 63	ATGGGAATGGGAFCCAAATAA	1,93
SP1	64-65	GGGGTCTFCCACTFGGAGAAAGCTATC	1,94
HYBINF	66-67	GGGAFCCAAATGAACATGGACAGAGCT	1,95
HYBMRSA	99-100	CGTAGFTACTGCGTGTAGAGACGTC	2,07
HYBA1928C	112-113	GACCAGFGAAGCAAGFGTCTTTG	2,14
HYBFII	115-116	GCATFGAGGCTCGCFGAGAGTC	2,36
HYBCH5	102-103	CAAGCCFGCAAATGTAFACCAAG	2,38
HYBCH6	103-104	GTAATCAAGCCFGCAAATGTAFACCAAG	2,38
HYBAdC	68-69	GACGTGGFCCGTGFGCACCAGCCT	2,88
HYBCH11	126, 103	GTAATCAAGCCFGCAAATGTAFACCAAG	2,90
HYBAdD	70-71	GACGTGGFCCAGAGFGCACCAGCCT	2,99
FVG111	127, 24	CTGTAFTCCTCGCCFGTCC	3,14

La medición de la absorción de UV-visible y los espectros de fluorescencia (Marks *et al.* (2005)) demuestra que hay un desplazamiento al azul de aproximadamente 4 nm y un aumento en la intensidad en la hibridación de las sondas oligonucleotídicas con secuencias diana complementarias. Las propiedades de fluorescencia del colorante FAMCAP libres son más parecidas a las del dúplex sonda/diana. La incorporación de FAMCAP en construcciones sonda de ADN causa un desplazamiento al rojo en la  $X_{\text{máx}}$  de excitación y emisión. El desplazamiento al rojo sugiere una posible interacción del fluoróforo con ADNmc, que puede incluir interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  entre el colorante y las bases de ADN. Los resultados de Marks *et al.* también sugieren que los fluoróforos no interactúan con el ADN bicatenario por intercalación o unión en el surco ya que estas interacciones causarían un fuerte desplazamiento al rojo tras la hibridación. Por lo tanto, puede haber una interacción entre el fluoróforo y las bases de la sonda de ADN monocatenario que causa inactivación de la fluorescencia. Esta interacción entre el fluoróforo y el ADN sonda se elimina tras la hibridación con la diana de modo que el colorante se proyecta en solución y se potencia la fluorescencia. No se espera que este mecanismo de potenciación de la fluorescencia funcione con sondas marcadas de forma terminal ya que el apilamiento de bases puede suceder sobre solamente un lado del fluoróforo. Los datos indican que los aumentos de fluorescencia de la sonda oligonucleotídica están causados por la eliminación de la inactivación en lugar de por la potenciación de la fluorescencia. Este modelo de la funcionalidad de la sonda también apoya nuestra proposición de que las señales de la sonda son independientes de la secuencia de la diana, de modo que los fluoróforos pueden posicionarse incluso en regiones ricas en C y aún mostrar niveles potenciados de fluorescencia tras la hibridación con la diana.

### Ejemplo 7: Alturas de pico

También se midieron las alturas de pico de sondas con marcaje individual, doble y triple para investigar el efecto de la secuencia de la sonda, la colocación del fluoróforo y múltiples fluoróforos. Las mediciones de las alturas de pico son ligeramente menos fiables que las proporciones de señal-a-ruido para comparaciones de sondas debido a las variaciones entre ejecuciones y entre instrumentos. Sin embargo, los picos de fusión generados en un único experimento LightCycler pueden emplearse para comparar de forma fiable secuencias de sonda. Normalmente se hibridaron 150 nM de sonda con 150 nM de oligonucleótido completamente complementario en tampón TaKaRa. Las mediciones de fluorescencia se hicieron usando un protocolo de curva de fusión LightCycler que comprendía desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C usando una velocidad de transición de 0,2 °C/s. Los datos de los picos de fusión obtenidos solamente con el software LightCycler versión 3.5 se han incluido en la tabla 3. La versión 3.01 del software LightCycler requirió que el usuario estableciera la ganancia de fluorescencia manualmente. Mientras que la versión 3,5 del el software determina automáticamente los niveles de fluorescencia relativos a la muestra que presenta el mayor nivel de emisión.

Todos los oligonucleótidos de la invención muestran picos de fusión positivos cuando se representa  $-dF/dT$  sobre el eje y frente a la temperatura en el eje x, independientemente de las secuencias de la sonda y la diana y la posición de las G en las mismas. La colocación de fluoróforos individuales, en la secuencia de sonda del Factor V, entre bases A y T (FVG1) y entre bases C y G (FVG1ALT) produce picos de fusión de aproximadamente la misma altura. La sonda del Factor V con marcaje doble (FVG11) produce picos de fusión que son aproximadamente cuatro veces la altura de los generados con las dos sondas marcadas individualmente FVG1 y FVG1ALT (tabla 3). La suma de las alturas de pico con marcaje individual es menor que la mostrada por la sonda con marcaje doble. Además, el empleo de 75 nM o 150 nM de ambas sondas marcadas individualmente en un único recipiente de reacción también produce picos de fusión que son más pequeños que los generados por las sondas oligonucleotídicas con marcaje doble. Una

interacción entre las bases marcadas con fluoróforo puede ser responsable de la proporción de señal-a-ruido potenciada y las alturas de los picos de fusión, haciendo que la sonda con marcaje doble sea mayor que la suma de las dos sondas marcadas individualmente. Se obtiene potenciación adicional de la señal de sondas con marcaje triple (véase a continuación). La localización y grado de separación de los fluoróforos en las sondas puede afectar a la magnitud del cambio de fluorescencia tras la hibridación y disociación de la diana. Las sondas marcadas individualmente poseen  $T_m$  reducidas en comparación con oligonucleótidos no marcados y sondas con marcaje doble muestran coherentemente  $T_m$  reducidas en comparación con sondas marcadas individualmente equivalentes (tabla 1). Como se cree que los fluoróforos se proyectan en solución tras la hibridación con la diana, no interaccionando de este modo con el ADN dúplex, se cree que los fluoróforos estabilizan las especies de sonda monocatenaria en lugar de desestabilizar el dúplex. Se cree que las sondas con marcaje múltiple estabilizan las estructuras de sonda monocatenaria más que las sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente equivalentes. Las sondas con marcaje doble y múltiple frecuentemente muestran niveles inferiores de ruido de fluorescencia que lo esperado (tabla 5) debido a las estructuras monocatenarias estabilizadas e inactivadas de forma eficaz. Los fondos reducidos y las señales aumentadas de las sondas con marcaje doble y múltiple dan lugar a mayores alturas de pico y proporciones de señal-a-ruido en comparación con oligonucleótidos marcados individualmente equivalentes.

**Ejemplo 8: Comparación de sondas marcadas de forma interna y terminal**

Las secuencias diana del Factor V se amplificaron usando los cebadores FVF1 (5'GACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAG (SEC ID N° 92)) y FVR3 (5'CCATTATTTAGCCAGGAGAC (SEC ID N° 93)). Los ensayos emplearon protocolos LightCycler de 3 fases que consisten en una desnaturalización inicial (95 °C 1 min.) seguida de 50 ciclos de PCR que comprenden desnaturalización (95 °C 0 s), hibridación de cebador (55 °C 10 s) y extensión de productos (72 °C 10 s). La diana amplificada se detectó y caracterizó a través de la inclusión de las sondas marcadas de forma terminal FV3 (5'CTGTATTCCTCGCCTGTCCF (SEC ID N° 94)) o FV5 (5'FCTGTATTCCTCGCCTGTCC (SEC ID N° 95)) y el análisis de la curva de fusión que comprende desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hacia 95 °C usando una velocidad de transición de 0,1 °C/s. La sonda FV3 marcada en 3' fue completamente no funcional, no produciendo ningún pico en los análisis de curva de fusión. La medición de los espectros de emisión de la sonda verificó una eficaz síntesis del oligonucleótido y unión del fluoróforo. La sonda FV5, que posee una unión 5'-FAM, mostró una reducción en la emisión de fluorescencia tras la hibridación con la diana. La sonda FV5 generó picos de fusión invertidos en los diagramas de -dF/dT (Figura 10) que permitieron la identificación de muestras homocigóticas y heterocigóticas. Los picos de fusión invertidos obtenidos de la sonda marcada en 5' fueron de magnitud similar a las alturas de los picos obtenidos de la sonda FVG1 marcada individualmente del Factor V (Figura 10).

5'CTGTATTCCTCGCCTGTCC3' (secuencia de la sonda del Factor V; SEC ID N° 140)  
 3'ATGGACATAAGGAGCGGACAGGTCC5' (Secuencia diana; SEC ID N° 141)

La sonda marcada en 5' sitúa el fluoróforo en cercana proximidad a restos G, en las posiciones 0 y +1, tras la hibridación con la secuencia diana, lo que explica la reducción observada en la emisión de fluorescencia. La sonda marcada en 3' también sitúa el fluoróforo en proximidad a restos G, en las posiciones 0 y -1, pero la fluorescencia ni se potenció ni se inactivó tras la hibridación.

50 TABLA 3 - Alturas de los picos de fusión obtenidas de la hibridación de sondas oligonucleotídicas 150 nM con oligonucleótidos completamente complementarios. Se proporcionan los números de identificación de secuencia para las sondas y las dianas. Las alturas de pico se clasifican desde la más baja hasta la más alta. Todos los picos fueron positivos cuando se representaba la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT) frente a la temperatura en el eje y y x respectivamente. Todos los picos de fusión se obtuvieron usando un único LightCycler (LC2) para evitar la variabilidad entre instrumentos.

Sonda	SEC ID	Secuencia	Altura de pico (Versión 3.5)
HSV1	49-50	GGACACGGGCGCFACCTCACCT	0,16
poliT	37-38	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	0,18
C19m2G	42-43	TACCFGGATCCAGGGGGTG	0,22
FVG1ALT	101, 24	CTGTATTCCTCGCCFGTCC	0,25
FVG1	21-24	CTGTAFTCCTCGCCTGTCC	0,28
NAT2*6	88-89	CTTCAAFGTGTTGAGGTTCAAG	0,3
2D64C*	51-52	GGCGFCCTGGGGTG	0,3
FVG1ALT2	128, 24	CTGTATTCFCGCCTGTCC	0,31
HYBCH8	105, 103	CAAGCCTGCAAATGTAFACCAAG	0,33
DdeFL1*4	6, 9	GAAGTGCFGAAAAATATATTTAAG	0,34
HYBNAT3S	16-17	CTTTAAAATACAFTTTTTATTATTA	0,34
PJ18S	47-48	GAGACGAACAACFCGCGAAAGC	0,36
HEPB	45-46	AAGAACTCCCFCGCCTCGCA	0,38
C19m1A	39-40	GATTATTFCCCAGGAACCC	0,43
136A	83-84	GGGAAGFGCCATGAGCAG	0,45

G08377	62-63	<b>ATGGGAFFGGGAFCCAATAA</b>	0,5
HYBCH7	105, 103	<b>GAAGCCFGCAAATGTATACCAAG</b>	0,52
HYBINF	66-67	<b>GGGAFCCAAFAACATGGACAGAGCT</b>	0,53
C9*2T	54-55	<b>CATTGAGGACTGFGTTCAAG</b>	0,59
NAT2*5	124,4	<b>GAGAGGAATCFGGTACTTGGACC</b>	0,64
C9*2C	56-57	<b>CATTGAGGACCGFGTTCAAG</b>	0,65
BamFL1*7	11, 14	<b>CCTGGTGAFGAATCCCTTAC</b>	0,67
171R	85-86	<b>CAGTGGAFCGGTATAGTAAC</b>	0,75
HYBCH2	32, 35	<b>CAAGCCTGCAAFFGTATACCAAG</b>	0,8
HYBNG	58-59	<b>TCTGCFTCCGCFACGGCTTC</b>	0,8
HYBSTR	91, 86	<b>GGTGGATAGAFAGATAGAFAG ATAGATAGATAGATAGATAGA TAGATAGATAGATAGATA</b>	0,9
HYBMTH	109-110	<b>GTCFGCGGGAGCCGAFTTCATC</b>	1,18
FVG11	60, 24	<b>CTGTAFTCCTCGCCFGTCC</b>	1,2
HYBCH10	108, 103	<b>CAAGCCFGCAAATGTAFACCAAG</b>	1,24
HYBCH	61, 35	<b>CAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG</b>	1,50
HYBCH9	107, 103	<b>CAAGCCTGCAAFFGTAFACCAAG</b>	1,59
HYBFII	115-116	<b>GCATFGAGGCTCGCFGAGAGTC</b>	1,59
HYBA1928C	112-113	<b>GACCAGFGAAGCAAGFGTCTTTG</b>	1,62
HYBMRSA	99-100	<b>CGTAGFTACTGCGTGTAGACGTC</b>	2,0
FVG111	127, 24	<b>CTGTAFTCCFCGCCFGTCC</b>	2,2
HYBAdD	68-69	<b>GACGTGGFCAGAGFGCACCAGCCT</b>	2,4
HYBCH5	102-103	<b>CAAGCCFGCAAFFGTAFACCAAG</b>	2,6
HYBCH6	103-104	<b>GTAAFCAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG</b>	2,6
HYBAdC	70-71	<b>GACGTGGFCCGTGFGCACCAGCCT</b>	3,4
HYBCH11	126, 103	<b>GTAAFCAAGCCFGCAAFFGTAFACCAAG</b>	3,5

- Los fluoróforos unidos a restos internos de los oligonucleótidos de la invención se inactivan en estado monocatenario y la hibridación libera una proporción de esta inactivación. La inactivación en la sonda monocatenaria puede surgir porque las bases del ADN pueden apilarse sobre el grupo fluorescente cuando no están formando pares de bases. En la forma monocatenaria el fluoróforo se emparejará entre dos bases de ADN que forman una estructura hidrófoba bastante estable. Ésta se descompondrá con la formación del dúplex ya que las bases tienen que participar en el apareamiento de base. El fenómeno no puede ser simplemente "inactivación por guanina", aunque las guaninas posiblemente tendrían una influencia mayor que otras bases.
- 5
- 10 La situación con los marcadores terminales es diferente, ya que el apilamiento de bases puede suceder solamente en un lado del fluoróforo. En la hebra sencilla (y en el dúplex) el fluoróforo no se emparejará entre bases de ADN, sino que se apilará solamente en una base. La inactivación tras la hibridación puede suceder si el fluoróforo se sitúa en cercana proximidad a bases de guanina en la hebra diana. A la inversa, la potenciación de la fluorescencia puede suceder en la hibridación si los fluoróforos están unidos a restos G terminales de la sonda. Los marcadores internos
- 15 de las sondas oligonucleotídicas se ven afectados considerablemente menos por las secuencias de la sonda y la diana y siempre muestran aumentos de fluorescencia tras la hibridación independientemente de la posición de las guaninas en el dúplex. Las sondas con marcaje terminal están influidas por los oligonucleótidos en la secuencia diana y pueden mostrar niveles aumentados o disminuidos de fluorescencia tras la hibridación con la diana. Los oligonucleótidos con marcaje doble de la invención muestran niveles aumentados de fluorescencia en hibridación
- 20 debido a la independencia de secuencia diana y no a una interacción entre fluoróforos.

### Ejemplo 9: Potencia de la señal y espaciado de fluoróforos en sondas con marcaje múltiple

- Puede esperarse que la incorporación de fluoróforos adicionales en secuencias de sondas oligonucleotídicas
- 25 aumente la emisión de la sonda tanto en estado hibridado (señal) como monocatenario (ruido), manteniendo de este modo la proporción de señal-a-ruido. Como alternativa, como los colorantes FAM pueden realmente inactivarse entre sí cuando están en proximidad, el marcaje de sondas con múltiples fluoróforos puede causar el deterioro de la proporción de señal-a-ruido. Sin embargo, las proporciones de señal-a-ruido y las alturas de los picos de fusión de la sonda se han mejorado considerablemente a través de la inclusión de dos o más colorantes FAM en las secuencias
- 30 de las sondas oligonucleotídicas. Todas las sondas descritas anteriormente utilizan C6 FAM dU o fluoresceína dT Glen para reemplazar nucleótidos de timina y los fluoróforos en estas sondas se separan por al menos tres nucleótidos. La inclusión de fluoróforos adicionales en los oligonucleótidos de la invención (por ejemplo, 3 ó 4 marcadores FAM) puede potenciar adicionalmente las proporciones de señal-a-ruido y las alturas de los picos de fusión. Sin embargo, las bases marcadas con fluoróforo deben separarse por una cantidad mínima de nucleótidos
- 35 para evitar la inactivación directa entre fluoróforos por transferencia de energía no radiante. Esta inactivación no FRET puede suceder a través de 'contactos' de corto intervalo entre los colorantes y no requiere el solapamiento de los espectros de excitación y emisión. La inactivación FRET también puede suceder entre marcadores FAM debido al solapamiento entre los espectros de excitación y emisión. El espaciado preferido cuando se diseñan las sondas oligonucleotídicas de la invención es 3-6. Sin embargo, todas las sondas con fluoróforos separados por al menos 2



nucleótidos no marcados muestran aumentos considerables en la fluorescencia en hibridación con la diana. No se han ensayado espaciados mayores de 11 nucleótidos pero pueden producir señales eficaces dependiendo de su disposición angular relativa en el dúplex (véase la tabla 7).

5 Se hibridaron 150 nM del oligonucleótido homólogo inverso HYBCHRC (SEC ID N° 35) con 150 nM de las sondas marcada individualmente (HYBCH2), con marcaje doble (HYBCH), con marcaje triple (HYBCH3) y cuádruple (HYBCH4) de Chlamydia en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

	HYBCH2	5'CAAGCCTGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 32)
10	HYBCH	5'CAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 61)
	HYBCH3	5'CAAGCCFGCAAFFGFATACCAAG (SEC ID N° 96)
	HYBCH4	5'CAAGCCFGCAAFFGFAFACCAAG (SEC ID N° 97)

15 Los picos de fusión se generaron usando un protocolo LightCycler que comprendía desnaturalización (95 °C 5 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C a 0,2 °C/s. En comparación con la sonda marcada individualmente, la sonda oligonucleotídica HYBCH con marcaje doble presentó una elevada proporción de señal-a-ruido y altura de pico de fusión junto con una T<sub>m</sub> reducida como se ha descrito anteriormente. Las bases marcadas con fluoróforo de HYBCH están separadas por 5 nucleótidos. La sonda HYBCH3 con marcaje triple se inactiva ligeramente tras la hibridación con la diana y muestra un pequeño pico negativo/invertido en huellas -dF/dT (Figura 11). La T<sub>m</sub> de HYBCH3 está reducida en comparación con la sonda marcada individualmente, pero es mayor que la de la sonda oligonucleotídica con marcaje doble. La sonda HYBCH4 con marcaje cuádruple muestra un pequeño pico positivo en huellas -dF/dT y una T<sub>m</sub> similar a la de HYBCH. Tanto la sonda HYBCH3 como la HYBCH4 contienen bases marcadas con fluoróforo que están separadas solamente por un único nucleótido y presentan niveles reducidos de fluorescencia tanto en estado hibridado como disociado (Figura 11). Los datos de fluorescencia indican que los colorantes FAM proximales se están inactivando entre sí en el estado monocatenario. La sonda HYBCH3 se inactiva a un grado mayor tras la hibridación con las secuencias diana complementarias, lo que sugiere que cuando los fluoróforos se proyectan en solución pueden situarse en contacto incluso más próximo que cuando están en conformación monocatenaria.

30 Se diseñaron sondas adicionales con marcaje triple de Chlamydia con un mayor nivel de separación entre las bases marcadas con fluoróforo. Se hibridaron 150 nM del oligonucleótido homólogo inverso HYBCH6RC (SEC ID N° 103) con 150 nM de las sondas marcada individualmente (HYBCH2), con marcaje doble (HYBCH) y con marcaje triple (HYBCH5 y HYBCH6) en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Los picos de fusión se generaron usando un protocolo LightCycler que comprendía desnaturalización (95 °C 5 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C a 0,2 °C/s.

	HYBCH2	5'CAAGCCTGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 32)
	HYBCH	5'CAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 61)
	HYBCH5	5'CAAGCCFGCAAFFGTAFACCAAG (SEC ID N° 102)
40	HYBCH6	5'GTAAFCAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 104)

45 La sonda HYBCH5 con marcaje triple muestra una T<sub>m</sub> muy similar a la de la sonda con marcaje doble HYBCH (tabla 1). Añadir más de dos colorantes fluorescentes puede no proporcionar estabilización adicional de la estructura monocatenaria. La sonda HYBCH6 con marcaje triple es 5 nucleótidos más larga que las sondas de Chlamydia mencionadas previamente y presenta una T<sub>m</sub> similar a la sonda HYBCH2 marcada individualmente. Las sondas con marcaje triple producen picos de fusión que son 6,5 y 3,25 veces la altura de las sondas HYBCH2 marcada individualmente y HYBCH con marcaje doble respectivamente (Figuras 4 y 11C).

50 Para investigar las contribuciones que cada fluoróforo tiene sobre la potencia de la señal total, se comparó la sonda HYBCH5 con marcaje triple con las tres sondas posibles de Chlamydia marcadas individualmente y tres sondas oligonucleotídicas con marcaje doble. Cada posición modificada dentro de las sondas oligonucleotídicas con marcaje triple se representó en las sondas con marcaje individual y doble. Estas sondas también se compararon con una sonda oligonucleotídica con marcaje cuádruple (SEC ID N° 126). Como se ha descrito previamente, se hibridaron 150 nM del oligonucleótido homólogo inverso HYBCH6RC (SEC ID N° 103) con 150 nM de la sonda en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

	HYBCH2	5'CAAGCCTGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 32)
	HYBCH7	5'CAAGCCFGCAAATGTATACCAAG (SEC ID N° 105)
	HYBCH8	5'CAAGCCTGCAAATGTAFACCAAG (SEC ID N° 106)
60	HYBCH	5'CAAGCCFGCAAFFGTATACCAAG (SEC ID N° 61)
	HYBCH9	5'CAAGCCTGCAAFFGTAFACCAAG (SEC ID N° 107)
	HYBCH10	5'CAAGCCFGCAAATGTAFACCAAG (SEC ID N° 108)
	HYBCH5	5'CAAGCCFGCAAFFGTAFACCAAG (SEC ID N° 102)
	HYBCH11	5'GTAAFCAAGCCFGCAAFFGTAFACCAAG (SEC ID N° 126)

65 Las alturas de picos de fusión generados en dos instrumentos LightCycler (LC1 y LC2) mostraron niveles mayores

de variación que las proporciones de señal-a-ruido calculadas (tabla 4). Sin embargo, con ambos instrumentos LightCycler, las alturas de pico de la sonda con marcaje triple fueron aproximadamente dos veces la altura de la sonda con marcaje doble más eficaz y más de cuatro veces mayor que la sonda oligonucleotídica marcada individualmente más eficaz (tabla 4). La altura de los picos de fusión con marcaje triple es mayor que la suma de las tres sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente y también es mayor que la suma de cualquier sonda con marcaje doble más cualquier sonda oligonucleotídica marcada individualmente equivalente. La sonda oligonucleotídica con marcaje cuádruple también produjo datos de fusión de alta calidad, mostrando alturas de pico que fueron aproximadamente un 25 % más grandes que las sondas con marcaje triple (tabla 4).

10 TABLA 4: Alturas de pico y proporciones de señal-a-ruido generadas con sondas con marcaje individual, doble y triple de Chlamydia usando dos instrumentos LightCycler (LC1 y LC2). Cada pico y curva de fusión se analizó por duplicado y se presenta el valor medio.

Sonda	Fluoróforos	Altura de pico (LC1)	Altura de pico (LC2)	Señal-a-ruido (LC1)	Señal-a-ruido (LC2)
HYBCH2	1	0,71	0,43	1,43	1,47
HYBCH7	1	0,97	0,52	1,42	1,54
HYBCH8	1	0,62	0,33	1,36	1,33
HYBCH	2	1,41	0,74	1,87	1,87
HYBCH9	2	2,1	1,59	1,58	1,92
HYBCH10	2	2,23	1,24	1,60	1,74
HYBCH5	3	4,28	2,80	2,33	2,42
HYBCH11	4	-	3,50	-	2,90

15 Las sondas con marcaje individual, doble y triple de Chlamydia también se investigaron a 35 °C en presencia y ausencia de diana para comparar los niveles de emisión de fluorescencia en estado hibridado y monocatenario. Se hibridaron 150 nM de oligonucleótido homólogo inverso HYBCH6RC (SEC ID N° 103) con 150 nM de sonda en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las muestras se desnaturalizaron en capilares LightCycler (95 °C 5 s) antes del enfriamiento hasta 35 °C con adquisición continua de fluorescencia. Las sondas se analizaron por duplicado en presencia y ausencia de diana y se detallan los valores medios de emisión para los estados hibridado y monocatenario en la tabla 5. En ausencia de diana, la sonda oligonucleotídica con marcaje triple emite menos fluorescencia que cualquiera de las sondas con marcaje individual y doble. Mientras que, en presencia de diana, el nivel de fluorescencia a partir de la sonda con marcaje triple fue muy similar al emitido a partir de la sonda HYBCH10 con marcaje doble. La sonda con marcaje triple muestra la mayor diferencia entre los estados dúplex y monocatenario y por tanto produce los mayores picos de fusión. Una interacción entre fluoróforos, tal como la inactivación en la estructura de sonda monocatenaria, puede ser responsable de las elevadas alturas de pico y proporciones de señal-a-ruido mostradas por las sondas oligonucleotídicas con marcaje doble y triple. En estado monocatenario (enrollamiento aleatorio) los fluoróforos pueden contactar entre sí y apilarse dando lugar a inactivación por colisión mientras que esto no es posible en el dúplex ya que los fluoróforos se mantienen apartados por la estructura rígida de ADN-B cuando están separados por al menos dos nucleótidos. Si están aún más juntos, el enlazador flexible en la posición 5 de la base de timina puede permitir que los fluoróforos se acerquen entre sí.

20 TABLA 5: Niveles de emisión (unidades arbitrarias de fluorescencia LightCycler) a 35 °C en presencia y ausencia de un oligonucleótido complementario. También se incluye la diferencia entre los estados hibridado y monocatenario.

Sonda	Fluoróforos	Más diana	Menos diana	Diferencia
HYBCH2	1	9,0	7,2	1,8
HYBCH7	1	8,4	7,0	1,4
HYBCH8	1	9,8	7,8	2,0
HYBCH	2	10,2	5,1	5,1
HYBCH9	2	14,3	7,4	6,9
HYBCH10	2	16,5	11,6	4,9
HYBCH5	3	16,2	5,0	11,2

35 **Ejemplo 10: Comparación adicional de oligonucleótidos con marcaje individual, doble y triple**

Se compararon tres sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente del Factor V con sondas con marcaje doble y triple de secuencia idéntica. Todos los fluoróforos presentes en las sondas oligonucleotídicas con marcaje doble y triple se representaron en las sondas marcadas individualmente. Se hibridaron 150 nM del oligonucleótido homólogo inverso FVG (SEC ID N° 24) con 150 nM de sonda oligonucleotídica en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. Los picos de fusión se generaron usando un protocolo LightCycler que comprendía desnaturalización (95 °C 5 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C a 0,2 °C/s. Las alturas de pico y las proporciones de señal-a-ruido de las sondas con marcaje individual, doble y triple se presentan en la tabla 6.

45

FVG1	5'CTGTAFTCCTCGCCTGTCC (SEC ID N° 21)
FVG1ALT	5'CTGTATTCCCTCGCCFGTCC (SEC ID N° 101)
FVG1ALT2	5'CTGTATTCCFCGCCTGTCC (SEC ID N° 128)

FVG11 5'CTGTAFTCCTCGCCFGTCC (SEC ID N° 60)  
 FVG111 5'CTGTAFTCCFCGCCFGTCC (SEC ID N° 127)

La sonda FVG11 con marcaje doble produce picos de fusión que son aproximadamente 3-4 veces mayores que las sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente que poseen fluoróforos en posiciones idénticas dentro de la secuencia. Por tanto, los picos de fusión con marcaje doble son mayores que la suma de los picos marcados individualmente. Además, la sonda oligonucleotídica con marcaje triple genera picos de fusión que son al menos 7 veces mayores que las sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente y 2,6 veces mayores que la sonda con marcaje doble (Figura 12). Los picos de fusión de las sondas con marcaje triple son considerablemente más grandes que la suma de los picos derivados de oligonucleótidos marcados individualmente. Como con los oligonucleótidos de Chlamydia, la adición de múltiples fluoróforos a las sondas causa la generación de picos de fusión cuyas alturas son mayores que las que se esperarían de las sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente. Los datos derivados de las sondas de Chlamydia y el Factor V demuestran que la incorporación de dos o tres bases marcadas con fluoróforo no duplica o triplica necesariamente la altura de los picos de fusión de las sondas oligonucleotídicas.

5 15 TABLA 6: Alturas de pico y proporciones de señal-a-ruido generadas con sondas con marcaje individual, doble y triple del Factor V en un único experimento LightCycler (LC2). Se analizó cada pico y curva de fusión por duplicado y se presenta el valor medio.

Sonda	Fluoróforos	Tm	Altura de pico	Señal-a-ruido
FVG	1	60,0	0,21	1,33
FVG1ALT	1	61,2	0,28	1,46
FVG1ALT2	1	61,2	0,30	1,47
FVG11	2	56,1	0,84	1,79
FVG111	3	55,9	2,2	3,14

20 **Ejemplo 11: Espaciado mínimo entre fluoróforos**

Se sintetizó una serie de sondas oligonucleotídicas para determinar el espaciado mínimo requerido entre las bases marcadas con fluoróforo en sondas oligonucleotídicas con marcaje doble. Las sondas poseían entre 0 y 9 nucleótidos entre las bases marcadas con fluoróforo. Se hibridaron 150 nM del oligonucleótido homólogo inverso MODRC (5'CCCCCTTTTTTTTTTCCCCC (SEC ID N° 139)) con 150 nM de la sonda oligonucleotídica en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. Los picos de fusión se generaron usando un protocolo LightCycler que comprendía desnaturalización (95 °C 5 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C a 0,2 °C/s. Las proporciones de señal-a-ruido y las alturas de los picos de fusión se presentan en la tabla 7. Las sondas que poseían 0 y 1 nucleótidos entre las bases marcadas mostraron niveles considerablemente reducidos de fluorescencia debido a la inactivación por contacto causada por la cercana proximidad de los fluoróforos. Estas dos sondas mostraron picos de fusión negativos (invertidos), donde el nivel de fluorescencia disminuyó cuando hibridaban con las secuencias diana en relación al estado monocatenario. Todas las sondas que poseían entre 2 y 9 nucleótidos separando las bases marcadas con fluoróforo mostraron picos de fusión positivos y potenciación de la fluorescencia tras la hibridación con la diana. Las sondas que poseían fluoróforos separados por 7 y 8 nucleótidos mostraron niveles ligeramente reducidos de fluorescencia y picos de fusión más pequeños en comparación con las sondas con espaciados de 2-6 y 9. Las sondas que poseen múltiples fluoróforos en la misma superficie del ADN dúplex pueden encontrarse con un grado de inactivación por contacto, presentando de este modo reducidas alturas de pico y proporciones de señal-a-ruido. Estos efectos de la disposición angular pueden ser específicos de secuencia ya que se han empleado espaciados de 8 nucleótidos en las sondas FVG11 (SEC ID N° 60), HYBMRSA (SEC ID N° 99) y HYBA1928C (SEC ID N° 112), generando grandes picos de fusión y proporciones de señal-a-ruido. Se requieren al menos dos nucleótidos separando las bases marcadas con fluoróforo para que las sondas oligonucleotídicas produzcan niveles mayores de emisión de fluorescencia tras la hibridación con la diana en relación a la sonda libre.

45 TABLA 7: Picos de fusión generados en un único experimento LightCycler (LC2) para determinar el espaciado mínimo requerido entre bases marcadas con fluoróforo. Cada pico de fusión se analizó por duplicado y se presenta el valor medio.

Sonda	Espacio	Secuencia	SEC ID	Altura de puco	Señal-a-ruido
MOD0	0	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	129	-0,06	0,71
MOD1	1	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	130	-0,07	0,84
MOD2	2	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	131	0,26	1,29
MOD3	3	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	132	0,24	1,30
MOD4	4	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	133	0,24	1,30
MOD5	5	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	134	0,17	1,25
MOD6	6	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	135	0,20	1,23
MOD7	7	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	136	0,09	1,15
MOD8	8	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	137	0,06	1,11
MOD9	9	GGGGGGTTTTFFTTTTGGGGGG	138	0,15	1,31

Todas las sondas oligonucleotídicas con marcaje doble, triple y cuádruple diseñadas hasta la fecha, que poseen

entre dos y once nucleótidos separando las bases marcadas con fluoróforo, muestran una considerable potenciación de la fluorescencia tras la hibridación con secuencias diana complementarias. Se ha descubierto que solamente aquellas sondas con ningún nucleótido o uno separando las bases marcadas con fluoróforo muestran pequeños niveles de inactivación de la fluorescencia tras la hibridación con la diana. Aún no se ha identificado una separación máxima de nucleótidos marcados con fluoróforo.

### Ejemplo 12: Unión de fluoróforos a dA y dC

Se sintetizaron sondas oligonucleotídicas FAM dA y FAM dC usando monómeros amino-dA y amino-dC (Glen Research, Sterling, VA) y marcaje post-sintético con FAM. Se sintetizaron sondas con marcaje individual y doble que contenían FAM dC y FAM dA y se compararon con sondas oligonucleotídicas con marcaje individual y doble C6 FAM dU (tabla 8). Se hibridaron 150 nM del oligonucleótido homólogo inverso apropiado (FVG o GLENARC) con 150 nM de la sonda oligonucleotídica en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM de MgCl<sub>2</sub>. Los picos de fusión se generaron usando un protocolo LightCycler que comprendía desnaturalización (95 °C 5 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C a 0,2 °C/s.

FVG 5'GGACAGGCGAGGAATACAG (SEC ID N° 24)  
GLENARC 5'CTGTATACCTTGCCTGTCC (SEC ID N° 91)

Las sondas FAM dC y FAM dA mostraron todas niveles potenciados de fluorescencia tras la hibridación con la diana en relación al estado monocatenario (Figura 13). La potenciación de la emisión de fluorescencia tras la hibridación de FAM dC apoya el modelo de que los fluoróforos de la sonda oligonucleotídica no interaccionan con el ADN de la hebra diana ya que se esperaba que la interacción con G en la diana causara inactivación de la fluorescencia. Como con C6 FAM dU y fluoresceína dT, las sondas con marcaje doble FAM dC y FAM dA producen ambas picos de fusión que son mayores que dos veces la altura de la sonda oligonucleotídica marcada individualmente equivalente.

Las sondas con marcaje doble de C6 FAM dU y fluoresceína dT muestran T<sub>m</sub> que son aproximadamente 4-5 °C inferiores que las sondas marcadas individualmente de secuencia idéntica. Las sondas marcadas con FAM dC y FAM dA mostraron diferentes de T<sub>m</sub> de 1 °C y 8,3 °C respectivamente (tabla 8).

TABLA 8: Alturas de pico y proporciones de señal-a-ruido derivadas de sondas oligonucleotídicas que contienen marcadores C6 FAM dU, FAM dC y FAM dA.

Sonda	SEC ID N°	Secuencia	Base marcada	T <sub>m</sub>	Altura de pico	Señal-a-ruido
FVG1	21	<b>CTGTAFTCCTCGCCTGTCC</b>	FAM dU	59,9	0,22	1,35
FVG11	60	<b>CTGTAFTCCTCGCCFGTCC</b>	FAM dU	56,0	0,81	1,81
GLENC 1	125	<b>CTGTATTFCTCGCCTGTCC</b>	FAM dC	60,9	0,28	1,37
GLENC 2	72	<b>CTGTATTFCTCGCFTGTCC</b>	FAM dC	59,9	1,03	1,81
GLENA 1	73	<b>GGACAGGCAAGGFATACAG</b>	FAM dA	49,8	0,59	2,4
GLENA 2	90	<b>GGACFGGCAAGGFATACAG</b>	FAM dA	41,5	1,52	4,1
ATD063 8	142	<b>GGACAFGCAAGGTATACAG</b>	FAM dG	53,0	0,63	2,0
ATD063 9	143	<b>GGACAFGCAAGFTATACAG</b>	FAM dG	53,0	0,15	1,5

Para A, T, C y U, no importa si los fluoróforos se unen a los nucleótidos antes, durante o después de la síntesis. La unión a estos nucleótidos es posible mientras se mantenga la base 'natural'. La unión del fluoróforo directamente a G produce un análogo de base.

### Ejemplo 13: PCR asimétrica para potenciar la altura del pico de fusión

Después de la fase de PCR de los ensayos usando los oligonucleótidos de la invención, las sondas compiten con los productos amplificados por hibridar con la secuencia diana. Esta competición reduce el potencial de las interacciones sonda/diana y limita la altura de los picos de fusión. Si la diana hibridación se desplaza a favor de la sonda, puede aumentarse la altura de los picos de fusión. Esto puede conseguirse aumentando la concentración de la sonda o disminuyendo la abundancia de la hebra competidora de PCR.

Se ha descubierto que la concentración óptima de las sondas oligonucleotídicas es 150 nM. Se ha descubierto que el aumento de la concentración de la sonda por encima de 200 nM no mejora las proporciones de señal-a-ruido. De hecho, una concentración aumentada de la sonda tiene un efecto adverso sobre las huellas de fusión de Chlamydia, generando un segundo pico a aproximadamente 80 °C que aumenta en altura junto con la concentración de la sonda. También se ha descubierto que las calidades de los picos se reducen a elevadas concentraciones de sonda debido a la fluorescencia adicional del fondo que surge de las sondas monocatenarias que son incapaces de hibridar con las secuencias diana.

Puede reducirse la abundancia de la hebra de ADN competidora, con relación a la secuencia diana, usando un método de amplificación asimétrica. Se optimizó la concentración de los cebadores directo e inverso de Chlamydia para maximizar la altura de los picos de fusión. Se amplificaron las dianas de plásmido críptico de Chlamydia usando los cebadores CHF3-1 (SEC ID N° 33) y CHR4-1 (SEC ID N° 34). Los ensayos emplearon protocolos LightCycler de

3 fases que consistían en una desnaturalización inicial (95 °C 1 min.) seguida de 50 ciclos de PCR que comprendían desnaturalización (95 °C 5 s), hibridación de cebador (55 °C 10 s) y extensión de productos (72 °C 10 s). La diana amplificada se detectó y caracterizó a través de la inclusión de la sonda HYBCH (SEC ID N° 61) y el análisis de la curva de fusión que comprendía desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hacia 95 °C usando una velocidad de transición de 0,2 °C/s. En presencia de ADN de Chlamydia, la sonda HYBCH genera claros picos de fusión con Tm de aproximadamente 56 °C (Figura 14). Se descubrió que una dilución de factor diez del cebador directo (0,05 µM) relativa al cebador inverso (0,5 µM) aumentaba la altura de los picos de Chlamydia en tres a cinco veces en comparación con ensayos equimolares convencionales (Figura 14). Esta altura de pico aumentada se observó con ADN genómico purificado y muestras clínicas procesadas. La combinación de PCR asimétrica con una sonda con marcaje triple (HYBCH6) generó picos de fusión que fueron aproximadamente 20 veces el tamaño de aquellos generados en ensayos simétricos que emplean la sonda oligonucleotídica marcada individualmente.

#### Ejemplo 14: PCR asimétrica, concentración de la sonda y alturas de pico

La PCR asimétrica ha producido alturas de pico aumentadas, relativas a la amplificación simétrica, con ensayos de Chlamydia, gonorrhoeae, Factor II, A1928C, y C677T. Sin embargo, la amplificación asimétrica no logró potenciar las alturas de pico en el ensayo de NAT2\*5C. Como la PCR asimétrica genera dianas monocatenarias, las sondas no tienen que competir por la hibridación con las hebras complementarias de PCR y los picos de fusión tienen el potencial de ser de similar magnitud a los obtenidos con oligonucleótidos. Si la amplificación simétrica produce picos de fusión que ya son de similar magnitud a los picos de oligonucleótido (por ejemplo, ensayo de NAT2\*5C), no puede obtenerse beneficio de la amplificación asimétrica. Parece que solamente aquellas sondas que presentan alturas de pico reducidas, en comparación con los oligonucleótidos, muestran alturas de pico potenciadas cuando los ensayos se convierten en ensayos asimétricos. La PCR asimétrica puede ser beneficiosa si los ensayos utilizan largos amplicones diana o si se generan dímeros de cebador.

Las sondas de Factor V (FVG1 y FVG11) son una situación más complicada. Los picos de fusión generados en ensayos simétricos son de altura razonable, permitiendo una identificación fiable de las muestras, pero son reducidos en comparación con picos derivados de dianas oligonucleotídicas. Se ha descubierto que cincuenta ciclos de amplificación asimétrica, realizados con una muestra heterocigótica, no afectan a la altura de los picos apareados o desapareados con relación a ensayos simétricos. Sin embargo, se descubrió que 60 y 70 ciclos de amplificación asimétrica aumentan la altura del pico de fusión apareado reduciendo/no afectando al mismo tiempo la altura del pico desapareado (Figura 14). Después de 70 ciclos, la sonda llega a saturarse con diana de modo que la hibridación preferencial con el alelo completamente complementario provoca un desequilibrio de las alturas de pico. La estabilidad aumentada de los dúplex sonda/diana completamente complementarios es responsable de esta hibridación preferencial y altura de pico aumentada relativas al dúplex desapareado.

La sonda FVG11 (SEC ID N° 60) se hibridó con los oligonucleótidos completamente complementario (FVG (SEC ID N° 24)) y desapareado (FVA (SEC ID N° 25)) para investigar el efecto de la concentración de diana sobre las alturas de los picos de fusión. El análisis de fusión se realizó en un instrumento LightCycler empleando un protocolo térmico que comprendía desnaturalización (95 °C 0 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un lento calentamiento hasta 95 °C usando una velocidad de transición de 0,2 °C/s. Se emplearon las dianas apareada y desapareada a concentraciones equimolares. La sonda 150 nM hibridada con 150 nM de diana produjo picos de fusión apareados y desapareados de altura idéntica (Figura 15). Sonda 300 nM hibridada con 300 nM de diana también produjo picos apareados y desapareados de altura comparable. Sin embargo, 150 nM de sonda hibridada con 1 µM de la diana produjo solamente el pico de fusión apareado (Figura 15). La diana completamente complementaria secuestra la sonda y la hibridación competitiva evita la hibridación eficaz con la diana desapareada. El SNP del factor V afecta a la estabilidad de los dúplex sonda/diana considerablemente, de modo que a elevadas concentraciones de diana la sonda se une preferentemente a la secuencia completamente complementaria. Esta observación también explica el desequilibrio de las alturas de pico entre dianas completamente complementarias y doblemente desapareadas, tal como en ensayos de células falciformes y NAT1\*10.

Para averiguar si mayores concentraciones de sonda podrían re-establecer el equilibrio de las alturas de los picos apareados y desapareados a elevadas concentraciones de diana, se realizaron ensayos simétricos y asimétricos usando 150 nM, 300 nM y 500 nM de la sonda FVG11 y una muestra de ADN genómico heterocigótico del Factor V. Se realizaron cincuenta, sesenta y setenta ciclos de amplificación de 2 fases. Después de 50 ciclos, las alturas de los picos apareado y desapareado se equilibraron y no hubo diferencia considerable entre las reacciones simétrica y asimétrica (Figura 16). Las reacciones de sonda 150 nM produjeron los datos de mayor calidad. Las alturas de los picos de fusión apareado y desapareado generados, con 150 nM de sonda, tras 60 y 70 ciclos asimétricos eran desiguales como se demuestra en la figura 14. La altura del pico de fusión desapareado se mejoró considerablemente a las mayores concentraciones de sonda. Después de 60 ciclos asimétricos, 150 nM de FVG11 produjo picos de fusión apareados y desapareados con alturas de 0,83 y 0,35 respectivamente (diferencia de 2,3 veces). Mientras que 500 nM de sonda produjo picos de fusión apareados y desapareados con alturas de 0,63 y 0,50 respectivamente (diferencia de 1,13 veces). La altura combinada de los picos heterocigóticos en las reacciones de sonda 150 nM y 500 nM fue de 1,19 y 1,13 respectivamente, similar a la observada con diana oligonucleotídica homocigótica (Figura 3). La concentración aumentada de la sonda equilibró la altura de los picos de fusión apareado

y desapareado generados con productos amplificados de forma asimétrica. Los datos del oligonucleótido y la PCR no confirman la hibridación competitiva de las sondas con moléculas diana apareadas y desapareadas. A concentraciones mayores de diana, esta hibridación competitiva y la estabilidad reducida de los dúplex desapareados provoca la reducción o pérdida de picos en un perfil de fusión multi-diana. Pueden ser necesarias concentraciones de sonda mayores de 150 nM en ciertos ensayos asimétricos.

#### Ejemplo 15: Análisis múltiple por temperatura de fusión

Se hibridaron simultáneamente cuatro sondas oligonucleotídicas con sus dianas oligonucleotídicas complementarias en un único capilar LightCycler para demostrar el potencial de combinación del análisis de picos de fusión. Las sondas y las dianas se emplearon a diversas concentraciones para compensar las alturas de los picos derivados de sondas con marcaje individual y doble. Las sondas poliT, HYBINF, HYBCH2 y HYBAdC y las dianas oligonucleotídicas se emplearon a 1,2 μM, 233 nM, 183 nM y 27 nM respectivamente. Los picos de fusión se generaron en tampón de PCR TaKaRa, y un total de 3 mM MgCl<sub>2</sub> usando un protocolo LightCycler que comprendía desnaturalización (95 °C 5 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un calentamiento hacia 95 °C a 0,4 °C/s. Las sondas poliT, HYBINF, HYBCH2 y HYBAdC generaron claros picos de fusión con T<sub>m</sub> de aproximadamente 49 °C, 54 °C, 62 °C y 68 °C respectivamente (Figura 17). Pueden detectarse e identificarse al menos cuatro secuencias diana basándose en la T<sub>m</sub> usando las sondas oligonucleotídicas que permiten análisis simultáneo de dos SNP bialélicos. El potencial de combinación puede potenciarse adicionalmente usando colorantes fluorescente espectralmente distintos.

#### Ejemplo 16: Control positivo de amplificación

Pueden emplearse oligonucleótidos de la invención para determinar la presencia o ausencia de patógenos infecciosos en muestras clínicas. La generación de picos de fusión específicos indica la presencia de agentes infecciosos particulares dentro de la muestra. Sin embargo, la ausencia total de picos de fusión no indica de forma fiable la ausencia de patógeno. Las muestras clínicas, tales como orina, pueden contener elevados niveles de inhibidores de PCR que pueden evitar la detección de patógenos en muestras positivas. Se requiere un control de amplificación para distinguir reacciones que sean negativas debido a la ausencia de patógeno de aquellas que no logren generar picos de fusión debido a la inhibición de la PCR.

El control de amplificación de Chlamydia (mímico) se construyó usando un oligonucleótido de 142 bases (SEC ID N° 98). El largo oligonucleótido se empleó como molde de PCR con propósitos de clonación y contenía una sustitución de base C a T dentro de la región de sonda para posibilitar la diferenciación entre el mímico de la diana de Chlamydia basándose en la T<sub>m</sub>. La amplificación a partir del largo oligonucleótido se realizó usando los cebadores CHF3-1 (SEC ID N° 33) y CHR4-1 (SEC ID N° 34). El producto amplificado se ligó en el vector pDrive usando un kit PCR cloning<sup>plus</sup> (Qiagen Ltd, Crawley, RU) y se transformó en células competentes Qiagen EZ. Se identificaron colonias que contenían la secuencia mímica directamente usando el ensayo de Chlamydia que usa las sondas oligonucleotídicas de la invención. Los plásmidos se purificaron de los cultivos transformantes usando un kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen Ltd, Crawley, RU) usando los procedimientos recomendados por el fabricante. La hibridación de los oligonucleótidos de Chlamydia de la invención con la secuencia diana mímica provoca un desapareamiento C:A que reduce las T<sub>m</sub> de las sondas en aproximadamente 8 °C (Figura 18).

#### Ejemplo 17: Cuantificación de ADN usando las sondas oligonucleotídicas de la invención

Se amplificaron las dianas del Factor V a partir de una serie de patrones de ADN usando los cebadores FVF1.3 (SEC ID N° 22) y FVR3.5 (SEC ID N° 23). Los patrones de ADN contenían 100 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl y 10 pg/μl de ADN genómico humano. Los ensayos emplearon protocolos LightCycler de 3 fases que consistían en una desnaturalización inicial (95 °C 1 min.) seguida de 50 ciclos de PCR que comprendían fases de desnaturalización (95 °C 0 s) e hibridación (50 °C 10 s) y extensión (72 °C 10 s). La diana amplificada se detectó y caracterizó a través de la inclusión de FVG 1 (SEC ID N° 21) o FVG 11 (SEC ID N° 60) y la adquisición de fluorescencia durante la fase de hibridación de PCR. La medición del número de ciclo al que aumenta la emisión de fluorescencia por encima de un nivel umbral (C<sub>T</sub>) posibilita la cuantificación de las dianas de ADN (Figura 19). Los valores C<sub>T</sub> derivados obtenidos durante ensayos de PCR a tiempo real son directamente proporcionales a la cantidad de copias de partida de la secuencia diana y pueden usarse para construir curvas patrón, a partir de las cuales pueden cuantificarse muestras 'desconocidas'. Se ha descubierto que las muestras de saliva normalmente contienen aproximadamente 1 ng/μl de ADN genómico humano.

#### Ejemplo 18: Análisis usando fluoróforos diferentes a fluoresceína

Se sintetizaron cuatro sondas oligonucleotídicas del Factor V cada una marcada con fluoróforos en dos posiciones internas. Estas sondas fueron:

FVG11TAM 5'CTGTAXTCCTCGCCXGTCC (SEC ID N° 140) donde X es un resto dT marcado con TAMRA.

65 FVG11ROX 5'CTGTAXTCCTCGCCXGTCC (SEC ID N° 141) donde X es un resto dT marcado con ROX.

FVG11Cy5 5'CTGTAXTCCTCGCCXGTCC (SEC ID N° 142) donde X es un resto dT marcado con Cy5.

FVG11Mix 5'CTGTAFTCCTCGCCXGTCC (SEC ID N° 143) donde F es un resto dT marcado con FAM y X es un resto dT marcado con ROX.

5 Las sondas se hibridaron con sus dianas oligonucleotídicas complementarias (SEC ID N° 24) en placas ópticas de 96 pocillos en tampón de PCR TaKaRa y un total de 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y se generaron curvas de fusión usando un termociclador ABI 7700. El protocolo de fusión comprendía desnaturalización (95 °C 30 s), enfriamiento (35 °C 30 s) y un perfil de fusión que comprendía una progresión por etapas desde 35 °C hasta 95 °C en incrementos de 1 °C con un mantenimiento de 15 s a cada temperatura. Las sondas y los complementos se usaron a concentraciones de 150 nM. Los datos sin procesar se exportaron desde el termociclador ABI 7700 y se procesaron usando el programa de hojas de cálculo Excel de Microsoft. Las Figuras 20A, 20B, 20C y 20D muestran las curvas de fusión de estas sondas a partir de sus complementos y en todos los casos se observa una intersección en la curva y demuestra una disminución en la fluorescencia como resultado directo de la disociación de la sonda desde su diana en comparación con la disminución lineal de la fluorescencia como una función de la temperatura a pesar de que el sistema óptico es sub-óptimo para la detección de Cy5. Estos datos confirman los datos y conclusiones previas de que este fenómeno es una característica general de los fluoróforos y no está restringido a la fluoresceína y otros derivados basados en fluoresceína.

## 20 Conclusión

Las sondas oligonucleotídicas que poseen una única y múltiples bases internas marcadas con fluoróforo muestran todas niveles aumentados de emisión de fluorescencia cuando hibridan en comparación con el estado monocatenario. Como la fluorescencia de la sonda siempre aumenta tras la hibridación independientemente de las secuencias oligonucleotídica y diana, se prevé que los fluoróforos interaccionan con el ADN sonda cuando es monocatenario, provocando inactivación, pero no interaccionan con las secuencias sonda o diana cuando está en estado dúplex, de modo que los fluoróforos se reactivan y aumenta la fluorescencia. Se cree que los niveles aumentados de fluorescencia emitida por las sondas hibridadas surge de los fluoróforos que se proyectan en solución lejos de la influencia inactivadora del ADN.

30 Un hallazgo inesperado resultante de la comparación de sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente con sondas con marcaje dual y triple de secuencia idéntica fue que la fluorescencia no se duplicaba o triplicaba simplemente con la inclusión de fluoróforos adicionales. Las sondas con marcaje doble y triple mostraban picos de fusión que eran mayores que los esperados de cada una de las sondas oligonucleotídicas marcadas individualmente, lo que sugiere una interacción entre fluoróforos. Los fluoróforos en las sondas oligonucleotídicas se separan preferiblemente por al menos dos nucleótidos para evitar la inactivación por contacto y asegurar una generación eficaz de la señal sobre la detección de la diana.

**TABLA 9: Colorantes fluorescentes generales de marcaje de oligonucleótidos**

Colorante	λ-excitación	λ-emisión	color
Fluoresceína	494 nm	525 nm	Verde
Tetracloro de Fluoresceína TET	521 nm	536 nm	Naranja
JOE	525 nm	555 nm	Verde
Amarillo Yakima	530 nm	549 nm	Amarillo
Hexacloro de Fluoresceína HEX	535 nm	556 nm	Rosado
Cy3 (también Quasar 570)	546 nm	563 nm	Rojo
5-TAMRA	541 nm	568 nm	Rosa
6-TAMRA	547 nm	573 nm	Rosa
Rojo Redmond	579 nm	595 nm	Rojo
Cy3.5	588 nm	604 nm	Púrpura
ROX	585 nm	610 nm	Rojo
Pulsar 650	490 nm	650 nm	Púrpura
Cy5 (también Quasar 670)	646 nm	662 nm	Violeta
Cy5.5	683 nm	707 nm	Azul oscuro

40

**TABLA 10: Colorantes Alexa (Invitrogen)**

Colorante Alexa	λ-excitación	λ-emisión
Alexafluor 350	350 nm	442 nm
Alexafluor 405	405 nm	421 nm

Alexafluor 430	430 nm	540 nm
Alexafluor 488	488 nm	518 nm
Alexafluor 500	502 nm	524 nm
Alexafluor 514	518 nm	542 nm
Alexafluor 532	534 nm	553 nm
Alexafluor 546	546 nm	565 nm
Alexafluor 555	552 nm	567 nm
Alexafluor 568	578 nm	603 nm
Alexafluor 594	591 nm	618 nm
Alexafluor 610	612 nm	628 nm
Alexafluor 633	633 nm	650 nm
Alexafluor 647	647 nm	662 nm
Alexafluor 660	663 nm	690 nm
Alexafluor 680	679 nm	702 nm
Alexafluor 700	696 nm	719 nm
Alexafluor 750	752 nm	779 nm

**TABLA 11: Colorantes ATTO (ATTO-TEC GmbH)**

<b>Colorante ATTO</b>	<b>λ-excitación</b>	<b>λ-emisión</b>
ATTO 425	436 nm	484 nm
ATTO 465	453 nm	508 nm
ATTO 488	501 nm	523 nm
ATTO 495	495 nm	527 nm
ATTO 520	525 nm	545 nm
ATTO 532	532 nm	553 nm
ATTO 550	554 nm	576 nm
ATTO 565	563 nm	592 nm
ATTO 590	594 nm	624 nm
ATTO 610	615 nm	634 nm
ATTO 620	619 nm	643 nm
ATTO 635	635 nm	659 nm
ATTO 647	645 nm	669 nm
ATTO 655	633 nm	684 nm
ATTO 680	680 nm	700 nm
ATTO 700	700 nm	719 nm

**TABLA 12: Colorantes Dyomics (Dyomics GmbH)**

<b>Colorante Dyomics</b>	<b>λ-excitación</b>	<b>λ-emisión</b>
DY415	418 nm	465 nm
DY495	495 nm	520 nm
DY505	505 nm	530 nm
DY547	557 nm	574 nm
DY548/549	558 nm	572 nm
DY550	553 nm	578 nm
DY555	555 nm	580 nm
DY556	548 nm	573 nm
DY560	559 nm	578 nm
DY590	580 nm	599 nm
DY610	609 nm	629 nm



DY615	621 nm	641 nm
DY630	636 nm	657 nm
DY631	637 nm	658 nm
DY632/633/634	637 nm	657 nm
DY635	647 nm	671 nm
DY636	645 nm	671 nm
DY647	652 nm	673 nm
DY648	653 nm	674 nm
DY650	653 nm	674 nm
DY651	653 nm	678 nm
DY652	654 nm	675 nm
DY675/676	674 nm	699 nm
DY677	673 nm	694 nm
DY680/682	690 nm	709 nm
DY700	702 nm	723 nm
DY701	706 nm	731 nm
DY730	734 nm	750 nm
DY731/734	736 nm	759 nm
DY732	736 nm	759 nm
DY750	747 nm	776 nm
DY751	751 nm	779 nm
DY752	748 nm	772 nm
DY776	771 nm	801 nm
DY781	783 nm	800 nm
DY782	782 nm	800 nm

**TABLA 13: Colorantes Dyomics Megastokes (Dyomics GmbH). Todos pueden excitarse a 488 nm**

Colorante Dyomics	$\lambda$ -excitación	$\lambda$ -emisión
DY475XL	493 nm	514 nm
DY480XL	500 nm	630 nm
DY485XL	485 nm	560 nm
DY500XL	505 nm	555 nm
DY510XL	509 nm	590 nm
DY600XL	603 nm	634 nm
DY520XL	520 nm	664 nm

**TABLA 14: Colorantes Hilyte (Cambridge Bioscience)**

Colorante	$\lambda$ -excitación	$\lambda$ -emisión
Hilyte Fluor 488	502 nm	527 nm
Hilyte Fluor 555	552 nm	569 nm
Hilyte Fluor 647	649 nm	674 nm
Hilyte Fluor 680	678 nm	699 nm

5

**TABLA 15: Fluoróforos con baja longitud de onda de excitación (UV)**

Derivado	Abs*	Em*
Alexa Fluor 350	346	442
Alexa Fluor 405	402	412
Amilinaftaleno	326	462
Bimane	375	456

Dansilo	328	563
Dapoxilo	374	572
Dibromobimane	394	490
Dietilaminocumarina	384	470
Dimetilaminocumarina	376	465
Dimetilaminonaftaleno	391	500
Monobromobimane	394	490
Monoclorobimane	394	490
Naftaleno	336	490
Pireno	339	384
Estilbeno	329	408

### Referencias citadas

#### Documentos de patente

- 5  
 US 5.691.146 11/1997 Mayrand  
 US 6.174.670 B1 1/2001 Rasmussen et al.  
 WO 01/36668 A1 5/2001 Sauer et al.  
 US 6.635.427 B2 10/2003 Wittwer et al.  
 10 WO 01/73118 A2 10/2001 French et al.

#### Otras publicaciones

- 15 1. Brown et al (2001) Synthesis of a modified thymidine monomer for site-specific incorporation of reporter groups into oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* 42, 2587-2591.  
 2. Brown et al (2003) Synthesis of fluorophore and quencher monomers for use in Scorpion primers and nucleic acid structure probes. *Organic and Biomolecular Chem.* 1, 2267-2275.  
 3. Crockett y Wittwer (2001) Fluorescein-Labeled Oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the Inherent Quenching of Deoxyguanosine Nucleotides. *Anal. Biochem.*, 290, 89-97.  
 20 4. Dobson et al (2003) Synthesis of HyBeacons and dual-labelled probes containing 2'-fluorescent groups for use in genetic analysis. *Chem. Comm.* 1234-1235.  
 5. Elnifro et al (2000) PCR and restriction endonuclease analysis for rapid identification of Human Adenovirus-subgenera. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2055-2061.  
 6. French et al (2001) HyBeacon probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination. *Molecular and Cellular Probes.* 15, 363-74.  
 25 7. French et al (2002) Ultra-rapid DNA analysis using HyBeacon probes and direct PCR amplification direct from saliva. *Molecular and Cellular Probes.* 16, 319-26.  
 8. Hawkins et al (1997) Fluorescence properties of pteridine nucleoside analogs as monomers and incorporated into oligonucleotides. *Anal. Biochem.* 244, 86-95.  
 30 9. Heinlein et al (2003) Photoinduced electron transfer between fluorescent dyes and guanosine residues DNA-hairpins. *J. Phys. Chem.* 107, 7957-7964.  
 10. Knemeyer et al (2000). Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level. *Anal. Chem.* 72, 3717-24.  
 35 11. Lee et al (1994) A fluorogenic assay for DNA cleavage reactions characterized with BamHI restriction endonuclease. *Anal. Biochem.* 220, 377-83.  
 12. Lee et al (2002) ResonSense: simple linear fluorescent probes for quantitative homogeneous rapid polymerase chain reaction. *Analytica Chimica Acta* 457, 61-70.  
 13. Marks et al (2005) Molecular basis of action of HyBeacon fluorogenic probes: A spectroscopic and molecular dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 23, 49-62.  
 40 14. Nazerenko et al (2002) Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* 30, e37.  
 15. Nazerenko et al (2002b) Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Res.* 30, 2089-2195.  
 16. Norlund et al (1989) Structure and dynamics of a fluorescent DNA oligomer containing the EcoRI recognition sequence: fluorescence, molecular dynamics and NMR studies. *Biochemistry* 28, 9095-9103.  
 45 17. Seidel et al (1996) Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. Nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies. *J. Phys. Chem.*, 100, 5541-5553.  
 18. Solinas et al (2001) Duplex Scorpion primers in SNP assays and FRET applications. *Nucleic Acids Res.* 29, e96.  
 50 19. Svanvik et al (2000) Detection of PCR products in real time using light-up probes. *Analytical Biochemistry* 287, 179-182.

20. Thelwell et al (2000) Mode of action and application of Scorpion Primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752-3761.
21. Tyagi y Kramer (1996) Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridisation. *Nature Biotechnology* 14, 303-308.
- 5 22. Whitcombe et al (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* 17, 804-807.
23. Xu et al (1994) Melting and premelting transitions of an oligomer measured by DNA base fluorescence and absorption. *Biochemistry* 33, 9592-9599.
- 10 24. Zucker (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridisation prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 15 <110> LGC Limited
- <120> Oligonucleótidos
- <130> LGCBW/P35723PC
- 20 <140> Not yet known  
<141> Not yet known
- <150> GB 0514889.5  
<151> 20-07-2005
- 25 <160> 143
- <170> PatentIn versión 3.1
- 30 <210> SEC ID Nº 1  
<211> LONGITUD: 23  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*
- 35 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (11)...(11)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU
- 40 <400> SECUENCIA: 1  
GAGAGGAATC FGGTACCTGG ACC
- <210> SEC ID Nº 2  
<211> LONGITUD: 21  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*
- 45 <400> SECUENCIA: 2  
CCTCTAGAAT TAATTTCTGG G
- 50 <210> SEC ID Nº 3  
<211> LONGITUD: 22  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*
- 55 <400> SECUENCIA: 3  
CTGCTCTCTC CTGATTTGGT CC
- 60 <210> SEC ID Nº 4  
<211> LONGITUD: 23  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*
- 65 <400> SECUENCIA: 4  
GGTCCAGGTA CCAGATTCCT CTC

5  
 <210> SEC ID Nº 5  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 5  
 GGTCCAAGTA CCAGATTCC TCTC

10  
 <210> SEC ID Nº 6  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

15  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

20  
 <400> SECUENCIA: 6  
 GAAGTGCFGA AAAATATATT TAAG

25  
 <210> SEC ID Nº 7  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 7  
 CCTATAGAAA ATTCAATTAT AAAG

30  
 <210> SEC ID Nº 8  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

35  
 <400> SECUENCIA: 8  
 CACGAGATTT CTCCCAAGG

40  
 <210> SEC ID Nº 9  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 9  
 CTAAATATA TTTTCAGCA CTTC

45  
 <210> SEC ID Nº 10  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

50  
 <400> SECUENCIA: 10  
 CTAAATATA TTTCTCAGCA CTTC

55  
 <210> SEC ID Nº 11  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

60  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (9)...(9)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

65  
 <400> SECUENCIA: 11  
 CCTGGTGAFG AATCCCTTAC

5  
 <210> SEC ID Nº 12  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 12  
 CCTATAGAAA ATTCAATTAT AAAG

10  
 <210> SEC ID Nº 13  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 13  
 CACGAGATTT CTCCCAAGG

15  
 <210> SEC ID Nº 14  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 14  
 GTAAGGGATT CATCACCAGG

20  
 <210> SEC ID Nº 15  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 15  
 GTAAGGGATC CATCACCAGG

25  
 <210> SEC ID Nº 16  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT  
 <400> SECUENCIA: 16  
 CTTTAAAATA CAFTTTTTAT TATTA

30  
 <210> SEC ID Nº 17  
 <211> LONGITUD: 30  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 17  
 TAATAATAAA AAATGTATTT TAAAGATGGC

35  
 <210> SEC ID Nº 18  
 <211> LONGITUD: 30  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 18  
 TAATAATAAT AAATGTATTT TAAAGATGGC

40  
 <210> SEC ID Nº 19  
 <211> LONGITUD: 30  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

45  
 <210> SEC ID Nº 12  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 12  
 CCTATAGAAA ATTCAATTAT AAAG

50  
 <210> SEC ID Nº 13  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 13  
 CACGAGATTT CTCCCAAGG

55  
 <210> SEC ID Nº 14  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 14  
 GTAAGGGATT CATCACCAGG

60  
 <210> SEC ID Nº 15  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <400> SECUENCIA: 15  
 GTAAGGGATC CATCACCAGG

65  
 <210> SEC ID Nº 16  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT  
 <400> SECUENCIA: 16  
 CTTTAAAATA CAFTTTTTAT TATTA

<400> SECUENCIA: 19  
 TAATAATAAT AAATGTCTTT TAAAGATGGC

5 <210> SEC ID Nº 20  
 <211> LONGITUD: 30  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

10 <400> SECUENCIA: 20  
 TAATAATAAA AAATGTCTTT TAAAGATGGC

15 <210> SEC ID Nº 21  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

20 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (6)...(6)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

25 <400> SECUENCIA: 21  
 CTGTAFTCCT CGCCTGTCC

30 <210> SEC ID Nº 22  
 <211> LONGITUD: 29  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

35 <400> SECUENCIA: 22  
 GGACTACTTC TAATCTGTAA GAGCAGATC

40 <210> SEC ID Nº 23  
 <211> LONGITUD: 31  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

45 <400> SECUENCIA: 23  
 GCCCCATTAT TTAGCCAGGA GACCTAACAT G

50 <210> SEC ID Nº 24  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

55 <400> SECUENCIA: 24  
 GGACAGGCGA GGAATACAG

60 <210> SEC ID Nº 25  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

65 <400> SECUENCIA: 25  
 GGACAGGCAA GGAATACAG

<210> SEC ID Nº 26  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (12)...(12)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

<400> SECUENCIA: 26  
 GTGCACCTGA CFCCTGTGG

5 <210> SEC ID Nº 27  
 <211> LONGITUD: 21  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

10 <400> SECUENCIA: 27  
 AGGGCAGAGC CATCTATTGC T

15 <210> SEC ID Nº 28  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

20 <400> SECUENCIA: 28  
 CATCCACGTT CACCTTGCC

25 <210> SEC ID Nº 29  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

30 <400> SECUENCIA: 29  
 CCACAGGAGT CAGGTGCAC

35 <210> SEC ID Nº 30  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

40 <400> SECUENCIA: 30  
 CCTCAGGAGT CAGGTGCAC

45 <210> SEC ID Nº 31  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

50 <400> SECUENCIA: 31  
 CCTTAGGAGT CAGGTGCAC

55 <210> SEC ID Nº 32  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

60 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

65 <400> SECUENCIA: 32  
 CAAGCCTGCA AAFGTATACC AAG

<210> SEC ID Nº 33  
 <211> LONGITUD: 30  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

<400> SECUENCIA: 33  
 GGGTTCGTTG TAGAGCCATG TCCTATCTTG

65 <210> SEC ID Nº 34  
 <211> LONGITUD: 30

<212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

5 <400> SECUENCIA: 34  
 CGCAGCTGCT GTAATCACCC AGTCGATAAA

<210> SEC ID Nº 35  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 10 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

<400> SECUENCIA: 35  
 CTTGGTATAC ATTTGCAGGC TTG

15 <210> SEC ID Nº 36  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

20 <400> SECUENCIA: 36  
 CTTGGTATAC ATTTACAGGC TTG

<210> SEC ID Nº 37  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Artificial  
 SECUENCIA

25 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (12)...(12)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

30 <400> SECUENCIA: 37  
 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTT

35 <210> SEC ID Nº 38  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<400> SECUENCIA: 38  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA

40 <210> SEC ID Nº 39  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

45 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

50 <400> SECUENCIA: 39  
 GATTATTFCC CAGGAACCC

55 <210> SEC ID Nº 40  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

60 <400> SECUENCIA: 40  
 GGGTTCCTGG GAAATAATC

65 <210> SEC ID Nº 41



<211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

5 <400> SECUENCIA: 41  
GGGTTCCCGG GAAATAATC

<210> SEC ID Nº 42  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

10

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (5)...(5)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

15

<400> SECUENCIA: 42  
 TACCFGGATC CAGGGGGTG

20

<210> SEC ID Nº 43  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

25

<400> SECUENCIA: 43  
 CACCCCTGG ATCCAGGTA

<210> SEC ID Nº 44  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

30

<400> SECUENCIA: 44  
 CACCCCTGA ATCCAGGTA

35

<210> SEC ID Nº 45  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Hepatitis B virus

40

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (11)...(11)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

45

<400> SECUENCIA: 45  
 AAGAACTCCC FGCCTCGCA

50

<210> SEC ID Nº 46  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Hepatitis B virus

55

<400> SECUENCIA: 46  
 TGCGAGGCGA GGGAGTTCTT

<210> SEC ID Nº 47  
 <211> LONGITUD: 21  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Plasmodium junxanuclease*

60

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

65

<400> SECUENCIA: 47  
GAGACGAACA ACFGCGAAAG C

5 <210> SEC ID Nº 48  
<211> LONGITUD: 21  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Plasmodium junxanuclease

10 <400> SECUENCIA: 48  
GCTTTCGCAG TTGTTTGTCT C

<210> SEC ID Nº 49  
<211> LONGITUD: 22  
15 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Herpes simplex virus TIPO 1 (HSV-1)

<220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
20 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

<400> SECUENCIA: 49  
GGACACCGGC GCFACCTCAC CT

25 <210> SEC ID Nº 50  
<211> LONGITUD: 22  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Herpes simplex virus TIPO 1 (HSV-1)

30 <400> SECUENCIA: 50  
AGGTGAAGTA GCGCCGGTGT CC

<210> SEC ID Nº 51  
35 <211> LONGITUD: 16  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
40 <222> LOCALIZACIÓN: (6)...(6)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

<400> SECUENCIA: 51  
45 GGGCGFCCTG GGGGAG

<210> SEC ID Nº 52  
<211> LONGITUD: 16  
<212> TIPO: ADN  
50 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<400> SECUENCIA: 52  
CTCCCCCAGG ACGCCC

55 <210> SEC ID Nº 53  
<211> LONGITUD: 16  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

60 <400> SECUENCIA: 53  
CTCCCCCAAG ACGCCC

<210> SEC ID Nº 54  
<211> LONGITUD: 20  
65 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
 5 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU  
  
 <400> SECUENCIA: 54  
 CATTGAGGAC TGFGTTCAAG  
  
 10 <210> SEC ID Nº 55  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
  
 15 <400> SECUENCIA: 55  
 CTTGAACACA GTCCTCAATG  
  
 <210> SEC ID Nº 56  
 <211> LONGITUD: 20  
 20 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
  
 <400> SECUENCIA: 56  
 CTTGAACACG GTCCTCAATG  
 25  
 <210> SEC ID Nº 57  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 30  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU  
 35  
 <400> SECUENCIA: 57  
 CATTGAGGAC CGFGTTCAAG  
  
 <210> SEC ID Nº 58  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Neisseria gonorrhoeae*  
 40  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (6)...(6), (12)...(12)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU  
 45  
 <400> SECUENCIA: 58  
 50 TCTGCFTCCG CFACGGCTTC  
  
 <210> SEC ID Nº 59  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Neisseria gonorrhoeae*  
 55  
 <400> SECUENCIA: 59  
 GAAGCCGTAG CGGAAGCAGA  
  
 <210> SEC ID Nº 60  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 60  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 65

## ES 2 445 624 T3

<222> LOCALIZACIÓN: (6)...(6), (15)...(15)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

5 <400> SECUENCIA: 60  
CTGTAFTCCT CGCCFGTCC

<210> SEC ID Nº 61  
<211> LONGITUD: 23  
<212> TIPO: ADN  
10 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

<220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7), (13)...(13)  
15 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

<400> SECUENCIA: 61  
CAAGCCFGCA AAFGTATACC AAG

20 <210> SEC ID Nº 62  
<211> LONGITUD: 22  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Influenza

25 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8), (14)...(14)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

30 <400> SECUENCIA: 62  
ATGGGAATGG GGAFCCAAAT AA

<210> SEC ID Nº 63  
<211> LONGITUD: 22  
35 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Influenza

<400> SECUENCIA: 63  
TTATTTGGAT CCCCATTCCC AT

40 <210> SEC ID Nº 64  
<211> LONGITUD: 27  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Streptococcus pneumoniae*

45 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8), (14)...(14)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

50 <400> SECUENCIA: 64  
GGGGTCTFCC ACTFGGAGAA AGCTATC

<210> SEC ID Nº 65  
<211> LONGITUD: 27  
55 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Streptococcus pneumoniae*

<400> SECUENCIA: 65  
60 GATAGCTTTC TCCAAGTGGA AGACCCC

<210> SEC ID Nº 66  
<211> LONGITUD: 26  
<212> TIPO: AND  
65 <213> ORGANISMO: Influenza

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (5)...(5), (11)...(11)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU  
 5  
 <400> SECUENCIA: 66  
 GGGAFCCAAA FAACATGGAC AGAGCT  
 <210> SEC ID Nº 67  
 10 <211> LONGITUD: 26  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Influenza  
 <400> SECUENCIA: 67  
 15 AGCTCTGTCC ATGTTATTTG GATCCC  
 <210> SEC ID Nº 68  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 20 <213> ORGANISMO: Adenovirus C  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8), (14)...(14)  
 25 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU  
 <400> SECUENCIA: 68  
 GACGTGGFCC GTGFGCACCA GCCT  
 30 <210> SEC ID Nº 69  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Adenovirus C  
 35 <400> SECUENCIA: 69  
 AGGCTGGTGC ACACGGACCA CGTC  
 <210> SEC ID Nº 70  
 <211> LONGITUD: 24  
 40 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Adenovirus D  
 <400> SECUENCIA: 70  
 45 AGGCTGGTGC ACTCTGACCA CGTC  
 <210> SEC ID Nº 71  
 <211> LONGITUD: 24  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Adenovirus D  
 50 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8), (14)...(14)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU  
 55 <400> SECUENCIA: 71  
 GACGTGGFCA GAGFGCACCA GCCT  
 <210> SEC ID Nº 72  
 60 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8), (14)...(14)  
 65

<223> OTRA INFORMACIÓN: Glen amino-dC marcado con FAM post-síntesis  
 <400> SECUENCIA: 72  
 CTGTATTFCT CGCFTGTCC

5 <210> SEC ID Nº 73  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

10 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Glen amino-dA marcado con FAM post-síntesis

15 <400> SECUENCIA: 73  
 GGACAGGCAA GGFATACAG

<210> SEC ID Nº 74  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Neisseria gonorrhoeae*

20 <400> SECUENCIA: 74  
 ACTTTGGCGA TATTGCTCGG

25 <210> SEC ID Nº 75  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Neisseria gonorrhoeae*

30 <400> SECUENCIA: 75  
 TACCGAGAAC GAACGCGACA

<210> SEC ID Nº 76  
 <211> LONGITUD: 29  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Adenovirus

35 <400> SECUENCIA: 76  
 GACATGACTT TCGAGGTCGA TCCCATGGA

40 <210> SEC ID Nº 77  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Adenovirus

45 <400> SECUENCIA: 77  
 GCCGAGAAGG GCGTGCGCAG GTA

50 <210> SEC ID Nº 78  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Influenza

55 <400> SECUENCIA: 78  
 GGACTGCAGC GTAGACGCTT

<210> SEC ID Nº 79  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Influenza

60 <400> SECUENCIA: 79  
 ATTTCTTTGG CCCCATGGAA TGT

65 <210> SEC ID Nº 80

<211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Streptococcus pneumoniae*

5  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

10  
 <400> SECUENCIA: 80  
 GGGGTCTFCC ACTTGAGAA AG

<210> SEC ID Nº 81  
 <211> LONGITUD: 26

15  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Streptococcus pneumoniae*

<400> SECUENCIA: 81  
 CTTGCGGTTG ATCGTGCTCC GATGAC

20  
 <210> SEC ID Nº 82  
 <211> LONGITUD: 30  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Streptococcus pneumoniae*

25  
 <400> SECUENCIA: 82  
 CATTATTGAC CTGACCATAA TCTTGATGCC

<210> SEC ID Nº 83  
 <211> LONGITUD: 18  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Ovis aries*

30  
 <212> TIPO: ADN

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: C6 FAM dU

35  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: C6 FAM dU

<400> SECUENCIA: 83  
 GGGAAGFGCC ATGAGCAG

40  
 <210> SEC ID Nº 84  
 <211> LONGITUD: 18  
 <212> TIPO: ADN

45  
 <213> ORGANISMO: *Ovis aries*

<400> SECUENCIA: 84  
 CTGCTCATGG CACTTCCC

50  
 <210> SEC ID Nº 85  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Ovis aries*

55  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: C6 FAM dU

60  
 <400> SECUENCIA: 85  
 CAGTGGAFCG GTATAGTAAC

<210> SEC ID Nº 86  
 <211> LONGITUD: 20

65  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Ovis aries*

<400> SECUENCIA: 86  
GTTACTATAC CGATCCACTG

5 <210> SEC ID Nº 87  
<211> LONGITUD: 19  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

10 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (5)...(5)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

15 <400> SECUENCIA: 87  
GTATFCCTCG CCTGTCCAG

<210> SEC ID Nº 88  
<211> LONGITUD: 22  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

20 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU

25 <400> SECUENCIA: 88  
CTTCAAFTGT TTGAGGTTCA AG

30 <210> SEC ID Nº 89  
<211> LONGITUD: 22  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

35 <400> SECUENCIA: 89  
CTTGAACCTC AAACAATTGA AG

40 <210> SEC ID Nº 90  
<211> LONGITUD: 19  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

45 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (5)...(5), (13)...(13)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Glen amino-dA marcado con FAM post-síntesis

50 <400> SECUENCIA: 90  
GGACFGGCAA GGFATACAG

<210> SEC ID Nº 91  
<211> LONGITUD: 19  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

55 <400> SECUENCIA: 91  
CTGTATACCT TGCCTGTCC

60 <210> SEC ID Nº 92  
<211> LONGITUD: 25  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

65 <400> SECUENCIA: 92  
GACTACTTCT AATCTGTAAG AGCAG



5 <210> SEC ID Nº 93  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<400> SECUENCIA: 93  
 CCATTATTTA GCCAGGAGAC

10 <210> SEC ID Nº 94  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

15 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc\_CARACTERÍSTICA  
 <222> LOCALIZACIÓN: (20)...(20)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Colorante 5' de FAM

20 <400> SECUENCIA: 94  
 CTGTATTCCT CGCCTGTCCF

25 <210> SEC ID Nº 95  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

30 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: misc\_CARACTERÍSTICA  
 <222> LOCALIZACIÓN: (1)...(1)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Colorante 3' de FAM

35 <400> SECUENCIA: 95  
 FCTGTATTCC TCGCCTGTCC

40 <210> SEC ID Nº 96  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

45 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7), (13)...(13), (15)...(15)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

<400> SECUENCIA: 96  
 CAAGCCFGCA AAFGFATACC AAG

50 <210> SEC ID Nº 97  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

55 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7), (13)...(13), (15)...(15), (17)...(17)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

60 <400> SECUENCIA: 97  
 CAAGCCFGCA AAFGFAFACC AAG

65 <210> SEC ID Nº 98  
 <211> LONGITUD: 142  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<400> SECUENCIA: 98

**AATTCGCGAG CTGCTGTAAT CACCCAGTCG ATAAATGTGT AAGCATACTT TGATGCATT  
GGTTTATTTC TTGGTATACA TTTACAGGCT TGATTATTCT ATTTGATCTA CCAAGATAGG  
ACATGGCTCT ACAACGAACC CG**

5 <210> SEC ID Nº 99  
<211> LONGITUD: 25  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Staphylococcus aureus (MRSA)*

10 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (6)...(6), (15)...(15)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

15 <400> SECUENCIA: 99  
CGTAGFTACT GCGTFGTAAG ACGTC

<210> SEC ID Nº 100  
<211> LONGITUD: 25  
<212> TIPO: ADN  
20 <213> ORGANISMO: *Staphylococcus aureus (MRSA)*

<400> SECUENCIA: 100  
GACGTCTTAC AACGCAGTAA CTACG

25 <210> SEC ID Nº 101  
<211> LONGITUD: 19  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

30 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (15)...(15)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

35 <400> SECUENCIA: 101  
CTGTATTCCT CGCCFGTCC

<210> SEC ID Nº 102  
<211> LONGITUD: 23  
40 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

45 <220> CARACTERÍSTICA:  
<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
<222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7), (13)...(13), (17)...(17)  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

50 <400> SECUENCIA: 102  
CAAGCCFGCA AAFGTAFACC AAG

<210> SEC ID Nº 103  
<211> LONGITUD: 28  
<212> TIPO: ADN.  
55 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

<400> SECUENCIA: 103  
CTTGGTATAC ATTTGCAGGC TTGATTAC

60 <210> SEC ID Nº 104  
<211> LONGITUD: 28  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (5)...(5), (12)...(12), (18)...(18)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

5 <400> SECUENCIA: 104  
 GTAAFCAAGC CFGCAAAGT ATACCAAG

<210> SEC ID Nº 105  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

10

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

15

<400> SECUENCIA: 105  
 CAAGCCFGCA AATGTATACC AAG

20

<210> SEC ID Nº 106  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

25

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (17)...(17)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

30

<400> SECUENCIA: 106  
 CAAGCCTGCA AATGTAFACC AAG

<210> SEC ID Nº 107  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

35

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (13)...(13), (17)...(17)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

40

<400> SECUENCIA: 107  
 CAAGCCTGCA AAFGTAFACC AAG

45

<210> SEC ID Nº 108  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*

50

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7), (17)...(17)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

55

<400> SECUENCIA: 108  
 CAAGCCFGCA AATGTAFACC AAG

60

<210> SEC ID Nº 109  
 <211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

65

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base

<222> LOCALIZACIÓN: (4)...(4), (16)...(16)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

5 <400> SECUENCIA: 109  
 GTCFGCGGGA GCCGAFTTCA TC

<210> SEC ID Nº 110  
 <211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 10 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<400> SECUENCIA: 110  
 GATGAAATCG GCTCCCGCAG AC

15 <210> SEC ID Nº 111  
 <211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

20 <400> SECUENCIA: 111  
 GATGAAATCG ACTCCCGCAG AC

<210> SEC ID Nº 112  
 <211> LONGITUD: 23  
 25 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 30 <222> LOCALIZACIÓN: (7)...(7), (16)...(16)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

<400> SECUENCIA: 112  
 GACCAGFGAA GCAAGFGTCT TTG

35 <210> SEC ID Nº 113  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

40 <400> SECUENCIA: 113  
 CAAAGACACT TGCTTCACTG GTC

<210> SEC ID Nº 114  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 45 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<400> SECUENCIA: 114  
 CAAAGACACT TTCTTCACTG GTC

50 <210> SEC ID Nº 115  
 <211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 55 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (5)...(5), (15)...(15)  
 60 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

<400> SECUENCIA: 115  
 GCATFGAGGC TCGCFGAGAG TC

65 <210> SEC ID Nº 116  
 <211> LONGITUD: 22

<212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

5 <400> SECUENCIA: 116  
 GACTCTCAGC GAGCCTCAAT GC

10 <210> SEC ID N° 117  
 <211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

15 <400> SECUENCIA: 117  
 GACTCTCAGC AAGCCTCAAT GC

20 <210> SEC ID N° 118  
 <211> LONGITUD: 22  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

25 <400> SECUENCIA: 118  
 CTGGGCTC CTGGAACCAA TC

30 <210> SEC ID N° 119  
 <211> LONGITUD: 21  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

35 <400> SECUENCIA: 119  
 GCTGCCCATG AATAGCACTG G

40 <210> SEC ID N° 120  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

45 <400> SECUENCIA: 120  
 CCCAAGGAGG AGCTGCTGAA

50 <210> SEC ID N° 121  
 <211> LONGITUD: 20  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

55 <400> SECUENCIA: 121  
 CCATTCCGGT TTGGTTCTCC

60 <210> SEC ID N° 122  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

65 <400> SECUENCIA: 122  
 CTGACCTGAA GCACTTGAAG GAG

70 <210> SEC ID N° 123  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

75 <400> SECUENCIA: 123  
 GCGGAAGAAT GTGTCAGCCT CAAAG

80 <210> SEC ID N° 124  
 <211> LONGITUD: 23  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (11)...(11)  
 5 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia C6 FAM dU  
  
 <400> SECUENCIA: 124  
 GAGAGGAATC FGGTACTTGG ACC  
  
 10 <210> SEC ID Nº 125  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
  
 15 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Glen amino-dC marcado con FAM post-síntesis  
  
 20 <400> SECUENCIA: 125  
 CTGTATTFCT CGCCTGTCC  
  
 <210> SEC ID Nº 126  
 <211> LONGITUD: 28  
 25 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Chlamydia trachomatis*  
  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 30 <222> LOCALIZACIÓN: (5)...(5), (12)...(12), (18)...(18), (22)...(22)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT  
  
 <400> SECUENCIA: 126  
 GTAAFCAAGC CFGCAAAGT AFACCAAG  
 35 <210> SEC ID Nº 127  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
  
 40 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (6)...(6), (10)...(10), (15)...(15)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT  
 45 <400> SECUENCIA: 127  
 CTGTAFTCCF CGCCFGTCC  
  
 <210> SEC ID Nº 128  
 <211> LONGITUD: 19  
 50 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*  
  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 55 <222> LOCALIZACIÓN: (10)...(10)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT  
  
 <400> SECUENCIA: 128  
 60 CTGTATTCCF CGCCTGTCC  
  
 <210> SEC ID Nº 129  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 65 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

5  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (12)...(12), (13)...(13)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

<400> SECUENCIA: 129  
 GGGGGGTTTT TFFTTTTTTTG GGGGG

10  
 <210> SEC ID Nº 130  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

15  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (12)...(12), (14)...(14)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

20  
 <400> SECUENCIA: 130  
 GGGGGGTTTT TFFTTTTTTTG GGGGG

25  
 <210> SEC ID Nº 131  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

30  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (11)...(11), (14)...(14)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

<400> SECUENCIA: 131  
 GGGGGGTTTT FTTFTTTTTTG GGGGG

35  
 <210> SEC ID Nº 132  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

40  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (11)...(11), (15)...(15)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

45  
 <400> SECUENCIA: 132  
 GGGGGGTTTT. FTTFTTTTTTG GGGGG

50  
 <210> SEC ID Nº 133  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

55  
 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (10)...(10), (15)...(15)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

60  
 <400> SECUENCIA: 133  
 GGGGGGTTTTF TTTFTTTTTTG GGGGG

65  
 <210> SEC ID Nº 134  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (10)...(10), (16)...(16)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

5 <400> SECUENCIA: 134  
GGGGGGTTTF TTTTFTTTG GGGGG

<210> SEC ID Nº 135  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

10

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (9)...(9), (16)...(16)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

15

<400> SECUENCIA: 135  
 GGGGGGTTFT TTTTFTTTG GGGGG

20

<210> SEC ID Nº 136  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

25

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (9)...(9), (17)...(17)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

30

<400> SECUENCIA: 136  
 GGGGGGTTFT TTTTFTTTG GGGGG

<210> SEC ID Nº 137  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

35

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8), (17)...(17)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

40

<400> SECUENCIA: 137  
 GGGGGGTFTT TTTTFTTTG GGGGG

45

<210> SEC ID Nº 138  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

50

<220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (8)...(8), (18)...(18)  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluorescencia Glen Fluoresceína dT

55

<400> SECUENCIA: 138  
 GGGGGGTFTT TTTTFTTTG GGGGG

60

<210> SEC ID Nº 139  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

65

<400> SECUENCIA: 139  
 CCCCCCTTTT TTTTFTTTT CCCCC



5 <210> SEC ID Nº 140  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<400> SECUENCIA: 140  
 CTGTATTCCT CGCCTGTCC

10 <210> SEC ID Nº 141  
 <211> LONGITUD: 25  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

15 <400> SECUENCIA: 141  
 CCTGGACAGG CGAGGAATAC AGGTA

20 <210> SEC ID Nº 142  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

25 <400> SECUENCIA: 142  
 GGACAFGCAA GGTATACAG

30 <210> SEC ID Nº 143  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<400> SECUENCIA: 143  
 GGACAFGCAA GFTATACAG

35 <210> SEC ID Nº 140  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

40 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (6) (6), (15) (15)  
 <223 OTRA INFORMACIÓN:Nucleótido marcado con fluoróforo MeNPOCOH dT + TAMRA

45 <400> SECUENCIA 140  
 CTGTAXTCCTCGCCXGTCC

50 <210> SEC ID Nº 141  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

55 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base  
 <222> LOCALIZACIÓN: (6) (6), (15) (15)  
 <223 OTRA INFORMACIÓN:Nucleótido marcado con fluoróforo MeNPOCOH dT + ROX

<400> SECUENCIA 141  
 CTGTAXTCCT CGCCXGTCC

60 <210> SEC ID Nº 142  
 <211> LONGITUD: 19  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

65 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base

## ES 2 445 624 T3

<222> LOCALIZACIÓN: (6) (6), (15) (15)

<223 OTRA INFORMACIÓN: Nucleótido marcado con fluoróforo MeNPOCOH dT + Cy5

<400> SECUENCIA 142

5 CTGTAXTCCT CGCCXGTCC

<210> SEC ID Nº 143

<211> LONGITUD: 19

<212> TIPO: ADN

10 <213> ORGANISMO: *Homo sapiens*

<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: modified\_base

<222> LOCALIZACIÓN: (6) (6), (15) (15)

15 <223 OTRA INFORMACIÓN: Fluoresceína dT (F) , MeNPOCOHdT + Cy5 (X)

<400> SECUENCIA 143

20 CTGTAFTCCT CGCCXGTCC

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido monocatenario, que no tiene una secuencia que contiene partes hechas de cuatro o más restos nucleotídicos consecutivos que son el complemento inverso de cada uno de los otros que permite el apareamiento intramolecular de bases, y que está formado de restos nucleotídicos donde las bases de dos o más restos nucleotídicos internos están marcadas con un fluoróforo sin un inactivador asociado, donde al menos dos de los restos nucleotídicos marcados con un fluoróforo están separados por al menos dos restos nucleotídicos no marcados, donde el resto nucleotídico 3' no contiene un hidroxilo 3' y donde cada fluoróforo es el mismo fluoróforo.
2. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, donde hasta aproximadamente un tercio de los restos internos están marcados con un fluoróforo.
3. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde todos los restos nucleotídicos marcados con un fluoróforo están separados por al menos dos restos nucleotídicos no marcados.
4. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y que contiene al menos un resto G, donde al menos uno de los restos nucleotídicos marcados con fluoróforo está posicionado adyacente a al menos uno de los restos G.
5. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el resto nucleotídico 3' contiene un fosfato 3' o es un resto 3' desoxi.
6. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que contiene de 10 a 50 restos nucleotídicos.
7. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 6 que contiene de 15 a 30 restos nucleotídicos.
8. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 7 que contiene de 2 a 10 restos nucleotídicos internos marcados con fluoróforo.
9. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 8 que contiene de 2 a 5 restos internos marcados con fluoróforo.
10. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fluoróforo se selecciona entre el grupo que consiste en colorantes basados en fluoresceína tales como 6-carboxifluoresceína (FAM), tetraclorofluoresceína (TET), hexaclorofluoresceína (HEX), colorantes basados en rodamina tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA); un colorante de la familia Cy tal como Cy3 o Cy5; otros fluoróforos tales como NED o JOE, y colorantes Alexa, colorantes Atto, colorantes Dyomic, colorantes Dyomic megastoke y colorantes Thilyte.
11. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el fluoróforo no se intercala en ADN estándar bicatenario.
12. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tiene una secuencia complementaria a una secuencia polinucleotídica diana.
13. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, donde la secuencia polinucleotídica diana se selecciona entre el grupo que consiste en el genoma humano incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, el genoma de ratón incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, y el genoma de cualquier agente infeccioso incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo; o donde el oligonucleótido tiene una secuencia complementaria al gen PrP de oveja.
14. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 13 que tiene una secuencia complementaria a uno cualquiera de los siguientes genes humanos o un alelo de los mismos:
- N-acetiltransferasa 2  
Factor V Leiden  
Factor II  
MTHFR  
Anemia falciforme
15. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 13 que tiene una secuencia complementaria al genoma o a cualquier gen en el mismo o alelo del mismo de los siguientes agentes infecciosos:
- Chlamydia trachomatis*  
Adenovirus

Influenza A  
***Streptococcus pneumoniae***

- 5 16 Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que tiene una secuencia completamente complementaria a un alelo de un gen.
17. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 % con el complemento de la secuencia polinucleotídica diana.
- 10 18. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 17 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con el complemento de la secuencia polinucleotídica diana.
- 15 19. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 16, donde la secuencia complementaria a la diferencia de la secuencia nucleotídica del alelo dado en comparación con otro alelo del gen está localizada hacia el centro del oligonucleótido.
20. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, inmovilizado sobre o dentro de un soporte.
- 20 21. Una serie de oligonucleótidos inmovilizados en localizaciones espaciadas sobre o dentro de un soporte, donde al menos uno de los oligonucleótidos es un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
- 25 22. Una serie de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 21, donde cada oligonucleótido es un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
- 30 23. Un método para investigar una secuencia polinucleotídica diana en una muestra que contiene secuencias polinucleotídicas, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica diana, y determinar si sucede hibridación.
24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, donde la detección de un aumento de la fluorescencia se usa para determinar si ha sucedido hibridación entre el oligonucleótido y la secuencia polinucleotídica diana.
- 35 25. Un método de acuerdo con la reivindicación 23 o la reivindicación 24, donde el método se realiza a una temperatura predeterminada próxima al, o en un intervalo de temperaturas que abarca el punto de fusión del híbrido o de los híbridos formados entre la secuencia polinucleotídica diana y dicho oligonucleótido.
- 40 26. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, donde el oligonucleótido es completamente complementario a la secuencia polinucleotídica diana.
27. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, donde el oligonucleótido no es completamente complementario a la secuencia polinucleotídica diana.
- 45 28. Un método de acuerdo con la reivindicación 27, donde el oligonucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 % con el complemento de la secuencia polinucleotídica diana.
- 50 29. Un método de acuerdo con la reivindicación 28, donde el oligonucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con el complemento de la secuencia polinucleotídica diana.
30. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, donde la secuencia polinucleotídica diana investigada son uno o más alelos de un gen.
- 55 31. Un método de acuerdo con la reivindicación 30, donde el oligonucleótido es capaz de hibridar con más de un alelo del gen.
32. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29, donde el método se usa para detectar, identificar o cuantificar la presencia o la cantidad de la secuencia polinucleotídica diana en la muestra.
- 60 33. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 30, donde la muestra contiene secuencias polinucleotídicas producidas por amplificación.
- 65 34. Un método de acuerdo con la reivindicación 33, donde las secuencias polinucleotídicas se producen mediante una cualquiera o más de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por círculo rodante (RCA) o amplificación basada en secuencias de ácido nucleico

(NASBA).

- 5 35. Un método de acuerdo con la reivindicación 33 ó 34, donde la amplificación de las secuencias polinucleotídicas en la muestra se realiza en presencia del oligonucleótido que es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica diana.
36. Un método de acuerdo con la reivindicación 35, donde la observación de la fluorescencia se hace durante la amplificación de las secuencias polinucleotídicas en la muestra.
- 10 37. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, donde las secuencias polinucleotídicas de la muestra se producen por amplificación de una fuente biológica sin extracción previa del ácido nucleico.
- 15 38. Un método de acuerdo con la reivindicación 34, donde la PCR es una amplificación asimétrica.
39. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 38, donde el oligonucleótido que es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica diana, la muestra que puede contener la secuencia polinucleotídica diana o ambos están inmovilizados sobre o dentro de un soporte.
- 20 40. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 39, donde la secuencia polinucleotídica diana se selecciona entre el grupo que consiste en el genoma humano incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, el genoma de ratón o cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, y el genoma de cualquier agente infeccioso incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo.
- 25 41. Un proceso para preparar un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, comprendiendo el proceso seleccionar una secuencia polinucleotídica diana y sintetizar un oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria al polinucleótido diana y que tiene las propiedades expuestas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.
- 30 42. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 41, donde la secuencia polinucleotídica diana se selecciona entre el grupo que consiste en el genoma humano incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, el genoma de ratón incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo, y el genoma de cualquier agente infeccioso incluyendo cualquier gen en el mismo o alelo del mismo.
- 35 43. Un método para investigar una secuencia polinucleotídica diana en una muestra que contiene secuencias polinucleotídicas producidas por amplificación, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un oligonucleótido que es capaz de hibridar con la secuencia polinucleotídica diana y determinar si sucede hibridación, donde el oligonucleótido es un oligonucleótido monocatenario que no tiene una secuencia que contiene partes hechas de cuatro o más restos nucleotídicos consecutivos que son el complemento inverso de cada uno de los otros
- 40 que permiten el apareamiento intramolecular de bases y que está formado de restos nucleotídicos, donde las bases de dos o más restos nucleotídicos internos están marcadas con un fluoróforo sin un inactivador asociado, donde al menos dos de los restos nucleotídicos marcados con un fluoróforo están separados por al menos dos restos nucleotídicos no marcados, y donde cada fluoróforo es el mismo fluoróforo.

FIGURA 1

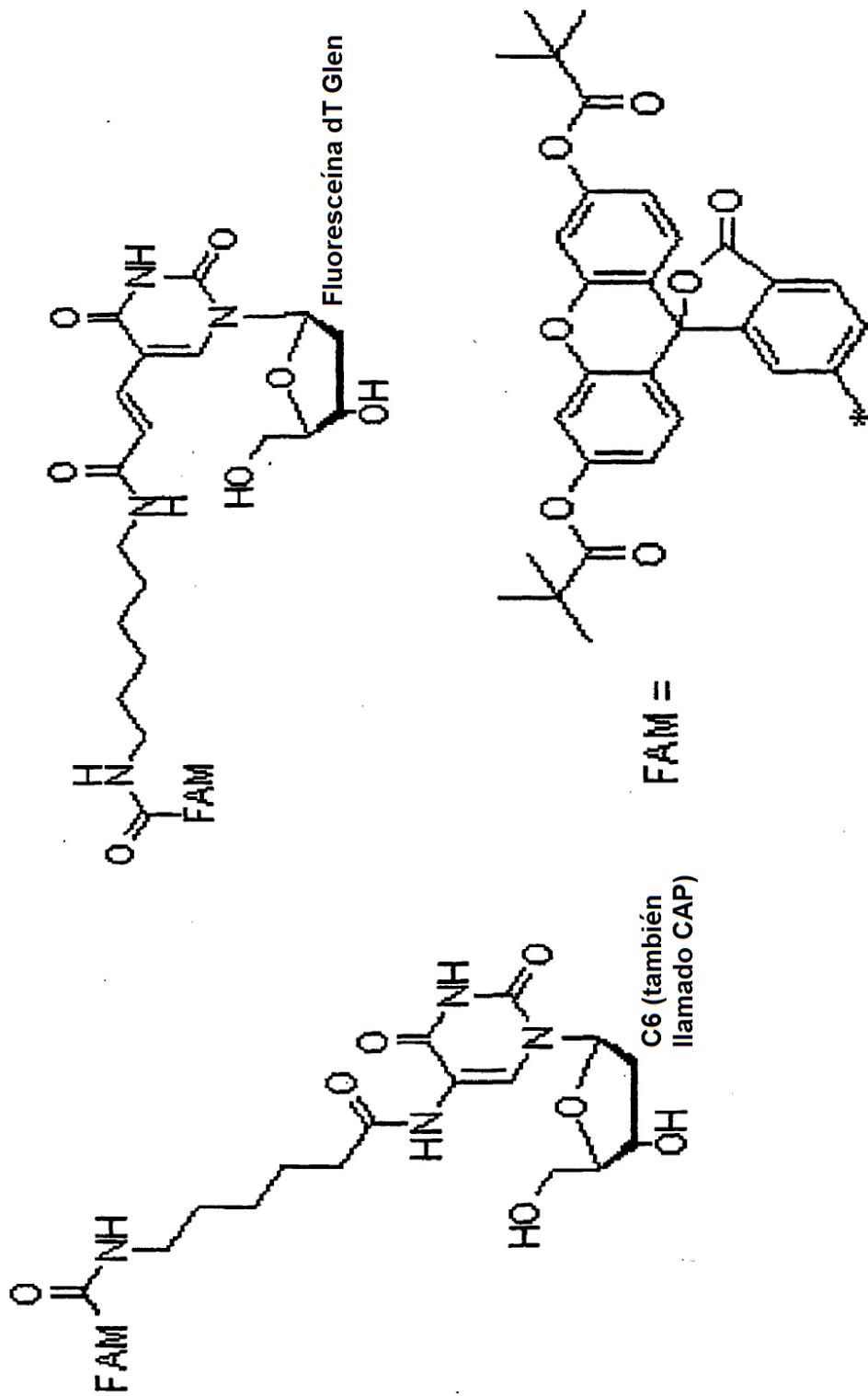


FIGURA 2

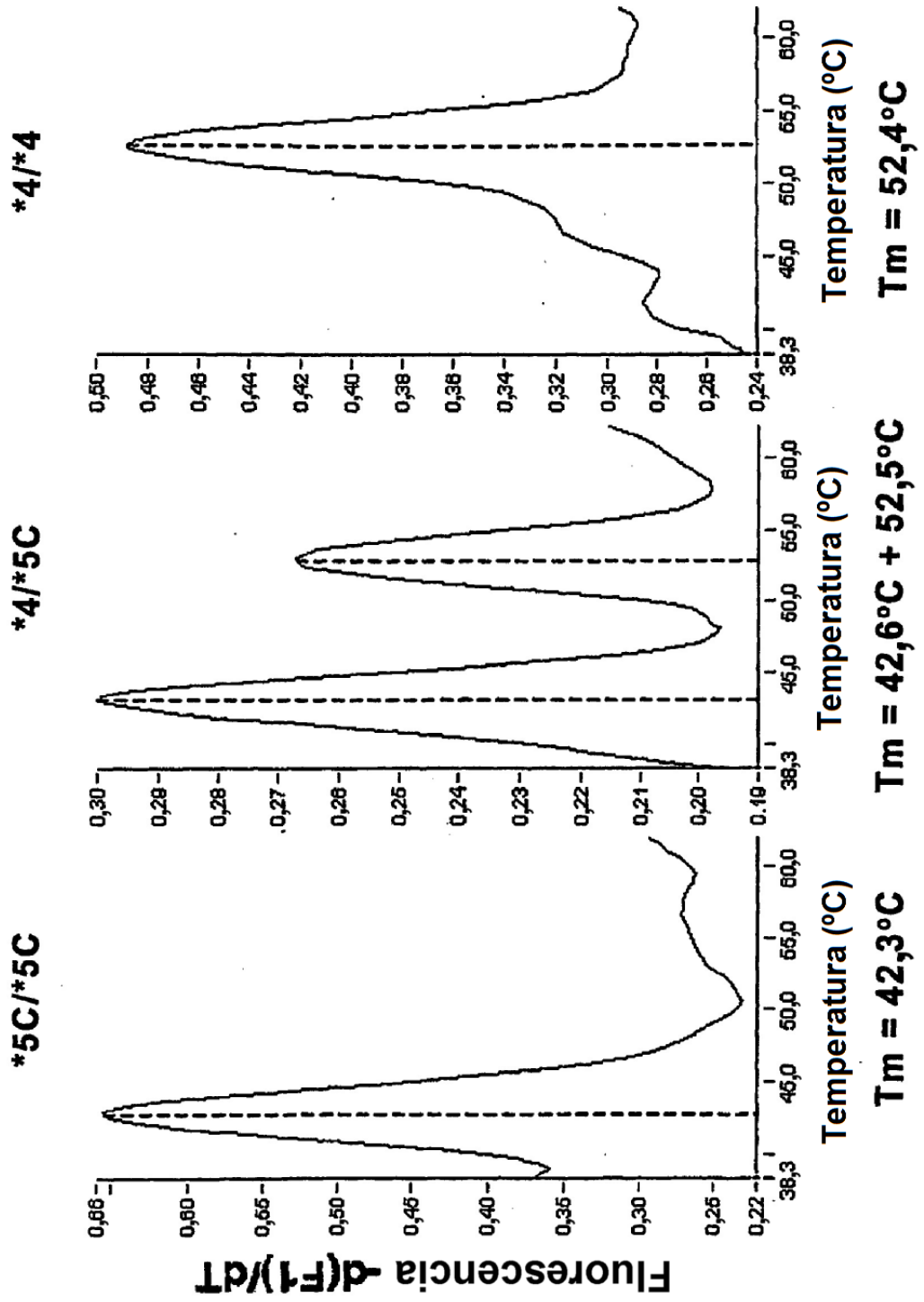


FIGURA 3

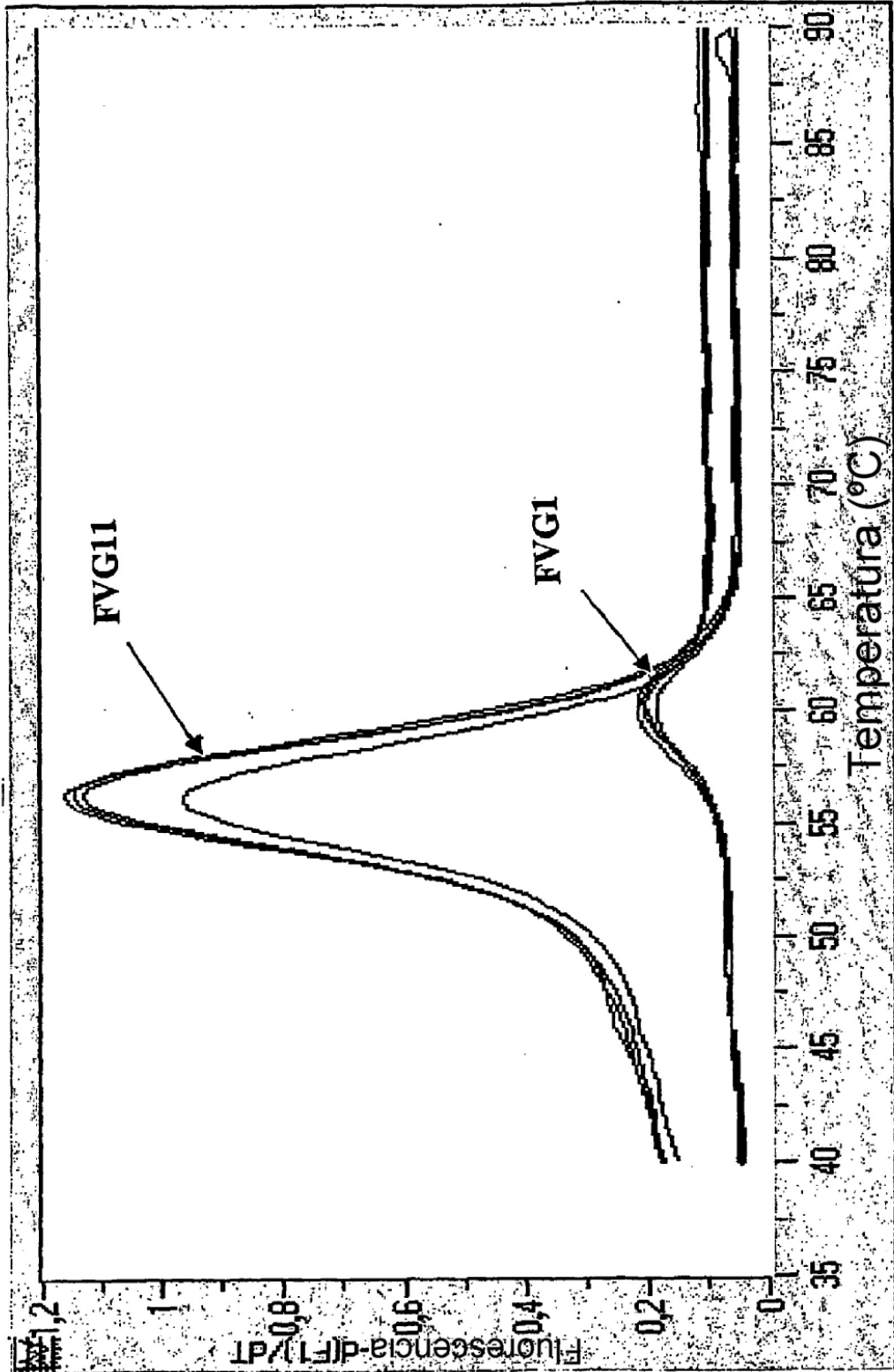
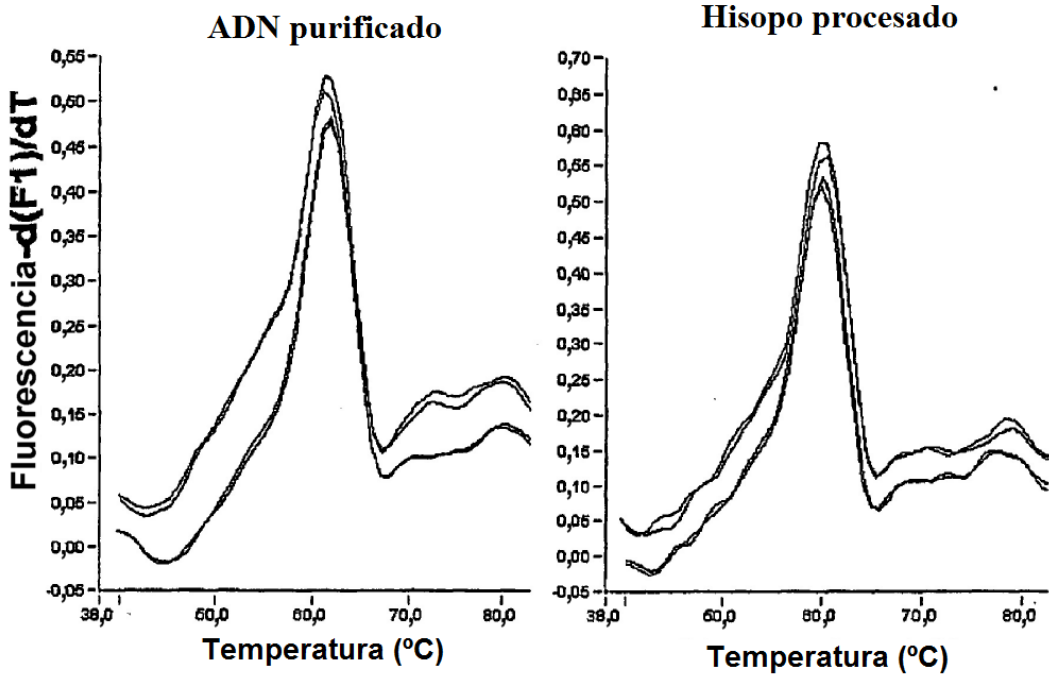




FIGURA 4

A



B

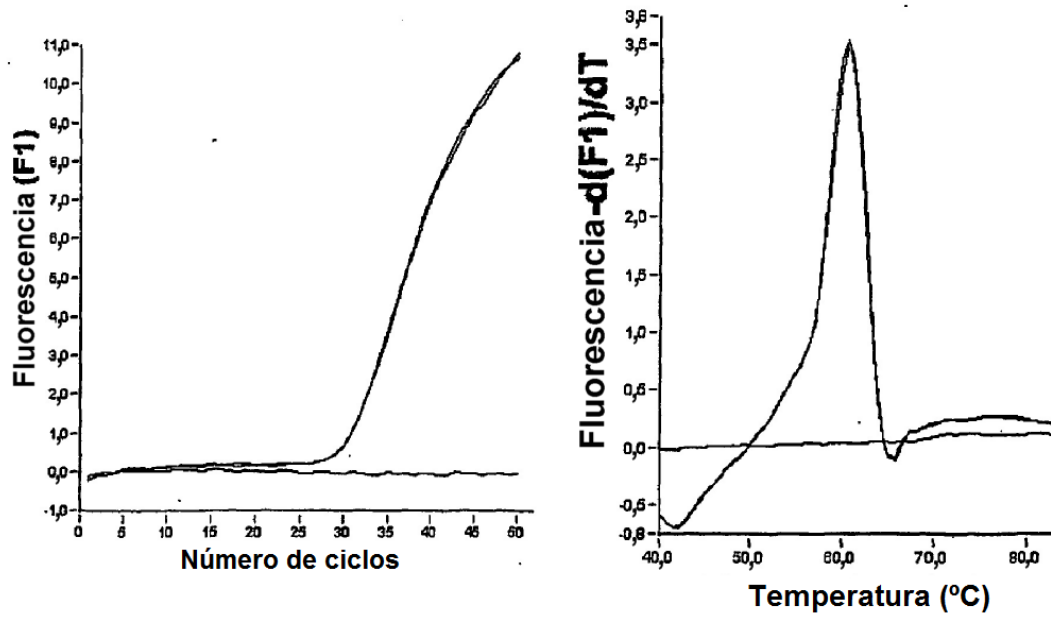


FIGURA 5

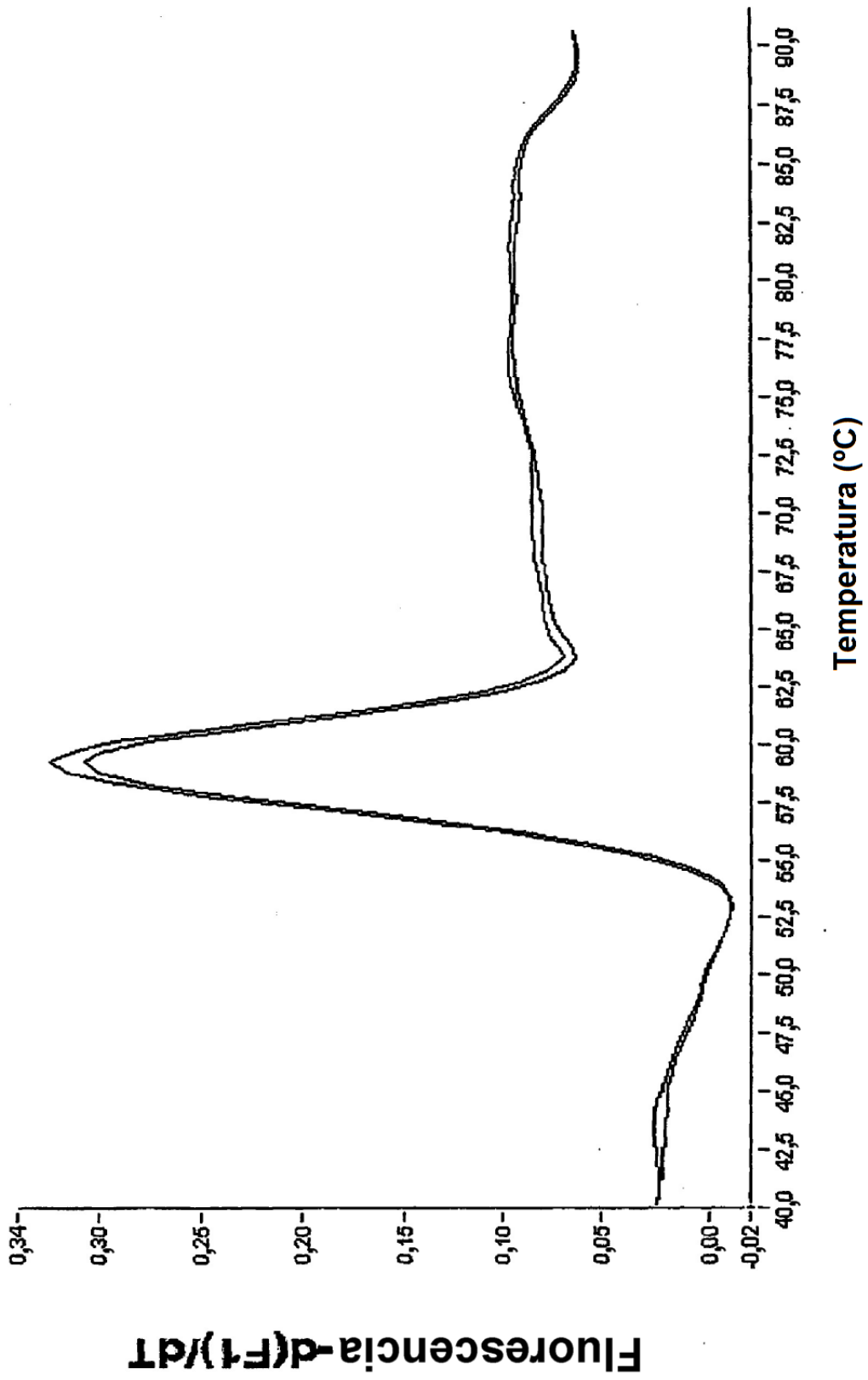
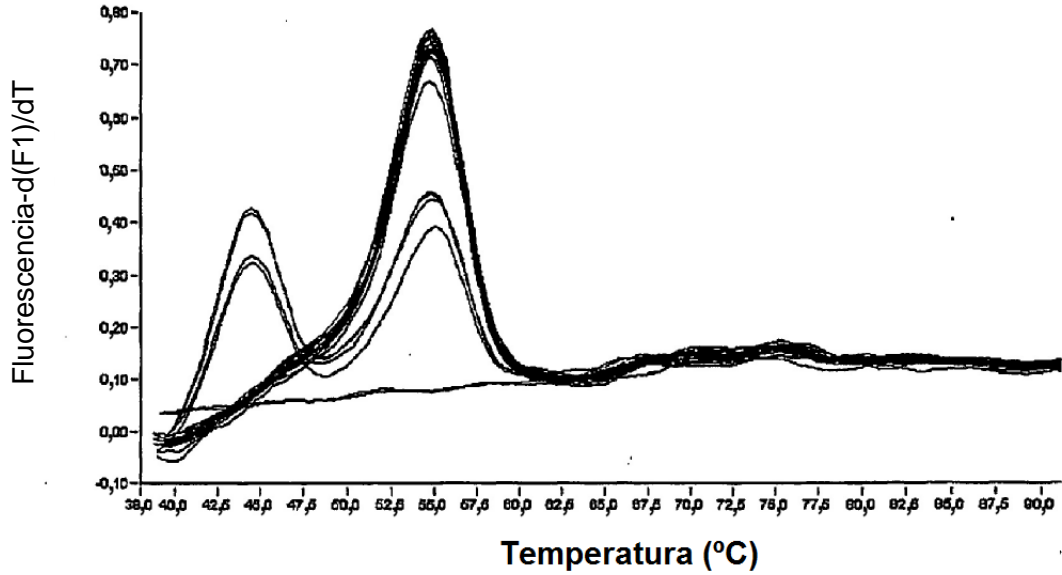


FIGURA 6

A



B

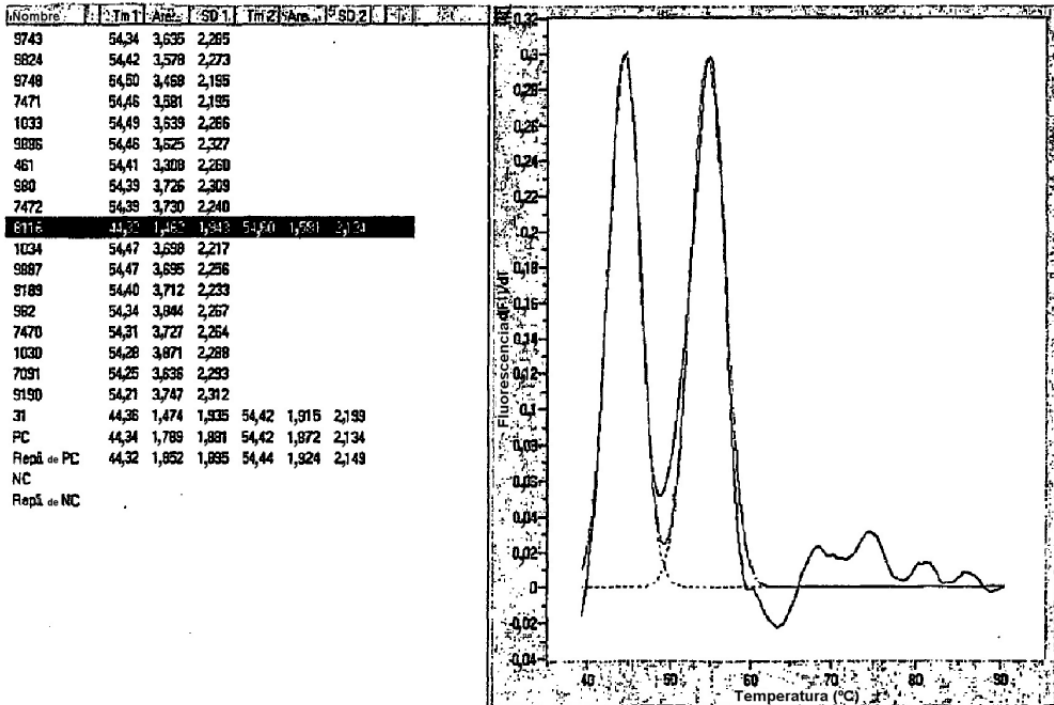


FIGURA 7

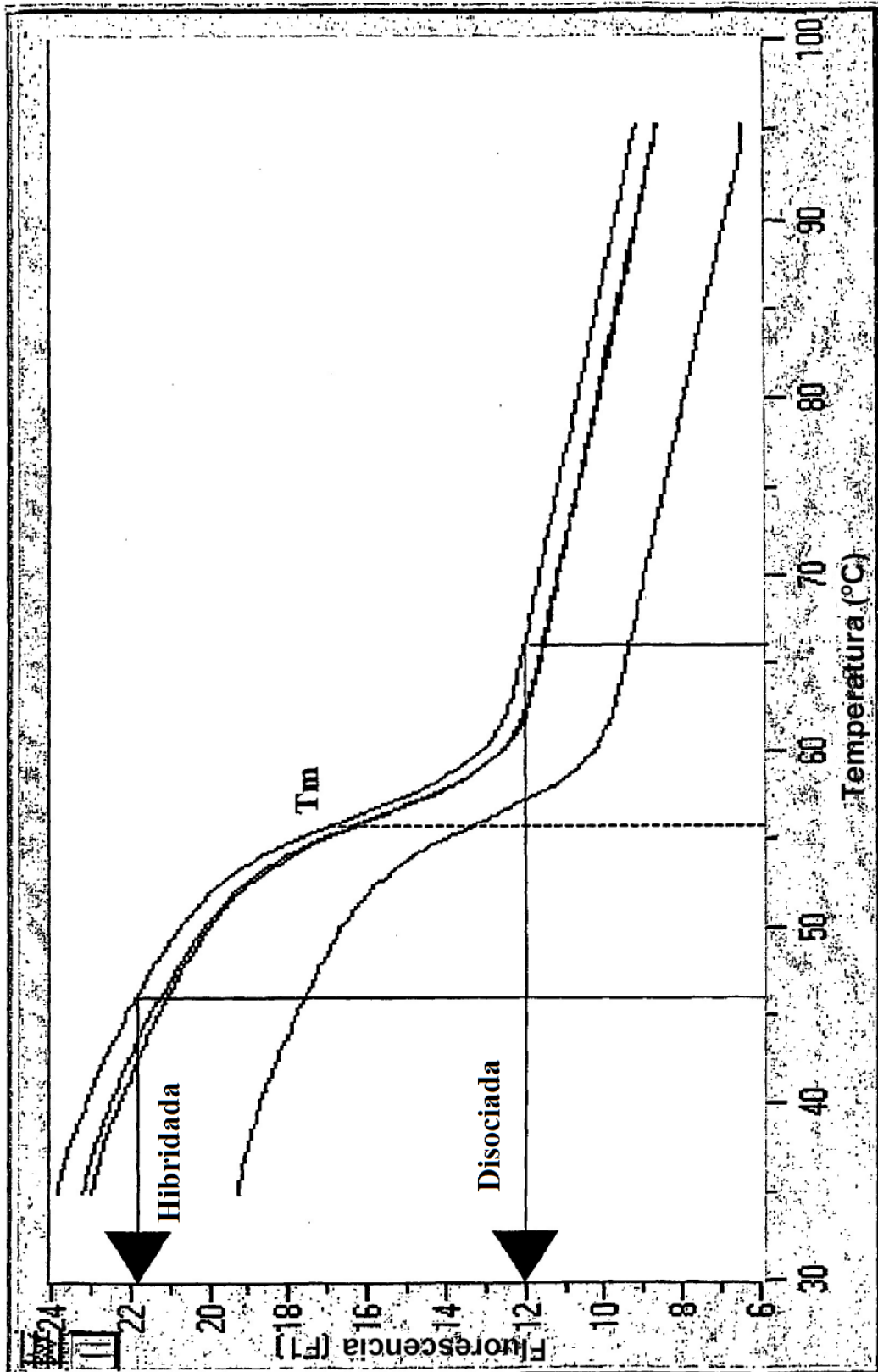
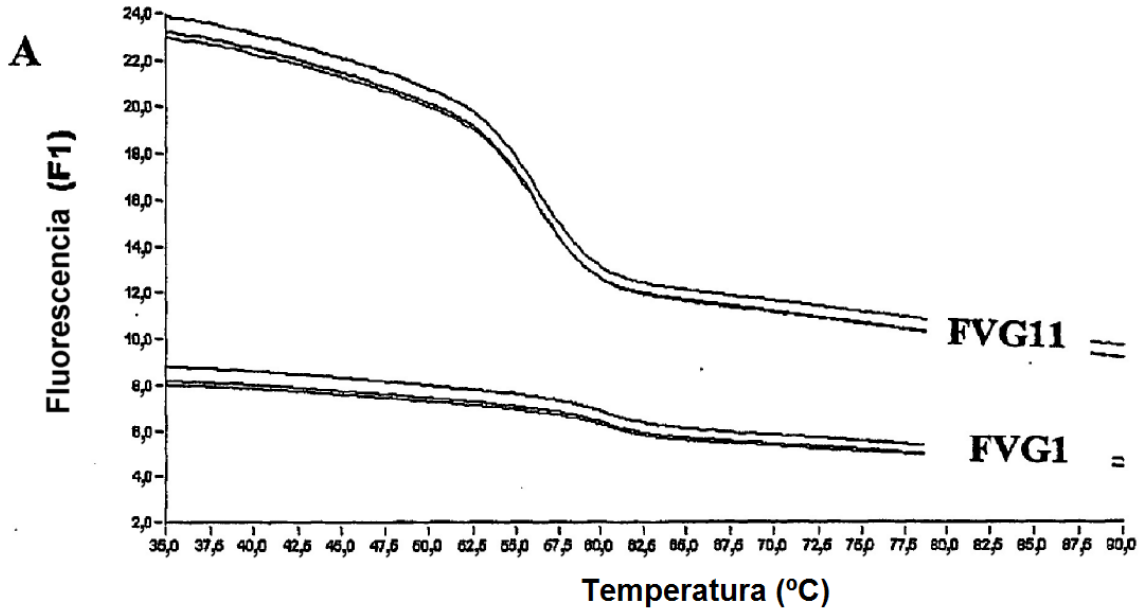


FIGURA 8



**B**

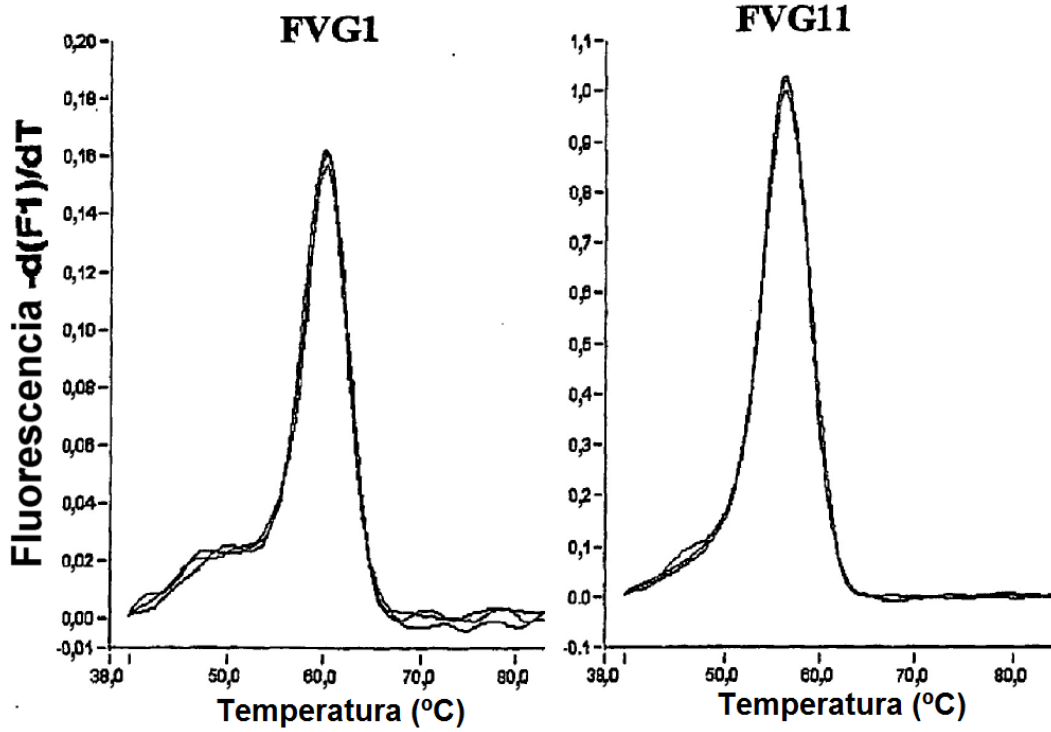


FIGURA 9

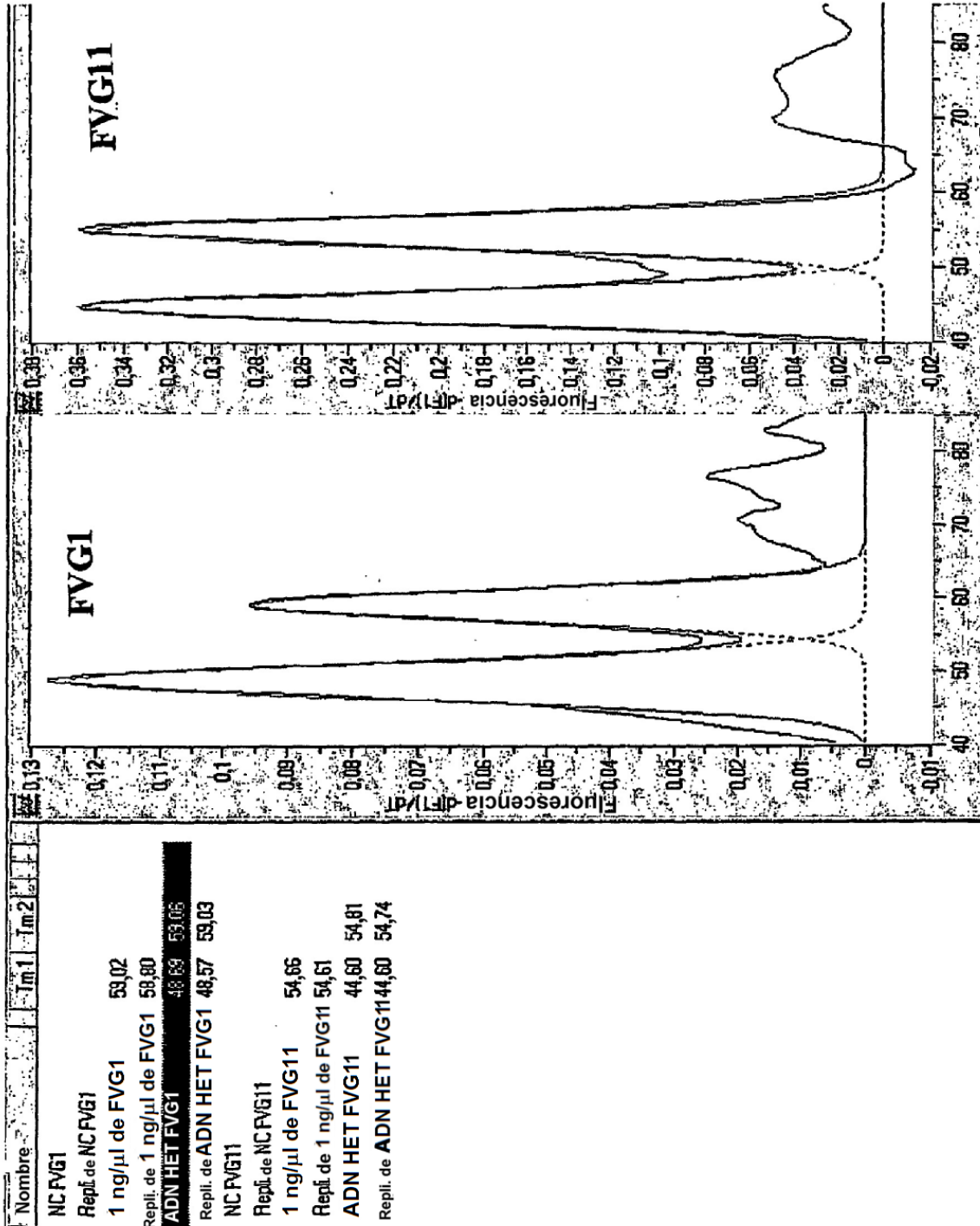


FIGURA 10

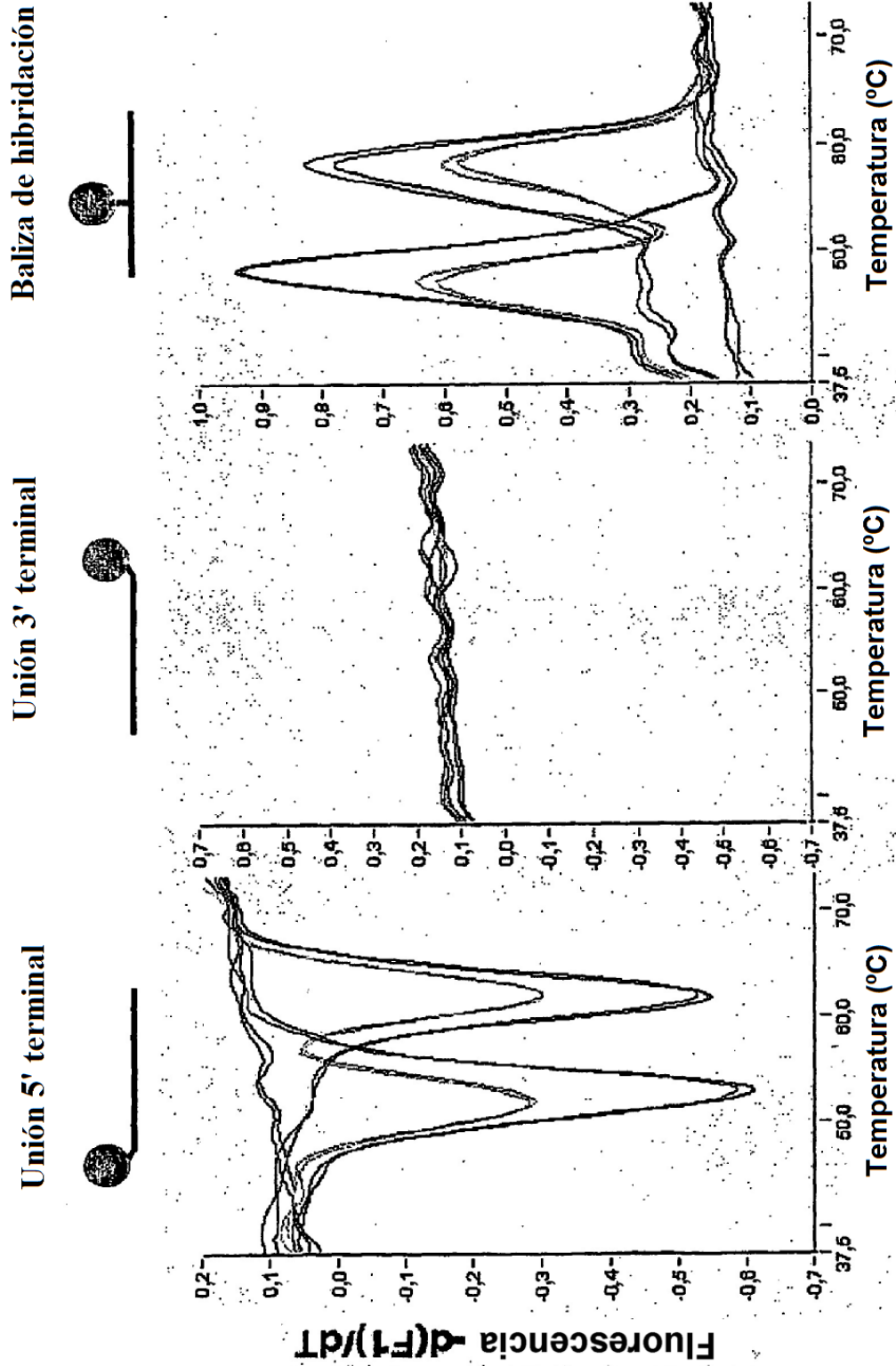


FIGURA 11

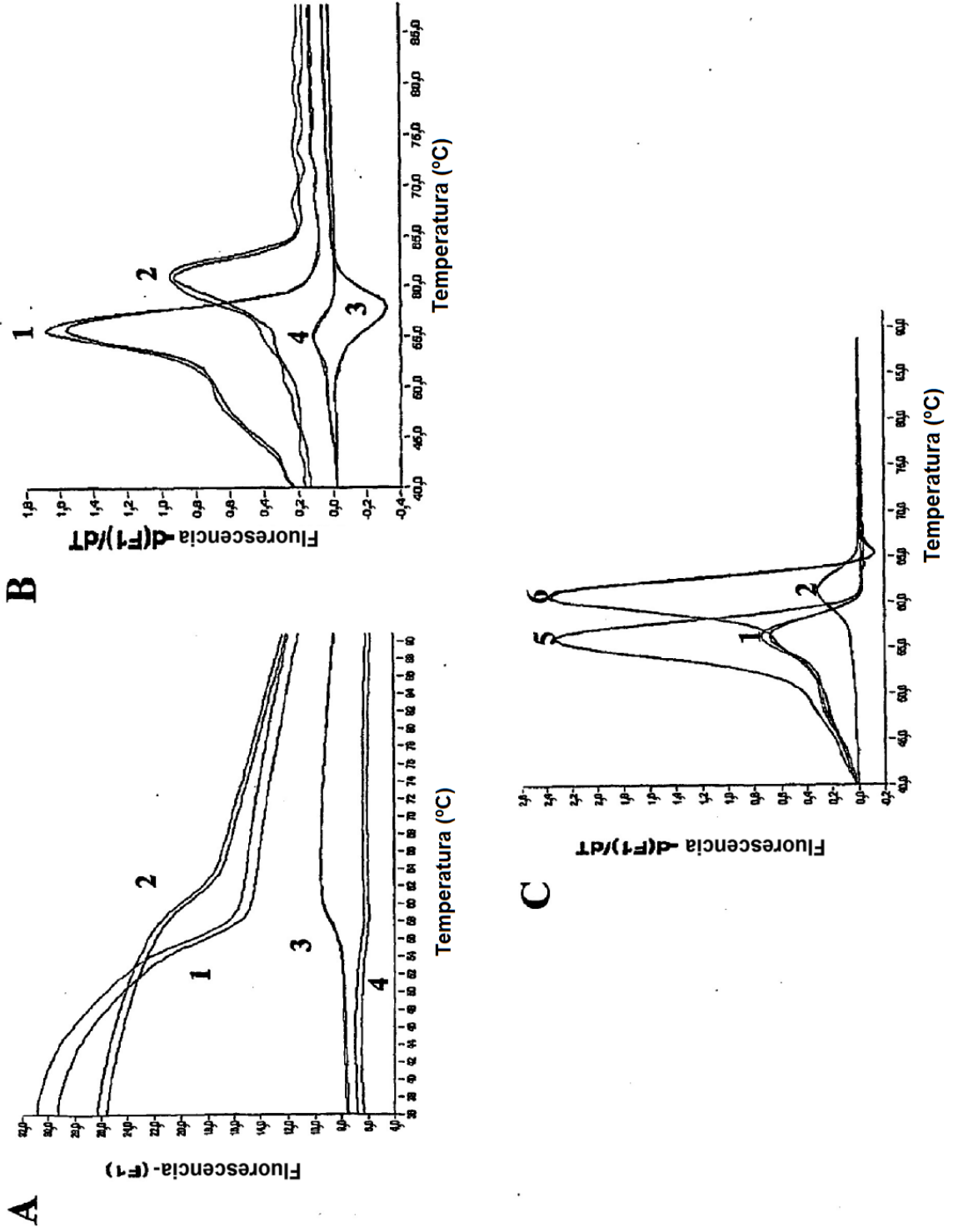




FIGURA 12

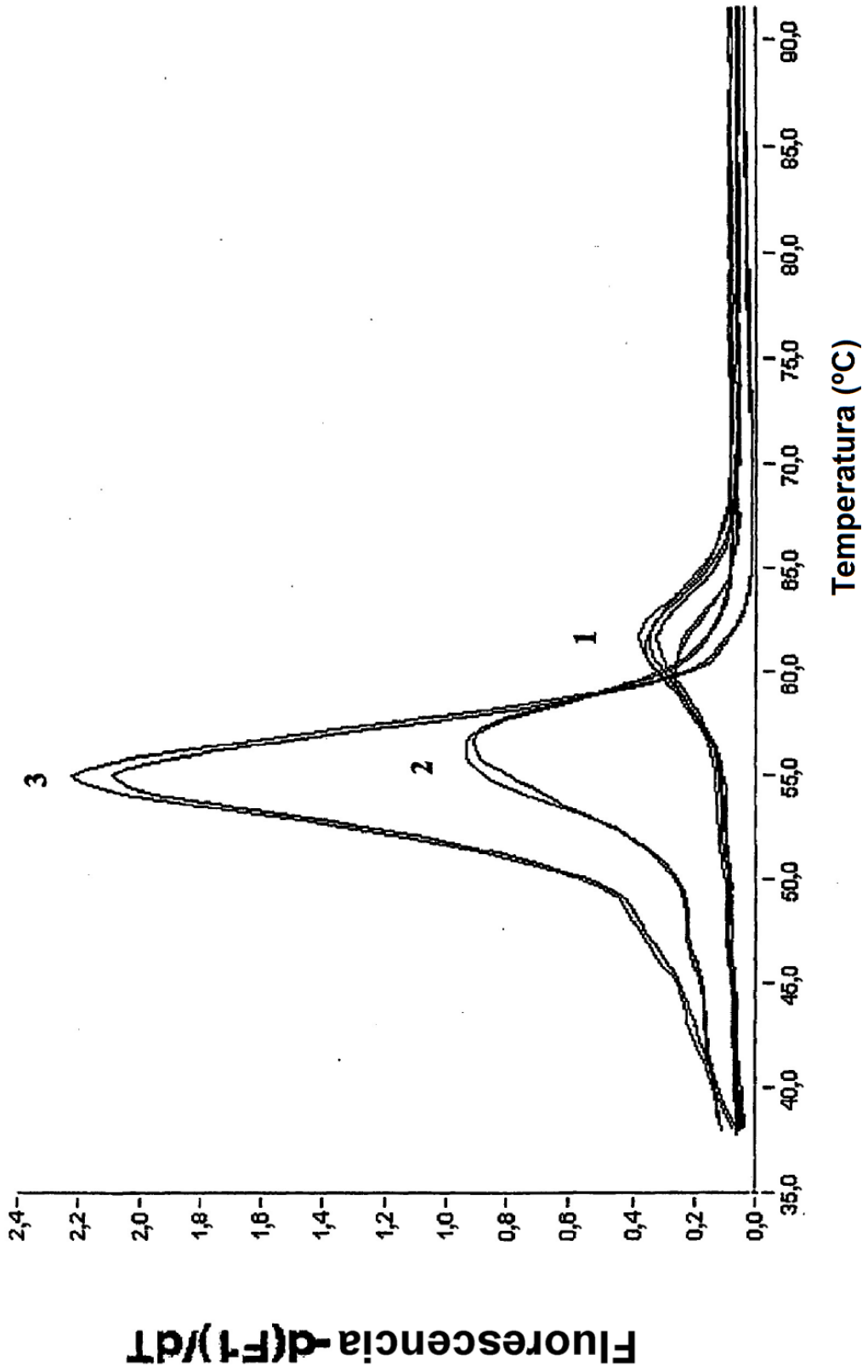
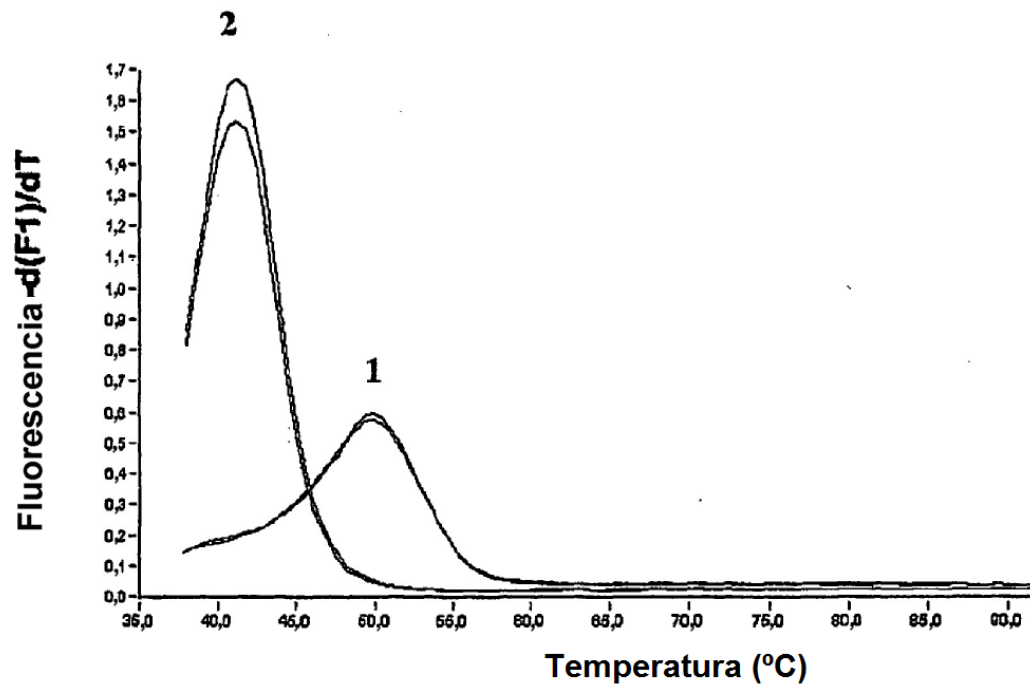


FIGURA 13

A



B

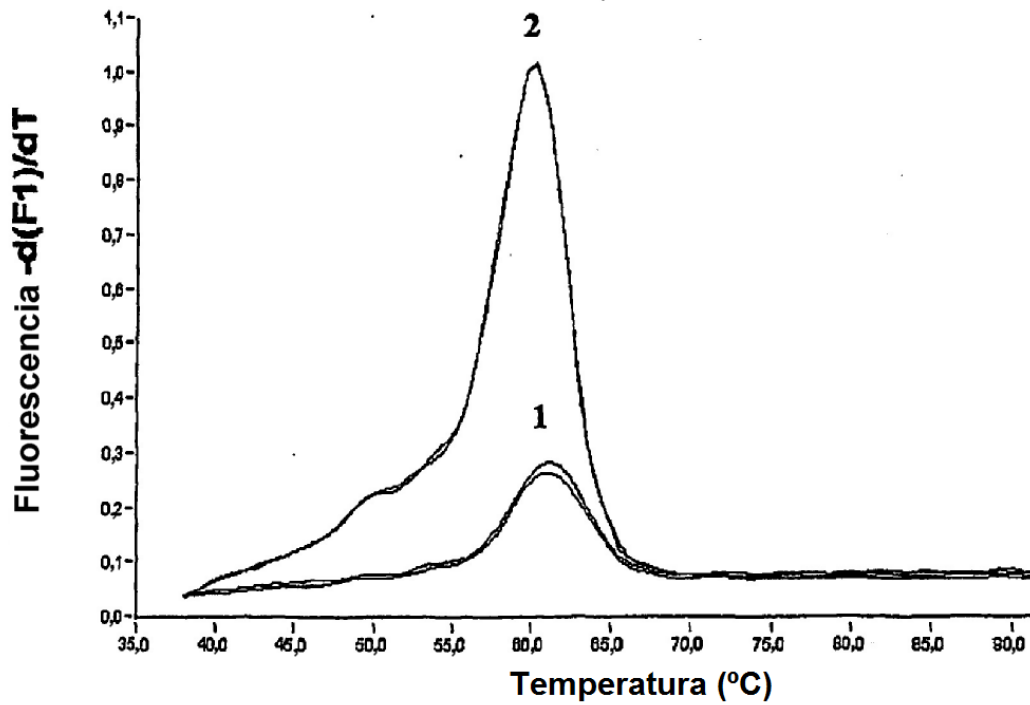
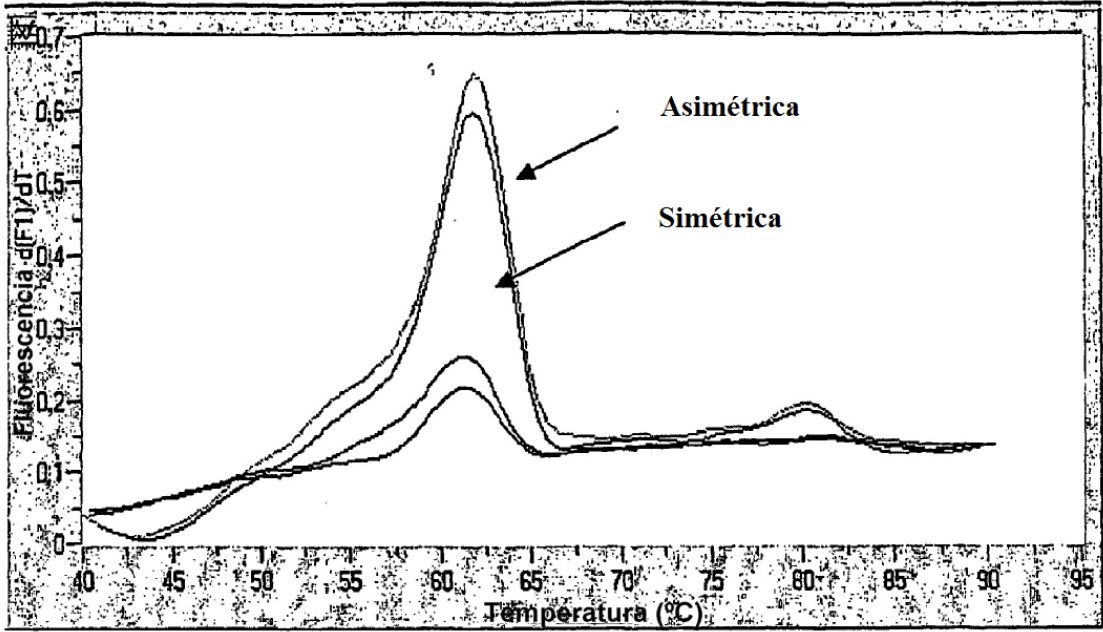


FIGURA 14

A



B

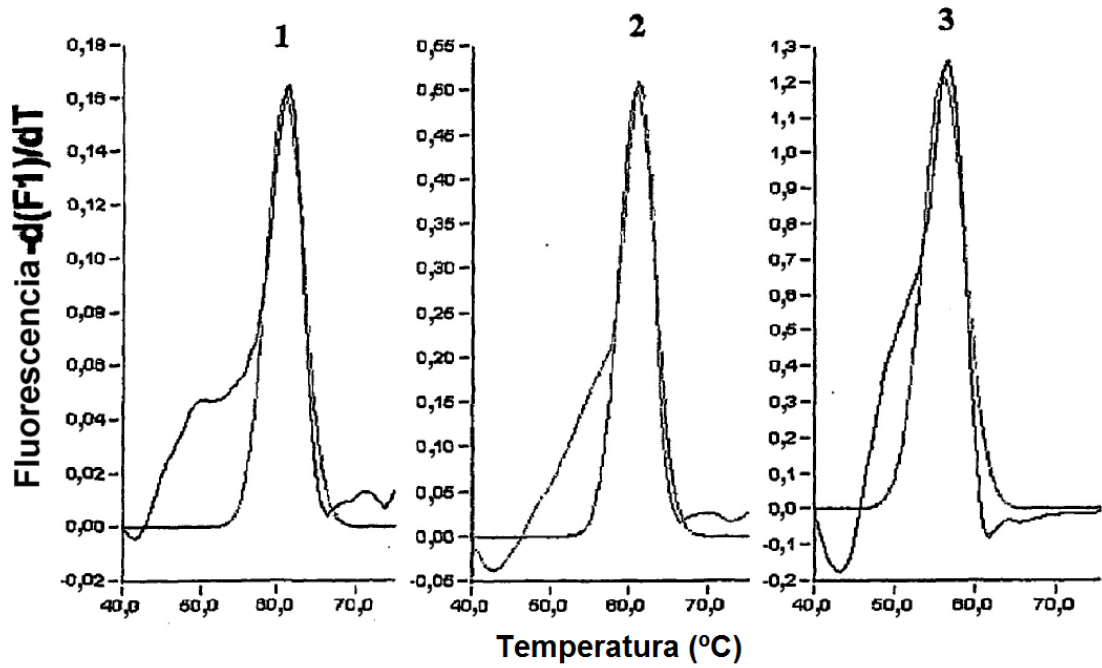


FIGURA 15

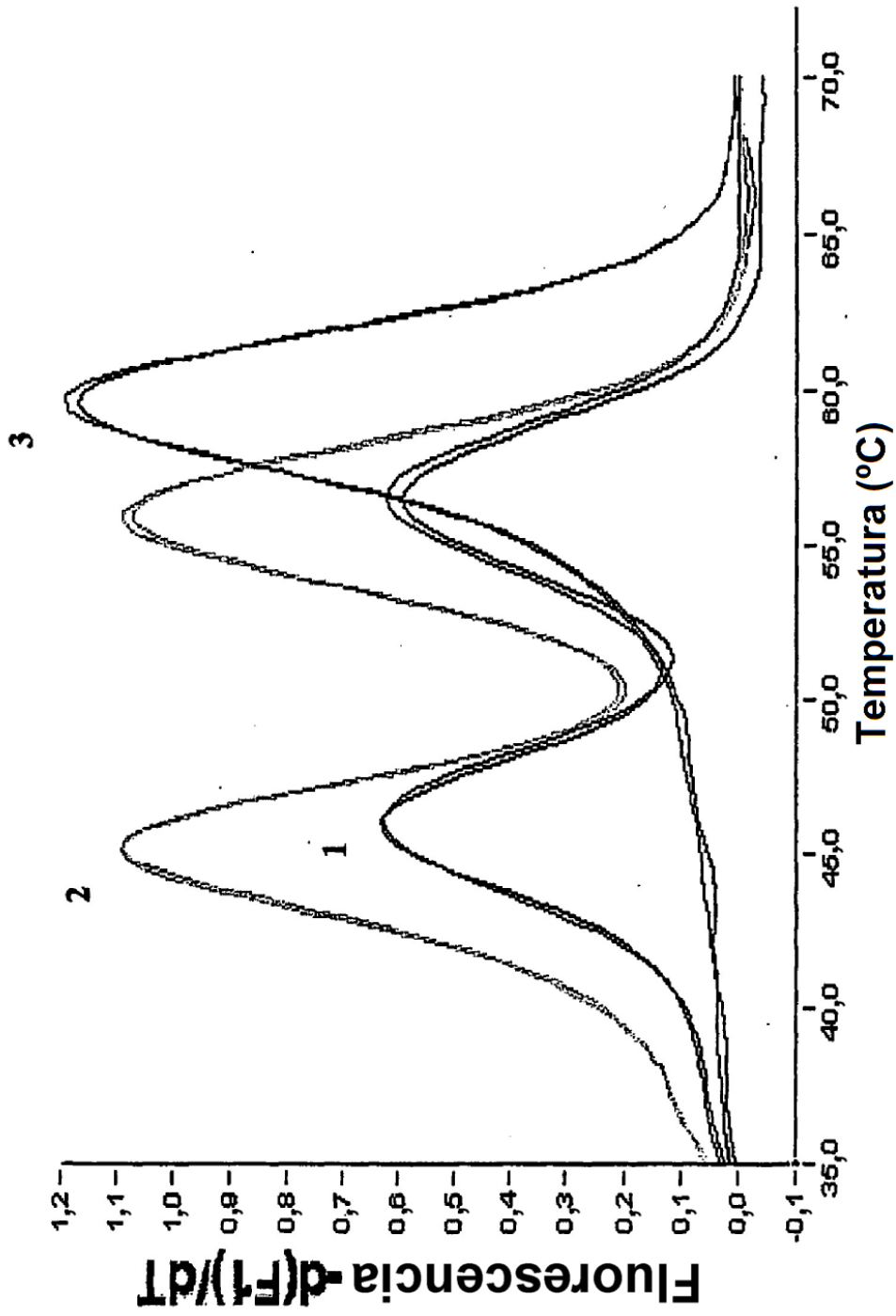
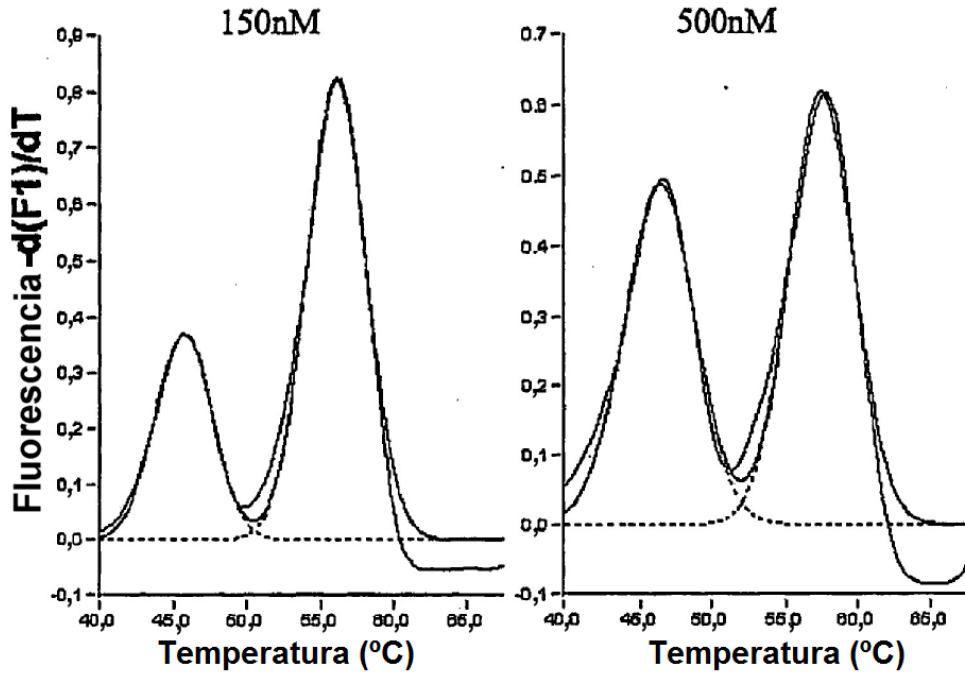


FIGURA 16

A



B

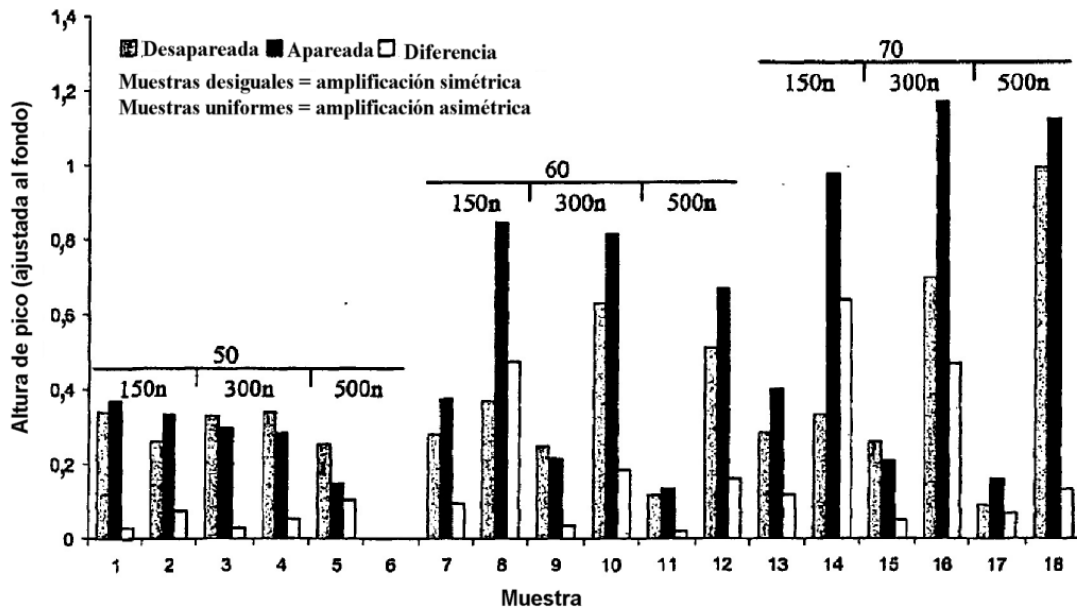


FIGURA 17

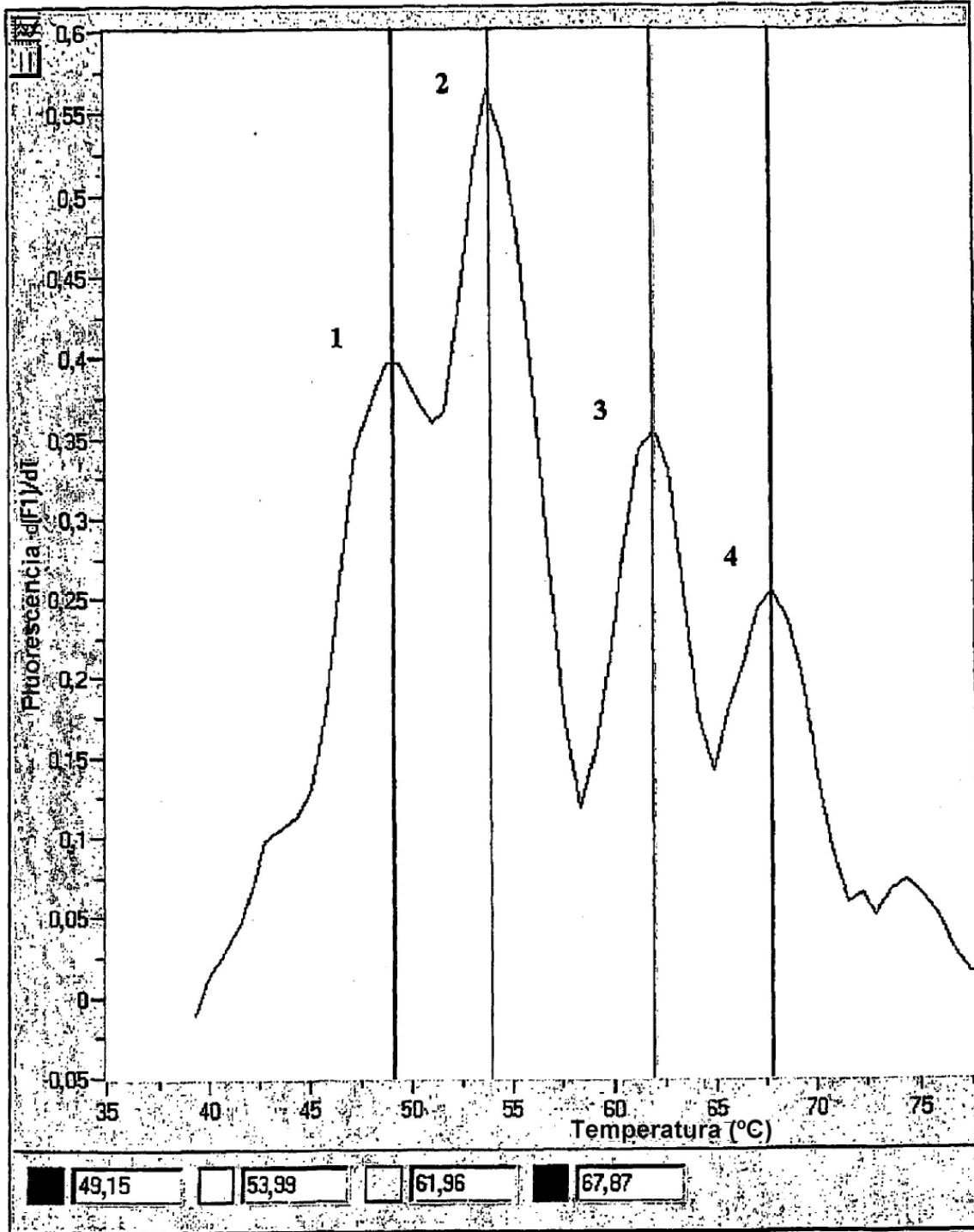


FIGURA 18

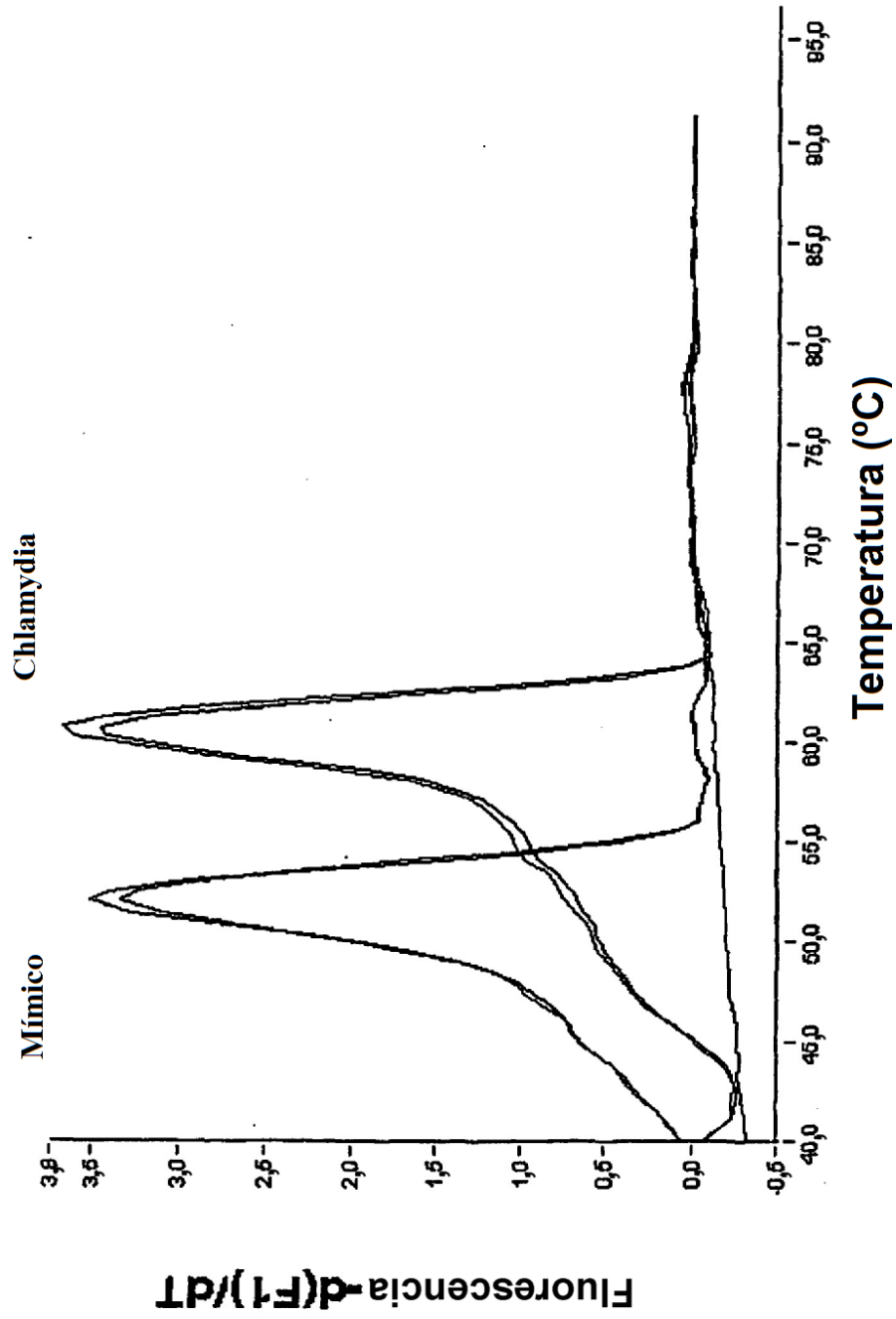


FIGURA 19

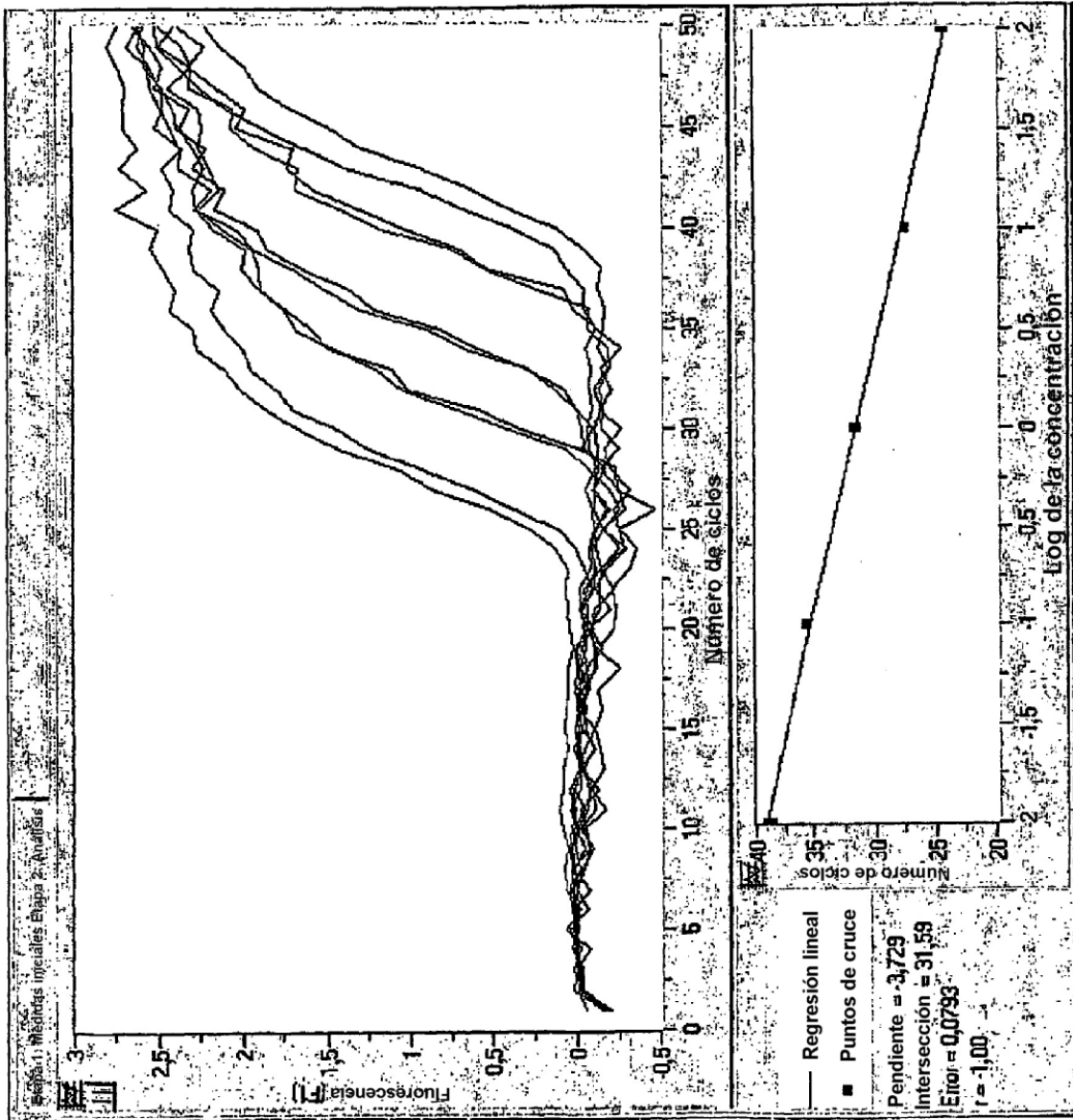




FIGURA 20

