

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 446**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C07D 293/00 (2006.01)
C09B 23/00 (2006.01)
C09B 23/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2005 E 05857791 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 1774047**

54 Título: **Análisis de fusión de ácidos nucleicos con colorantes de saturación**

30 Prioridad:

20.04.2004 US 827890

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION
(50.0%)
615 Arapeen Drive, Suite 110
Salt Lake City, Utah 84108, US y
BIOFIRE DIAGNOSTICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WITTWER, CARL T.;
ZHOU, LUMING;
DUJOLS, VIRGINIE E.;
HOLDEN, JOSEPH A. y
WILLMORE-PAYNE, CARLYNN**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 527 446 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análisis de fusión de ácidos nucleicos con colorantes de saturación

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a colorantes de unión a ácidos nucleicos de doble cadena y métodos para llevar a cabo el análisis de ácidos nucleicos en presencia de un colorante de unión a ácidos nucleicos de doble cadena.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los métodos para analizar variaciones en las secuencias de ADN se pueden dividir en dos categorías generales: 1) genotipado de variantes de secuencia conocidas y 2) cribado de variantes desconocidas. Existen diversos métodos para genotipar variantes se secuencia conocidas, y métodos de una sola etapa, homogéneos, en tubo cerrado que utilizan sondas fluorescentes (Lay MJ, y otros, Clin. Chem. 1997; 43:2262-7). En cambio, la mayoría de técnicas de cribado de las variantes desconocidas precisan de electroforesis de gel o de separación en columna tras la PCR. Dichas técnicas incluyen polimorfismos de conformación de una única cadena (Orita O, y otros, Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:2766-70), migración de heterodúplex (Nataraj AJ, y otros, Electrophoresis 1999; 20:1177-85), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (Abrams ES, y otros, Genomics 1990; 7:463-75), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (Wartell RM y otros, J Chromatogr A 1998; 806:169-85), métodos de división enzimática o química (Taylor GR, y otros, Genet Anal 1999; 14:181-6), así como la secuenciación de ADN. La identificación de nuevas mutaciones mediante secuenciación también requiere varios pasos tras realizar la PCR, concretamente la secuenciación del ciclo y electroforesis en gel. La cromatografía líquida de alto rendimiento en condiciones desnaturalizantes (Xiao W, y otros, Hum Mutat 2001; 17:439-74) incluye la inyección del producto de la PCR en una columna.

Recientemente, se han utilizado métodos homogéneos de fluorescencia en el cribado de mutaciones. El SYBR® Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon) es un colorante específico para ADN de doble cadena que se utiliza a menudo para hacer un seguimiento de la formación de producto (Wittwer CT, y otros, BioTechniques 1997; 22:130-8) y la temperatura de fusión (Ririe KM, y otros, Anal. Biochem 1997; 245:154-60) con PCR en tiempo real. Se ha podido detectar la presencia de cambios heterocigóticos de una sola base en productos de hasta 167 pb mediante análisis de la curva de fusión con SYBR® Green I (Lipsky RH, y otros, Clin Chem 2001; 47:635-44). Sin embargo, posteriormente a la amplificación y previamente al análisis de fusión, se purificó el producto de la PCR y se añadieron elevadas concentraciones de SYBR® Green I. La concentración de SYBR® Green I que se utiliza para la detección en este método inhibe la PCR (Wittwer CT y otros, BioTechniques 1977; 22:130-1, 134-8); por ese motivo, el colorante se añadió tras la amplificación. Sería adecuado un colorante que se pudiera utilizar para detectar la presencia de variaciones genéticas, incluidos los cambios heterocigóticos de una sola base y que a su vez se pudiera añadir previamente a la PCR.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son ampliamente la variación genética más observada en el ser humano y otras especies. En dichos polimorfismos, entre dos individuos solo varía una única base. Esta modificación puede llevar al cambio de un aminoácido en una proteína, alterar las tasas de transcripción, afectar el corte y empalme del ARNm o no tener ningún efecto aparente en los procesos celulares. En ocasiones, cuando este cambio es silencioso (por ejemplo, cuando el aminoácido por el que codifica no cambia), el genotipado de los SNP puede seguir siendo valioso si la modificación está relacionada (asociada) con un único fenotipo provocado por otra alteración genética.

Existen varios métodos para el genotipado de SNP. La mayoría de ellos utilizan la PCR u otras técnicas de amplificación para amplificar el molde que se está estudiando. Se pueden utilizar técnicas contemporáneas o posteriores, incluyendo la electroforesis en gel, la espectrometría de masas y la fluorescencia. Las técnicas de fluorescencia resultan adecuadas ya que son homogéneas y no precisan de la adición de reactivos tras el inicio de la amplificación o del muestreo físico de las reacciones para realizar el análisis. Algunos ejemplos de técnicas homogéneas utilizan cebadores de oligonucleótidos para localizar la región que se estudia, y etiquetas fluorescentes o colorantes para generar señales. Métodos ilustrativos basados en PCR son tubos completamente cerrados, utilizan una enzima termoestable que es estable a la temperatura de desnaturalización del ADN, de manera que no hace falta añadir más compuestos tras empezar el aumento de temperatura.

Se pueden utilizar varios métodos de PCR en tubo cerrado, homogéneos y fluorescentes para el genotipado de los SNP. Dichos métodos incluyen sistemas que utilizan sondas de oligonucleótidos FRET con dos cromóforos que interactúan (sondas de hibridación adyacente, sondas Taq Man, Molecular Beacons, Scorpions), sondas de un único oligonucleótido con un solo fluoróforo (sondas G-quenching, Crockett, A.O. y C. T. Wittwer, Anal. Biochem. 2001; 290:89-97 y SimpleProbes, Idaho Technology), y técnicas que utilizan un colorante de ADNdc, en lugar de sondas de oligonucleótidos marcados covalentemente con fluorescencia. Las técnicas de tinción son adecuadas porque no precisan sondas de oligonucleótidos con marcaje, con lo que se reduce el tiempo de diseño y el coste de los ensayos.

Se han publicado dos técnicas para clasificar SNP mediante la utilización de colorantes de ADNdc. Se puede utilizar amplificación específica de alelo en presencia de colorantes de ADNdc para genotipar con PCR en tiempo real (Germer S, y otros, Genome Research 2000; 10:258-266). Según el método de la referencia de Germer, dos cebadores específicos de alelo se diferencian en su base 3' y amplifican de forma diferencial un alelo o el otro en presencia de un cebador antisentido común. A pesar de que no se necesitan oligonucleótidos marcados con fluorescencia, para el genotipado se precisan tres cebadores y dos pocillos para cada genotipo de SNP. Además, es necesario un instrumento de PCR en tiempo real para hacer un seguimiento de la fluorescencia en cada ciclo.

El otro método basado en tinción no precisa de un seguimiento en tiempo real, solamente necesita un pocillo por cada genotipo de SNP y utiliza el análisis de fusión (Germer S, y otros, Genome Research 1999; 9:72-79). En este método también se utiliza la amplificación específica de alelo, que precisa de tres cebadores, tal y como sucedía con el método Germer citado previamente. Además, uno de los cebadores incluye cola de anclaje GC ("GC-clamp tail") para aumentar la temperatura de fusión de un amplicón, permitiendo así la diferenciación mediante temperatura de fusión en un pocillo. Se hace un seguimiento de la fluorescencia tras la amplificación mediante PCR, y la adquisición en tiempo real no es necesaria.

T. ISHIGURO y otros en Anal. Biochem. 229, 207 (1995) dan a conocer un ensayo basado en una reacción en cadena de la polimerasa que se lleva a cabo en presencia de un intercalador fluorescente, el colorante de monometino YO-PRO-1.

MOREDA y otros en Tetrahedron 53/37, 12595 (1997) y Tetrahedron 53/37, 12605 (1997) dan a conocer colorantes de cianina como marcadores de ADN que contienen una estructura parcial de purina.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones. Se da a conocer un método que solamente precisa de una mezcla de PCR estándar, que incluye reactivos, cebadores, y la simple adición previa a la PCR de un colorante de unión al ADN (dc) de doble cadena "saturante" o un nuevo colorante de unión a ADNdc según la presente descripción. Para los propósitos de la presente memoria descriptiva, un colorante "saturante" es un colorante que no inhibe significativamente la PCR cuando se encuentra en concentraciones que proporcionan una señal de fluorescencia máxima en el caso de la cantidad de ADNdc que se genera normalmente mediante una PCR en ausencia de colorante, a modo de ejemplo, de aproximadamente 10 ng/μl. A pesar de que los colorantes se identifican por su compatibilidad con el procedimiento de PCR a concentraciones cercanas a la saturación, se comprende que dichos colorantes se pueden utilizar a concentraciones muy inferiores. Durante el proceso de amplificación o después del mismo, los colorantes se pueden utilizar para distinguir heterodúplex y homodúplex mediante el análisis de la curva de fusión de un modo similar a como se utiliza el marcaje de los cebadores. (Gundry CN, y otros, Clin Chem. 2003 Mar; 49(3):396-406). La identificación de heterodúplex y homodúplex se puede utilizar en diversos análisis, entre ellos el cribado y genotipado de mutaciones. El término "cribado" describe el proceso en el cual el fragmento de ácido nucleico se compara con un fragmento de ácido nucleico de referencia para detectar la presencia de cualquier diferencia entre las secuencias. Una respuesta positiva que indica la presencia de una diferencia en la secuencia puede no reflejar la naturaleza exacta de la modificación de la secuencia o su posición dentro del fragmento de ácido nucleico. El término "genotipado" incluye la detección y determinación de variaciones en la secuencia de ácidos nucleicos conocidos, incluyendo pero sin limitación a los mismos, SNP, supresiones de bases, inserciones de bases, duplicaciones de secuencias, reorganizaciones, inversiones, metilaciones de bases, el número de repeticiones cortas en tándem; y en el caso de un genoma diploide, si el genoma es homocigoto o heterocigoto de la variación de la secuencia, así como la relación de posiciones *cis/trans* de dos o más variaciones de secuencia de una cadena de ADN (haplotipo). De forma opcional, se pueden añadir una o más sondas sin marcar a la mezcla en cualquier momento previamente a los análisis de curva de fusión.

El término "sonda sin marcaje" se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que no está unido covalentemente a un colorante y que está diseñado para hibridarse perfecta o parcialmente a una secuencia diana. El colorante que se encuentra en la mezcla puede unirse a la sonda sin marcaje o separarse de la misma, especialmente cuando la sonda se hibrida con la secuencia diana o se funde de la misma. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" tal como se utilizan en el presente documento incluyen oligómeros y polímeros de monómeros naturales o modificados o enlaces que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, nucleósidos de ácidos peptidonucleicos, y compuestos similares capaces de unirse específicamente a polinucleótidos diana mediante interacciones de apareamiento de bases. De forma opcional, se puede modificar la sonda sin marcaje con uno o diversos residuos no fluorescentes, incluyendo pero sin limitarse a los mismos, ligandos de unión al surco menor no fluorescentes, biotina, separadores, enlazadores, fosfatos, análogos de bases, bases no naturales, y similares. En realizaciones en las que la sonda sin marcaje se encuentra en la mezcla de PCR, es deseable que la sonda sin marcaje no se una a la secuencia diana tan estrechamente como para inhibir la amplificación.

En otro aspecto de la presente invención, se identifican diversos colorantes de unión a ADNdc. Los colorantes de unión a ADNdc de la presente invención se pueden encontrar en concentraciones suficientemente saturantes respecto al ADN durante o tras la amplificación, a la vez que se minimiza la inhibición de la PCR. Por ejemplo, a concentraciones máximas compatibles con el proceso de PCR, el colorante de unión a ADNdc tiene un porcentaje

de saturación, como mínimo, del 50%. En otras realizaciones, el porcentaje de saturación es, como mínimo, del 80%, y más especialmente, como mínimo, del 90%. Aún en otras realizaciones, el porcentaje de saturación es, como mínimo, del 99%. Se entiende que el porcentaje de saturación es el porcentaje de fluorescencia en comparación con la fluorescencia del mismo colorante a concentraciones saturantes, es decir, la concentración que proporciona la mayor intensidad posible de fluorescencia en presencia de una cantidad predeterminada de ADNdc. A modo de ejemplo, la cantidad predeterminada de ADNdc es de 100 ng/10 µl, que es la cantidad de ADN que se produce normalmente al final de un procedimiento de PCR en meseta. Se entiende que las preparaciones de colorante pueden contener impurezas que inhiben la amplificación. Dichas impurezas se deberían eliminar previamente a la determinación del porcentaje de saturación. También se entiende que la medición de la intensidad de fluorescencia respecto al porcentaje de saturación se realiza a la longitud de onda correspondiente para la detección del colorante unido a ADNdc, y si es posible, no se utilizan longitudes de onda que puedan detectar fluorescencia elevada de fondo procedente de colorante no unido o formas secundarias de uniones del colorante que se podrían dar a una proporción elevada de colorante/pb (por ejemplo, unión del colorante al complejo ADNdc-colorante o a ácidos nucleicos de una sola cadena).

En algunos ejemplos, el colorante de unión a ADNdc tiene una saturación superior al 50% en concentraciones máximas compatibles con el proceso de PCR, y tiene espectros de excitación y de emisión que no sugieren compatibilidad con los instrumentos estándar de PCR en tiempo real. Los instrumentos "estándar" de análisis de PCR en tiempo real tienen un intervalo de excitación de aproximadamente 450-490 nm y un intervalo de detección de emisión de aproximadamente 510-530 nm. Se ha descubierto que ciertos colorantes "azules" son compatibles con dichos sistemas, a pesar de que sus espectros de excitación y de emisión sugirieran lo contrario. Por este motivo, en este aspecto de la presente invención se da a conocer un método de análisis durante o tras el proceso de PCR utilizando un instrumento de PCR en tiempo real estándar y un colorante de unión a ADNdc con un máximo de excitación en el intervalo de 410 a 465 nm, más especialmente en el intervalo de 430 a 460 nm, y con un máximo de emisión en el intervalo de 450 a 500 nm, más especialmente en el intervalo de 455 a 485 nm, cuando se cuantifica en tampón de PCR en presencia de ADNdc. Los instrumentos adecuados pueden utilizar los intervalos de excitación y de emisión citados anteriormente, o se pueden modificar en función de los máximos de excitación y de emisión de los colorantes. Los intervalos de detección adecuados de los colorantes "azules" de la presente invención así como de detección de colorantes habituales, tales como fluoresceína o SYBR® Green I, pueden incluir de 440 a 470 nm en el caso de la excitación, y de 500 a 560 nm en el caso de la detección. Cabe señalar que mientras que la utilización de muchos de estos colorantes es adecuada para instrumentos de PCR en tiempo real e instrumentación de fusión estándar, el ajuste de los parámetros ópticos para coincidir con los espectros de excitación y de emisión de dichos colorantes puede mejorar adicionalmente su sensibilidad para su utilización en análisis de amplificación cuantitativos o cualitativos.

El cribado o el genotipado se pueden llevar a cabo mediante análisis de curva de fusión en presencia de una o varias sondas sin marcaje y un colorante de unión a doble cadena. El análisis de curva de fusión se puede llevar a cabo durante o tras el proceso de amplificación, o sin realizar dicha amplificación. El colorante puede ser un colorante saturante o un nuevo colorante según el presente documento.

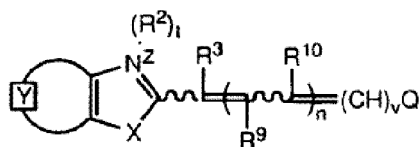
Mientras que los ejemplos que se proporcionan en el presente documento están dirigidos al análisis de curva de fusión, se entiende que los colorantes se pueden utilizar para varios análisis de PCR cuantitativa en tiempo real, incluyendo la cuantificación de ácidos nucleicos, la determinación de la concentración inicial, el ensayo de la presencia de un ácido nucleico, el multiplexado mediante sondas con marcaje y otros métodos basados en PCR.

Además, a pesar de hacer referencia a PCR, otros métodos de amplificación también pueden ser compatibles con los colorantes. Dichos procedimientos adecuados incluyen la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA); la amplificación por círculo rodante en cascada (CRCA), la amplificación mediante Q beta replicasa; la amplificación de ácidos nucleicos isotérmica y quimérica iniciada por cebador (ICAN); la amplificación mediante transcripción (TMA), y similares. También se puede utilizar la PCR asimétrica. Por este motivo, cuando se utiliza el término PCR, se entiende que comprende variaciones de la PCR y otros métodos de amplificación alternativos. Los métodos de amplificación que favorecen la amplificación de una cadena en mayor grado que la otra cadena, son especialmente adecuados para los análisis de curva de fusión mediante sondas sin marcaje.

Además, a pesar de que se hace referencia a la amplificación, se entiende que el análisis de curva de fusión de la presente invención se puede realizar con muestras de ácidos nucleicos que se hayan obtenido sin amplificación.

De forma adicional, se entiende que los colorantes de unión al ADNdc incluyen intercaladores, así como otros colorantes que se unen a ácidos nucleicos, siempre que el colorante se una de forma diferente a ADN monocatenario y bicatenario, o que produzca una señal distinta en base a la cantidad de ácido nucleico bicatenario.

Se dan a conocer nuevos colorantes. Los nuevos colorantes, que pueden ser saturantes o no, se pueden utilizar durante o tras la amplificación, o se pueden utilizar durante el análisis de la curva de fusión en presencia o ausencia de amplificación. De forma ilustrativa, los colorantes nuevos tienen la fórmula:



en la que

el residuo $\boxed{Y}$ representa un anillo aromático, monocíclico o policíclico, fusionado, opcionalmente sustituido o un anillo heteroaromático que contiene nitrógeno, monocíclico o policíclico, fusionado, opcionalmente sustituido;

5 X es oxígeno, azufre, selenio, telurio o un residuo seleccionado entre $C(CH_3)_2$ y NR^1 , en el que R^1 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} .

R^2 se selecciona del grupo que comprende alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , arilo, arilo(alquilo C_{1-2}), hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, monoalquilaminoalquilo y dialquilaminoalquilo, trialquilamonoalquilo, alquilencarboxilato, alquilencarboxamida, alquilensulfonato, residuos que contienen un heteroátomo cíclico opcionalmente sustituido, y

10 residuos que contienen un heteroátomo acíclico opcionalmente sustituido;

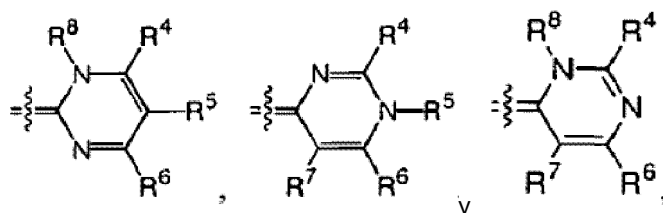
$t = 0$ ó 1 ;

Z es una carga seleccionada entre 0 y 1;

R^3 , R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que comprende hidrógeno, alquilo C_{1-6} y arilcarbonilo;

$n = 0, 1$ ó 2 ; y

15 Q es un heterociclo seleccionado del grupo de estructuras que comprende:



y

20 en las que R^5 , R^6 , R^7 y R^8 se seleccionan independientemente del grupo que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, alqueno, polialqueno, alquino, polialquino, alquenalquino, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonoalquilcarboniltio, dialquilamino, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, trialquilamonoalquiltio y nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente; un residuo que contiene un heteroátomo acíclico, un

25 residuo que contiene un heteroátomo cíclico, un PUENTE-COLORANTE, y un grupo reactivo, cada uno de los cuales incluye opcionalmente un residuo de amonio cuaternario.

R^4 se selecciona del grupo que comprende arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonoalquilcarboniltio, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, trialquilamonoalquiltio, alquinitriltio y nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. En otra realización, el colorante se selecciona del grupo que comprende N7, O7, P7, Q7, R7, S7, T7, U7, V7, W7, X7, Z7, K8, P8, T8, W8, Z8, A9, C9, G9, I9, I9Met, J9, J9Met, K9, L9, L9Met, M9, N9, O9, P9, Q9, R9, A10 y V10. En un método, estos colorantes se utilizan en la

30 amplificación mediante PCR. En otro método, estos colorantes se utilizan con un ácido nucleico diana y una sonda sin marcaje en el análisis de curva de fusión. Dichos colorantes se pueden utilizar en varios métodos descritos en el presente documento.

Se describe un método para el análisis de ácidos nucleicos que comprende las etapas de mezclar un ácido nucleico diana con un colorante saturante de unión al ADNdc y, como mínimo, una sonda sin marcaje configurada para hibridarse con una parte del ácido nucleico diana para formar una mezcla, dejar la sonda sin marcaje que se hibride al ácido nucleico diana para formar un dúplex sonda/diana, generar una curva de fusión del dúplex sonda/diana al

40 medir la fluorescencia del colorante de unión a ADNdc a medida que se calienta la muestra, y analizar la forma de dicha curva de fusión. A modo de ilustración, la forma de dicha curva de fusión se puede analizar generando una derivada de la curva de fusión, por ejemplo al analizar la forma y localización de uno o más picos de fusión en dicha derivada de la curva de fusión. El análisis, de forma opcional, se puede llevar a cabo previamente o durante la amplificación del ácido nucleico diana. En este método se pueden utilizar los colorantes saturantes descritos

45 anteriormente u otros colorantes saturantes.

Se describe un kit para analizar el ácido nucleico diana, que comprende una sonda sin marcaje configurada para hibridarse, como mínimo, parcialmente con el ácido nucleico diana y un colorante saturante de unión al ADNdc. De

50 forma opcional, el kit puede comprender otros componentes, por ejemplo, una polimerasa termol estable y cebadores de oligonucleótidos configurados para amplificar el ácido nucleico diana.

Se proporciona un método para detectar mutaciones en el gen c-kit que comprende proporcionar una mezcla de amplificación que comprende una muestra de ácido nucleico, uno o más pares de cebadores configurados para amplificar un locus del gen c-kit, una polimerasa termotable y un colorante saturante de unión al ADNdc, amplificar la muestra de ácido nucleico para generar un amplicón, fundir el amplicón para crear una curva de fusión y analizar la forma de la curva de fusión. A modo de ejemplo, los cebadores comprenden cualquiera de los cebadores seleccionados del grupo que consiste en GATGCTCTGCTTCTGTACTG (SEQ ID NO. 40) y GCCTAAACATCCCCTTAAATTGG (SEQ ID NO. 41); CTCTCCAGAGTGCTCTAATGAC (SEQ ID NO. 42) y AGCCCTGTGTTTCATACTGACC (SEQ ID NO. 43); CGGCCATGACTGTCGCTGTAA (SEQ ID NO. 44) y CTCCAATGGTGCAGGCTCCAA (SEQ ID NO. 45); y TCTCTCCAACCTAATAGTG (SEQ ID NO. 46) y GGACTGTCAAGCAGAGAAT (SEQ ID NO. 47)

Se da a conocer un método para el análisis de los ácidos nucleicos, que comprende las etapas de mezclar un ácido nucleico diana con un colorante saturante de unión al ADNdc para formar una mezcla, generar una curva de fusión del ácido nucleico diana midiendo la fluorescencia del colorante saturante de unión al ADNdc a medida que se calienta la mezcla, incluir un segundo ácido nucleico a la mezcla configurado para hibridarse con una parte del ácido nucleico diana, siendo el segundo ácido nucleico de menor tamaño que el ácido nucleico diana y cuya temperatura de fusión es distinta a la de dicho ácido nucleico y permitir que el segundo ácido nucleico se hibride con la parte del ácido nucleico diana, fundir el segundo ácido nucleico del primer ácido nucleico y analizar la forma de la curva de fusión. En una realización, el segundo ácido nucleico es una sonda sin marcaje que se puede añadir previamente o tras la generación de la curva de fusión de un ácido nucleico diana, mientras que en otra realización, por ejemplo, el segundo nucleótido es un amplicón más pequeño y se puede generar, a modo de ejemplo, en una única mezcla con amplificación del ácido nucleico diana.

Se da a conocer un método de análisis por PCR que comprende los pasos de mezclar el colorante de unión a ADNdc con una muestra que comprende una cantidad inicial desconocida de ácido nucleico diana y cebadores configurados para amplificar el ácido nucleico diana, para formar una mezcla, amplificar el ácido nucleico diana en presencia de colorante de unión a ADNdc, monitorizar la fluorescencia del colorante de unión a ADNdc en un intervalo de temperatura durante varios ciclos de amplificación para generar varias curvas de fusión y utilizar dichas curvas de fusión para cuantificar la cantidad inicial de ácido nucleico diana. Durante la amplificación se pueden utilizar sondas sin marcaje y/o colorantes saturantes.

Tras la consideración de la descripción detallada de las realizaciones ilustrativas que se describen a continuación, los expertos en la materia comprenderán sin dificultades las características adicionales de la presente invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS ILUSTRACIONES

La figura 1 muestra el genotipado del Factor V Leiden mediante el colorante S5. Se muestra la primera derivada negativa (-dF/dT) de la curva de fusión.

La figura 2 muestra el efecto de las velocidades de enfriamiento previamente al análisis de curva de fusión en la detección de heterodúplex.

La figura 3 muestra el efecto de las velocidades de calentamiento previamente al análisis de curva de fusión en la detección de heterodúplex.

Las figuras 4A-B son curvas de fusión de alta resolución normalizadas de todos los genotipos posibles de SNP en una posición mediante un plásmido diseñado mediante ingeniería genética. Se analizaron tres muestras de cada genotipo y se incluyeron cuatro homocigotos (Figura 4A, -A/A, --, T/T, -- -C/C,G/G) y seis heterodúplex (Figura 4B, -- A/T, -- -A/C,C/T, -- A/G, -G/T, -- -C/G).

Las figuras 5A-D muestran una comparación de métodos de genotipado; la figura 5A muestra un mapa de fibrosis quística en el que se marca la posición de un marcaje opcional de un cebador (estrella), la figura 5B muestra el genotipado mediante un cebador con marcaje, la figura 5C muestra el genotipado mediante el colorante S5 y la figura 5D muestra un intento de genotipado con la utilización de SYBR® Green I (Homocigotos: - - - wt, - F508del; heterocigotos: -- F508del, --- I507del, ---- F508C).

La figura 6 muestra el genotipado mediante el colorante S5 en amplicones de mayor longitud (- - - homocigoto (TT), homocigoto (CC), --- heterocigoto (TC)). Se muestran las curvas de fusión de tres individuos (no se muestran las derivadas).

Las figuras 7A-B muestran las curvas de fusión derivadas de mezclas de ADN utilizando SYBR® Green I (figura 7A) y colorante S5 (figura 7B).

En la figura 8 se puede ver el cambio de fluorescencia no lineal cuando hay varias especies de ADN. Se muestra el colorante S5 (círculos blancos) y SYBR® Green I (cuadrados negros).

Las figuras 9A-B muestran las valoraciones de colorante para determinar los porcentajes de saturación, en la figura 9A, $\blacklozenge$ - SYBR[®] Green I, $\blacksquare$ - SYBR[®] Gold, $\blacktriangle$ - Pico Green, en la figura 9B, $\circ$ - colorante S5, $\blacksquare$ - SYTOX[®] Green. El cuadro sombreado indica ejemplos de intervalos de PCR para SYBR[®] Green I y el colorante S5.

5 La figura 10 ilustra el efecto de distintas concentraciones de colorante a temperatura de fusión.

Las figuras 11A-B muestran los espectros de excitación y emisión del colorante S5 (figura 11A) y de SYBR[®] Green I (figura 11B).

10 Las figuras 12A-D muestran análisis de curvas de fusión de alta resolución de muestras cuadruplicadas de seis genotipos distintos de un fragmento de 110 pb de beta globina (---- SS, - AA, - - - - CC, --- SC, AC, ----- AS); la figura 12A muestra datos primarios obtenidos de análisis de curvas de fusión de alta resolución de muestras cuadruplicadas de cada genotipo; la figura 12B muestra curvas de fusión de alta resolución normalizadas de muestras cuadruplicadas de los seis genotipos; la figura 12C muestra curvas de fusión de alta resolución normalizadas con desplazamiento de la temperatura de muestras cuadruplicadas de seis genotipos. Se modificó la temperatura de las muestras para superponer las curvas a una fluorescencia de entre el 5 y el 10%; la figura 12D muestra las curvas diferenciales de fluorescencia obtenidas de los datos de la figura 12C. Cada curva diferencial se obtuvo sustrayendo cada muestra de la curva normal (AA) para obtener los datos diferenciales. Se hicieron correr los cuadruplicados, pero debido a la superposición, en ocasiones aparecen menos de cuatro muestras.

20 La figura 13A muestra el análisis de curvas de fusión de alta resolución de muestras duplicadas de tres genotipos de un fragmento de 544 pb del gen (HTR2A) que codifica por el receptor humano 2A de la 5-hidroxitriptamina (- - - TC, - CC, - - - - TT). Los datos se normalizaron y se desplazó la temperatura utilizando la fracción de fluorescencia entre el 10 y el 20%. En la figura 13B se muestra un mapa de fusión teórico del homodúplex. La posición del SNP está marcada (X).

25 La figura 14 muestra la curva diferencial de seis genotipos de un fragmento de 612 pb del gen (CFTR) que codifica el regulador de la conductividad transmembrana de la fibrosis quística. Las gráficas se han normalizado, la temperatura se ha desplazado al superponer la fracción de fluorescencia entre el 30 y el 40% y al sustraer de una de las gráficas del tipo salvaje.

30 La figura 15 muestra la genealogía de CEPH de la familia 1331 de Utah. El genotipo de HLA-A de la familia de Utah 1331 es el siguiente: A:02011; B:3101; C:2402101; D:03011; E:01011. Se numeró a cada uno de los individuos. Mujer (círculo); hombre (cuadrado).

35 Las figuras 16A y B muestran la curva de fusión de los miembros de la familia 1331 de Utah. Seis curvas de fusión distintas representan seis genotipos del exón 2 de HLA-A presentes en 17 miembros de la familia. La figura 16A muestra la curva de fusión completa y la figura 16B muestra una parte ampliada (que aparece en un cuadrado en la figura 16A) con la denominación del genotipo y los individuos entre paréntesis.

40 La figura 17 muestra la determinación de los genotipos de dos muestras al mezclar (-BM15, ----BM 16, ---- BM15 + BM16). En HLA-A del exón 2, dos muestras homocigotas BM15(0101) y BM16(0201) se diferencian en 15 pb. Las curvas de fusión de BM15 y BM16 son similares si se observan por separado, pero cuando se combinan, los 15 pb diferentes modifican la curva de fusión.

45 Las figuras 18A y B muestran los resultados de un experimento de optimización para genotipar mediante la utilización de sonda sin marcaje utilizando una PCR asimétrica. La figura 18A muestra los resultados de amplificación con varias proporciones de cebadores (..... simétrico (0,5 μ M de cada cebador); --- simétrico (sin control de molde); - (ligero) 0,05 μ M de cebador sentido y 0,5 μ M de cebador antisentido; - (pesado) 0,5 μ M de cebador sentido y 0,05 μ M de cebador antisentido; - - - - (ligero) 0,5 μ M de cebador sentido y 0,025 μ M de cebador antisentido; ---- (pesado) 0,025 μ M de cebador sentido y 0,5 μ M de cebador antisentido; - - - (ligero) 0,5 μ M de cebador sentido y 0,01 μ M de cebador antisentido; - - - - (pesado) 0,01 μ M de cebador sentido y 0,5 μ M de cebador antisentido; la figura 18B es una curva de fusión derivada que muestra los picos de fusión de sonda (..... simétrico (0,5 μ M de cada cebador); -- 0,05 μ M de cebador sentido y 0,5 μ M de cebador antisentido; - 0,5 μ M de cebador sentido y 0,05 μ M de cebador antisentido).

50 La figura 19 es similar a la figura 18B, muestra picos de fusión tras una amplificación asimétrica (..... simétrico (0,5 μ M de cada cebador); línea continua 0,5 μ M de cebador sentido y 0,05 μ M de cebador antisentido; ---- 0,5 μ M de cebador sentido y 0,025 μ M de cebador antisentido; 0,5 μ M de cebador sentido y 0,01 μ M de cebador antisentido).

55 La figura 20 es una curva de fusión derivada que muestra los picos de fusión de sondas sin marcaje, las longitudes oscilan entre 14 y 30 nucleótidos.

65

Las figuras 21A-D son curvas de fusión derivadas que muestran los picos de fusión de sondas sin marcaje de un sistema de prueba. La figura 21A muestra las curvas de fusión derivadas de cada uno de los cuatro homocigotos mediante el colorante D6. La figura 21B muestra las curvas de fusión derivadas del homocigoto A y de los heterocigotos A/G, A/T y A/C mediante el colorante D6. La figura 21C muestra las curvas de fusión derivadas del homocigoto A y de los heterocigotos A/G, A/T y A/C mediante el colorante SYBR® Green I; y la figura 21D muestra las curvas de fusión derivadas del homocigoto A y de los heterocigotos G/T, C/G y C/T el colorante D6.

Las figuras 22A-B son curvas de fusión derivadas que muestran los picos de fusión de varias mutaciones de fibrosis quística mediante sonda sin marcaje.

La figura 23 es una curva de fusión derivada que muestra los picos de fusión de una mutación SNP de fibrosis quística mediante dos sondas sin marcaje distintas.

La figura 24 es una curva de fusión derivada que muestra los picos de fusión de las mutaciones F508del y Q493V de fibrosis quística mediante dos sondas distintas sin marcaje en la misma reacción.

Las figuras 25 A-B son curvas de fusión de un amplicón de PCR que incluye el locus G542X de la fibrosis quística, en las que se analizaron simultáneamente la mutación en las muestras mediante fusión del amplicón y se genotiparon mediante la fusión de la sonda. La figura 25A compara una gráfica de datos de fluorescencia con una de temperatura entre 75°C y 83°C (perfil de fusión del amplicón). El recuadro muestra una vista ampliada de la parte de la curva que indica el cuadrado. La figura 25B muestra una gráfica derivada de los datos entre 58°C y 72°C (el perfil de fusión de la sonda), - tipo salvaje; ... homocigoto G542X; - - - heterocigoto G542X

La figura 26 ilustra los parámetros de la PCR programados en LightCycler para monitorizar la fusión de sonda sin marcaje/dúplex diana durante cada ciclo de amplificación. Se muestran dos ciclos de PCR. La fluorescencia se monitorizó de forma continua entre alineamiento y extensión (indicado con una línea continua) de cada ciclo.

La figura 27 muestra curvas de fusión derivadas obtenidas durante cada ciclo de la PCR mediante la utilización de una sonda sin marcaje y el colorante N7. La altura del pico aumenta a medida que aumenta el número de ciclos. La concentración inicial del ADN molde de esta muestra era de 10^5 copias/10 µl.

Las figuras 28 A-D muestran análisis de datos de fluorescencia obtenidos durante cada ciclo de PCR. La figura 28A muestra el número de ciclos en función de la gráfica de fluorescencia de datos recopilados a 61°C (se refleja la cantidad total de ADNdc en la reacción, ■) y a 73°C (se refleja la cantidad de amplicón, □). La figura 28B muestra una gráfica con el número de ciclos en función del área de picos de fusión (▲) y en función de la diferencia entre el máximo del pico de fusión y justo antes de la transición de fusión, calculado a partir de los datos derivados (Δ). La figura 28C muestra el número de ciclos en función del área de los picos de fusión de tres concentraciones iniciales de molde diferentes (▲ - 10^4 copias/10 µl; ■ - 10^5 copias/10 µl; □ - 10^6 copias/10 µl). La figura 28D muestra el logaritmo de la concentración de molde inicial en forma de gráfica en función del punto de cruce de cada muestra, que deriva de la figura 28C.

Las figuras 29-32 muestran curvas de fusión para genotipar diversas mutaciones de tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cada una comparada con amplicones normales de tipo salvaje. La figura 29 muestra un SNP heterocigótico (- normal, ---- GIST 1), la figura 30 muestra una delección/SNP de 12 pb homocigótica (- normal, - - - GIST 2), la figura 31 muestra una duplicación en tándem heterocigótica (36 pb) (- normal, - - - GIST 3) y la figura 32 muestra una delección heterocigótica (54 pb) (- normal, ---- GIST 4).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

SYBR® Green I es un colorante ampliamente utilizado en el análisis de fusión ya que muestra un gran cambio de fluorescencia durante la PCR (Wittwer CT, y otros, BioTechniques 1997; 22:130-1, 134-8; Wittwer CT, y otros, Real-Time PCR. In: Persing D, y otros, eds. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. ASM Press, 2004: in press). El SYBR® Green I se utilizó por primera vez en los análisis de fusión para distinguir diferentes productos de la PCR cuya diferencia de temperatura de fusión (T_m) era de 2°C o más (Ririe KM, y otros, Anal Biochem 1997; 245:154-160). A continuación, se utilizó el SYBR® Green I para identificar delecciones (Aoshima T, y otros, Clin Chem 2000; 46:119-22), repeticiones de dinucleótidos en el genotipo (Marziliano N, y otros, Clin Chem 2000; 46:423-5), e identificar diversas alteraciones en una secuencia (Lipsky RH, y otros, Clin Chem 2001; 47:635-44; Pirulli D, y otros, Clin Chem 2000; 46:1842-4; Tanriverdi S, y otros J Clin Microbiol. 2002; 40:3237-44; Hladnik U, y otros, Clin Exp Med. 2002; 2105-8). Sin embargo, la diferencia de temperatura de fusión entre dos genotipos puede ser pequeña y puede cuestionar la calidad de la resolución de los instrumentos actuales. De hecho, se ha sugerido que SYBR® Green I, "no se debe utilizar en aplicaciones rutinarias de genotipado" (von Ahsen N, y otros, Clin Chem 2001; 47:1331-1332). El genotipado de curvas de fusión mediante los colorantes específicos de ADN de doble cadena que se utiliza habitualmente puede llevar a un aumento de la T_m y una ampliación de la transición de fusión (Douthart RJ, y otros, Biochemistry 1973; 12:214-20), y reducción de la diferencia de T_m entre genotipos (figura 5D). Dichos factores disminuyen el potencial de SYBR® Green I en la discriminación de genotipos.

El ADN heterocigoto se forma a partir de cuatro cadenas simples diferentes y puede originar dos productos en forma de homodúplex o de heterodúplex cuando se desnaturaliza y se enfría. Teóricamente dichos cuatro productos tienen T_m diferentes y su curva de fusión debe ser una combinación de las cuatro dobles cadenas a cadenas simples. Sin embargo, los colorantes específicos de ADN de doble cadena se pueden redistribuir durante la fusión (Aktipis S, y otros, *Biochemistry* 1975; 14:326-31), provocando de esta manera la liberación de colorante de los heterodúplex de baja fusión y la redistribución a los homodúplex de alta fusión. Dado que SYBR[®] Green I no es un producto saturante a concentraciones compatibles con la PCR (Wittwer CT, y otros, *BioTechniques* 1997; 22:130-1, 134-8; figura 9), dicha redistribución es plausible y coherente con la falta de una transición de heterodúplex (figura 5D).

Los colorantes se pueden utilizar para aplicaciones de genotipado y cribado. Cuando solo se amplifica un producto de PCR y su secuencia es homocigótica, solamente se forman homodúplex. Mediante los colorantes descritos, no se reducen las diferencias de T_m entre diferentes genotipos de homodúplex (figura 5C) y se puede realizar una separación clara entre genotipos, incluso en el caso de los SNP. Los colorantes también pueden identificar y distinguir varios productos presentes en una reacción, por ejemplo, homodúplex producidos durante la amplificación de varios loci o varias dianas homocigóticas. En cambio, en la mayor parte de los casos solo se pueden observar pocos productos con SYBR[®] Green I y supuestamente se debe a la redistribución del colorante (véase figura 7A).

Cuando se amplifican una o más dianas heterocigóticas, los productos heterodúplex se pueden observar fácilmente con los colorantes. La capacidad de detectar e identificar heterodúplex es especialmente útil para detectar genotipos heterocigóticos así como para cribar mutaciones desconocidas. Este proceso no se puede llevar a cabo con los colorantes habituales de ADN que se utilizan con PCR en tiempo real, tales como SYBR[®] Green I, SYBR[®] Gold, o bromuro de etidio, ya que no se pueden observar los productos en forma de heterodúplex.

Las cadenas de heterodúplex se pueden volver a unir con su cadena complementaria exacta y formar homodúplex durante el proceso de fusión. Dicha unión se produce rápidamente ya que la concentración de productos al final de la PCR es elevada. Este proceso se puede minimizar limitando el tiempo en que dichos productos están a una temperatura cercana a su temperatura de fusión, especialmente entre las T_m de los productos en forma de heterodúplex y homodúplex. Además de la reunión de cadenas durante la fusión, las velocidades de enfriamiento influyen la hibridación selectiva de una cadena con su cadena complementaria exacta o con su cadena complementaria no correspondiente. En las condiciones que se detallan en el presente documento, la formación de heterodúplex se ve favorecida por una velocidad de enfriamiento elevada y a menudo desaparece en velocidades inferiores a $-0,1^\circ\text{C/s}$ (figura 2). Este comportamiento difiere con las técnicas de desnaturalización HPLC, en las que las velocidades de enfriamiento son muy inferiores (de $-0,01$ a aproximadamente $-0,02^\circ\text{C/s}$), sin embargo, se produce una formación eficiente de heterodúplex (Xiao W, y otros, *Hum Mutat* 2001; 17:439-74). Quizás las tasas relativas de formación de heterodúplex y homodúplex son muy dependientes del tamaño del producto y los resultados que se obtienen al utilizar amplicones pequeños no son los habituales en los productos de mayor tamaño que se utilizan normalmente en dHPLC.

La diferenciación entre genotipos homocigóticos se puede mejorar realizando la fusión a velocidades inferiores, a cambio de utilizar tiempos de análisis mayores. Una fuente de error potencial en el genotipado mediante curvas de fusión es el efecto de la concentración de ADN en la T_m . Si se utiliza un amplicón al azar de 100 pb con un contenido del 50% de GC en condiciones de PCR, la diferencia de T_m entre los productos a una concentración de $0,05\ \mu\text{M}$ y $0,5\ \mu\text{M}$ es de aproximadamente $0,7^\circ\text{C}$ (von Ahlsen N, y otros, *Clin Chem* 2001; 47:1956-61). Esta diferencia puede ser importante cuando las T_m de distintos genotipos homocigóticos son muy cercanas. Sin embargo, diferentes muestras de PCR tienen tendencia a llegar a la meseta a la misma concentración de producto, por lo que las diferencias de concentración tras la amplificación suelen ser mínimas. Además, también se pueden estimar las concentraciones de amplicón mediante fluorescencia en tiempo real y al ajustar las T_m para obtener todavía más precisión de genotipado. De forma alternativa, se puede utilizar la PCR asimétrica para limitar automáticamente la concentración final del producto de la PCR.

Con los colorantes descritos en el presente documento, se pueden distinguir todos los heterocigotos de una sola base de los homocigotos. Cuando se detectan heterocigotos, la temperatura absoluta de fusión y la influencia de la concentración de ADN no son tan importantes como en los métodos que implican diferenciación entre genotipos homocigóticos. La presencia de heterodúplex afecta a la forma de la curva de fusión, especialmente en la zona "temprana" de baja temperatura de la transición. Se pueden relacionar mediante temperatura diferentes curvas de fusión al trasladar el eje X y superponerlo sobre la "última" parte a elevada temperatura de la transición. La presencia o ausencia de heterodúplex se puede deducir con gran precisión. De este modo, incluso en muestras obtenidas sin amplificación por PCR, puede no ser esencial la atención a la concentración de ADN.

Sea cual sea la precisión del instrumento, la T_m de algunos genotipos será prácticamente idéntica. Un método para detectar variantes de homocigotos con la misma T_m es mezclar dichas variantes. Los heterodúplex resultantes se fusionarán a temperaturas inferiores a las de los homodúplex y se mostrarán como una caída en las curvas de fusión normalizadas justo antes de la transición de fusión principal.

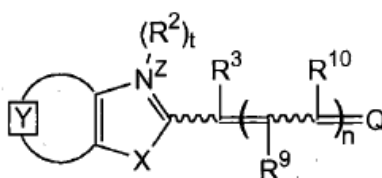
De este modo, utilizando los dispositivos de PCR presentes actualmente, los colorantes de la presente invención pueden identificar heterodúplex en transiciones de curvas de fusión que no se pueden identificar actualmente

mediante la utilización de SYBR® Green I. En la figura 7A se muestra una posible razón por la cual con SYBR® Green I no se puede identificar fácilmente las transiciones de fusión bajas. Cuando se encuentran varios fragmentos de ADN de estabilidad creciente, los picos a baja temperatura con SYBR® Green I son de muy reducido tamaño, en comparación con colorantes como el colorante S5 (su estructura se muestra en el ejemplo 1). Durante la fusión SYBR® Green I puede liberarse de los dúplex a baja temperatura, para unirse con los dúplex que llegan a fusión a temperaturas más elevadas. Este hecho provoca que cada pico sucesivo sea superior al previo y que los picos a bajas temperaturas sean muy pequeños, si es que se pueden observar en las curvas. En la figura 7B se puede observar que los productos de fusión a baja temperatura se detectan con facilidad mediante el colorante S5, pero no con SYBR® Green I.

Las ventajas de la utilización del colorante S5 han llevado a la identificación de otros colorantes de ADNdc que son compatibles con PCR y que son adecuados para el genotipado a concentraciones compatibles con PCR. Muchos de los colorantes útiles para los métodos descritos pertenecen a la familia de las cianinas. Los colorantes de cianina son aquellos colorantes que contienen uno o más residuos bivalentes "-C(R)=", dispuestos en una cadena que une dos heterociclos que contienen nitrógeno. El grupo "R" puede ser hidrógeno o cualquier sustituyente de carbono y a modo de ejemplo, hidrógeno o alquilo, incluyendo alquilo C₁₋₆, que puede estar sustituido opcionalmente. Se entiende que en los colorantes de cianina donde existe más de un residuo bivalente "-C(R)=", cada "R" se puede seleccionar de forma independiente. Dichos colorantes de cianina pueden ser monómeros o dímeros, tal como se describirá más adelante en la fórmula general de ejemplo del presente documento. Muchas variantes de cianina, por ejemplo colorantes en los que la fracción bivalente es =N-, -C(R)=N- o similares, también son adecuadas. Además de los colorantes de cianina, en el presente documento también se contemplan otras familias de colorantes de unión a ADNdc que son útiles en mezclas, métodos y composiciones para reacciones de PCR descritos en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse a los mismos, colorantes basados en acridina, intercaladores de fenantridinio y metalointercaladores a base de fenantrolina.

Algunos ejemplos de colorantes útiles para la presente reacción de PCR y mezclas, métodos y composiciones para curvas de fusión incluyen, PO-PRO®-1, BO-PRO®-1, SYTO®9, SYTO®43, SYTO®44, SYTO®45, SYTOX® Blue, POPO®-1, POPO®-3, BOBO®-1, BOBO®-3, LO-PRO®-1, JO-PRO®-1, YO-PRO®-1, TO-PRO®-1, SYTO® 11, SYTO® 13, SYTO® 15, SYTO® 16, SYTO® 20, SYTO® 23, TOTO®-3, YOYO®-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), GelStar® (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME), naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI), EvaGreen® (Biotum, Hayward, CA), BEBO, BETO, BOXTO (TATAA Biocenter AB., Göteborg, Suecia), y varios colorantes nuevos descritos en el presente documento, la mayoría de los cuales son colorantes de saturación.

Los colorantes de cianina de la presente invención para utilizar en mezclas, métodos y composiciones de la reacción de PCR descritos en el presente documento se corresponden generalmente con la fórmula I:



Fórmula I

en la que

el residuo $\boxed{Y}$ representa un anillo aromático fusionado o heteroaromático que contiene nitrógeno, opcionalmente sustituido;

X es oxígeno, azufre, selenio, telurio o un grupo seleccionado entre C(CH₃)₂ y NR¹, en el que R¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆, incluyendo alquilo C₂₋₆;

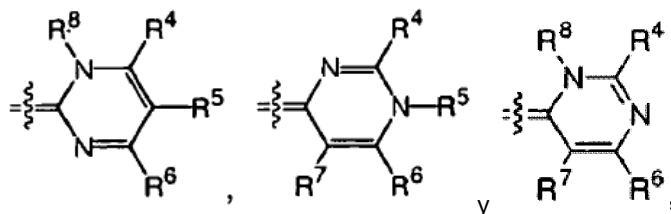
R² se selecciona entre alquilo C₁₋₆ (incluyendo alquilo C₂₋₆), cicloalquilo C₃₋₈, arilo, incluyendo arilo(alquilo C₁₋₃), hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono y dialquilaminoalquilo, trialquilamonioalquilo, alquilencarboxilato, alquilencarboxamida, alquilensulfonato, ácido alquilensulfónico, un residuo que contiene un heteroátomo cíclico opcionalmente sustituido, o un residuo que contiene un heteroátomo acíclico, opcionalmente sustituido, entre los ejemplos de residuos que contienen un heteroátomo se incluyen heteroalquilo, opcionalmente sustituido, incluyendo metoximetilo, etoxietilo; y similares, heterociclo, incluyendo piperidinilo y similares, alquil y arilsulfonatos, incluyendo metilsulfonato, 4-clorofenilsulfonato, y similares, alcoxi, incluyendo metoxi, etoxi, y similares, amino, incluyendo metilamino, dimetilamino, y similares, derivados de carbonilo, incluyendo alquil y arilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, alcoxicarbonilo, y similares, heteroalquenilo, incluyendo alquenilaminoalquilo, alqueniloxialquilo, alquilaminoalquenilo, alquiloxialquenilo, alquilidenaminoalquilo, y similares, heteroalilo, ésteres, aminas, amidas, enlaces fósforo-oxígeno y fósforo-azufre; e incluyendo residuos que contienen un heteroátomo, tal como se dan a conocer en la patente de Estados Unidos No. 5.658.751 y la publicación PCT No. WO 00/66664;

t = 0 ó 1;

Z es una carga seleccionada entre 0 y 1;

R^3 , R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_{1-6} , incluyendo alquilo C_{2-6} y arilcarbonilo; $n = 0, 1 \text{ ó } 2$; y

Q es un heterociclo seleccionado del grupo de estructuras que comprende:



El término "alquilo", tal como se utiliza en el presente documento generalmente se refiere a un residuo de hidrocarburo lineal u opcionalmente ramificado que incluye de 1 a 12 átomos de carbono, por ejemplo incluyendo pero sin limitarse a los mismos, metilo (Me), etilo, propilo, butilo, dodecilo, 4-etilpentilo, y similares.

El término "cicloalquilo" tal y como se utiliza en el presente documento generalmente se refiere a un residuo de hidrocarburo lineal u opcionalmente ramificado, en el que, como mínimo, una parte de este forma uno o dos anillos, incluyendo de 3 a aproximadamente 14 átomos de carbono, por ejemplo incluyendo pero sin limitarse a los mismos, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, 4-metilciclohexilo, 2,3-dimetilciclopentilo, 3,5-dimetilciclohexiletilo, y similares.

El término "arilo" tal y como se utiliza en el presente documento generalmente se refiere a un residuo aromático cíclico, por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a los mismos, fenilo (Ph), naftilo, furilo, tienilo, pirrolo, pirazolo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirinidilo, piridacinilo, pirimidinilo, piracinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, quinazalinilo, y similares.

El término "opcionalmente sustituido" tal como se utiliza en el presente documento generalmente se refiere a la sustitución opcional de uno o más átomos de hidrógeno o parejas de electrones solitarios presentes en el grupo parental, incluyendo aquellos presentes en átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre, con un sustituyente, tal como halo; hidroxilo; amino; tio; sulfonato; nitrilo; alquilnitrilo; alquilnitrilitio; alquilo, cicloalquilo, haloalquilo, halocicloalquilo; alcoxi, cicloalcoxi, haloalcoxi; monoalquilo y dialquilamino; trialquilamino; aminoalquilo; monoalquilo y dialquilaminoalquilo; triaminoalquilo; trialquilaminoalquilo, alquiltio; cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, nucleosidiltio; alquilo, haloalquilo, cicloalquilo y arilcarbonilo; arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio; trialquilaminoalquilcarboniltio; alquilo, haloalquilo, cicloalquilo y arilcarbonilo; alquilo, haloalquilo, cicloalquilo y arilsulfonilo; ftalamido; benzotiazolio o naftotiazolio; benzoxazolilo o naftoxazolilo; y derivados de carboxilo, tales como ácidos carboxílicos, ésteres, tioésteres y amidas. Se aprecia que la sustitución de átomos de hidrógeno proximal, incluyendo hidrógenos geminales y vecinales, pueda ser tal que los sustituyentes que sustituyen a aquellos hidrógenos proximales se toman conjuntamente para formar un anillo espiro o un anillo fusionado, respectivamente.

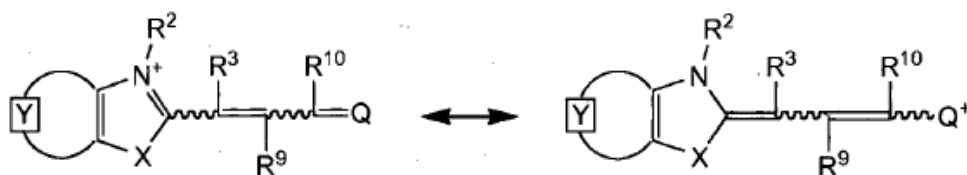
Se aprecia que cada uno de los términos descritos anteriormente se puede utilizar en combinación de maneras químicas relevantes para referirse a otros residuos, tales como arilalquilo que hace referencia a un grupo arilo como se define en el presente documento unido a un grupo alquilo como se define en el presente documento para formar estructuras, incluyendo, pero sin limitación a los mismos, bencilo, fenetilo, picolinilo, 3,5- dimetoxipicolin-4-ilo, y similares.

Se aprecia que las estructuras de colorantes de cianina descritas en el presente documento pueden contener centros quirales. En tales casos, se entiende que todos los estereoisómeros se incluyen en la descripción de estas estructuras de colorantes de cianina, si no se especifica lo contrario. Dichos estereoisómeros incluyen isómeros activos ópticamente puros, mezclas racémicas y mezclas de diastereoisómeros que contienen una cantidad relativa de una o más configuraciones estereoisoméricas.

También se aprecia que las estructuras de colorantes de cianina descritas en el presente documento puedan contener centros geométricos. En tales casos, se entiende que todos los isómeros geométricos se incluyen en la descripción de estas estructuras de colorantes de cianina, si no se especifica lo contrario. Dichos isómeros geométricos incluyen isómeros *cis*, *trans*, E y Z, ya sea en su forma pura o en varias mezclas de configuraciones geométricas. También se entiende que dependiendo de la naturaleza de los dobles enlaces presentes en las estructuras de colorantes de cianina, tales isómeros de doble enlace se pueden interconvertir entre las configuraciones *cis* y *trans*, E y Z dependiendo de las condiciones, tales como la composición del disolvente, la polaridad del disolvente, la fuerza iónica, y similares.

También se aprecia que si la carga de Z es superior a 0, pueden existir varias estructuras de resonancia de los compuestos de la fórmula I. A modo de ejemplo, la carga de Z se puede encontrar en el átomo de nitrógeno como se representa en la fórmula I o, de forma alternativa, la carga se puede localizar en el heterociclo Q. Las estructuras de

resonancia de los compuestos cargados de la fórmula I se pueden representar al reorganizar la configuración de doble enlace-enlace simple de los compuestos de la fórmula I, tal y como en las estructuras de ejemplo:

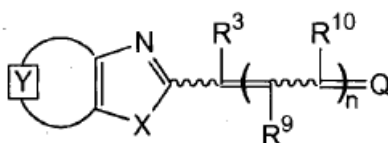


en las que $\bar{Y}$, X, R^2 , R^3 , R^9 , R^{10} y Q se definen según la fórmula I, y $t=1$, $Z=1$ y $n=1$. Los compuestos de colorantes de cianina descritos en el presente documento incluyen cualquiera de las varias estructuras de resonancia posibles. Se entiende que la ubicación de la carga formal y, por consiguiente, la estructura de resonancia más probable, este influenciada por la naturaleza de los residuos $\bar{Y}$, X, R^2 , R^3 , R^9 , R^{10} y Q.

También se entiende que cuando los compuestos de la fórmula I tienen una carga neta, como cuando Z es 1, o cuando uno de los compuestos de la fórmula I tiene un sustituyente con una carga, como el grupo amonio, o un grupo de ácido sulfónico, dichos compuestos de la fórmula I están acompañados por un contraión. Cualquier contraión monovalente, bivalente o polivalente está incluido en la descripción de las estructuras de colorantes de cianina descritas en el presente documento. Entre los contraiones de ejemplo se pueden incluir contraiones de carga negativa, tales como yoduro, cloruro, bromuro, hidróxido, óxido, acetato, trifluoroacetato, monofosfato, difosfato, trifosfato, y similares, e iones de carga positiva como litio, potasio, cesio, amonio, polialquilamonio, y similares. Dichos contraiones pueden aparecer a raíz de los métodos de síntesis utilizados, el protocolo de purificación u otros procesos de intercambio de iones.

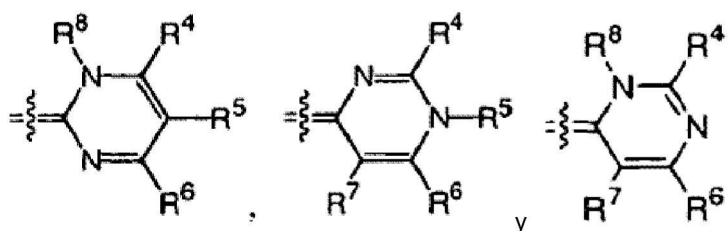
Se entiende que la naturaleza o tipo de contraión no influencia la funcionalidad de los colorantes de cianina descritos en el presente documento. Se aprecia que cuando los colorantes descritos en el presente documento se disuelven en disolventes u otros medios para realizar mezclas, métodos o composiciones para la reacción de PCR descritos en el presente documento, el contraión acompañante pueda intercambiar con otros contraiones presentes en los disolventes u otros medios. Dichos contraiones adicionales pueden ser iones del disolvente, sales, tampones y/o metales.

Se aprecia que el grupo R^2 es un grupo que surge de la reacción nucleofílica entre el compuesto parental de la fórmula I, en la que $t=Z=0$:



y un compuesto con la fórmula R^2-L , en el que L es un grupo saliente adecuado, y R^2 es tal y como se ha definido anteriormente. A modo de ejemplo, R^2 es un alquilo opcionalmente sustituido, acilo, arilo, ácido sulfónico, o grupo sulfonilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. Entre los grupos salientes L de ejemplo se incluyen, pero sin limitación a los mismos, haluros, tales como cloruro y bromuro, acilatos, tales como acetato, formiato y trifluoroacetato, sulfonatos, tales como metilsulfonato, trifluorometilsulfonato y tolisulfonato, sulfatos, tales como metilsulfato, y similares.

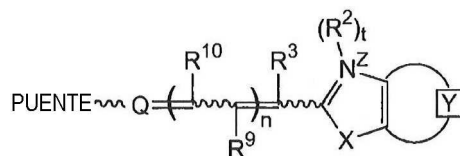
Q es un heterociclo:



En el que R^4 se selecciona del grupo que comprende arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonioalquilcarboniltio, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, trialquilamonioalquiltio, alquilnitriltio y nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido, y R^5 , R^6 , R^7 y R^8 se

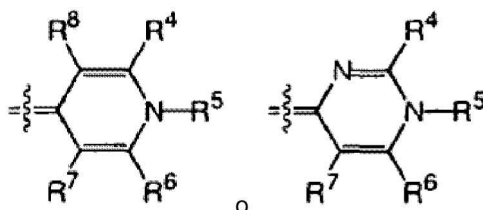
seleccionan independientemente del grupo que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo, trialquilamonioalquiltio, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, alquenoilo, polialquenoilo, alquinilo, polialquinilo, alquenilalquinilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariltio, arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonioalquilcarboniltio, dialquilamino, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente.

En otra realización de ejemplo, uno de los R^5 , R^6 , R^7 y R^8 es un grupo reactivo, seleccionado entre halógenos, hidroxilo, alcóxidos, aminas, ácidos carboxílicos, haluros, alcoholes, aldehídos, tioles, alquil y ariltioles, alquil y arilsulfonilos, ésteres de succinimidilo, cetonas e isotiocianatos que se pueden utilizar para unir los residuos al núcleo de la estructura del colorante, a modo de ejemplo, a través de la formación de enlaces carbono-carbono, aminas, amidas, éteres, tioéteres, disulfuros, cetonas, tioureas y bases de Schiff. En otra realización de ejemplo, uno de los R^5 , R^6 , R^7 y R^8 es un PUENTE-COLORANTE con la fórmula siguiente:



en el que $\boxed{Y}$, X , R^2 , t , Z , R^3 , R^9 , R^{10} , Q y n se corresponden con la definición de la fórmula I, y PUENTE es un único puente covalente, o enlace covalente lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 16 átomos no hidrogenados tales como enlaces carbono, nitrógeno, fosfato, oxígeno y azufre, de tal forma que el enlace contiene cualquier combinación de uniones alquilo, éter, tioéter, amina, éster o amida; enlaces carbono-carbono simples, dobles, triples o aromáticos; enlaces fósforo-oxígeno, fósforo-azufre, nitrógeno-nitrógeno o nitrógeno-oxígeno; o enlaces aromáticos o heteroaromáticos. Es recomendable que en algunas realizaciones, esta estructura dimérica sea simétrica respecto al PUENTE, y en otras realizaciones, dicha estructura dimérica sea asimétrica respecto al PUENTE, de manera que por ejemplo, $\boxed{Y}$, X , R^2 , t , Z , R^3 , R^9 , R^{10} y n se seleccionan independientemente en cada caso en cada lado del PUENTE.

Colorantes a modo de ejemplo según la presente invención también incluyen colorantes de cianina de la fórmula I que tienen una estructura central de pirimidinio en la que X es oxígeno o azufre; el residuo $\boxed{Y}$ representa un benzo fusionado opcionalmente sustituido, un naftaleno fusionado opcionalmente sustituido, un piridino fusionado opcionalmente sustituido, un pirimidino fusionado opcionalmente sustituido, un quinolino fusionado opcionalmente sustituido, y similares; $n = 0$ ó 1 ; $t = 0$ ó 1 ; R^2 es alquilo, tal como metilo y etilo, arilo opcionalmente sustituido, tal como fenilo o toliilo, un alquilensulfonato, tal como, ácido propilenosulfónico, o alquilsulfonilo, como $CH_3(CH_2)_mSO_2$, en el que m es 0 , 1 , 2 ó 3 ; y Q es un heterociclo seleccionado entre el grupo de estructuras que consisten en:



en las que

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

R^5 es alquilo C_{1-6} , incluyendo metilo, etilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, y similares; fenilo opcionalmente sustituido; o $(CH_2)_3N^+(Me)_3$; y

R^6 , R^7 y R^8 son cada uno, independientemente, hidrógeno o metilo.

Los colorantes a modo de ejemplo de utilización en el presente documento también incluyen colorantes de cianina de la fórmula I que tienen una estructura central de piridinio o pirimidinio en la que X es oxígeno o azufre, el residuo $\boxed{Y}$ representa un benzo fusionado opcionalmente sustituido, que forma un anillo de benzoxazolio o benzotiazolio opcionalmente sustituido, o un grupo nafto fusionado opcionalmente sustituido, que forma un anillo de naftoxazolio o naftotiazolio opcionalmente sustituido; $n = 0$ ó 1 ; $t = 0$ ó 1 ; R^2 es alquilo C_{1-6} , tal como metilo, arilo, tal como fenilo o toliilo, o un alquilensulfonato, tal como ácido propilenosulfónico Q es un heterociclo de 4-pirimidinio.

En otra realización, se unen dos compuestos de la fórmula I para formar un dímero. Los dos compuestos se unen entre ellos mediante la sustitución de uno de los sustituyentes R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} , tal y como se han descrito anteriormente, presentes en cada uno de los compuestos de la fórmula I con un único enlazador bivalente. A título de ejemplo, se toman dos compuestos de la fórmula I y se unen para formar un dímero, en el que los dos sustituyentes R^5 presentes en los dos compuestos de la fórmula I se sustituyen por un único enlazador bivalente. Se aprecia que tanto los dímeros simétricos como los asimétricos de la fórmula I se contemplan en el presente documento. En el caso de los dímeros asimétricos de los compuestos de la fórmula I, se entiende que dicha asimetría puede aparecer al formar dímeros de compuestos de la fórmula I con patrones de sustitución o heterociclos Q diferentes. Además, dicha asimetría puede aparecer al formar dímeros de compuestos de la fórmula I en los que se remplazan sustituyentes diferentes con el enlazador bivalente, como por ejemplo la sustitución de R^5 en el primer compuesto de la fórmula I y la sustitución de R^8 en un segundo compuesto de la fórmula I con el enlazador bivalente.

Las estructuras diméricas del colorante de cianina formadas por los compuestos de fórmula I también se pueden representar mediante la fórmula III:



Fórmula III

en la que

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

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

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

$t = 0$ ó 1 ;

$t' = 0$ ó 1 ;

Z y Z' son una carga que se selecciona independientemente entre 0 y 1.

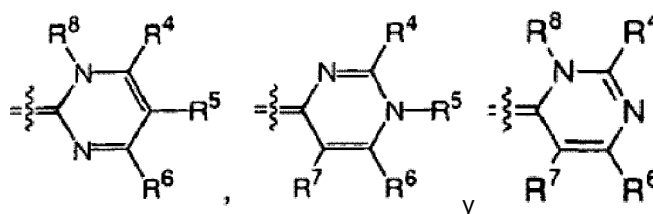
R^3 , R^9 , R^{10} , $R^{3'}$, $R^{9'}$ y $R^{10'}$ se seleccionan independientemente entre hidrógeno y alquilo C_{1-6} ;

$n = 0$, 1 ó 2 ;

$n' = 0$, 1 ó 2 ;

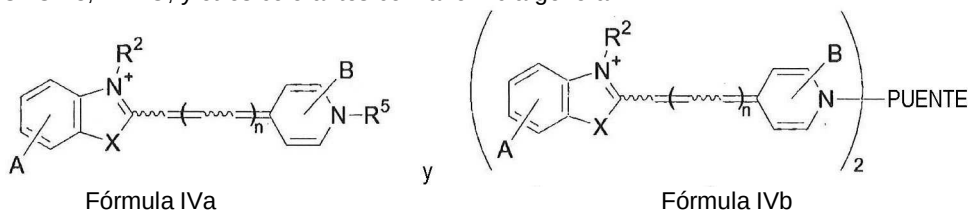
PUENTE es un enlazador bivalente que comprende entre 2 y aproximadamente 30 unidades bivalentes seleccionadas entre alquileno, heteroalquileno, alquilaminidilo, alquilalquilamoniodifilo, y similares, tales como $(CH_2)_p$, $(CH_2)_pN^+Me_2(CH_2)_q$, $(CH_2)_pN^+Me_2(CH_2)_qN^+Me_2(CH_2)_r$, y similares en los que p, q y r se seleccionan independientemente entre 1, 2 y 3; y

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

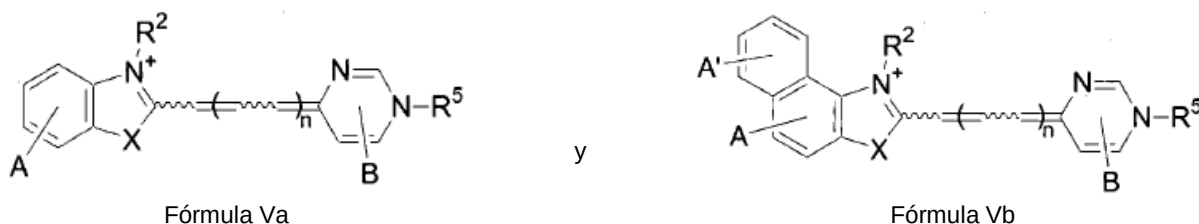


en las que R^4 se selecciona del grupo que comprende arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonioalquilcarboniltio, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, trialquilamonioalquiltio, alquilnitriltio y nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido, R^5 , R^6 , R^7 y R^8 se encuentran en cada caso en compuestos de la fórmula III seleccionados independientemente del grupo que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo, trialquilamonioalquiltio, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, polialquenilo, alquinilo, polialquinilo, alquenilalquinilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariltio, arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonioalquilcarboniltio, dialquilamino, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente.

Los colorantes de cianina útiles en las mezclas de reacción por PCR también incluyen, aunque sin limitación a los mismos S5, PO-PRO[®]-1, BO-PRO[®]-1, SYTO[®] 43, SYTO[®] 44, SYTO[®] 45, SYTOX[®] Blue, POPO[®]-1, POPO[®]-3, BOBO[®]-1, BOBO[®]-3, BEBO, y otros colorantes con la fórmula general IV:



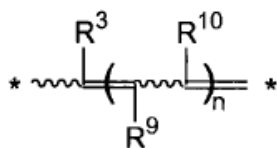
y varios colorantes nuevos que se han descrito en el ejemplo 1, y otros colorantes con la fórmula general V:



en los que n es 0, 1 ó 2; R² es alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono y dialquilaminoalquilo, trialquilamonioalquilo, alquilencarboxilato, alquilencarboxamida, alquilensulfonato, y similares; R⁵ es alquilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono o dialquilaminoalquilo, trialquilamonioalquilo, alquilencarboxilato, alquilencarboxamida, alquilensulfonato, fenilo sustituido opcionalmente, y similares; X es oxígeno o azufre; A, A' y B representan cada una de ellas uno o más sustituyentes opcionales seleccionados independientemente, tales como alquilo, halo, amino, haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquil y arilsulfonilo, haloalquilosulfonilo, alquil y ariltio, formilo, alquil y arilcarbonilo, derivados de carboxilo, mono y dialquilamino, trialquilamino, dialquilaminoalquilo, trialquilamonioalquilo, trialquilamonioalquiltio, alquilnitrilitio, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, polialquenilo, alquinilo, polialquinilo, alquenilalquinilo, arilo, heteroarilo, arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonioalquilcarboniltio, dialquilamino, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, nucleosidiltio, o un heterociclo incluyendo pirrolidino, piperidino, piperacino, benzotiazolio, benzoxazolio, ftalimido, nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente por alquilo, amino, mono o dialquilaminoalquilo, trialquilamonioalquilo o se puede cuaternizar opcionalmente en el nitrógeno con un grupo alquilo, y similares; y el PUENTE es un enlazador bivalente con la fórmula (CH₂)_pN⁺Me₂(CH₂)_q, en la que p y q son independientemente 2 ó 3, que incluye el enlazador bivalente (CH₂)₃N⁺Me₂(CH₂)₃. Se entiende que cuando dichos colorantes tienen una carga neta, les acompañan uno o varios contraiones, incluyendo contraaniones como haluro, alcanato, fosfato, y similares, y contracaciones que incluyen litio, sodio, potasio, cesio, amonio, y similares.

Los resultados iniciales indican que S5, PO-PRO[®]-1, JO-PRO[®]-1, BO-PRO[®]-1, G5, H5, S5, D6, E6, P6, R6, Y6, Z6, N7, O7, P7, Q7, R7, T7, V7, Z7, G8, L8, P8, T8, V8, W8, Z8, A9, C9, G9, I9, I9Met, J9, J9Met, K9, L9, L9Met, M9, N9, O9, P9 y V10 son colorantes bastante prometedores en la detección de heterodúplex. Estos colorantes tienen varias características sorprendentes. En primer lugar, no inhiben significativamente la reacción de PCR a una saturación del 50%. De hecho, en la mayoría de dichos colorantes, los niveles de saturación bastante cercanos al 100% son compatibles con la PCR. En segundo lugar, a pesar de que ciertos de estos colorantes emitan en el rango de los azules, son compatibles con la utilización en el canal de la fluorescencia de varios de los instrumentos disponibles actualmente. El ajuste de los parámetros ópticos para corresponderse mejor con los espectros de excitación y emisión de estos colorantes puede mejorar adicionalmente la sensibilidad para su utilización en análisis de amplificación cuantitativo o cualitativo.

No se ha demostrado que algunas cianinas asimétricas basadas en quinolinio, tales como SYBR[®] Green I, SYTOX[®] Green, SYTO[®] 14, SYTO[®] 21, SYTO[®] 24, SYTO[®] 25, TOTO[®]-1, YOYO[®]-1, pero sin limitación a las mismas, sean útiles en la detección de heterodúplex o de productos múltiples en un sistema en tubo cerrado de algunas que incluyen pero no se limitan a. Cuando el colorante es un monómero de una cianina basada en quinolinio, es posible que las sustituciones voluminosas en el carbono que se encuentra al lado del nitrógeno del anillo de quinolinio (posición equivalente a R⁴) interfieran con la capacidad del colorante de actuar en las funciones de la presente invención. Algunos ejemplos de sustituciones voluminosas son, por ejemplo, residuos aromáticos o alifáticos que contienen heteroátomos y ramificaciones de cadenas largas sustituidos con residuos alifáticos de cadenas ramificadas superiores a un peso molecular de aproximadamente 105. Dicha restricción, sin embargo, no se pueden aplicar a ninguna de las cianinas de piridinio o pirimidinio citadas anteriormente. En caso de dímeros de cianina basados en quinolinio, la distancia entre los sistemas de anillo de la derecha y de la izquierda, tal como define el fragmento bivalente siguiente:



también modifica la funcionalidad. La funcionalidad se puede determinar según la detección de heterodúplex, tal y como se describe previamente en el presente documento en el ejemplo 1. Otros colorantes que se han descrito previamente como útiles en el seguimiento de la PCR en tiempo real, como SYBR® Gold, Pico Green y bromuro de etidio, han resultado no ser eficaces en la detección de heterodúplex en sistemas de PCR en tubo cerrado.

Los colorantes se pueden utilizar en un método basado en colorantes para el genotipado de SNP, requiriendo solamente dos cebadores de oligonucleótidos sin marcaje y un pocillo para cada genotipo de SNP, y sin necesidad de PCR en tiempo real. Se utiliza un colorante específico de ADNdc para identificar dichos heterocigotos mediante la presencia de heterodúplex que alteran la forma de la curva de fusión posterior a la amplificación. Los genotipos homocigóticos diferentes se pueden distinguir por la diferencia de T_m , o de forma alternativa al mezclar una muestra de ADN homocigoto conocido con el no conocido y buscando los heterodúplex. A título de ejemplo, el diseño de cebadores para PCR resulta mucho más simple porque se pueden utilizar amplicones muy cortos, preferentemente que flanqueen directamente el SNP. Dichos amplicones muy cortos son capaces de amplificar muy eficientemente, reducen el riesgo de amplificar dianas alternativas, y permiten realizar ciclos térmicos muy rápidos.

El diseño de cebadores de PCR no es muy preciso, y a menudo es necesario un proceso de prueba y error. A pesar de que en general se aceptan ciertas reglas en el diseño de cebadores para PCR, no se ha analizado su validez. Teniendo en cuenta que el efecto de fenotipos diferentes en las curvas de fusión es mayor si se utilizan amplicones cortos, es preferente utilizar dichos amplicones cortos (≤ 100 pb), y los amplicones más cortos posibles acostumbran a ser los más eficaces (≤ 50 pb). Por este motivo, para diseñar cebadores para el genotipado con colorantes específicos de ADNdc un ejemplo empieza con cada cebador que flanquea al lado de la posición del SNP. Es decir, que la longitud del amplicón equivaldrá a la del cebador 1, más la longitud del cebador 2, más la longitud de la región que se desea analizar (la longitud de un SNP es 1). Para llevar a cabo una amplificación eficiente, la temperatura de fusión (T_m) de los dos cebadores debe ser prácticamente la misma. Las T_m adecuadas para los cebadores puede ser de 50°C a 70°C . Los cebadores con la T_m más elevada permitirán realizar los ciclos térmicos más rápidos, mientras que los cebadores con una T_m inferior tienen habitualmente un coste inferior y producen los amplicones más cortos, lo que da lugar a mayores diferencias de genotipado. Normalmente se utilizan cebadores con una longitud de 12 a 30 bases. A modo de ejemplo, cada cebador se construye lejos del SNP hasta que la T_m calculada se acerca a la T_m deseada. Los métodos de cálculo de la T_m se conocen bien en la materia (por ejemplo, Clin. Chem. 2001; 47:1956-61). En general, cuando se procura igualar al máximo las T_m , las longitudes de los cebadores no serán las mismas. Por ejemplo, las longitudes del cebador utilizado en el ensayo del SNP del Factor V (figura 1) son de 17 y 24 bases con una T_m coincidente cercana a 62°C .

Los parámetros de los ciclos térmicos de la amplificación pueden ser muy breves porque no se necesita una extensión del cebador muy importante para unos amplicones tan cortos. Tras la desnaturalización inicial del ADN genómico previa al ciclo térmico, no es necesario mantener las temperaturas de desnaturalización y alineamiento, y el tiempo de extensión puede ser de 10 segundos o menos. Incluso es posible reducir a 0 el tiempo de extensión, programado, permitiendo de este modo que cada ciclo se desarrolle en menos de 20 segundos. De forma alternativa, también se puede utilizar un tiempo de extensión de 1 segundo. Teniendo en cuenta que el amplicón es tan reducido, no se necesitan grandes cantidades de polimerasa (se pueden utilizar $< 0,6$ unidades por $10 \mu\text{l}$).

Por consiguiente, se pueden seguir los siguientes pasos, a modo de ejemplo, para realizar el genotipado de SNP según la presente invención:

1. Escoger una T_m y empezar por el extremo 3' de cada cebador justo al lado de la posición del SNP. De forma opcional, se puede desplazar ligeramente un cebador de la posición del SNP para evitar la complementariedad 3' entre los cebadores y así disminuir el riesgo de la formación de dímeros de cebadores.
2. Diseñar cada cebador hacia el exterior hasta que la T_m calculada sea lo más cercana posible a la T_m diana.
3. Realizar rápidamente un ciclo térmico con la muestra en presencia de reactivos de PCR y añadir colorantes para ADNdc que permitan detectar heterodúplex.
4. Formación de heterodúplex al enfriar rápidamente a una velocidad, como mínimo, de $-0,1^\circ\text{C/s}$, preferentemente, como mínimo, de -2°C/s , y más preferentemente, como mínimo, de -5°C/s , tras la desnaturalización.
5. Calentar de $0,1$ a $0,5^\circ\text{C/s}$ y obtener una curva de fusión.

6. Si la amplificación no se realiza correctamente, se debe desplazar el extremo 3' de uno de los cebadores 1 base y repetir todos los pasos hasta llevar a cabo correctamente la amplificación.

- 5 En un ejemplo se pueden detectar todos los heterocigotos mediante el efecto de los heterodúplex en la curva de fusión (figura 4). Además, 4 de cada 6 diferencias homocigóticas (A vs. C, A vs. G, C vs. T y G vs. T) se pudieron distinguir muy fácilmente mediante los cambios de T_m (figura 4, flechas). Sin embargo, para distinguir homocigotos A vs. T de homocigotos C vs. G, normalmente se necesita una curva de fusión de alta resolución, y en algunos casos, incluso con las curvas de fusión de alta resolución disponibles actualmente tampoco se pueden diferenciar dichos homocigotos. Si se considera la frecuencia de los SNP en el genoma humano, en el 84% de los SNP es sencillo distinguir los homocigotos (A vs. C, A vs. G, C vs. T y G vs. T), mientras que el 16% resulta más complicado (A vs. T y C vs. G). De hecho, en el 4% de los casos (una cuarta parte de 16%), el cálculo de la estabilidad mediante el análisis de la base vecina más cercana, indica que las estabilidades son idénticas a causa de la simetría de las bases vecinas. En la tabla 1 se muestran las frecuencias exactas, en la que se clasifican los SNP según si producen homodúplex o heterodúplex. En los casos en los que es difícil distinguir los homocigotos, es preferente la utilización de sonda sin marcaje para realizar un genotipado completo y robusta.

Tabla 1^a.

Clase	Heterocigoto SNP (frecuencia) ^b	Homodúplex coincidentes (núm. de T _m)	Heterodúplex no coincidentes (núm. de T _m)
1	C vs. T o G vs. A (0,675)	C::G y A::T (2)	C::A y T::G (2)
2	C vs. A o G vs. T (0,169)	C::G y A::T (2)	C::T y A::G (2)
3	C vs. G (0,086)	C::G (2 ó 1) ^c	C::C y G::G (2)
4	T vs. A (0,070)	A::T (2 ó 1) ^c	T::T y A::A (2)

^aLos heterocigotos SNP se especifican escribiendo las bases alternadas separadas por "vs.", por ejemplo C vs. T significa que un alelo tiene una C y el otro una T en la misma posición de la misma cadena. No hay preferencias entre un alelo o el otro, es decir, C vs. T equivale a T vs. C. El apareamiento de bases (ya sea coincidente o no coincidente) se indica mediante dos puntos dobles y no es direccional. Es decir, C::G indica un par de bases G::C sin especificar qué base se encuentra en qué cadena.

^bLas frecuencias de SNP en el ser humano se obtuvieron del conjunto de datos Kwok según se ha descrito en Venter JC, y otros. The sequence of the human genome. Science 2001; 291:1304-51).

^cEl número de dúplex termodinámicos pronosticados dependen de la simetría de la base vecina más cercana cerca del cambio de base. Una cuarta parte de las veces se puede predecir la simetría de la base vecina más cercana, es decir, se flanquea la posición del cambio de base a cada lado mediante bases complementarias. Por ejemplo, si una A y una T flanquean un SNP C vs. G en la misma cadena, se da simetría de la base vecina más cercana y solo se espera una T_m de homodúplex.

- 20 De forma alternativa, en los casos en que es difícil diferenciar los homocigotos, se puede mezclar un genotipo homocigoto conocido con el genotipo desconocido en proporciones iguales ya sea previamente o tras la amplificación. Se amplifica la mezcla (si no se ha amplificado previamente), se desnaturaliza y se funde. Si los genotipos son iguales, la curva de fusión de la mezcla será igual a la curva de fusión del genotipo homocigótico conocido. Si los genotipos son diferentes, aparecerán heterodúplex y se podrán identificar al observar una forma alterada en la curva de fusión.

- 25 A modo de ejemplo, se pueden utilizar amplicones cortos o sondas sin marcaje para genotipar variantes de secuencias conocidas, mientras que los amplicones de mayor longitud son de utilización preferente cuando se analiza en búsqueda de variantes desconocidas. También se puede utilizar multiplexado de amplicones. Por ejemplo, si se sabe que un fragmento más pequeño de un amplicón de mayor longitud incluye una variante de la secuencia que se está estudiando, entonces se pueden amplificar y fusionar tanto el segmento más corto como la longitud completa del amplicón en una misma reacción. Los datos de fusión del amplicón más largo darán información de análisis acerca de mutación, mientras que los datos de fusión del amplicón más corto pueden proporcionar información de genotipado. La amplificación de ambos amplicones se puede realizar simultáneamente, o mediante una PCR bifásica que amplifique el amplicón largo en la primera fase, y el amplicón o amplicones más cortos en la segunda fase, o a la inversa. Esta PCR bifásica se puede realizar diseñando la T_m y la cantidad de cada uno de los cebadores de tal forma que, al ajustar la temperatura de alineamiento de las dos fases, se produzca una amplificación preferencial de los diferentes amplicones. Cuando se espere que la señal del amplicón más largo vaya a oprimir o enmascarar la señal del amplicón más corto, se puede utilizar esta técnica bifásica para ajustar la cantidad final de cada uno de los amplicones para evitar dicho problema.

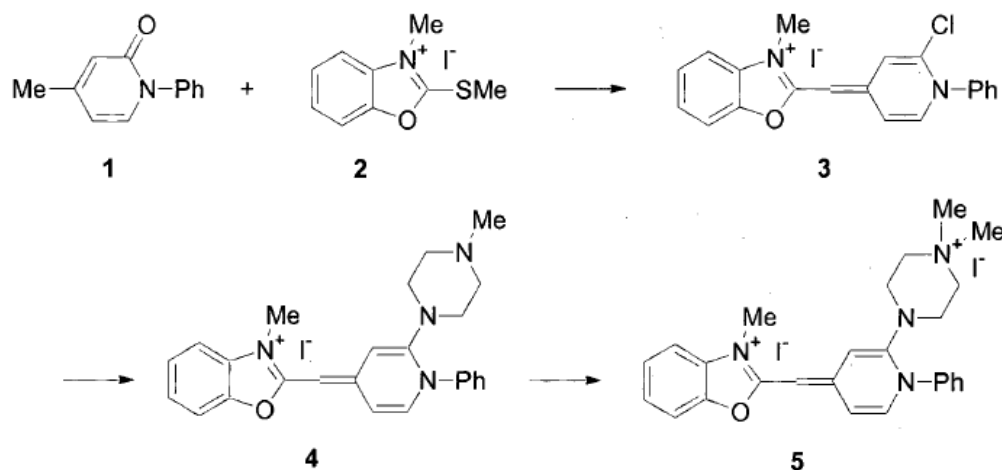
- 40 También se puede realizar el cribado o genotipado simultáneo en una única PCR si se incluyen una o más sondas sin marcaje. Se analizan tanto la transición de fusión del producto como la de la sonda. A modo de ejemplo, en primer lugar se analiza la transición de fusión de la longitud completa del producto de la PCR para detectar la presencia de cualquier heterodúplex. Cualquier diferencia en la secuencia del amplicón se debe detectar mediante este estudio de análisis. Si mediante análisis se detecta una variante de la secuencia, la transición o transiciones de fusión de la sonda o sonda sin marcaje, presentes demuestran el genotipo del locus de cada sonda. Debido a que

las sondas son de menor tamaño que el producto completo de la PCR, el genotipado mediante sondas sin marcaje es más específico que el genotipado con la totalidad del amplicón, y se pueden genotipar todos los cambios SNP en el locus de la sonda.

5 EJEMPLO 1

Síntesis de colorantes

Los colorantes de cianina asimétricos se pueden sintetizar mediante un método general que incluye la fracción de benzazolio de la molécula al residuo de piridinio (o quinolinio, pirimidinio, purinio) a través de uno o varios grupos “-C(R)=”. Tal y como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.436.134 y referencias citadas en esta, los reactivos sintéticos específicos utilizados en la síntesis determinan el número de grupos “-C(R)=”. En la síntesis de colorantes monometino ($R^3=H$, $n=0$) como el colorante S5, se utiliza una combinación de reactivos en la que los átomos de carbono metino se originan bien de A, la sal de benzazolio, bien de B, la sal de pirimidinio, siendo el grupo metilo y el otro A o B siendo el grupo saliente que habitualmente es metilitio, metilsulfonilo, o cloro, pero que puede ser cualquier grupo saliente que proporcione suficiente reactividad como para completar la reacción. Un método posible para sintetizar el colorante S5 y otros colorantes similares es el siguiente:



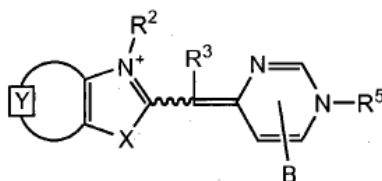
El material inicial, compuesto 1, se prepara al calentar 4-metil-2-piridinona (Aldrich) a la temperatura de reflujo con polvo de cobre, carbonato de potasio y yodobenceno durante 48 horas. La reacción se enfría a temperatura ambiente, se separa el agua del acetato de etilo, se filtra, y la capa orgánica se seca en sulfato de magnesio. El producto bruto se purifica en columna de gel de sílice, y se diluye con 1:1 acetato de etilo/hexanos para producir el compuesto 1.

Otro material inicial, el compuesto 2, se prepara al añadir 2-(metilitio)benzoxazol a yoduro de metilo en DMF y calentándolo en un tubo sellado a 150°C durante una hora y se obtiene dicho compuesto 2, en forma de sal de yoduro.

Una mezcla del compuesto 1, oxiclورو de fósforo, y una cantidad catalítica de DMF en cloruro de metileno se calienta a temperatura de reflujo durante 24 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se añade otro volumen de cloruro de metileno, seguido del compuesto 2 y un equivalente de trietilamina. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 horas. Una fracción sólida se separa por filtración y se purifica en columna de gel de sílice diluyendo con una mezcla de acetato de etilo/cloroformo/metanol. A continuación, el compuesto purificado se redisuelve en metanol y se añade a una solución en exceso de yoduro de sodio en agua. El compuesto 3 se aísla por filtración en forma de sal de yoduro y se seca al vacío.

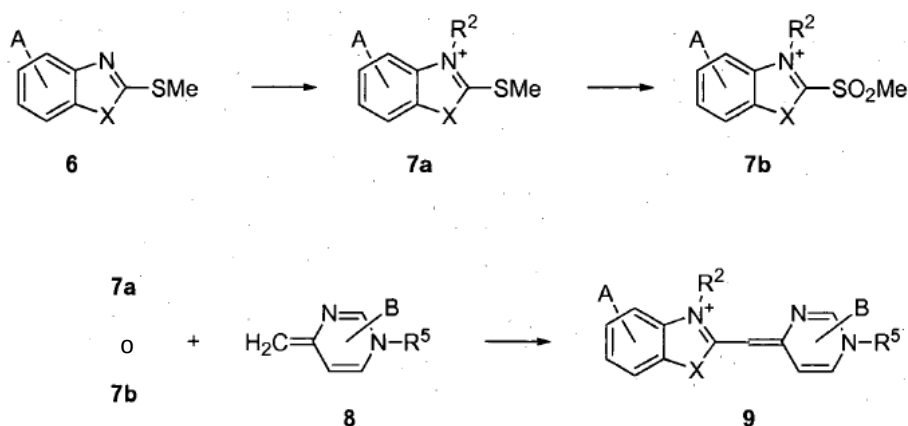
A continuación, se mezcla el compuesto 3 con 1-metilopiperacina en 1,2-dicloroetano y se calienta a 55°C durante 2 horas. A continuación, el producto resultante (compuesto 4) se cuaterniza al añadir un exceso de yoduro de metilo y una esponja de protón (Aldrich), y se espera que produzca el colorante S5 (compuesto 5) en forma de sal de diyoduro.

Además, se han preparado ciertas realizaciones de colorantes con la estructura central de pirimidinio siguiente:



en la que Y , X , R^2 , R^3 y R^5 son tal y como se ha definido previamente en la fórmula I, y B se corresponde con la fórmula V.

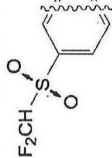
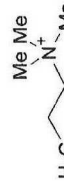
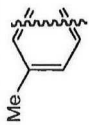
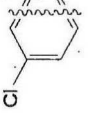
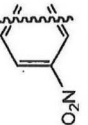
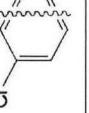
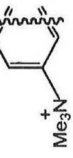
5 A pesar de que existen numerosas formas de preparar los colorantes con esta fórmula, un método es el siguiente:



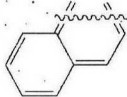
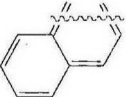
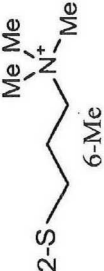
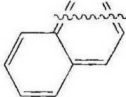
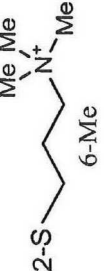
10 en el que los compuestos **6** están disponibles en el mercado, o bien se pueden sintetizar según los métodos convencionales. Los compuestos **7a** se preparan por alquilación del compuesto **6** en N(3) mediante agentes alquilantes como alquilohaluros, alquilosulfatos, y similares, en condiciones neutras o básicas, incluyendo alquillitios, aminas aromáticas y alifáticas, K_2CO_3 , y similares. De forma similar, los compuestos **7a** se preparan por arilación de **6** en N(3) por reacciones de unión aromática de haluros aromáticos, boronatos, y similares, que se catalizan mediante compuestos metálicos, como cobre, paladio, platino, y catalizadores similares. Los compuestos **7b** se preparan a partir de los compuestos **7a** mediante oxidación convencional, con reacciones que utilizan peróxido de hidrógeno, peroxiácidos, incluyendo *m*-CPBA, y similares. En algunos casos los compuestos **7a** o los compuestos **7b** están disponibles en el mercado. Los compuestos **8** están disponibles en el mercado o bien se pueden preparar, tal y como se ilustra, por condensación de 1,3-diones y ureas o tioureas correctamente sustituidas. Además, teniendo en cuenta que los compuestos **8** tienen tiol, alcoxi o aminas primarias/secundarias en C(2), se pueden modificar, por ejemplo, al reaccionar con alquilhaluros, alcoxilhaluros o cualquier reactivo con un buen grupo saliente en condiciones neutras. Los compuesto **9** se pueden preparar al hacer reaccionar los compuestos **7** y **8** en condiciones básicas, tal y como se describe en el presente documento.

25 Se prepararon compuestos de ejemplo como los descritos en el presente documento, se purificaron mediante HPLC mediante acetato de trietilamina-amonio como fase móvil, y se aislaron en forma de sus respectivas sales de acetato. Dichos compuestos de ejemplo se ilustran en la tabla 2.

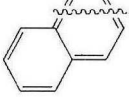
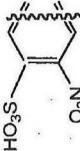
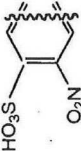
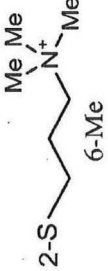
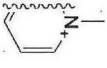
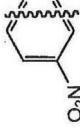
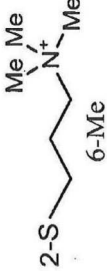
TABLA 2.

Colorante	Y	X	R ²	R ⁵	B
G5		S	Ph		H
H5		S	Me		H
I5		S			H
K5		S	Me		H
L5		S	Me		H
D6		S	Me		H
E6		O	Me		H
P6		S			H
R6		S	Me		H

(continuación)

Colorante	Y	X	R ²	R ⁵	B
Y6		O	Me		H
Z6		S	Me		H
F7		S	Me	Ph	2-[4-(N,N-dimetil piperacina)] 6-Me
N7		S	Me	Ph	
O7		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-piridina)] 6-Me
P7		S	Me	Ph	2-[S-(1-biciclo [2.2.1]heptano)] 6-Me
Q7		S	Me	Ph	2-[S-(4-(N-metil-piperadina))] 6-Me
R7		S	Me	Ph	

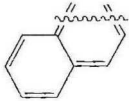
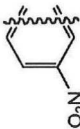
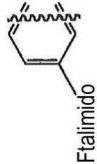
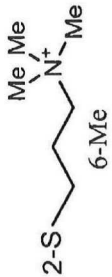
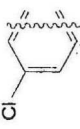
(continuación)

Colorante	Y	X	R ²	R ⁵	B
S7		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-piridina)] 6-Me
T7		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-PhNO ₂)] 6-Me
U7		S	Me	Ph	2-SMe 6-Me
V7		S	Me	Ph	2-S  6-Me
W7		S	Ninguno	Ph	2-S  6-Me
X7		S	Me	Ph	2-S  6-Me
Z7		S	Me	Ph	2-SCH ₃ 6-Me
C8		S	Me	Ph	2-NH ₂ 6-Me

(continuación)

Colorante	Y1	X	R ²	R ⁵	B
E8		S	Me	Ph	2-OH 6-Me
G8		S	Me	Ph	2-SCH ₃ 6-Me
K8		S		Ph	2-SCH ₃ 6-Me
L8		S	Ninguno	Ph	2-SCH ₃ 6-Me
M8		S	Me	Ph	2-[S-(2-pirimidina)] 6-Me
N8		S	Me	Ph	2-SMe 6-Ph
O8		S			H
P8		S	Me	Ph	2-S-bencilo 6-Me
T8		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-Ph)] 6-Me

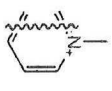
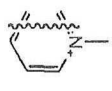
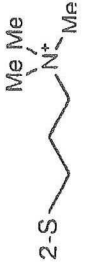
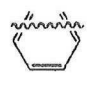
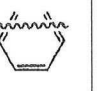
(continuación)

Colorante	Y	X	R ²	R ⁵	B
V8		S	Me	Ph	2-SCH ₃ 6-Me
W8		S	Ph	Ph	2-SCH ₃ 6-Me
X8		S	Me	Ph	2-SCH ₃ 6-Me
Z8		S	Me	1-Naftilo	2-SCH ₃ 6-Me
A9		S	Me	Ph	2-[S-(5'-desoxiadenosina)] 6-Me
C9		S	Me	Ph	
G9		S		Ph	2-SCH ₃ 6-Me
I9		S	Me	Ph	2-S-C(O)-CH ₂ -NMe ₂ 6-Me
I9Met		S	Me	Ph	2-S-C(O)-CH ₂ -N ⁺ Me ₃ 6-Me

(continuación)

Colorante	Y	X	R ²	R ⁵	B
J9		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-(N-metilpiperacina))] 6-Me
J9Met		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-(N,N-dimetilpiperacina))] 6-Me
K9		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-morfolina)] 6-Me
L9		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-(N,N-dimetilanilina))] 6-Me
L9Met		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-4-(N,N,N-trimetilanilina))] 6-Me
M9		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-2-piracina)] 6-Me
N9		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-6-benzopiracina)] 6-Me
O9		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-5-(1-metil-1,2,3-benzotriazol))] 6-Me
P9		S	Me	Ph	2-[S-(C(O)-C ₆ F ₅)] 6-Me

(continuación)

Colorante	$ Y $	X	R ²	R ⁵	B
Q9		O	Ninguno	Ph	2-SCH ₃ 6-Me
R9		O	Ninguno	Ph	
A10		S	Me	Ph	
V10		S	Me	Ph	

El compuesto D6 se preparó, en primer lugar, al hacer reaccionar 4-metilpirimidina con bromuro de (3-bromopropil)trimetilamonio en acetonitrilo a reflujo. El producto resultante (compuesto A6) en acetonitrilo se hizo reaccionar con yoduro de 3-metil-2-metilsulfonilbenzotiazolio (disponible de Aldrich) en presencia de piridina anhidra y trietilamina, o en cloroformo:metanol (10:1) y en trietilamina en exceso. La reacción se llevó a cabo bien a temperatura de reflujo, o bien a temperatura ambiente.

El compuesto E6 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de yoduro de 3-metil-2-metilsulfonilbenzotiazolio (obtenido al hacer reaccionar 2-metilsulfonilbenzoxazol con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

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

El compuesto H5 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de 5-difluorometilsulfonil-3-metil-2-metiltiobenzotiazolio metilsulfato (obtenido al hacer reaccionar 5-difluorometilsulfonil-3-metil-2-metiltiobenzotiazol, disponible de Aldrich, con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

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

El compuesto R6 se preparó según el procedimiento general utilizado para preparar el compuesto D6 a partir de metilsulfato de 6-amino-3-metil-2-metiltiobenzotiazolio (obtenido al hacer reaccionar 6-amino-3-metil-2-metiltiobenzotiazol, disponible de Aldrich, con dimetilsulfato) y el compuesto A6.

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

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

El compuesto G8 se preparó al calentar una solución de *N*-feniltiourea y 2,4-pentanediona en HCl/EtOH a reflujo. La pirimidintona resultante se hizo reaccionar con yoduro de 3-metil-2-metilsulfonilbenzotiazolio en presencia de trietilamina en cloroformo/metanol (10:1) a reflujo durante la noche y así se obtuvo el compuesto G8.

Los compuestos G5, I5, K5, L5, F7, N7, O7, P7, Q7, R7, S7, T7, U7, V7, W7, X7, Z7, C8, E8, K8, L8, M8, N8, O8, P8, T8, V8, W8, X8, Z8, A9, C9, G9, I9, I9Met, J9, J9Met, K9, L9, L9Met, M9, N9, O9, P9, Q9, R9, A10 y V10 se pueden preparar utilizando métodos similares a los descritos anteriormente. Dichos colorantes son colorantes de unión a ADNdc cuya fluorescencia cambia cuando se unen a ADNdc. Se espera que muchos de estos colorantes serán útiles en la detección de heterodúplex.

Los colorantes de cianina basados en pirimidinio descritos en el presente documento, a modo de ejemplo G5, H5, I5, K5, L5, D6, E6, P6, R6, Y6, Z6, F7, N7, O7, P7, Q7, R7, S7, T7, U7, V7, W7, X7, Z7, C8, E8, G8, K8, L8, M8, N8, O8, P8, T8, V8, W8, X8, Z8, A9, C9, G9, I9, I9Met, J9, J9Met, K9, L9, L9Met, M9, N9, O9, P9, Q9, R9, A10 y V10 también son nuevos. Los resultados de la utilización de algunos de estos colorantes en la detección de heterodúplex se resumen en la tabla 3. En general, los colorantes que inhiben la PCR a niveles de saturación por debajo del 50% no detectan bien heterocigotos. Los métodos de detección por PCR y heterodúplex se describen en los siguientes ejemplos.

TABLA 3.

Colorante	Ex/Em ¹	% Sat ² máximo compatible con PCR	% Het ³
G5	442-458/475	100%	20,0%
H5	444/459	100%	22,5 %
S5	450/469	>99 %	20,5 %
D6	457/471	92%	23,3 %
E6	425/454	>99 %	15,0 %
P6	464/490	100%	21,0 %
R6	453/470	>90%	15,0 %
Y6	439/477-515	100%	21,0%

Colorante	Ex/Em ¹	% Sat ² máximo compatible con PCR	% Het ³
Z6	469/494-526	100%	13,4 %
N7	458/474	>100%	22,0%
O7	**4	>70%	21,2%
P7	**4	>70%	21,5%
Q7	453/471	>70%	20,7%
T7	453/471	>70%	21,2%
G8	453/471	>100%	19,7%
L8	470-490/490-520	>70%	2,3%
P8	453/471	>70%	17,7%
T8	453/471	>70%	24,0%
V8	469/494-526	>70%	21,4%
W8	453/471	>70%	27,5%
Z8	453/471	>70%	22,7%
A9	**4	100%	23,0%
I9	**4	100%	20,9%
I9Met	**4	>80%	23,0%
J9	**4	100%	22,4%
J9Met	**4	100%	23,0%
K9	**4	100 %	22,3%
L9	**4	100%	21,3%
V10	**4	95%	15,5%

1. Máximos de excitación (Ex) y de emisión (Em) obtenidos en un fluorímetro mediante 2,5 µM de pb (100 ng/60 µl) de ADNdc y colorante a la concentración máxima compatible con PCR en tampón de PCR (MgCl₂ 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 200 µM de cada dNTP, 500 µg/ml BSA). Algunos colorantes tienen un intervalo a causa de la amplitud de sus picos de emisión o excitación.

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

3. Porcentaje de área de pico del pico distintivo de heterodúplex medido con instrumentos ópticos a 420-490 nm de excitación y 450-530 nm de detección, mediante la curva de fusión de heterocigotos F508 a una rampa de temperatura de 0,3°C/s. El amplificación que se utilizó en este conjunto de experimentos tenía una longitud de 57 pb y se generó con los cebadores GGCACCATTAAGAAATAT (SEQ ID NO. 1) y TCTGTATCTATATTCATCATAGG (SEQ ID NO. 24). Se registró el porcentaje máximo obtenido.

4. No se dispone de los datos de espectro.

EJEMPLO 2

Protocolo de PCR

5

Se obtuvieron nucleótidos marcados y sin marcaje de IT Biochem (Salt Lake City, UT), Quiagen Operon (Alameda, CA), o Synthegen (Houston, TX). La PCR se realizó con volúmenes de 10 µl en un LightCycler® (Roche Applied Systems, Indianapolis, IN) con transiciones programadas a 20°C/s, si no se indicaba lo contrario. La mezcla de amplificación incluía 50 ng de ADN genómico molde, 200 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, pH 8,8, 0,04 U/µl de polimerasa Taq (Roche), 500 µg/ml de albúmina de suero bovino y 0,5 µM de cada cebador, si no se indicaba lo contrario. En estudios previos (Gundry GN, y otros, Genetic Testing, 1999; 3:365-70; Hermann M, y otros, Clin Chem 2000; 46:425-8) o de Coriell Cell Repositories (Camden, NJ) se obtuvo el genotipo del ADN genómico humano. Se añadió colorante S5 en la reacción de PCR, a razón de 10 µM si no se indicaba lo contrario. Cuando se utilizó SYBR® Green I como indicador, se utilizó una dilución final de 1:10.000 del

10

stock de Molecular Probes. El colorante se añade antes de llevar a cabo la PCR, se realiza la amplificación y se hace un seguimiento de la transición de fusión del amplicón en LightCycler® o mediante un análisis de fusión de alta resolución. Se pueden distinguir los diferentes homocigotos mediante la temperatura de fusión (T_m) del amplicón. Los heterocigotos se identifican por la baja temperatura de fusión de los heterodúplex que amplían la transición de fusión general. El análisis de fusión necesita aproximadamente 1 minuto y no es necesario el procesamiento de las muestras tras la PCR.

Para estudiar la sensibilidad del colorante S5, SYBR® Green I, y otros colorantes de unión a ADNdc, se analizaron los polimorfismos de los genes del Factor V Leiden, de la fibrosis quística (F508del, F508C, I507del, I506V), y HTR2A (T102C). Además, se utilizaron plásmidos de ingeniería genética para estudiar de forma sistemática todos los posibles cambios de una única base. Los heterodúplex generados durante la amplificación de ADN heterocigótico eran los más fáciles de detectar mediante enfriamiento rápido (como mínimo -2°C/s) los productos desnaturalizados, y a continuación un calentamiento rápido durante el análisis de fusión (de $0,2$ a $0,4^\circ\text{C/s}$). Todos los heterocigotos se diferenciaron de los homocigotos mediante una transición de fusión más amplia. Habitualmente, los diferentes homocigotos se podían distinguir por su T_m . Sin embargo, tal y como se esperaba, algunos cambios de base homocigóticos G a C y A a T no se podía distinguir la reproducibilidad, incluso al utilizar análisis de alta resolución, sin mezclar los homocigotos. La longitud de los amplicones variaba entre 44 y 331 pb.

Aunque en los ejemplos descritos en el presente documento se utilicen los colorantes S5, D6, Z6 y N7, se entiende que se pueden utilizar otros colorantes según la presente invención.

EJEMPLO 3

Análisis de la curva de fusión

Los análisis de fusión se realizaron en el LightCycler® inmediatamente tras el ciclo o posteriormente, bien con un instrumento de fusión de alta resolución HR-1 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) o con LightTyper® (Roche Applied Systems, Indianapolis, IN). Sin embargo, se entiende que el análisis de la curva de fusión se puede realizar sin amplificación. Cuando se utilizó el LightCycler® en primer lugar se elevó la temperatura a 94°C , se enfrió a 60°C mediante un programa configurado a -20°C/s , a continuación se fundió a $0,2^\circ\text{C/s}$ con adquisición continua de fluorescencia. Para realizar la fusión en uno de los otros instrumentos, primeramente se amplificaron las muestras en el LightCycler®, a continuación se calentaron momentáneamente en el LightCycler® a 94°C y se enfriaron rápidamente (programado a -20°C/s) a 40°C , si no se indicaba lo contrario. Los capilares del LightCycler® se transfirieron, a continuación, uno por uno al instrumento de alta resolución y se calentaron a $0,3^\circ\text{C/s}$, si no se indicaba lo contrario. El HR-1 es un instrumento de una única muestra que envuelve un capilar del LightCycler® con un cilindro de aluminio. El sistema se calienta mediante calentamiento de Joule a través de una espiral enrollada alrededor del exterior del cilindro. La temperatura de la muestra se controla con un termopar que también se encuentra en el cilindro y que convierte la información en señales digitales de 24 bits. El seguimiento de la fluorescencia se realiza mediante epi-iluminación en el extremo del capilar (Wittwer CT, y otros, BioTechniques 1997; 22:176-81) que se coloca en la base del cilindro y también convierte la información en señales digitales de 24 bits (se indica que algunos de los ejemplos utilizaban prototipos anteriores de HR-1 de 16 bits). Por cada $^\circ\text{C}$ se recogen aproximadamente 50 puntos de datos. En todos los instrumentos se utilizaron elementos ópticos estándar, si no se indicaba lo contrario.

En algunas ocasiones resulta ventajoso no desnaturalizar el producto tras la PCR y previamente a realizar la curva de fusión. Por ejemplo, cuando el objetivo es determinar el número de secuencias repetidas (por ejemplo, STR, VNTR), la amplificación se puede detener en la etapa de extensión durante la fase exponencial de la reacción antes de llegar a la meseta, y a continuación, se realiza el análisis de fusión. De esta forma se pueden analizar los productos de extensión de homodúplex. Al repetir el genotipado, los productos homodúplex pueden aportar más información que los productos heterodúplex, especialmente porque se pueden formar muchos productos heterodúplex diferentes a partir de diferentes alineamientos de las repeticiones. En algunos casos, la obtención de una curva de fusión de homodúplex (sin desnaturalización previa) y una curva de fusión de heterodúplex (con desnaturalización y formación de todas las combinaciones posibles de dúplex) puede ser útil. La diferencia entre estas dos curvas de fusión da una medida de la cantidad de heterodúplex que se pueden formar, utilizando la misma muestra como "control de homodúplex".

Mediante el software adaptado elaborado con LabView se analizaron los datos de fusión. Se normalizaron gráficas de fluorescencia en función de la temperatura entre el 0 y el 100 por ciento, al definir en primer lugar los valores de referencia lineales antes y después de la transición de fusión de cada muestra. Para cada muestra se calculó la fluorescencia de cada adquisición como el porcentaje de fluorescencia entre los valores de referencia superiores e inferiores a la temperatura de adquisición. En algunos casos se calcularon las gráficas de la derivada de la curva de fusión de los polinomios de Savitsky-Golay en cada punto (Press WH, y otros, eds. Numerical recipes in C, 2ª ed. Nueva York: Cambridge University Press, 1992:650-5). En los análisis Savitsky-Golay se utilizaron polinomios de segundo grado y una ventana de datos que incluía todos los puntos en un intervalo de 1°C . Las áreas de pico y las temperaturas de fusión se obtuvieron utilizando regresión no lineal de mínimos cuadrados para ajustarse a múltiples Gaussianos. En algunos casos, el eje X de cada curva de fusión normalizada se desplazó, de modo que los trazados

se solapaban en cierto intervalo de fluorescencia. Este “desplazamiento de temperatura” corrige cualquier variación de temperatura e incrementa la capacidad de distinguir heterocigotos de homocigotos. La diferencia entre genotipos también se puede aumentar representando gráficamente la diferencia de fluorescencia entre genotipos a cada temperatura.

EJEMPLO 4

Genotipado de los polimorfismos de un solo nucleótido con el colorante S5: genotipado de la mutación del factor V Leiden

Se generó un amplicón de 43 pb con cebadores de 18 a 24 pb de longitud, que flanqueaba directamente la localización de mutación del factor V Leiden. La T_m estimada de ambos cebadores era de 62°C. Las muestras se sometieron a 35 ciclos según el protocolo siguiente: 94°C sin retención, 60°C sin retención y 72°C con retención de 10 segundos. Tras la amplificación, las muestras se calentaron de forma momentánea en el LightCycler® hasta 94°C, se enfriaron rápidamente (programado a -20°C/s) a 60°C, y los productos de la PCR se fundieron a 0,2°C/s con adquisición de fluorescencia continua.

En la figura 1 se muestran las curvas de fusión derivadas de los productos amplificados en la PCR de diferentes genotipos del locus del gen del factor V. Se utilizó el colorante S5 para hacer el seguimiento de fluorescencia de la transición de fusión entre productos monocatenarios y bicatenarios. La mutación Leiden se localiza a 19 bases de un extremo del amplicón. Se muestran los resultados de genotipo Leiden de diez homocigotos de tipo salvaje, dos heterocigotos, y un homocigoto. La temperatura de fusión del amplicón del mutante homocigoto es aproximadamente 1°C inferior a la temperatura de fusión del homocigoto de tipo salvaje. Las muestras de heterocigotos muestran una transición de fusión secundaria a baja temperatura que se puede atribuir a la formación de heterodúplex. Se realizó un experimento parecido utilizando SYBR® Green I y este no detectó la transición de fusión secundaria que se producía en los heterocigotos (no se muestran los datos).

Se estudiaron los efectos de las velocidades de enfriamiento y de calentamiento utilizando ADN heterocigótico del factor V Leiden en el LightCycler®. Para estudiar el efecto de la velocidad de enfriamiento se amplificaron las muestras tal y como se ha descrito anteriormente, se calentaron hasta 85°C, y a continuación se enfriaron de 85°C a 60°C a una velocidad de -20, -2, -1, -0,5 o -0,1°C/s, a continuación se aplicó una velocidad de calentamiento constante de 0,2°C/s para la adquisición de la curva de fusión. El enfriamiento rápido fue necesario para la formación significativa de heterodúplex (figura 2). No se observaron heterodúplex con velocidades de enfriamiento de -0,1°C/s o inferiores. La mayor formación de heterodúplex se dio cuando las muestras de los capilares se transfirieron rápidamente del agua hirviendo al agua helada (no se muestran los datos). Con el enfriamiento en el LightCycler®, la formación de heterodúplex tiene forma de meseta en velocidades programadas más rápidas que -5°C/s (figura 2). Sin embargo, las mediciones de las temperaturas reales de las muestras mostraron que la velocidad de enfriamiento aumentaba solo ligeramente con velocidades programadas más rápidas que -5°C/s: si el instrumento se había programado para enfriar a -20°C/s, la velocidad real era de aproximadamente -6°C/s.

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

EJEMPLO 5

Estudio sistemático de genotipado de SNP mediante plásmidos

Los plásmidos creados mediante ingeniería genética se utilizaban en estudios sistemáticos de genotipado de curvas de fusión de todos los cambios de una única base posibles. Los plásmidos (DNA Toolbox, Cambrex Bio Science Rockland Inc.) contenían A, C, G o T en una posición definida en el centro del 50% del contenido de GC (Highsmith WE, y otros, Electrophoresis 1999; 20:1186-94). Los cuatro plásmidos se utilizaban por separado para simular genotipos homocigotos, o en combinaciones binarias para construir “heterocigotos”. Los cebadores eran TCTGCTCTGCGGCTTTCT (SEQ ID NO. 50) y CGAAGCAGTAAAAGCTCTTGGAT (SEQ ID NO. 51) y generaron un amplicón de 50 pb cerca de la posición polimórfica. Los moldes de ADN se utilizaron 10^6 copias y se realizó una PCR de 35 ciclos a 85°C sin retención y a 55°C durante 1 segundo en presencia de 20 uM de D6. El instrumento de fusión de alta resolución HR-1 se utilizó para el análisis de fusión.

Se muestran las curvas de fusión normalizadas de los cuatro homocigotos (figura 4A) y los seis heterocigotos (figura 4B). La distinción entre homocigotos y heterocigotos es sencilla, ya que los heterocigotos tienen una mayor transición de fusión debida a la presencia de heterodúplex. Todos los homocigotos realizan la fusión en una única transición (figura 4A) y se puede predecir correctamente el orden de fusión haciendo cálculos con la base vecina más cercana del tipo A/A < T/T < C/C < G/G (SantaLucia J., Jr, Biochemistry 1996; 35:3555-62). Las curvas de fusión de los heterocigotos son más complejas a causa de las contribuciones de dos homodúplex y dos heterodúplex

(figura 4B). Cada heterocigoto dibuja una trayectoria de curva de fusión única según las T_m de los cuatro dúplex. El orden de fusión vuelve a corresponder con los cálculos con la base vecina más cercana ($A/T < A/C < C/T < A/G < G/T < C/G$) utilizando la media de las T_m de los dos homodúplex. Las curvas de los seis heterocigotos se unen a temperaturas elevadas formando tres trayectorias, que se pueden determinar teniendo en cuenta el homodúplex de fusión más elevada presente (T/T en el caso del heterocigoto A/T, C/C en el caso de los heterocigotos A/C y C/T, G/G en el caso del heterocigoto A/G, G/T y C/G). Todos los genotipos se pueden distinguir entre ellos mediante análisis de fusión de alta resolución.

EJEMPLO 6

Genotipado del gen de la fibrosis quística mediante cebadores con marcaje: Colorante S5 o SYBR® Green I

Se utilizó polimerasa Klen Taq (0,04 U/μl, AB Peptides, St. Louis, MO), 88 ng de anticuerpo TaqStart (ClonTech, Palo Alto, CA), y 50 mM de Tris, a pH 8,3 en la PCR en lugar de polimerasa Taq y 2-amino-2-metil-1,3-propandiol. Se amplificó un fragmento de 44 pb con los cebadores GGCACCATTAAGAAAATAT (SEQ ID NO. 1) y TCATCATAGGAAACACCA (SEQ ID NO. 2). El primer cebador se marca en 5' con Oregon Green, o se realizó la reacción en presencia de SYBR® Green I o de S5. Los cebadores flanqueaban el centro de interés que contenía las variantes F508del, I507del y F508C. La PCR realizó 40 ciclos a 85°C y a 58°C (0 segundos de retención). Se hizo el seguimiento de seis muestras durante la adquisición de la curva de fusión en LightCycler®.

Las curvas de fusión derivadas de los productos de PCR amplificados de la región I507/F508 de diferentes genotipos del gen de la fibrosis quística se muestran en las figuras 5B-D. La longitud de los productos de PCR era de 41 a 44 bases (figura 5A). Para el seguimiento de fluorescencia de la transición de fusión entre productos monocatenarios y bicatenarios se utilizaron tanto cebadores marcados en el extremo 5' (figura 5B), como los colorantes S5 (figura 5C) o SYBR® Green I (figura 5D). Se muestran los resultados de dos genotipos homocigóticos y tres genotipos heterocigóticos.

La estabilidad de los dúplex de diferentes genotipos se corresponde con los cálculos teóricos (von Ahsen N, y otros, Clin Chem 2001; 47:1956-6), F508del ~ I507del < tipo salvaje < F508C. Salvo F508del y F508C, los genotipos se pueden distinguir por las T_m de sus transiciones principales. La desviación estándar de la T_m de 10 réplicas de muestras de tipo salvaje fue de 0,12°C cuando se fundió en el instrumento LightCycler®. Cuando se fundieron en un instrumento de alta resolución, la desviación estándar de la T_m de las mismas 10 muestras fue de 0,04°C.

Cuando se amplifica una muestra heterocigótica mediante PCR, se supone la producción de dos homodúplex y dos heterodúplex (Nataraj AJ, y otros, Electrophoresis 199; 20:1177-85). Sin embargo, cuando se utilizó SYBR® Green como indicador fluorescente, solamente se detectó un único pico de fusión por cada genotipo (figura 5D). En cambio, cuando se utilizaron cebadores con marcaje o el colorante S5 en las mismas condiciones, aparecieron dos picos claramente definidos (figuras 5B y 5C). El pico a temperatura más baja siempre es inferior que el pico a temperatura más alta, y se cree que indica la transición de fusión de uno o ambos productos heterodúplex. Como cabía esperar, los heterocigotos con delección de 3 pb (F508del e I507del) dieron lugar a picos de heterodúplex más desestabilizados que los picos de heterodúplex del cambio de una única base (F508C). El pico primario del heterocigoto F508C se encontraba a una temperatura más alta que el tipo salvaje, lo que reflejaba la mayor estabilidad de la transición T a G (Gundry CN, y otros, Genetic Testing, 1999; 3:365-70).

EJEMPLO 7

Análisis de mutaciones con colorantes de saturación

Se estudió el polimorfismo de un único nucleótido HTR2A. Se realizó la PCR con KlenTaq, TaqStart y Tris como se ha descrito para el caso del locus de la fibrosis quística. Un fragmento de 331 pb del gen del receptor 2A de hidrotriptamina (HTR2A) incluía el polimorfismo habitual (T102C) en el exón 1 (Lipsky RH, y otros, Clin Chem 2001; 47:635-44). La reacción realizó 40 ciclos entre 95°C sin retención, 62°C con 2 segundos de retención y 74°C con 20 segundos de retención. Se obtuvo una curva de fusión de alta resolución.

La figura 6 demuestra que se puede utilizar el colorante S5 de saturación para analizar variantes de secuencia. Es decir, no es necesario conocer la localización de la variante de la secuencia. Se puede detectar la presencia de cualquier variante en un amplicón de gran tamaño. Tal y como se puede observar en la figura 6, los tres genotipos del SNP en el gen HTR2A (homocigoto T, homocigoto C y heterocigoto T/C) se puede diferenciar en un amplicón de 331 pb. La precisión de la curva de fusión y la capacidad de distinguir diferentes genotipos depende precisión de medición de la temperatura y la resolución que tenga el instrumento.

EJEMPLO 8

Análisis de la curva de fusión de una escalera de ADN: comparación de SYBR® Green I con el colorante S5

- 5 Se mezclaron 100 ng de escalera de ADN (escalera de ADN de bajo peso molecular, Gibco BRL) que contenía seis especies distintas de ADNdc con SYBR® Green I (1:10.000) o bien con el colorante S5 (10 µM) en 3 mM de MgCl₂, 100 mM de 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, a pH 8,7 con tampón. Mediante un instrumento de alta resolución se obtuvo una curva de fusión a 0,1°C/s.
- 10 Tal y como se ha descrito anteriormente, el colorante S5, a diferencia de SYBR® Green I, es capaz de identificar heterodúplex en transiciones de curvas de fusión a concentraciones compatibles con PCR. Uno de los motivos por los cuales SYBR® Green I no puede identificar fácilmente transiciones de fusión bajas se ilustra en la figura 7. Cuando se encuentran varios fragmentos de ADN de estabilidad creciente, los picos a baja temperatura que se observan con SYBR® Green I son muy pequeños en comparación con aquellos que se encuentran con el colorante
- 15 S5. Una explicación a este fenómeno es que durante la fusión, SYBR® Green I puede liberarse de dúplex a baja temperatura, únicamente para unirse a dúplex con temperaturas de fusión más elevadas. Esto implica que el pico siguiente sea más elevado que el anterior, de forma que los picos con temperaturas más bajas son muy pequeños, si es posible observarlos. El colorante S5, que se encuentra a un nivel de saturación mucho más elevado tiene picos visibles incluso para dúplex de temperatura baja. Mientras que en este ejemplo el colorante S5 se encontraba a niveles cercanos a la saturación, sorprendentemente, el S5 puede detectar picos de baja temperatura cuando se diluye a niveles de saturación de 5-20%. Por ejemplo, los datos mostrados en la figura 13 se obtuvieron utilizando S5 a una concentración de 1 µM. De este modo, a pesar de no conocer el mecanismo de actuación, el colorante S5 y varios otros colorantes saturantes de la presente invención no se redistribuyen durante la fusión.
- 20 Si las áreas de cada pico de la figura 7 se han determinado y clasificado según la cantidad conocida de cada especie de ADN, la sensibilidad relativa de cada especie de ADN se puede evaluar (figura 8). Tal y como se muestra en la figura 8, con el colorante S5 se favorecen los picos de fusión a bajas temperaturas, mientras que con SYBR® Green I, se observa un gran aumento de la señal a alta temperatura.

EJEMPLO 9

Curvas de valoración de los colorantes de ADN habituales y determinación de un intervalo de concentración útil del colorante S5 en PCR

- 35 Se mezclaron 100 ng de la escalera de ADN de bajo peso molecular con distintas concentraciones de colorantes de ADNdc habituales en presencia de 3 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris, pH 8,3, 250 µg/ml de BSA y 200 µM de cada dNTP a un volumen final de 10 µl. Las muestras se transfirieron a tubos de LightCycler® y se midió la fluorescencia 40°C en un fluorímetro en tiempo real. La fluorescencia se normalizó al máximo de fluorescencia obtenida con cada colorante.
- 40 Se llevaron a cabo estudios de dilución mediante un amplicón HTR2A de 152 pb en volúmenes de 10 µl con 3 mM de Mg²⁺, 50 mM de Tris-HCl, pH=8,3, 500 µg/ml de BSA, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador, 50 ng de ADN genómico, 0,4 U de polimerasa Taq, y 88 ng de anticuerpo TaqStart con diluciones de S5 de 2 µM a 100 µM. Tras la desnaturalización inicial durante 10 segundos a 95°C, se realizaron 40 ciclos a 95°C durante 0 segundos,
- 45 62°C durante 2 segundos, y 72°C durante 20 segundos. Después de un acondicionamiento de la temperatura en el LightCycler® (95°C durante 0 segundos, 55°C durante 0 segundos) las muestras se fundieron en un instrumento de alta resolución con una pendiente de 0,3°C/s.

- 50 Las figuras 9A-B muestran las concentraciones de SYBR® Green I y de colorante S5 compatibles con PCR. A concentraciones compatibles con PCR a SYBR® Green I le falta mucho para saturar la cantidad de ADN que habitualmente se encuentra presente al final de una PCR. El colorante S5, en cambio, se puede utilizar en un amplio intervalo de concentraciones, incluyendo concentraciones saturantes. En la figura 10 se muestran curvas de fusión típicas en un intervalo de 50 veces la concentración de colorante S5.

EJEMPLO 10

Espectros de fluorescencia de SYBR® Green I el colorante S5

- 60 Los espectros de excitación y emisión de SYBR® Green I con el colorante S5 que se unen a ADN se midieron en un fluorímetro de Photon Technology (FL-1). Se añadió colorante S5 (10 µM) o SYBR® Green I (1:10.000) a 100 ng de ADN (escalera de ADN de bajo peso molecular) en presencia de 3 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris, pH 8,3, 250 µg/ml de BSA y 200 µM de cada dNTP en un volumen final de 60 µl.

- 65 Los dispositivos ópticos de LightCycler® se corresponden adecuadamente con los espectros de excitación y emisión de SYBR® Green I (figura 11). A pesar de que los parámetros ópticos de LightCycler® no se corresponden adecuadamente con el colorante S5, la señal de fluorescencia observada mediante LightCycler® del colorante S5 a

algunas concentraciones compatibles de PCR es mayor a la observada habitualmente con SYBR® Green I (no se muestran los datos).

Gran parte de los otros colorantes de saturación descritos en el presente documento son también colorantes “azules”. Mientras que la fluorescencia de dichos colorantes se puede observar con los parámetros ópticos habituales de LightCycler®, en algunos ejemplos, los parámetros ópticos de ciertos instrumentos se han modificado para adaptarse mejor a dichos colorantes azules. Dichas modificaciones a los parámetros ópticos se detallan en los ejemplos más relevantes.

EJEMPLO 11

Genotipado del gen de la beta globina mediante el ajuste del eje X y análisis de diferencia de fluorescencia

Se amplificó un fragmento de 110 pb de la región de la beta globina del cromosoma 11 humano (núm. de acceso NG_000007). El producto de 110 pb incluía los lugares habituales de mutación de la beta globina HbS y HbC. El ADN se extrajo de muestras secas de sangre de 4 individuos distintos de cada genotipo habitual. Dichos genotipos incluían 3 tipos de homocigotos (AA, SS y CC) y 3 tipos de heterocigotos (AS, AC y SC). Los cebadores sentido y antisentido eran ACACAAGTGTGTTCACTAGC (SEQ ID NO. 3) y CAACTTCATCCACGTTCCACC (SEQ ID NO. 4), respectivamente. Cada 10 µl de reacción contenía 50 µg de ADN genómico, 0,50 µM de cada cebador, 10 µM de colorante S5, 3 mM de MgCl₂, Tris 50 mM, pH 8,3, 500 µg/ml de albúmina de suero bovino, 0,2 mM de cada dNTP, 0,04 U/µl de KlenTaq® (AB Peptides, St. Louis, MO), 88 ng de anticuerpo TaqStart® (CloneTech, Palo Alto, CA). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: un ciclo previo de desnaturalización de 5 segundos a 95°C; 35 ciclos a 94°C durante 0 segundos, 50°C durante 2 segundos, y 72°C durante 2 segundos con una pendiente de 2°C por segundo. Se tomaron adquisiciones puntuales de fluorescencia de cada muestra tras 2 segundos de extensión. Tras la amplificación de la PCR, se enfriaron las muestras a una velocidad programada de -20°C/s. Inmediatamente después de enfriarlas a elevada velocidad, se realizó la fusión en un instrumento de fusión de alta resolución adaptado de 24 bits de 70°C a 93°C a una velocidad de 0,30°C/s con adquisición de fluorescencia continua.

Los datos de la curva de fusión de alta resolución se obtienen al medir la fluorescencia a medida que aumenta la temperatura de la muestra. Los datos originales de las muestra cuadruplicadas de los 6 genotipos de beta globina se muestran en la figura 12A. Hay que destacar que la magnitud de la fluorescencia es variable entre diferentes muestras debido a las diferencias de volumen de las muestras y los parámetros ópticos variables de los capilares.

Las diferencias de magnitud entre las muestras se pueden normalizar mediante la utilización de valores de referencia lineales de cada curva antes y después de la transición principal. Específicamente se seleccionan dos regiones lineales, una anterior y una posterior a la transición principal. Dichas regiones definen dos líneas en cada curva, una línea superior con una fluorescencia del 100% y una línea inferior con una fluorescencia del 0%. El porcentaje de fluorescencia en la transición (entre las dos regiones) se calcula en cada temperatura como el porcentaje de distancia entre las líneas extrapoladas superior e inferior. El resultado normalizado de los datos de beta globina se muestran en la figura 12B. Las muestras cuadruplicadas de cada genotipo se agruparon de forma evidente, en este caso se puede observar de forma más clara entre 84°C y 85°C. Sigue existiendo una ligera variación dentro de cada genotipo, secundario a la compensación de la temperatura entre cada vez que se corren las muestras (se debe tener en cuenta que hay una dispersión de 0,2°C de cuadruplicados en los genotipos a una fluorescencia aproximada del 10-20%). Dicha variación de las muestras se puede dar entre dos muestras diferentes o incluso entre dos veces diferentes que se haga correr la misma muestra. Las preparaciones distintas, incluso las preparaciones con diferentes concentraciones de sales, también pueden dar lugar a una desviación de la temperatura. Sin embargo, para, como mínimo, una primera aproximación, estas diferencias no afectan la forma de la curva.

Las desviaciones de temperatura entre series se pueden corregir desviando el eje de la temperatura de cada curva de manera que se superponga a un intervalo dado de fluorescencia. A modo de ejemplo, se selecciona una muestra como estándar, y los puntos incluidos en el intervalo de fluorescencia se ajustan a un cuadrático. Se calcula, para cada curva restante, el desplazamiento de temperatura necesario para la translación de cada punto dentro del intervalo de fluorescencia en el cuadrático. A continuación, se desplaza cada curva mediante el desplazamiento promedio para permitir la superposición de las curvas dentro del intervalo de fluorescencia seleccionado. La amplificación de un heterocigoto genera transiciones de fusión de heterodúplex a baja temperatura, así como una mayor transición de fusión de homodúplex. Si las curvas se desplazan para superponer su región homodúplex de alta temperatura (bajo porcentaje de fluorescencia), los heterodúplex se pueden identificar mediante su temprana disminución de fluorescencia a bajas temperaturas, tal y como se ha mostrado en la figura 12C. Sin embargo, dado que la forma de los diferentes homodúplex no varía demasiado, la modificación de la temperatura de diferentes homodúplex puede ocultar cualquier diferencia que exista entre ellos.

En último lugar, es más sencillo observar los distintos genotipos si se representa en un gráfico la diferencia de fluorescencia entre las curvas de fusión normalizadas (y de forma opcional, con un desplazamiento de la temperatura). Primero se selecciona un genotipo estándar (por ejemplo, se utiliza el tipo salvaje AA de beta globina).

A continuación, se representa en un gráfico la diferencia entre cada curva en función de la temperatura, tal y como se muestra en la figura 12D. El estándar (restado de sí mismo) es cero para todas las temperaturas. Los otros genotipos dibujan trayectorias únicas y se pueden identificar visualmente relacionando dichos patrones. También se pueden utilizar métodos automatizados de obtención de rasgos para asignar genotipos. Además, mientras que los ejemplos a título ilustrativo utilizan colorantes de saturación y detección de heterodúplex, se entiende que los gráficos de desplazamiento y diferencia de temperatura se pueden utilizar para el genotipado cuando no hay heterodúplex, por ejemplo, se puede utilizar para el genotipado de virus cuando el genoma es haploide. Algunos ejemplos de dichos genotipados de alta resolución incluyen el genotipado de la hepatitis C, del papiloma virus humano, del VIH, y la identificación de bacterias mediante amplificación de ADN ribosómico.

Se pueden considerar los parámetros únicos que se correlacionan con el genotipo. Por ejemplo, las curvas normalizadas se pueden utilizar para determinar la temperatura a la que el 10% de los diferentes genotipos llega al punto de fusión (90% de fluorescencia). Este método permite distinguir claramente algunos genotipos, pero no su totalidad (figura 12B). De forma alternativa, se puede utilizar la pendiente máxima de la curva para distinguir homocigotos de heterocigotos, pero los distintos homocigotos a menudo son similares en la pendiente máxima de la curva. En último lugar, se puede utilizar el área que queda por debajo de las curvas de diferencia (figura 12D) para definir el genotipo, pero dichas curvas pueden tener una área similar y trazar trayectorias diferentes. A pesar de que una combinación de parámetros pueda resultar eficaz para la determinación del genotipo de forma automatizada, esta técnica es adecuada para relacionar patrones visualmente.

Se entiende que se dispone de otras técnicas de normalización que se incluyen en el ámbito de la presente invención. Por ejemplo, el HR-1 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) dispone de una configuración que ajusta automáticamente el valor de fluorescencia a una temperatura predeterminada (por ejemplo, un valor de fluorescencia de 100°C a 40°C), y se alinean las curvas de fusión de todas las muestras con el mismo valor de fluorescencia. La diferencia entre la normalización descrita anteriormente y esta normalización controlada por un dispositivo electrónico reside en que con la normalización controlada por un dispositivo electrónico, las pendientes de las curvas previas y posteriores a la transición no se aplanan.

EJEMPLO 12

Análisis de amplicones de mayor longitud

Mientras que los amplicones cortos dan lugar a más diferencias de genotipado, los colorantes de la presente invención también se pueden utilizar para genotipar amplicones de mayor longitud. La longitud de los dominios de fusión del ADN es habitualmente de 50 a 500 pb, y los amplicones de mayor longitud, por ejemplo de 500 a 800 pb, suelen tener múltiples dominios de fusión. La alteración de la secuencia en un dominio puede no afectar la fusión de otros dominios, y la variación observada en un dominio puede ser independiente de la longitud del amplicón. Por consiguiente, mientras que los ejemplos descritos se limitan al intervalo de 400-650 pb, no tiene que haber un límite superior para el tamaño del producto de la PCR que se pueda analizar para buscar alteraciones de la secuencia.

Además, dado que el dominio de fusión es independiente de la fusión de otros dominios, se puede utilizar un dominio no variable como control interno para ajustar el eje X (eje de la temperatura) debido a la variación del funcionamiento de la muestra y/o el instrumento. Los heterocigotos se pueden distinguir entre ellos y de los homocigotos, ya que la forma de sus curvas de fusión es diferente. La forma de las curvas de fusión la definen la estabilidad y/o las tasas de fusión cinética de los heterodúplex y homodúplex presentes en la mezcla. Teniendo en cuenta que en los amplicones de larga longitud se encuentran múltiples dominios de fusión, la variación de la forma se puede dar en cualquier parte de la curva. Al ajustar la posición del eje X de varias curvas para superponerse la parte invariable de la curva, es mucho más sencillo distinguir la parte variable de la curva. De forma alternativa, al superponer la parte variable de las curvas, si hay varios genotipos, el resto de las curvas variará. De forma alternativa, el ajuste del eje X se puede realizar al añadir (1) un ácido nucleico externo de control, o (2) un colorante con una longitud de onda de emisión secundaria que no interactúe con el ácido nucleico pero cuya fluorescencia sea dependiente de la temperatura (un colorante con un buen coeficiente de temperatura como Cy5) a cada muestra previamente a la PCR o a la fusión. El desplazamiento del eje de temperatura se debe realizar según la posición de la transición de fusión del ácido nucleico de control o del perfil de intensidad del colorante de control.

Las figuras 13A y 14 ilustran dos ejemplos de análisis de amplicones de mayor longitud. La figura 13A muestra la amplificación de un fragmento de 544 pb del gen humano para el gen del receptor 2A de la 5-hidroxitriptamina (HTR2A), el exón 2 (número de acceso NM_000621.1). Los cebadores sentido y antisentido eran CCAGTCCGGGAGA (SEQ ID NO. 5) y CATA CAGGATGGTTAACATGG (SEQ ID NO. 6), respectivamente. Cada 10 µl de reacción contenía 50 ng de ADN genómico, 0,50 µM de cada cebador, 1 µM de colorante S5, 2 mM de MgCl₂, Tris 50 mM, pH 8,3, 500 µg/ml de albúmina de suero bovino, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 U de KlenTaq® (AB Peptides, St. Louis, MO) y 88 ng de anticuerpo TaqStart® (CloneTech, Palo Alto, CA).

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 40 ciclos a 92°C durante 0 segundos, 60°C durante 2 segundos, y 74°C durante 25 segundos. Tras la amplificación por PCR, las muestras se enfriaron a una velocidad programada de -20°C/s. Inmediatamente después de enfriarlas a elevada velocidad, se realizó la fusión en un

instrumento de fusión de alta resolución adaptado de 24 bits de 70 a 93°C a una velocidad de 0,30°C/s con adquisición continua de fluorescencia.

Se amplificaron y analizaron muestras duplicadas de cada genotipo (CC, TC y TT), los resultados se muestran en la figura 13A. Se normalizaron los datos y se desplazó la temperatura tal y como se describe en el ejemplo 11, salvo que las curvas se superpusieron entre el 10 y el 20% de fluorescencia. La figura 13B muestra la predicción del mapa de fusión de homodúplex y la posición del heterodúplex en el dominio de fusión inferior. Los datos experimentales muestran dos dominios de fusión aparentes. Todos los genotipos son similares en el dominio de fusión superior. Los genotipos difieren en el dominio de fusión inferior, en el que los heterocigotos muestran un comportamiento típico de heterodúplex de fusión baja con la curva de los heterocigotos que cruza la curva de fusión inferior de los homocigotos y se aproxima al homocigoto de temperatura más elevada cuando la temperatura aumenta.

La figura 14 muestra las curvas de diferencia por amplificación de un fragmento de 612 pb del gen que codifica el gen del regulador de la conductividad transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), en concreto el exón 10 (núm. de acceso M55115). Los cebadores sentido y antisentido son AGAATATACACTTCTGCTTAG (SEQ ID NO. 7) y TATCACTATATGCATGC (SEQ ID NO.8), respectivamente. Cada 10 µl de reacción contenía 50 ng de ADN genómico, 0,50 µM de cada cebador, 10 µM de colorante S5, 3 mM de MgCl₂, Tris 50 mM, pH 8,3, 500 µg/ml de albúmina de suero bovino, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 U de KlenTaq[®] (AB Peptides, St. Louis, MO) y 88 ng de anticuerpo TaqStart[®] (CloneTech, Palo Alto, CA). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 35 ciclos a 89°C durante 0 segundos, 58°C durante 8 segundos, y 74°C durante 35 segundos. Las adquisiciones de fluorescencia simples se tomaron para cada muestra después de 35 segundos de extensión. Tras la amplificación por PCR, las muestras se enfriaron a una velocidad programada de -20°C/s. Inmediatamente después de enfriarlas a elevada velocidad, se realizó la fusión en un instrumento de fusión de alta resolución adaptado de 24 bits de 60 a 87°C a una velocidad de 0,30°C/s con adquisición de fluorescencia continua. En este ejemplo, la mejor diferenciación de los heterocigotos se dio en la parte central de la curva (fluorescencia entre el 30 y el 40%) se utilizó para el ajuste del eje X. En último lugar, la fluorescencia de cada gráfico se restó de un de los gráficos del tipo salvaje para obtener las representaciones de diferencia que se muestran en la figura 14. Cada alteración de la secuencia es claramente diferente del tipo salvaje y se pueden diferenciar todos los genotipos.

EJEMPLO 13

Detección dirigida y multiplexado con colorantes saturantes

Los colorantes de la presente invención se pueden utilizar como donadores para excitar un colorante aceptor unido a la sonda de oligonucleótidos. Como dichos colorantes se pueden utilizar a concentraciones prácticamente saturantes para unirse a sondas hibridadas a altas densidades (aproximadamente dos moléculas de colorante por cada tres pares de bases), el colorante está disponible durante toda la longitud del ADNdc y puede transferir energía de resonancia de fluorescencia. Se añade una sonda con un colorante aceptor a la reacción previamente a la PCR, se amplifica y se detecta cuando se hibrida al producto. La unión del colorante de saturación a alta densidad con el dúplex aporta una excitación favorable al colorante aceptor unido a la sonda, dando lugar a un alto grado de fluorescencia en el receptor. Anteriormente, los colorantes con una elevada proporción pb/colorante se utilizaban y solo producían bajos niveles de fluorescencia en el receptor.

Se pueden realizar experimentos multicolor con varias sondas. Por ejemplo, se puede hacer un seguimiento de la fusión total del amplicón a 470 nm, de la emisión de una sonda marcada con fluoresceína a 515 nm, de una sonda marcada con HEX (que se hibrida con un segmento de ADN interno diferente al de los cebadores) a una tercera longitud de onda, y de una sonda marcada con TET (que se hibrida todavía con un segmento de ADN interno diferente al de los cebadores) de una cuarta longitud de onda. Se utiliza la compensación de color, bien conocida en la materia, para separar las cuatro señales superpuestas. El resultado es que se puede utilizar la primera señal para analizar mutaciones por todo el amplicón, mientras que la 2^a, 3^a y 4^a señal permiten genotipar regiones más pequeñas dentro del amplicón.

EJEMPLO 14

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

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

Los antígenos de leucocitos humanos (HLA) son proteínas de la superficie celular de los leucocitos y otros tejidos del organismo que desempeñan un papel clave en el reconocimiento inmune, y por lo tanto también en la aceptación o rechazo en los trasplantes. La correspondencia entre los alelos HLA del donante y el receptor en un trasplante de

órganos es importante. Las proteínas HLA forman dos grupos principales: la clase I y la clase II. Cada grupo está codificado por múltiples genes. Las técnicas aceptadas actualmente para determinar el alelotipo HLA de un tejido incluyen el serotipado mediante reactivos de anticuerpos específicos, la hibridación con sondas de ácidos nucleicos y secuenciación directa de los genes HLA. El coste para determinar el alelotipo HLA es de más de 1.000 \$ por persona, debido al elevado número de genes y loci que se tienen que analizar. Si el donante y el receptor no están emparentados, se debe realizar un genotipado completo de HLA. Sin embargo, hay un 25% de posibilidades de que se dé una compatibilidad perfecta entre hermanos, y por este motivo es preferente realizar trasplantes de órganos entre hermanos cuando los HLA coincidentes indican que es posible. En tal caso, solo se debe demostrar que los parientes donantes y receptores comparten los mismos alelos HLA. No es necesario determinar la identidad exacta de los alelos compartidos.

El Instituto Coriell facilitó las muestras de ADN genómico de CEPH/genealogía de la familia 1331 de Utah. Esta familia está formada por 17 personas de 3 generaciones que incluyen cuatro abuelos internos, dos padres y 11 niños (la genealogía de la familia 1331 se muestra en la figura 15). El Instituto Coriell también facilitó otras muestras con genotipos homocigóticos bien conocidos de HLA-A BM 15(0101) y BM 16(0202).

Se llevó a cabo la amplificación de dos exones del gen HLA-A de la forma siguiente: los genes HLA de clase I son tan parecidos en lo que respecta a la longitud de sus exones codificantes que es difícil diseñar cebadores de PCR que amplifiquen únicamente el gen HLA-A y no los genes relacionados de la clase II. Se adoptó una estrategia de PCR anidada que amplificaba específicamente un fragmento de larga longitud (948 pb) del gen HLA-A seguido por una amplificación secundaria de dicho producto mediante cebadores internos. Los cebadores utilizados en la primera PCR se hibridaron al intrón 1 de HLA-A (cebador sentido 5'-GAAAC(C/G)GCCTCTG(C/T)GGGGAGAAGCAA (SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12)) y el intrón 4 (cebador antisentido 5'-TGTTGGTCCCAATTGTCTCCCCTC (SEQ ID NO. 13)). Y en la PCR secundaria se utilizaron los cebadores sentido 5'AGCCGCGCC(G/T)GGAAGAGGGTCG (SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15) y el cebador antisentido 5'GGCCGGGGTCACTCACCG (SEQ ID NO. 16) para amplificar un segmento de 335 pb del exón 2 de HLA-A. Se utilizaron los cebadores sentido 5'CCC(G/A)GGTTGGTCGGGGC (SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18) y el cebador antisentido 5'ATCAG(G/T)GAGGCGCCCCGTG (SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20) para amplificar un segmento de 366 pb del exón 3 de HLA-A. En las secuencias de cebador de este ejemplo, (N/N') significa que el cebador es una mezcla de secuencias de nucleótidos que tienen el mismo porcentaje de N y de N' en aquella posición. Por ejemplo, el cebador sentido para el segmento de 335 pb del exón 2 de HLA-A tiene una mezcla igual de dos nucleótidos, con G o A en la cuarta posición, tal y como se representa en (SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18). El cebador sentido del intrón 1 de HLA-A tiene dos posiciones de este tipo, y por consiguiente una mezcla de cuatro nucleótidos, tal y como se representa en SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 y SEQ ID NO. 12.

Todas las PCR se llevaron a cabo en capilares de cristal mediante LightCycler®. La PCR inicial contenía 0,5 µM de cebadores sentido y antisentido, 50 ng de ADN genómico en un tampón de 3 mM de Mg⁺⁺, Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, 500 µg/ml de BSA y 20 µM de colorante D6 en 10 µl. Las condiciones de los ciclos fueron de 94°C durante 20 segundos seguidos de 40 ciclos a 94°C durante 1 segundos, 62°C durante 0 segundos, y 72°C durante 1 min. La PCR anidada secundaria contenía 0,25 µM de cebador sentido y antisentido, 1/10.000 del producto de la primera PCR en el mismo tampón que contenía 2 mM de Mg⁺⁺. Las condiciones de los ciclos fueron de 94°C durante 5 segundos seguidos de 25 ciclos a 94°C durante 1 segundos, 65°C durante 0 segundos, y 72°C durante 8 segundos.

Tras la amplificación secundaria se transfirieron los capilares de cristal al instrumento de fusión de alta resolución RH-1, y se llevó a cabo la fusión. La muestra se calentó de 60 a 95°C a una velocidad de 0,3°C/s y se tomaron mediciones de fluorescencia (450 excitación/470 emisión) y de temperatura cada 40 ms (figuras 16A-B). Los productos de la amplificación anidada se secuenciaron mediante el ABI 3700. Se utilizó la versión 4.0 de Sequencher para realizar el análisis de secuencias.

La concordancia entre los resultados del análisis de curva de fusión y de la secuenciación se determinaron de la forma siguiente: el análisis de curva de fusión de los productos amplificados por PCR del exón 2 y el exón 3 de los 17 miembros de CEPH/genealogía de la familia 1331 de Utah se agruparon en seis grupos diferentes (figuras 16A-B). Este hecho sugirió que en esta familia existían seis genotipos diferentes de HLA-A. Los productos de PCR del exón 2 y el exón 3 se secuenciaron, y los resultados confirmaron los análisis de curva de fusión identificando los seis genotipos de la forma siguiente: el genotipo HLA-A 02011/3101 (de ahora en adelante genotipo AB) se corresponde con los miembros de la familia 1, 4, 7, 12; el genotipo HLA-A 3101/2402101 (genotipo BC) se corresponde con los miembros de la familia 3, 5, 6, 11, 17; el genotipo HLA-A 02011/2402101 (genotipo AC) se corresponde con los miembros de la familia 2, 9, 10, 16; el genotipo HLA-A 02011/03011 (genotipo AD) se corresponde con los miembros de la familia 13, 14; el genotipo HLA-A 02011/02011 (genotipo AA) se corresponde con el miembro de la familia 8 y el genotipo HLA-A 2402101/01011 (genotipo CE) se corresponde con el miembro de la familia 15 (los resultados del exón 2 se muestran en las figuras 16A-B).

En algunos casos, los productos de amplificación de hermanos pueden presentar curvas de fusión idénticas o prácticamente idénticas a pesar de tener genotipos diferentes. En tales casos la mezcla de ADN genómico de dos hermanos previamente a la PCR inicial seguida por las dos etapas de amplificación y la curva de análisis de fusión pueden diferenciar genotipos idénticos de genotipos no idénticos. En especial, si los hermanos tienen un genotipo

idéntico, la mezcla de la curva de fusión será idéntica a las curvas realizadas por separado. Si los hermanos tienen genotipos distintos, entonces la mezcla de la curva de fusión será distinta a las curvas realizadas por separado. Los experimentos combinados en cada grupo confirmaron que los miembros de cada grupo tenían genotipos idénticos.

- 5 Otro ejemplo de técnica de análisis combinada se demostró con dos muestras de homocigotos BM15 (0101) y BM16 (0201). En este caso los dos alelos tenían un total de 15 nucleótidos diferentes distribuidos en toda la longitud del exón 2 de HLA-A, pero las curvas de fusión eran similares. La curva de fusión de las muestras combinadas estaba notablemente desplazada hacia la izquierda (temperatura de fusión más baja) a causa de 15 no coincidencias presentes en los heterohíbridos generados en la muestra combinada de PCR del exón 2 de HLA-A (véase la figura 17).

EJEMPLO 15

Seguimiento de la amplificación de colorantes saturantes en tiempo real

Se amplificó un fragmento de 60 pb del gen HTR2A con cebadores sentido y antisentido ACCAGGCTCTACAGTAA (SEQ ID NO.21) y GTTAAATGCATCAGAAG (SEQ ID NO. 22), respectivamente. La amplificación se realizó utilizando los reactivos descritos en el ejemplo 12 pero con ciertas modificaciones en los parámetros de los ciclos, que son 95°C, 0 segundos; 62°C, 2 segundos; 74°C, 20 segundos mediante LightCycler®. En la mezcla de la reacción había concentraciones, de forma independiente, de SYBR® Green I, D6, Z6 y N7. Los datos de fluorescencia se tomaron una vez en cada ciclo, hasta 36 ciclos. Los puntos de cruce (Cp) de fluorescencia, calculados como el segundo máximo de derivada de la representación gráfica de la amplificación (el número de ciclo se representó en el eje X en función de la intensidad de fluorescencia en el eje Y), se obtuvieron de la forma siguiente:

TABLA 4.

Colorante presente en la reacción	Dilución/Concentración	Cp
SYBR® Green I	1:2.500	Sin amplificación
	1:5.000	26
	1:10.000	26
	1:20.000	Señal demasiado débil
D6	250 µM	Sin amplificación
	125 µM	28
	63 µM	27
	31 µM	27
	16 µM	26
	8 µM	26
	4 µM	26
	2 µM	26
	1 µM	Señal demasiado débil
Z6	20 µM	Sin amplificación
	10 µM	31
	5 µM	27
	2,5 µM	26
	1,3 µM	26
	0,7 µM	25
	0,4 µM	25
	0,2 µM	Señal demasiado débil
N7	62 µM	Sin amplificación
	31 µM	27
	16 µM	27
	7,9 µM	26
	4,0 µM	26

Colorante presente en la reacción	Dilución/Concentración	Cp
	2,0 µM	26
	1,0 µM	26
	0,5 µM	26
	0,2 µM	26
	0,1 µM	Señal demasiado débil

Se espera que el valor de Cp, que representa el número de ciclo en el que la señal supera el fondo aumente cuando los inhibidores presentes en la reacción afecten la eficiencia de la amplificación. Sin embargo, en las condiciones de estos experimentos, la inhibición mediante cantidades crecientes de colorante no llevó a un incremento gradual de Cp, sino a una detención repentina de la amplificación. Debido a la breve longitud del amplicón (que emite una señal inferior en comparación con amplicones de mayor longitud) el colorante SYBR® Green I solo se pudo utilizar en el intervalo de dos veces la concentración de la monitorización en tiempo real. En cambio, los colorantes D6, Z6 y N7 se pudieron utilizar en el intervalo de 32 a 128 veces la concentración. Se considera que muchos de los colorantes saturantes tienen un amplio intervalo de concentraciones que se pueden utilizar en seguimiento de la amplificación en tiempo real.

EJEMPLO 16

Genotipado de SNP mediante la utilización de sondas sin marcaje y colorantes saturantes

Tal y como se muestra en la figura 7, los colorantes saturantes tienen la capacidad de detectar firmas distintivas de fusión de múltiples especies de ADNdc presentes en una mezcla de reacción sin llegar a ocultar las firmas de fusión a baja temperatura a causa de la redistribución de colorante de dúplex de temperaturas de fusión (Tm) inferiores a superiores. Este aspecto de los colorantes saturantes permite la utilización de sondas sin marcaje en genotipado. Cuando se mezcla una sonda sin marcaje con el amplicón en presencia de un colorante saturante, la firma de fusión de los dúplex amplicón y sonda-diana se pueden observar a la vez. Los cambios en el perfil de fusión se pueden utilizar para detectar la presencia de variaciones en la secuencia bajo la sonda, así como en cualquier otro lugar del amplicón. De manera opcional, si se interrumpe el proceso de fusión previamente a la transición de fusión del amplicón, se puede estudiar únicamente la fusión de la sonda sin marcaje. Con los colorantes, como SYBR® Green I (comparar la figura 21B con la 21C), que se utilizan habitualmente para PCR en tiempo real no ha sido posible la utilización de sondas sin marcaje para realizar un genotipado o análisis de mutaciones eficaz. Además, debido a las propiedades de los colorantes saturantes, el genotipado se puede llevar a cabo en presencia de la sonda sin marcaje sin necesidad de que esta o el ácido nucleico diana estén inmovilizados en una superficie. En cada una de las realizaciones de ejemplo, el colorante, la sonda sin marcaje y el ácido nucleico diana están libres en la solución.

Se generó un amplicón de 300 pb mediante PCR con LightCycler® (Roche Applied Systems, Indianapolis, IN) mediante los cebadores 5'GATATTTGAAGTCTTTCGGG (el cebador "antisentido", SEQ ID NO. 23) y 5'TAAGAGCAACACTATCATAA (el cebador sentido, SEQ ID NO. 24) en una mezcla de reacción de 10 µl que contenía ADN de plásmido molde inicial (ejemplo 5) de 1×10^6 copias, 0,5 µM del extremo 3' fosforilado de sonda, 3 mM de MgCl₂, Tris 50 mM, pH 8,3, 0,2 nM de cada dNTP, 500 µg/ml de BSA, 20 µM de colorante D6 de ADNdc (ejemplo 1) y 0,4 U de polimerasa Taq (Roche). En la amplificación simétrica se utilizaron 0,5 µM de cada cebador. En la amplificación asimétrica las proporciones de cebadores se hicieron variar entre 10:1, 20:1 y 50:1. La reacción de PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 segundos, seguida de 45 ciclos a 95°C durante 1 segundos, 55°C durante 0 segundos, y 72°C durante 10 segundos (o 5 segundos sin la sonda). Al final de la amplificación las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 0 segundos, se alinearon a 40°C durante 0 segundos y a continuación se llevó a cabo un análisis de fusión a una velocidad de 0,2°C/s hasta 90°C (LightCycler®), o de forma alternativa, hasta 75°C a una velocidad de 0,3°C/s (HR-1) o 0,1°C/s (LightTyper® con parámetros ópticos modificados a 450 nm de excitación y 470 nm de detección).

La cadena diana del producto amplificado debe estar disponible adecuadamente para hibridarse con la sonda. En muchos casos se puede llegar a esta condición si se añade el cebador que genera la cadena de hibridación con la sonda (el cebador "sentido") en exceso en comparación con el otro cebador (el cebador "antisentido"). Las figuras 18A y 19 muestran los resultados de un experimento de optimización en el que se examinaron los amplicones generados al modificar las proporciones de cebadores. Mientras que la proporción óptima de cebador puede ser diferente para cada amplicón y/o sistema de amplificación, la fusión de la sonda se observa habitualmente cuando la proporción entre los cebadores sentido y antisentido es de aproximadamente 10 a 1 o superior. Se debe tener en cuenta que en los datos de LightCycler®, los picos de fusión de la sonda y del amplicón se podían observar a tal proporción de cebadores (figura 18B). Se entiende que, mientras que los ejemplos del presente documento utilizan PCR "asimétricas" para obtener más abundancia de cadena diana, otros métodos de amplificación también son adecuados, en especial métodos de amplificación como NASBA, TMA o la amplificación por círculo rodante, que favorecen la amplificación de una cadena. De forma alternativa, la separación de las cadenas se puede producir tras

la PCR, por ejemplo, al incorporar una cola de biotina o de poli-A (u otra secuencia) en el amplicón mediante cebadores correctamente diseñados. Aún en otro ejemplo alternativo, los análisis de fusión se pueden realizar para un ácido nucleico monocatenario posteriormente a la amplificación o sin esta. Además, se ha descubierto que la magnitud relativa de la transición sonda-diana aumenta a medida que disminuye la longitud del amplicón. Por lo tanto, en otro ejemplo se pueden utilizar amplicones de menor longitud, por ejemplo de 100 pb o menos.

En los presentes ejemplos, el extremo 3' de la sonda sin marcaje está fosforilado para evitar la extensión de la polimerasa durante la amplificación. Si se desea, se puede evitar la extensión de la sonda mediante la polimerasa por otros medios, incluyendo la utilización de un 2',3'-didesoxinucleótido, un 3'-desoxinucleótido, una unión 3'-3' u otras terminaciones no prolongables como un espaciador 3' C3 (Glen Research, Sterling, VA), una biotina con un enlazador opcional, o un enlazador de la hendidura menor. Para evitar la extensión también se puede utilizar la ausencia de coincidencia de dos o más bases del extremo 3' terminal de la sonda. De forma alternativa, se puede añadir la sonda sin marcaje con o sin el extremo 3' bloqueado a una mezcla de ácidos nucleicos que sustancialmente carecen de actividad polimerasa.

En muchas de las realizaciones descritas en el presente documento, cuando se incluye una sonda sin marcaje a la mezcla de amplificación, es preferente que la sonda sin marcaje no se una a la secuencia diana tan fuertemente como para inhibir la amplificación, hasta llegar incluso a una hibridación completa con la secuencia diana. Este hecho es especialmente importante si la sonda sin marcaje es un ácido peptidonucleico, el cual, dependiendo de su configuración, puede unirse tan fuertemente cuando se hibrida completamente, que se inhibe la amplificación (Behn M, y otros, Nucleic Acids Res. 1998; 26:1356-8). Además, en muchas realizaciones, no es preferente que la sonda sea suficientemente complementaria con el cebador como para interferir en el análisis de curva de fusión. Varios colorantes nuevos incluidos en el presente documento, así como otros colorantes conocidos, son adecuados para utilizar con dichas sondas sin marcaje. Además, a pesar de que no se comprenda completamente su mecanismo de actuación, varios colorantes con un porcentaje de saturación inferior al 50% también son adecuados para utilizar con sondas sin marcaje. Un ejemplo de dichos colorantes es el tiazol naranja.

Otra consideración para realizar un genotipado correcto es la longitud y contenido de GC de la sonda. Dado que no se conoce completamente el mecanismo de unión de los colorantes de saturación con ADNdc, se han estudiado varios diseños de sonda. La tabla 5 y la figura 20 muestran un experimento de optimización con el colorante D6 en el que se examinaron sondas cuya longitud era de 14 a 30 bases con un contenido de GC del 14 al 37%. Cuando la sonda y la diana eran completamente complementarias, se detectaron los picos de fusión de las sondas de 14 pb (figura 20). Sin embargo, cuando en la sonda había una coincidencia (que en este ejemplo se sitúa en el centro de la sonda), no se observaron picos de fusión de las sondas de menos de 22 bases (no se muestra la información), lo que sugiere que el colorante D6 en estas condiciones requiere, como mínimo, entre 10 y 11 pb de longitud de unión sin interrupción. Cuando se diseñan sondas, las no coincidencias se pueden colocar cerca de los extremos de la sonda, así como en el centro de esta. Se llevó a cabo un experimento similar con secuencias de sonda del 100% de AT y el 100% de GC que se hibridaban con las cadenas complementarias sintéticas. Los picos de fusión de dichas sondas se detectaban claramente cuando las sondas tenían una longitud mínima de 24 bases (no se muestran los datos) con la sonda de 100% de AT, y de solo 10 bases con la sonda de 100% de GC. Los resultados de los análisis de fusión en LightCycler®, HR-1, y el LightTyper® modificado coincidían.

TABLA 5

Longitud (bases)	Secuencia de la sonda	% de GC	SEQ ID NO.
14	caatgaa*tatttat	14,3	SEQ ID NO. 25
16	tcaatgaa*tatttatg	18,8	SEQ ID NO. 26
18	ttcaatgaa*tatttatga	16,7	SEQ ID NO. 27
20	attcaatgaa*tatttatgac	20	SEQ ID NO. 28
22	g attcaatgaa*tatttatgac g	27,3	SEQ ID NO. 29
24	gg attcaatgaa*tatttatgac ga	29,2	SEQ ID NO. 30
26	ggg attcaatgaa*tatttatgac gat	30,8	SEQ ID NO. 31
28	gggg attcaatgaa*tatttatgac gatt	32,1	SEQ ID NO. 32
30	ggggg attcaatgaa*tatttatgac gattc	36,7	SEQ ID NO. 33

a* marca una posición complementaria al SNP del amplicón

El genotipado de SNP se demostró con sondas de 28 bases y moldes que eran homocigotos para A, C, G y T en la posición de la base alternativa o bien heterocigotos para aquella posición de la manera siguiente: A/C, A/G, A/T, C/G, C/T y G/T. Las figuras 21A-D muestran las curvas de fusión generadas por una sonda que es completamente complementaria con el homocigoto A (en este caso la secuencia de la sonda es A y la cadena sentido es T). Todos los homocigotos se funden en una única transición (figura 3A). La coincidencia A::T tiene el máximo de estabilidad con una T_m de 66,1°C (esperada a 64,0°C), con las no coincidencias A::G (63°C, esperada a 62,4°C), A::A (61,9°C, esperada 60,7°C) y A::C (61,4°C, esperada 60,8°C) decrecientes en orden de estabilidad. Las predicciones de T_m no tenían en cuenta la presencia del colorante. Tal y como sucede con la T_m del amplicón (figura 10), la presencia del colorante suele aumentar la T_m de la sonda. Las curvas de fusión de todos los homocigotos están claramente separadas y se distinguen con facilidad (figura 21A). Los moldes heterocigóticos se separaron en dos grupos: los del primer grupo tenían un alelo completamente complementario con la sonda (A/T, A/C, AG), y los del otro grupo no lo

tenían (C/T, C/G, G/T). En el primer grupo la curva de fusión de la sonda muestra claramente dos picos: el pico de T_m superior que coincidía con el molde homocigótico A, y el pico de T_m menor que caracterizaba el tipo de no coincidencia de base (figura 21B). En el segundo grupo, las curvas de fusión mostraban solamente un pico, cada uno de los cuales estaba desplazado a la izquierda en comparación con el molde homocigótico A y cada uno de los cuales se podía distinguir claramente de los demás (figura 21D). Cuando se realizó la misma sonda con el colorante SYBR[®] Green I, los picos de fusión de los moldes homocigóticos con no coincidencia con la sonda se desplazaron hacia la izquierda en comparación con los moldes homocigóticos A que coincidían perfectamente, pero no se podían distinguir entre ellos. Los moldes heterocigóticos C/T, C/G y G/T también estaban desplazados hacia la izquierda, pero no estaban separados entre ellos. Las curvas de fusión de los moldes heterocigóticos A/C, A/G y A/T no se podían distinguir del molde homocigótico A (figura 21C).

EJEMPLO 17

Genotipado de la fibrosis quística con sondas sin marcaje y colorantes saturantes

Se amplificaron fragmentos del gen CFTR, en concreto el exón 10 y 11, mediante muestras facilitadas por el Instituto Coriell para el desarrollo médico, mediante los cebadores 5'ACATAGTTTCTTACCTCTTC (SEQ ID NO. 34, cebador sentido), y 5'ACTTCTAATGATGATTATGGG (SEQ ID NO. 35, cebador antisentido) para el exón 10, y los cebadores 5'TGTGCCTTTCAAATTCAGATTG (SEQ ID NO. 36, cebador sentido) y 5'CAGCAAATGCTTGCTAGACC (SEQ ID NO. 37, cebador antisentido) para el exón 11. La sonda para el exón 10, que hibrida en la mutación F508del, era 5'TAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTA (SEQ ID NO. 38). Se utilizaron dos sondas para detectar la mutación G542X en el exón 11 (5'CAATATAGTTCTTNGAGAAGGTGGAATC, SEQ ID NO. 39) en las que N es G o T. Se fosforilaron todos los extremos 3' de las sondas. Se realizó una PCR asimétrica utilizando una proporción de cebadores de 10:1 (0,5 μ M sentido; 0,05 μ M antisentido). Los otros reactivos de la PCR fueron básicamente los mismos que en el ejemplo 16, salvo que se utilizaron 50 ng de ADN genómico como molde. Las condiciones de los ciclos fueron de 95°C durante 10 segundos y a continuación 45 ciclos a 95°C durante 0 segundos, 52°C durante 0 segundos y 72°C durante 10 segundos. El análisis de curva de fusión en LightCycler[®] se realizó como en el ejemplo 16. La tabla 6 recoge varias deleciones encontradas en las sondas.

TABLA 6.

Mutación	Posición del nucleótido	Cambio de aminoácido	exón
I506V	A o G en 1648	Ile o Val en 506	10
I507del	deleción de 3 pb entre 1648 y 1653	deleción de Ile506 o Ile507	10
F508del	deleción de 3 pb entre 1652 y 1655	deleción de Phe en 508	10
F508C	T o G en 1655	Phe o Cys en 508	10
G542X	G a T en 1756	Gly a parada en 542	11

Se escogió la mutación F508del como un ejemplo de deleción breve (3 pb). La sonda contenía una secuencia de tipo salvaje de 28 bases. La figura 22A muestra que la T_m del homocigoto F508del es 10°C inferior a la del tipo salvaje. La curva de fusión del heterocigoto F508del mostró dos picos de fusión: uno a la misma temperatura que el tipo salvaje y otro coincidente con el homocigoto F508del. La figura 22B muestra una superposición de tres mutaciones heterocigóticas adicionales encontradas en este locus, F508C, I506V y I507del.

La mutación G542X es una mutación de una sola base en la que la G del tipo salvaje pasa a T. Se utilizaron la sonda G de tipo salvaje de 28 bases y la sonda de mutación T para genotipar la mutación homocigótica G542X (T/T) y heterocigótica (G/T) sin secuenciación (figura 23).

EJEMPLO 18

Genotipado mediante múltiples sondas sin marcaje y un colorante saturante

El análisis de fusión mediante una sonda sin marcaje con un colorante saturante permite realizar el genotipado de una o más variantes de secuencia bajo la sonda. La utilización de múltiples sondas sin marcaje permite el genotipado simultáneo de variantes de secuencias en múltiples segmentos de secuencia. Las sondas se pueden diseñar para hibridar con múltiples segmentos de secuencia en un fragmento de ADN, o con segmentos de secuencia en múltiples fragmentos de ADN. A modo de ejemplo, en aquellos casos en los que se utilizan múltiples sondas con un único fragmento de ADN diana, no es necesario que las sondas se superpongan para proporcionar información sobre la variación de la secuencia. En un ejemplo, se amplificó asimétricamente un fragmento de 210 pb del gen de la fibrosis quística en presencia de 20 μ M de colorante D6 o N7, utilizando dos cebadores descritos anteriormente (el cebador sentido SEQ ID NO. 34 y el cebador antisentido SEQ ID NO. 35 a 0,5 μ M y 0,05 μ M, respectivamente). En este fragmento de 210 pb se estudió la presencia o ausencia de dos mutaciones, F508del y Q493V, mediante dos sondas sin marcaje: sonda 1: ATCTTTGGTGTTCCTATGATG (SEQ ID NO. 48; se han subrayado las 3 bases que se eliminan por deleción en la mutación F508del) y la sonda 2:

CTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGC (SEQ ID NO. 49; se han subrayado las bases que mutan y se convierten en T en Q493V). Se fosforilaron los extremos 3' de ambas sondas. Las temperaturas de fusión de las sondas coincidentes y no coincidentes se mantuvieron por debajo de 72°C para permitir una separación suficiente de la firma de fusión del amplicón. Se realizó el análisis de fusión con los instrumentos LightCycler®, HR-1 y LightTyper® modificado, tal como en el ejemplo 16. Los datos de fusión de los tres instrumentos genotiparon correctamente cuatro muestras: tipo salvaje, homocigoto F508del, heterocigoto F508del y el heterocigoto compuesto F508del/Q493V. La figura 24 muestra el perfil de fusión con colorante N7. Se obtuvieron resultados muy similares con el colorante D6.

10 EJEMPLO 19

Genotipado y análisis de mutaciones simultáneas

Los estudios para encontrar trastornos genéticos pueden ser complejos porque las mutaciones causales acostumbran a estar dispersas por todo el gen. El genotipado y análisis de mutaciones simultáneas se puede utilizar para detectar dichos trastornos. Por ejemplo, para analizar cualquier gen, se amplifica cada exón utilizando cebadores externos a los sitios habituales de corte y empalme. Si se conoce variantes de secuencia que aparecen con alta frecuencia, se puede incluir una sonda sin marcaje para genotipar el sitio, o se puede utilizar un grupo adicional de cebadores para amplificar este locus más pequeño. El genotipado y análisis de sitios específicos se puede realizar en reacciones separadas, o si el análisis es positivo, a continuación se puede añadir la sonda al tubo y repetir el análisis de fusión para el genotipado. Preferentemente el genotipado y análisis se realizan simultáneamente al analizar tanto el amplicón de longitud completa como los dúplex del locus de menor longitud en el mismo análisis de curva de fusión. Dada la diferencia de tamaño de estos dos elementos, se espera que los picos de fusión del amplicón completo se encontrarán a temperaturas superiores que los del locus de menor tamaño.

El tamaño promedio del gen es de 27 kb, pero solo aproximadamente 1.300 bases codifican aminoácidos. De media, existen aproximadamente 9 exones por gen cuya longitud promedio es de aproximadamente 150 pb. De las alteraciones de secuencia que provocan enfermedades, aproximadamente el 70% son SNP, con un 49% de mutaciones de cambio de sentido, 11% de mutaciones sin sentido, 9% de corte y empalme, y <1% de mutaciones reguladoras. Las inserciones y deleciones pequeñas representan el 23% de mutaciones que provocan enfermedades. El 7% restante son causadas por inserciones o deleciones de gran tamaño, repeticiones, redistribuciones o alteraciones de secuencias compuestas. Algunas alteraciones de secuencia no afectan al funcionamiento del gen, por ejemplo los SNP silenciosos que producen la misma secuencia de aminoácidos. Otros ejemplos son los SNP e inserciones o deleciones con desplazamiento de marco que cambian la secuencia del aminoácido pero no alteran la actividad de la proteína. La mayoría de SNP y repeticiones con intrones no provocan enfermedades, salvo por el corte y empalme y las mutaciones reguladoras. Excepto las deleciones de gran tamaño y las alteraciones de secuencia interna de intrones, las mutaciones que causan enfermedades se pueden detectar mediante PCR con cebadores en intrones que flanquean todos los exones. Los cebadores se colocan fuera de los sitios con tendencia a mutaciones por corte y empalme. Si no se amplifica la alteración de secuencia, no se podrá detectar con ningún método, ni por secuenciación.

El análisis de fusión de alta resolución que utiliza colorantes del presente documento es cada vez más complejo a medida que aumenta el tamaño del amplicón. De forma opcional, para mantener una sensibilidad de análisis cercana al 100%, los exones de más de 400-500 bases se pueden analizar con más de un amplicón. Por ejemplo, los parámetros de ciclos térmicos habituales se configuran de tal forma que se pueda amplificar todos los exones de una sola vez.

Simultáneamente al análisis de mutaciones, las mutaciones y polimorfismos habituales se pueden genotipar al añadir una o más sondas sin marcaje de oligonucleótidos o al amplificar selectivamente un amplicón más pequeño mediante uno o más grupos adicionales de cebadores. La amplificación de los amplicones de mayor y menor tamaño se puede realizar simultáneamente, o mediante una PCR bifásica que amplifique en la primera etapa el amplicón de mayor tamaño, y en la segunda etapa el amplicón o amplicones de menor tamaño. Para realizar una PCR bifásica se debe diseñar la T_m y la cantidad de cada cebador de tal manera que, al ajustar las temperaturas de alineamiento de las dos fases, se de una amplificación preferente de los diferentes amplicones. Cuando se espera que la señal del amplicón de mayor tamaño oculte o enmascare la señal del amplicón de menor tamaño, se puede utilizar esta técnica bifásica para ajustar la cantidad final de cada amplicón para evitar dicho problema. Cuando se utilizan una o más sondas de oligonucleótidos, se puede utilizar una PCR ligeramente asimétrica para amplificar el amplicón de mayor tamaño, por ejemplo con una proporción de cebadores de 10:1.

Un ejemplo de la utilización de un procedimiento de fusión única para analizar simultáneamente mutaciones en el amplicón y genotipar mediante una sonda se llevó a cabo de la forma siguiente: se amplificó un fragmento del exón 11 del gen de la fibrosis quística de diez muestras de tipo salvaje y veinte desconocidas en presencia de una sonda G de tipo salvaje y el colorante D6 según el método descrito en el ejemplo 17. Las muestras amplificadas se fundieron en el instrumento LightTyper® modificado (ejemplo 16) con una velocidad de aumento de 0,1°C/s entre 40°C y 90°C. La figura 25A muestra la parte del amplicón de la curva de fusión (75°C-83°C). Las curvas de diez de las muestras estaban ligeramente desviadas hacia la izquierda y eran claramente distintas de las muestras de tipo

salvaje. Se creía que dichas muestras llevaban una mutación heterocigótica en algún lugar del amplicón. El resto de las curvas tenían la forma esperada de las muestras homocigóticas. Sin embargo, las curvas de las diez muestras desconocidas restantes no se solapaban con las curvas de tipo salvaje, y por lo tanto, la mayoría de estas también se marcan como posibles variantes de la secuencia. La figura 25B muestra la parte de sonda de la curva de fusión (58°C-72°C) representada como la derivada negativa. Las treinta muestras se genotiparon inequívocamente.

EJEMPLO 20

Seguimiento de la fluorescencia durante la amplificación mediante sondas sin marcaje

Cuando se realiza un seguimiento de la fluorescencia de un colorante de unión a ADN durante la PCR, es posible observar la generación de una secuencia ácido nucleico diana específica, ciclo a ciclo, como define la hibridación del ácido nucleico diana a una sonda sin marcaje. La cantidad de secuencia diana en cada ciclo de la PCR depende de la cantidad inicial en la muestra original. Por ese motivo se puede llevar a cabo una cuantificación. Como se ha mencionado, las señales de fluorescencia del amplicón y de otros ADN se separan de la señal específica de la sonda. Esta separación se consigue al hacer un seguimiento de la fluorescencia a varios puntos de temperatura incluyendo antes y durante la transición de fusión de la sonda, durante, como mínimo, dos ciclos en la reacción de amplificación.

A modo de ejemplo, se amplificó un fragmento de 300 pb de plásmido de ADN (ejemplo 5) en presencia de una sonda de 28 pb (tabla 5, SEQ ID NO. 32) mediante los reactivos descritos en el ejemplo 16, salvo que el molde de ADN era de 10^5 copias/10 μ l, si no se especificaba lo contrario, $MgCl_2$ a 2 mM, y se utilizó el colorante N7 en lugar de D6. Se utilizó una proporción de cebadores de 10:1. Las secuencias de la sonda y el plásmido coincidían (es decir, no había no coincidencia bajo la sonda). Se realizó la amplificación en LightCycler® utilizando los siguientes parámetros programados para 45 ciclos: 95°C durante 0 segundos, enfriamiento a -20°C/s, 52°C durante 0 segundos, calentamiento a 0,5°C/s, 74°C durante 8 segundos, calentamiento a 20°C/s. Se hizo un seguimiento continuo de la fluorescencia entre 52°C y 74°C y durante cada ciclo de la PCR, y los resultados se muestran en la figura 26. A continuación se importaron los archivos de datos a un software adaptado, básicamente como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.174.670, que se ha incorporado en las referencias del presente documento, para analizar los múltiples datos de fluorescencia obtenidos durante cada ciclo. Se evaluó la calidad de la amplificación mediante el método habitual de representación gráfica del valor de fluorescencia a una temperatura cada ciclo, por ejemplo 61°C en la que se puede observar la cantidad de todo el ADN (figura 28A, cuadrado negro), o 73°C en la que solamente se puede observar la cantidad del amplicón bicatenario (figura 28A, cuadrado blanco).

Cuando se ha seleccionado un intervalo específico de temperatura de cada ciclo para observar la fusión de la sonda (en este caso entre 62°C y 72°C), las curvas de fluorescencia resultantes (representadas como la derivada negativa en la figura 27) mostraron que cuando aumentaba el número de ciclos, el pico de fusión de la sonda aumentaba en tamaño. Un método capaz de expresar la correlación entre el número de ciclos y la cantidad de señal específico sonda-diana es la representación gráfica de la diferencia en valor derivado en la T_m de la sonda (en este caso a 66,5°C) y justo antes de llegar a la transición de fusión de la sonda (a 64°C). En la figura 28B se muestra la representación gráfica resultante (triángulo blanco) y muestra una correlación positiva entre la señal sonda:diana y el número de ciclos. Se pueden predeterminar los dos puntos de temperatura, o escogerlos de forma visual a partir de las derivadas de las curvas, u obtenidos de las segundas curvas derivadas en las que la segunda derivada es igual a cero. Se considera que, una vez se han establecido las representaciones gráficas, estas se pueden utilizar para cuantificar el molde inicial de una muestra.

En otro método a las curvas de la figura 27 se restaron los valores de referencia y se ajustaron a un Gaussiano (si era posible), por lo que el área situada bajo los picos se puede calcular y representar gráficamente en función del número de ciclos como en la figura 28B (triángulo negro). En la figura 28C se vuelve a mostrar, en esta ocasión con muestras de tres concentraciones de molde iniciales diferentes, cada una ajustada a una línea recta que indica una correlación positiva y lineal entre el número de ciclos y la amplificación específica del producto tal y como lo define la sonda. Los valores del área del pico de fusión fueron negativos durante algunos ciclos previamente a cuando empezó a aumentar con el número de ciclos. Este hecho dio la oportunidad de establecer los puntos de cruce en el área sin picos, a pesar de que los valores del área de picos no cruzaron cero, se puede utilizar la extrapolación a cero. Cuando se representaron gráficamente los puntos de cruce en función del logaritmo de la concentración inicial de molde, se encontró una relación lineal (figura 28D) que indicaba que se puede utilizar la fusión de la sonda sin marcaje para cuantificar el molde inicial mediante seguimiento de fluorescencia durante la amplificación.

Mientras que en este y otros ejemplos se utilizan colorantes saturantes, se entiende que con ciertos métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar otros colorantes, especialmente con métodos donde no es necesario detectar SNP y otras modificaciones de pequeño tamaño. Por ejemplo, en el método citado anteriormente, la sonda coincidía perfectamente con la secuencia diana, y el método no incluía la detección de variación genética. Sin embargo, también se entiende que el método citado anteriormente se puede utilizar en combinación con otros análisis diversos, incluyendo el genotipado.

EJEMPLO 21

Detección de mutaciones en el gen c-kit para diagnosticar el GIST

La proteína humana c-kit es un receptor transmembrana de tirosina quinasa que se activa por la unión a su ligando. La activación de la tirosina quinasa lleva a la autofosforilación de los residuos de tirosina que, a su vez, inician una cascada de señalización intracelular que finaliza con la proliferación celular. En varios tumores se han observado mutaciones que provocan la activación de la proteína c-kit sin necesidad de unión a su ligando, entre ellos el tumor de células germinales, tumores de los mastocitos y tumores del estroma del tracto gastrointestinal (GIST). Se cree que estas mutaciones son el motivo principal del crecimiento neoplásico. Un avance reciente en el tratamiento molecular dirigido es el desarrollo del fármaco STI-571 (imatinib, gleevec) que inhibe el receptor c-kit activado en GIST. Este fármaco es un derivado de la fenilaminopirimidina, y muchos de los pacientes de GIST tratados con STI-571 han mostrado respuestas parciales y estabilización de la enfermedad. Sin embargo, se necesita un diagnóstico mejorado para esta clase de neoplasma.

Históricamente, el diagnóstico de tumores del estroma del tracto gastrointestinal ha sido una tarea complicada. Actualmente se realizan inmunotinciones de forma habitual de CD117 (c-kit) en los tumores del estroma del tracto gastrointestinal. Una inmunotinción positiva sugiere que se ha identificado correctamente el tumor como GIST. Sin embargo, en ocasiones la inmunotinción de GIST es focal y/o equívoca y difícil de evaluar. Además la inmunotinción no da información sobre la localización, presencia o ausencia, o el tipo de la mutación activante, y los anticuerpos CD-117 disponibles en el mercado pueden presentar una reacción cruzada con moléculas que no sean c-kit. La fusión de amplicón de alta resolución es un método mejorado que se puede utilizar para detectar rápidamente mutaciones activantes en el gen c-kit. Las variantes de secuencia detectadas por fusión de alta resolución se pueden clasificar a continuación mediante secuenciación del ADN.

Se llevó a cabo un experimento, a título de ejemplo, de detección de c-kit de la forma siguiente: se obtuvieron varias muestras de tejido afectado por GIST, incluidos tumor primario, tumor metastásico/recurrente, neoplasmas procedentes del intestino delgado y grueso, estómago, peritoneo y tejido blando peripancréatico en bloques de parafina. Se aisló el ADN de secciones de tejido embebido en parafina a portaobjetos de vidrio, para ello se eliminó la parafina y se rehidrataron las muestras mediante lavados sucesivos de xileno y después etanol al 95%, 70%, 50% y 30%. Tras el enjuagado final con H₂O desionizada, el portaobjetos se secó bajo una lámpara de infrarrojos durante 5 minutos. Se hizo una microdissección del área apropiada del tejido tumoral que se retiró del portaobjetos con un bisturí y se incubó en de 50 a 100 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, Tween 20 al 1%, 1,0 mg/ml de proteinasa K durante la noche a 37°C. La muestra se incubó en un baño de H₂O hirviendo durante 10 min para inactivar la proteinasa K. Tras enfriar en hielo, la muestra se diluyó en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 0,1 mM y se sometió a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos de exón que se muestran en la tabla 7.

TABLA 7.

Cebador	Secuencia (5'→3')	SEQ ID NO.
Exón sentido 9	GATGCTCTGCTTCTGTAAGT	SEQ ID NO. 40
Exón antisentido 9	GCCTAAACATCCCCTTAAATTGG	SEQ ID NO. 41
Exón sentido 11	CTCTCCAGAGTGCTCTAATGAC	SEQ ID NO. 42
Exón antisentido 11	AGCCCCTGTTTCATACTGACC	SEQ ID NO. 43
Exón sentido 13	CGGCCATGACTGTGCGCTGTAA	SEQ ID NO. 44
Exón antisentido 13	CTCCAATGGTGCAGGCTCCAA	SEQ ID NO. 45
Exón sentido 17	TCTCCTCCAACCTAATAGTG	SEQ ID NO. 46
Exón antisentido 17	GGACTGTCAAGCAGAGAAT	SEQ ID NO. 47

Se llevó a cabo una PCR en un volumen total de 20 µl en una cubeta para capilares. La mezcla de la reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), MgCl₂ 3 mM, BSA 0,5 mg/ml, 200 µM de cada dATP, dGTP y dCTP, 600 µM de dUTP, 0,5 µM de cebadores, 1 µl de polimerasa Klentaq diluida (1 µl de polimerasa Klentaq sensible al frío incubada con 10 µl de diluyente de enzima), 1 unidad de uracil N-glicosilasa (Amperase) y 20 µM de colorante D6. La PCR se realizó en LightCycler® (Roche Applied Systems, Indianapolis, IN) con una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C (para desnaturalizar la uracil glicosilasa) seguida de 45 ciclos a 95°C durante 3 segundos, enfriamiento a 20°C/s hasta 58°C (exones 9 y 11), 62°C (exón 13), o 55°C (exón 17) durante 10 segundos, y a continuación un calentamiento de 1°C/s hasta 75°C durante 0 segundos. Los tamaños de los amplicones eran 235 pb (exón 9), 219 pb (exón 11), 227 pb (exón 13), 170 pb (exón 17). Tras la PCR, se calentaron momentáneamente las muestras a 95°C y a continuación se enfriaron a 40°C en el LightCycler®. Las muestras se transfirieron al instrumento de análisis

de fusión de ADN de alta resolución HR/1 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Los análisis de fusión se llevaron a cabo tal y como se describe en el ejemplo 3. Todas las muestras se corrieron dos veces.

- 5 En las figuras 29-32 se muestran resultados ilustrativos en los que se detectaron SNP heterocigóticos (figura 29), delección homocigótica de 12 pb yuxtapuesta a un SNP (figura 30), duplicación en tándem heterocigótica de 36 pb (figura 31) y una delección heterocigótica de 54 pb (figura 32), mediante análisis de fusión de amplicón de alta resolución. La tabla 8 resume estas y otras mutaciones que se identificaron mediante el análisis de fusión de amplicón de alta resolución y se verificaron por secuenciación de ADN.

TABLA 8.

Número de muestra	Número de exón donde se detectó variación mediante fusión de alta resolución	Cambios de base de la secuencia establecidos por secuenciación del ADN (het/hom)	Alteración del aminoácido
1	Exón 11	SNP cambio de sentido (het)	V559D
2	Exón 11	*delección de 54 pb (het)	DEL 557-574
5	Exón 11	delección de 6 pb	DEL 558-559
6	Exón 11	*delección de 12 pb + SNP (hom)	DEL 554-557; K558G
7	Exón 11	*duplicación de 36 pb (het)	DUP 574-585
8	Exón 11	*delección de 30 pb + SNP (het)	DEL 548-557; K558G
9	Exón 11	*delección de 33 pb + SNP (het)	DEL 547-557; K558G
13	Exón 11	*inserción de 9 pb (het)	INS 579-581
19	Exón 11	*delección de 6 pb + SNP (het)	DEL 557-558; V559F
20	Exón 13	SNP cambio de sentido (het)	K642E
26	Exón 9	duplicación de 6 pb (het)	DUP 502-503
25	Exón 11	*delección de 27 pb + SNP (het)	DEL 565-573; T574P
29	Exón 11	SNP cambio de sentido (het)	W557R
Control normal	Ninguno	Ninguno	n/a
*nuevas mutaciones identificadas het: heterocigoto hom: homocigoto			

EJEMPLO 22

Utilización de un estándar de control interno de la temperatura para aumentar la precisión de la temperatura de las réplicas de curvas de fusión

Se amplificó un fragmento de 100 pb de la región del factor V Leiden mediante 0,5 μ M de cada uno de los cebadores CTGAAAGGTTACTTCAAGGAC (SEQ ID NO. 52) y GACATCGCCTCTGGG (SEQ ID NO.53). La reacción se realizó en LightCycler[®] en volúmenes de 10 μ l con los reactivos descritos en el ejemplo 17, salvo que se utilizaron 10 μ M de colorante N7 (ejemplo 1), 0,2 U KlenTaqI[®] (AB Peptides), y 70 ng del anticuerpo TaqStart[®] (Clontech). Además se incluyeron 0,5 μ M de cada uno de los oligonucleótidos complementarios ACGATGCTACGTACGTGCGATG-P (SEQ ID NO. 54) y CATCGCGACGTACGTAGCATCGT-P (SEQ ID NO. 55) como estándar de control interno de la temperatura (también denominado estándar interno). Los ciclos de la PCR incluyeron una desnaturalización inicial de 10 segundos a 94°C seguida de 30 ciclos a 94°C durante 0 segundos, 57°C durante 0 segundos, 78°C durante 0 segundos con una transición a 1°C/s de 57°C-78°C. Tras la PCR se calentaron las muestras a 94°C durante 1 segundo y a continuación se enfriaron a 40°C antes de la fusión. La fusión se llevó a cabo en un instrumento de fusión de alta resolución HR-1 (Idaho Technology) de 24 bits con adquisición de temperatura y fluorescencia. Tras la PCR cada capilar se transfirió al HR-1 y se fundió de 50°C a 90°C con una pendiente de 0,3°C/s, dando lugar a 65 puntos/°C. Las curvas de fusión se analizaron con software adaptado escrito en LabVIEW (National Instruments).

Se amplificaron y analizaron independientemente 5 muestras replicadas de mutaciones homocigóticas del Factor V Leiden. Tras la normalización, la T_m del amplicón (se considera la temperatura en la que la fluorescencia normalizada de la transición de fusión del amplicón es del 50%) era de 83,388 $\pm$ 0,025°C (media $\pm$ desviación estándar). La T_m del estándar de control interno de temperatura era de 74,446 $\pm$ 0,036°C. Sin embargo, la desviación estándar de la diferencia de T_m entre amplicón y estándar interno (Δ T_m 0,016°C) es inferior a la desviación estándar de la T_m del amplicón (0,025°C). Por ese motivo, la precisión de la temperatura de las curvas de fusión puede aumentar si se ajustan las curvas de fusión mediante la temperatura límite determinada por la T_m del estándar interno de cada muestra. A modo de ilustración, se ajusta la temperatura de cada curva de fusión

(como en el ejemplo 11) de manera que la Tm del estándar interno de cada muestra sea el mismo valor (como el promedio de la Tm del estándar interno original).

- 5 La utilización de un estándar interno permite la corrección de las diferencias menores en tampón de amplificación (por ejemplo, diferencias en concentraciones de sales por evaporación). Este hecho da una buena precisión a las curvas de fusión de un mismo genotipo, y permite así distinguir diferencias muy pequeñas en los perfiles de las curvas de fusión de diferentes genotipos.
- 10 El estándar de control interno de temperatura no se debe limitar a pares de oligonucleótidos complementarios. Otros ejemplos no limitantes de estándares internos son híbridos sonda sin marcaje-diana en los que la secuencia de la diana bajo la sonda es invariable en el grupo de la muestra, o un segundo amplicón cuya secuencia se sabe que es invariable. Los ejemplos de estándares internos pueden tener una Tm superior o inferior a la Tm del amplicón o al híbrido sonda sin marcaje-diana que se estudia.
- 15 La descripción anterior da a conocer y describe solamente realizaciones de ejemplo de la presente invención. Un experto en la materia reconocerá fácilmente a partir de dicha descripción y de las ilustraciones y reivindicaciones que las acompañan que se pueden realizar diversos cambios, modificaciones y variaciones en la misma sin apartarse del alcance de la presente invención según se define, más adelante, en las reivindicaciones.
- 20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wittwer, Carl T. Zhou, Luming T. Dujols, Virginie E. Holden, Joseph A. willmore-Payne, Carlynn

<120> Análisis de fusión de amplicón con colorantes de saturación

<130> P00922-WO-00

<150> US 10/827.890

<151> 2004-04-20

<160> 55

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcaccatta aagaaaatat 20

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

tcacatagg aaacacca 18

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3
 acacaactgt gttcactagc 20

 <210> 4
 <211> 20
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 caacttcac caggttcacc 20

 <210> 5
 <211> 14
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 ccagctccgg gaga 14

 <210> 6
 <211> 21
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 catacaggat ggtaacatg g 21

 <210> 7
 <211> 21
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 agaatacata ctctgctta g 21

 <210> 8
 <211> 17
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 tatcactata tgcacgc 17

 <210> 9
 <211> 28
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 gaaaccggcc tctgctggg agaagcaa 28

 <210> 10
 <211> 28
 <212> **ADN**
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 gaaaccggcc tctgctggg agaagcaa 28

<210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 gaaaccggcc tctgctgggg agaagcaa 28

 <210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 gaaaccggcc tctgctgggg agaagcaa 28

 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 tgttggtccc aattgtctcc cctc 24

 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 agccgcgccg tggaagaggg tcg 23

 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 15
 agccgcgccg tggaagaggg tcg 23

 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 ggccgggggtc actcaccg 18

 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 17
 cccgaggttg gtcggggc 18

 <210> 18
 <211> 18

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 cccgaggttg gtcggggc 18

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 atcaggtgag gcgccccgtg 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 atcaggtgag gcgccccgtg 20

<210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 accaggctct acagtaa 17

<210> 22
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 gttaaagca tcagaag 17

<210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para amplificación por PCR de un plásmido diseñado por ingeniería genética.

<400> 23
 gatattgaa gtcttcggg 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para amplificación por PCR de un plásmido diseñado por ingeniería genética.

<400> 24

taagagcaac actatcataa 20

<210> 25

<211> 14

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>

<221> variación

<222> (7)..(7)

<223> localización de SNP.

<400> 25

caatgaatat ttat 14

<210> 26

<211> 16

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>

<221> variación

<222> (8)..(8)

<223> localización de SNP.

<400> 26

tcaatgaata ttatg 16

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>

<221> variación

<222> (9)..(9)

<223> localización de SNP.

<400> 27

ttcaatgaat atttatga 18

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>
 <221> **variación**
 <222> (10)..(10)
 <223> Localización de SNP.

<400> 28
 attcaatgaa tatttatgac 20

<210> 29
 <211> 22
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>
 <221> **variación**
 <222> (11)..(11)
 <223> Localización de SNP.

<400> 29
 gattcaatga atatttatga cg 22

<210> 30
 <211> 24
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>
 <221> **variación**
 <222> (12)..(12)
 <223> localización de SNP.

<400> 30
 ggattcaatg aatatttatg acga 24

<210> 31
 <211> 26
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>
 <221> **variación**
 <222> (13)..(13)
 <223> localización de SNP.

<400> 31
 gggattcaat gaatatttat gacgat 26

<210> 32
 <211> 28

<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>

<221> variación

<222> (14)..(14)

<223> localización de SNP.

<400> 32

ggggattcaa tgaatattta tgacgatt 28

<210> 33

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda para la detección de SNP de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<220>

<221> variación

<222> (15)..(15)

<223> localización de SNP.

<400> 33

gggggattca atgaatattt atgacgattc 30

<210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 34

acatagtttc ttacctcttc 20

<210> 35

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 35

acttctaag atgattatgg g 21

<210> 36

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 36

tgtgccttc aaattcagat tg 22

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 37
cagcaaatgc ttgctagacc 20

<210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 38
taaagaaaat atcatcttg gtgttccta 30

<210> 39
<211> 28
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica misc.
<222> (14)..(14)
<223> n e s g o t

<400> 39
caatatagtt ctngagaag gtggaatc 28

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 40
gatgctctgc ttctgtactg 20

<210> 41
<211> 23
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 41
gcctaaacat cccctaaat tgg 23

<210> 42
<211> 22
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 42
ctctccagag tgctctaag ac 22

<210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 43
gcccctgttt cataactgac c 21

<210> 44
<211> 21

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 cggccatgac tgcgctgta a 21

<210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 ctccaatggg gcaggctcca a 21

<210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 tctcctccaa cctaatagtg 20

<210> 47
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 ggactgtcaa gcagagaat 19

<210> 48
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 atctttgggt ttctcatga tg 22

<210> 49
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 ctcagttttc ctggattatg cctggc 26

<210> 50
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para amplificación de una región de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<400> 50
 tctgctctgc ggctttct 18

<210> 51

<211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador para amplificación de una región de plásmido diseñado por ingeniería genética.

<400> 51
 cgaagcagta aaagctcttg gat 23

<210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 ctgaaagggt acttcaagga c 21

<210> 53
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 gacatcgctt ctggg 15

<210> 54
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido diseñado por ingeniería genética para su utilización como estándar interno. Complementario a Sec. ID No. 55.

<400> 54
 acgatgctac gtacgtcgcg atg 23

<210> 55
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido diseñado por ingeniería genética para su utilización como estándar interno. Complementario a Sec. ID No. 54.

<400> 55
 catcgcgacg tacgtagcat cgt 23

REIVINDICACIONES

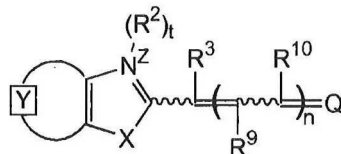
1. Mezcla de reacción de PCR que comprende un ácido nucleico diana

5 reactivos de PCR,

un par de cebadores de oligonucleótidos configurados para amplificar una parte del ácido nucleico diana para producir un amplicón,

y

un colorante de unión a ADNdc que tiene la fórmula:



en la que

el residuo $\boxed{Y}$ representa un anillo aromático, monocíclico o policíclico, fusionado, opcionalmente sustituido o un anillo heteroaromático que contiene nitrógeno, monocíclico o policíclico, fusionado, opcionalmente sustituido;

X es oxígeno, azufre, selenio, telurio o un residuo seleccionado entre $C(CH_3)_2$ y NR^1 , en el que R^1 es hidrógeno o alquilo C_{1-6} ;

R^2 se selecciona del grupo que comprende alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , arilo, arilo(alquilo C_{1-3}), hidroxialquilo, alcoxialquilo, aminoalquilo, mono y dialquilaminoalquilo, trialquilamonioalquilo, alquilencarboxilato, alquilencarboxamida, alquilensulfonato, residuos que contienen un heteroátomo cíclico opcionalmente sustituido, o

residuos que contienen un heteroátomo acíclico opcionalmente sustituido;

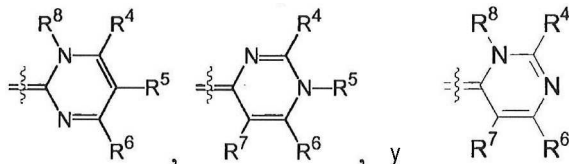
t = 0 ó 1;

Z es una carga seleccionada entre 0 y 1;

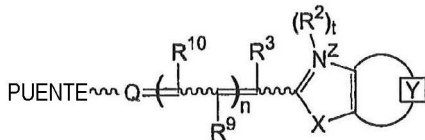
R^3 , R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que comprende hidrógeno, alquilo C_{1-6} y arilcarbonilo;

n = 0, 1 ó 2; y

Q es un heterociclo seleccionado del grupo de estructuras que comprende:



en el que R^5 , R^6 , R^7 y R^8 se seleccionan independientemente del grupo que comprende hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilo, alquenilo, polialquenilo, alquinilo, polialquinilo, alquenilalquinilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariltio, arilcarboniltio, dialquilamino, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio, trialquilamonioalquilcarboniltio, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, trialquilamonioalquiltio y nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente; un residuo que contiene un heteroátomo acíclico, o un residuo que contiene un heteroátomo cíclico, una unión PUENTE-COLORANTE con la fórmula:



en el que el PUENTE es un enlace covalente simple, o un enlace covalente lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, que tiene 1-16 átomos diferentes al hidrógeno, tales como carbono, nitrógeno, fosfato, oxígeno y azufre, de tal forma que la unión contiene cualquier combinación de enlaces alquilo, éter, tioéter, amina, éster o amida; enlaces carbono-carbono simples, dobles, triples o aromáticos; enlaces fósforo-oxígeno, fósforo-azufre, nitrógeno-nitrógeno o nitrógeno-oxígeno; o enlaces aromáticos o heteroaromáticos;

y un grupo reactivo seleccionado entre halógenos, hidroxí, alcóxidos, aminas, ácidos carboxílicos, haluros, alcoholes, aldehídos, tioles, alquilo y ariltioles, alquilo y arilsulfonilos, ésteres de succinimidilo, cetonas e isotiocianatos;

cada uno de los cuales comprende opcionalmente un residuo de amonio cuaternario, y

R^4 se selecciona del grupo que comprende arilcarboniltio, cicloheteroalquilcarboniltio, dialquilaminoalquilcarboniltio; trialquilamonioalquilcarboniltio, cicloalquiltio, cicloheteroalquiltio, trialquilamonioalquiltio, alquilnitriltio, y nucleosidiltio, cada uno de los cuales puede estar sustituido opcionalmente.

2. Mezcla de reacción de PCR, según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una sonda sin marcaje configurada para hibridarse, como mínimo, a una parte del amplicón.

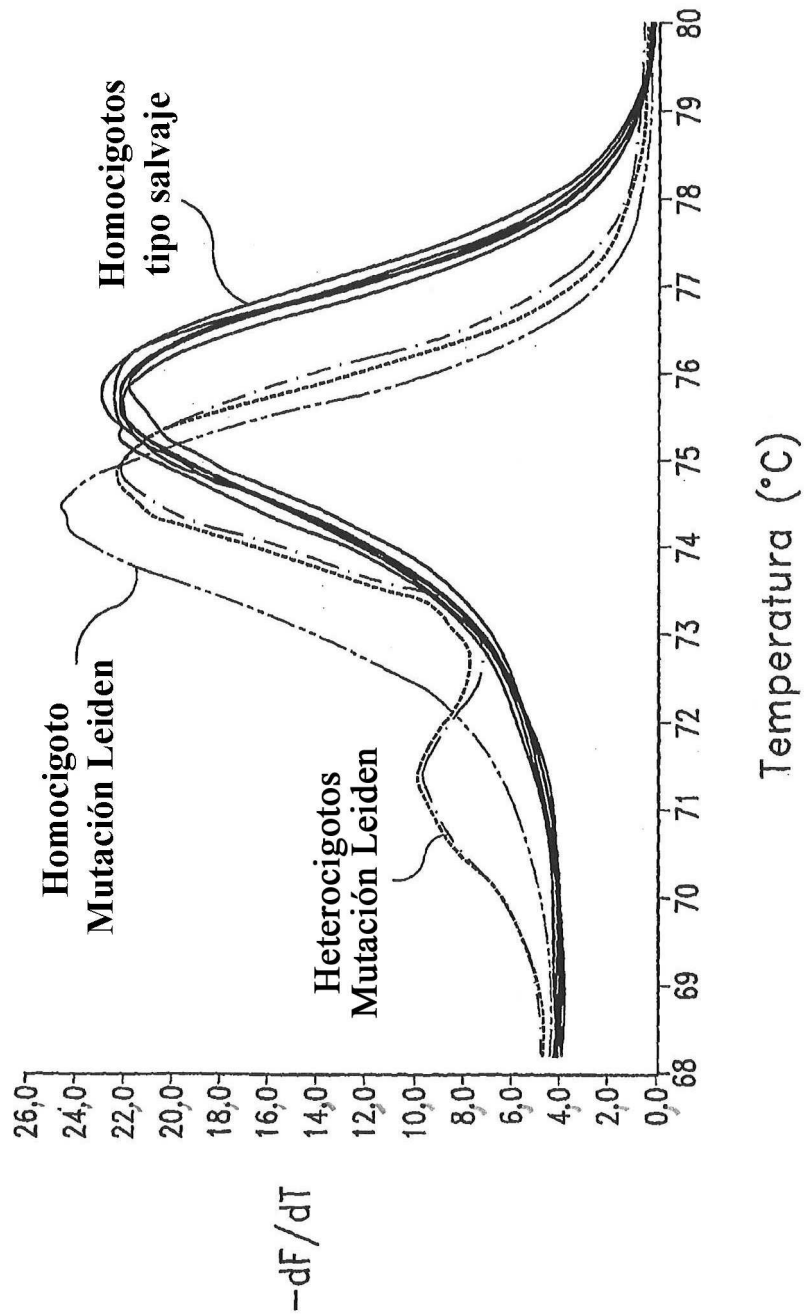


Fig. 1

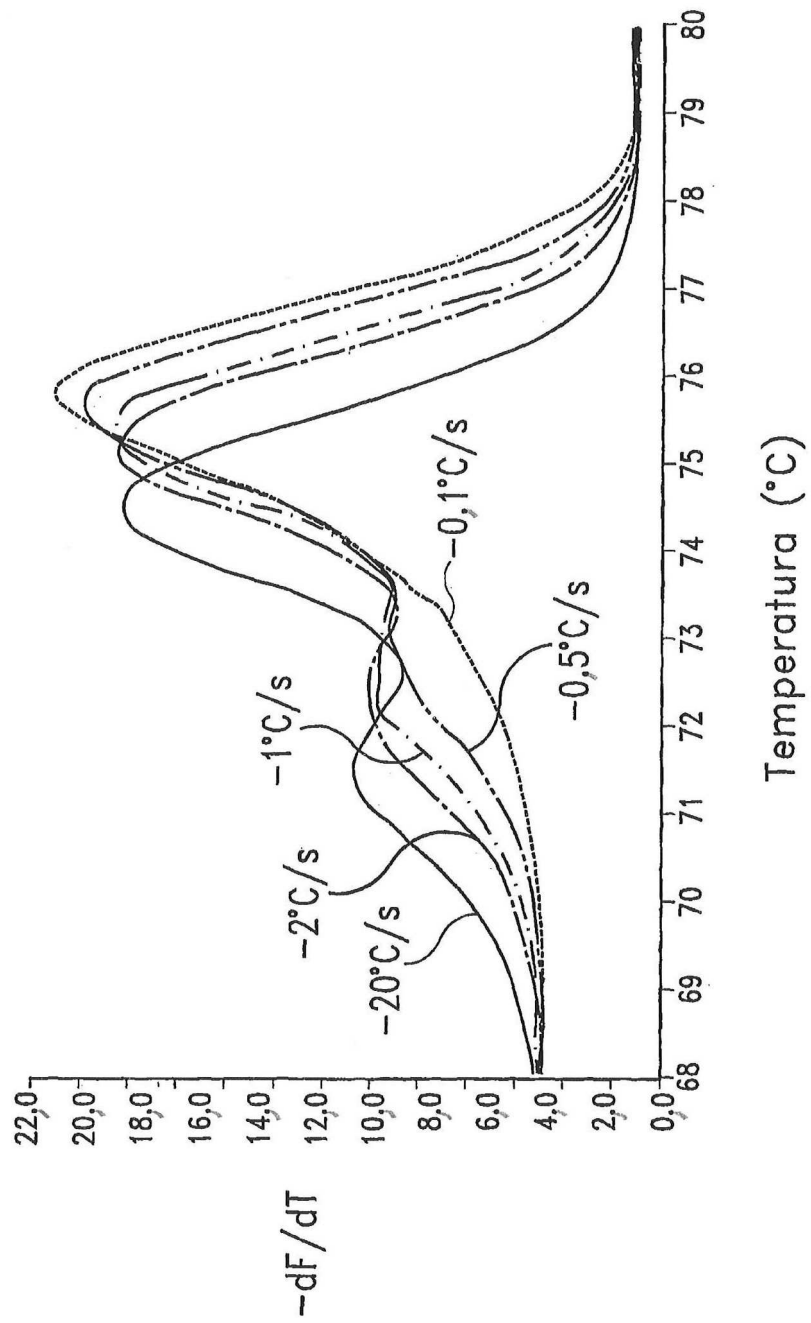
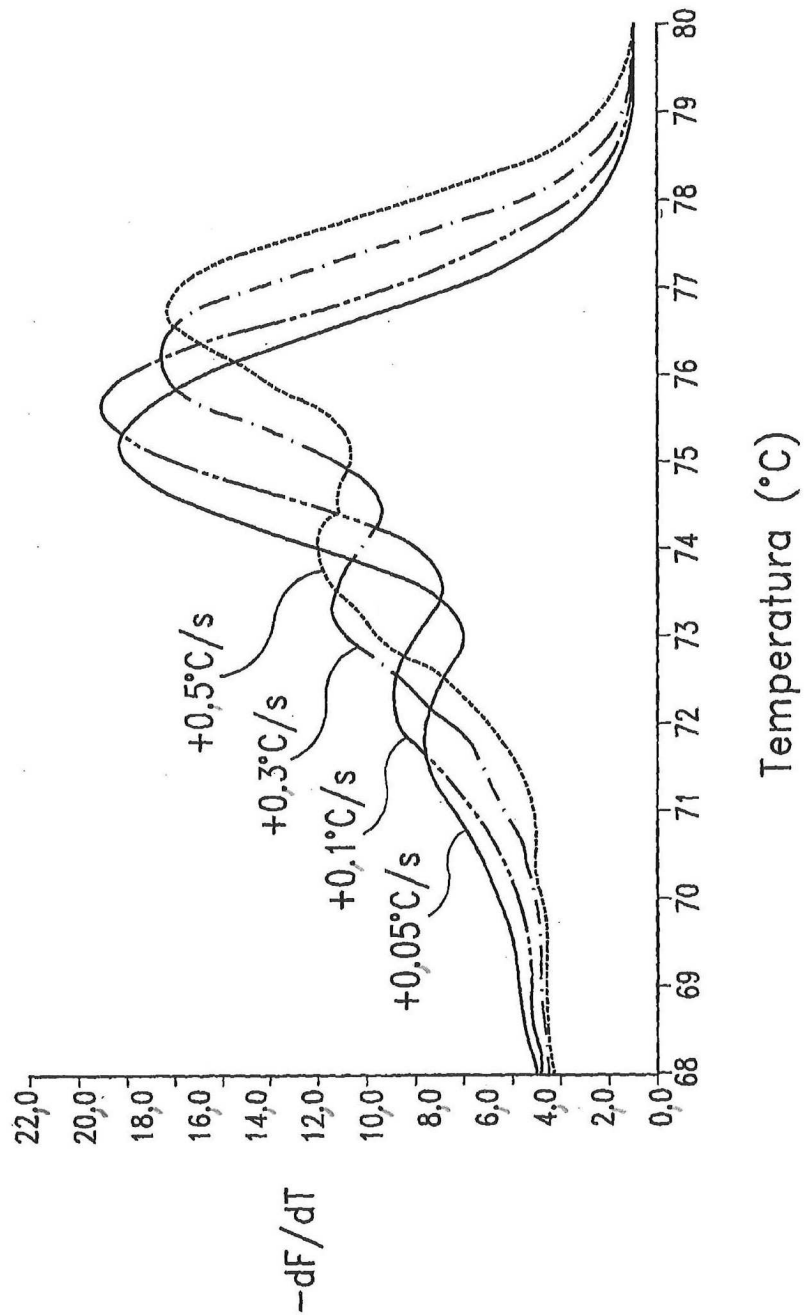


Fig. 2

**Fig. 3**

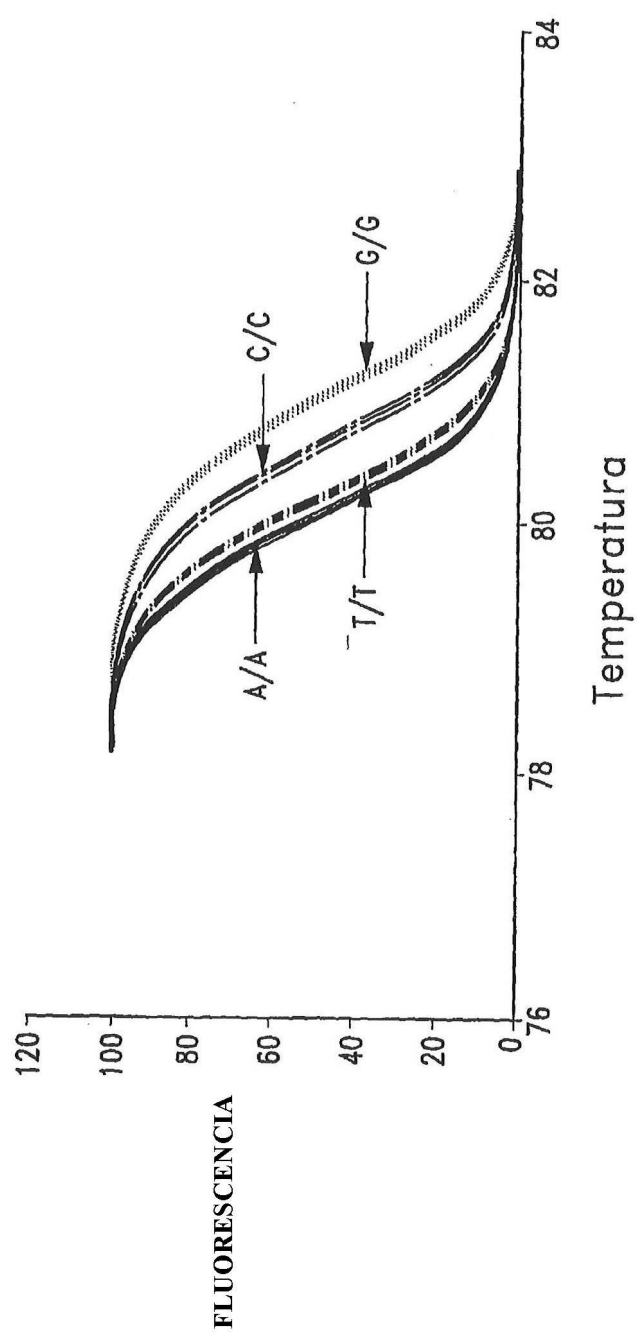


Fig. 4A

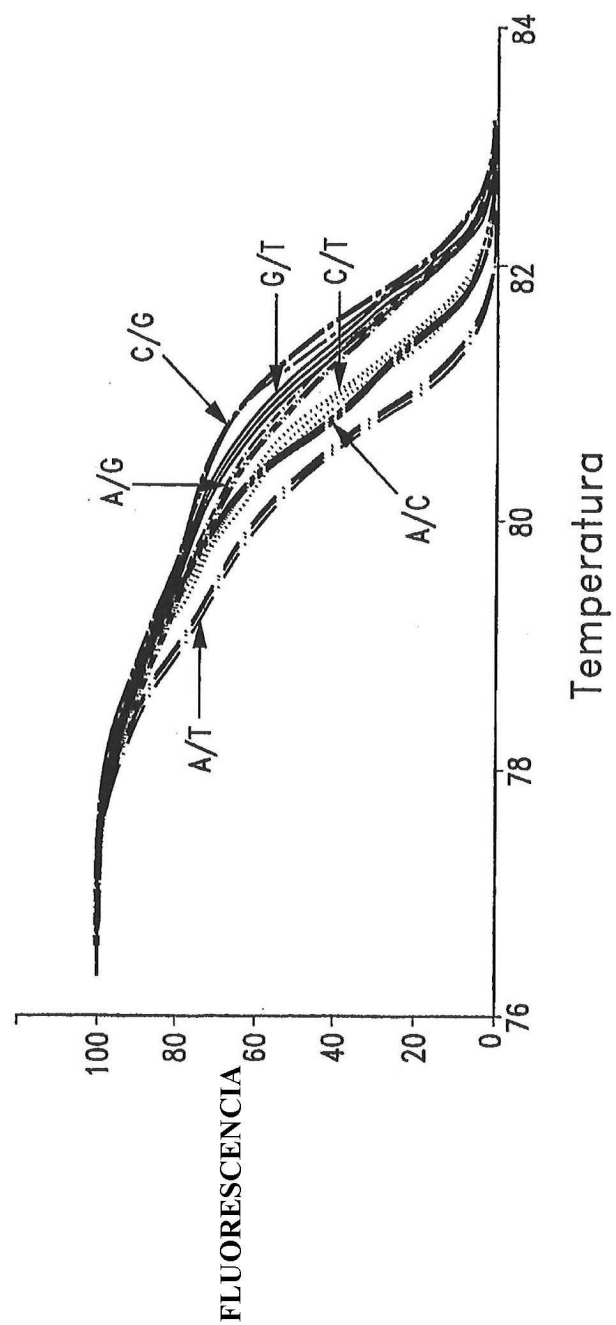


Fig. 4B

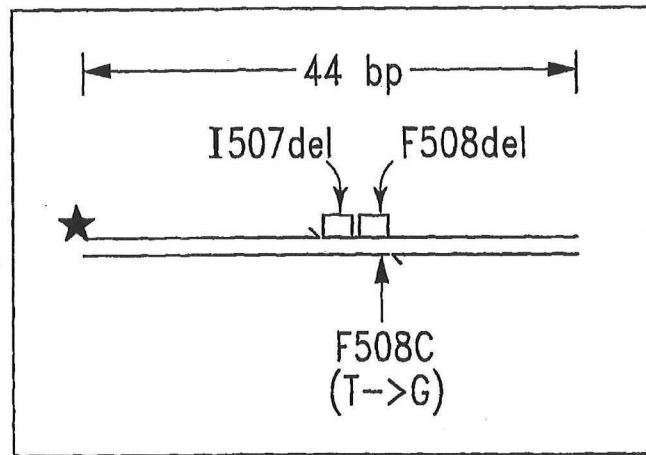


Fig. 5A

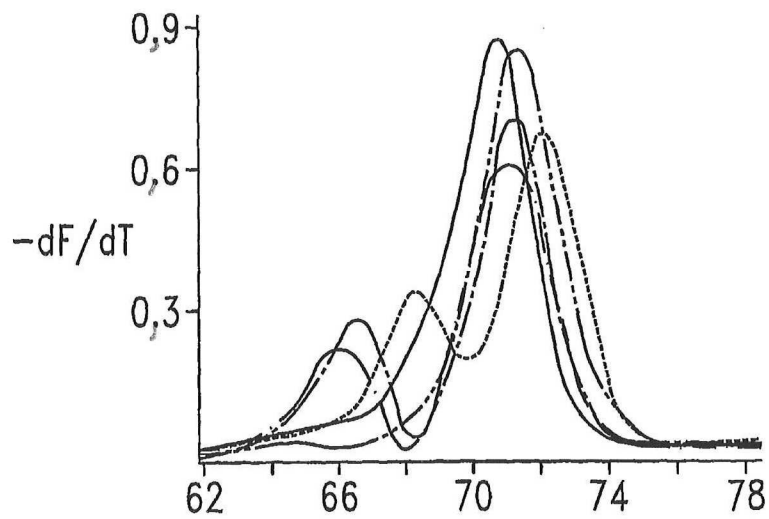


Fig. 5B

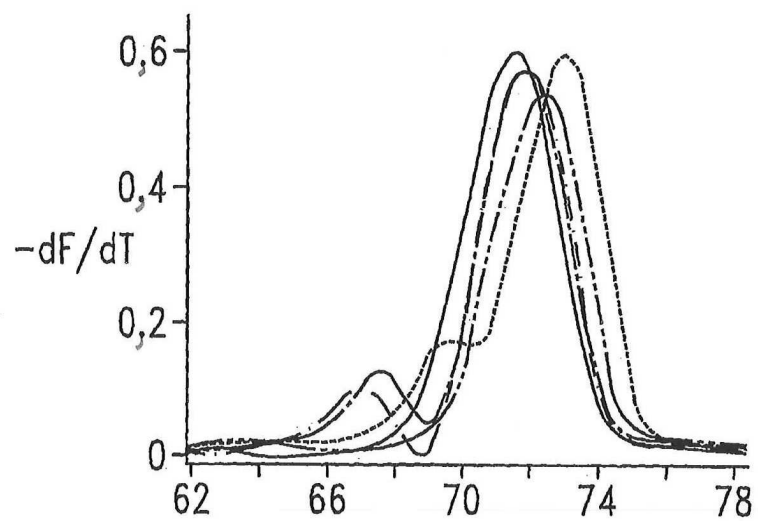


Fig. 5C

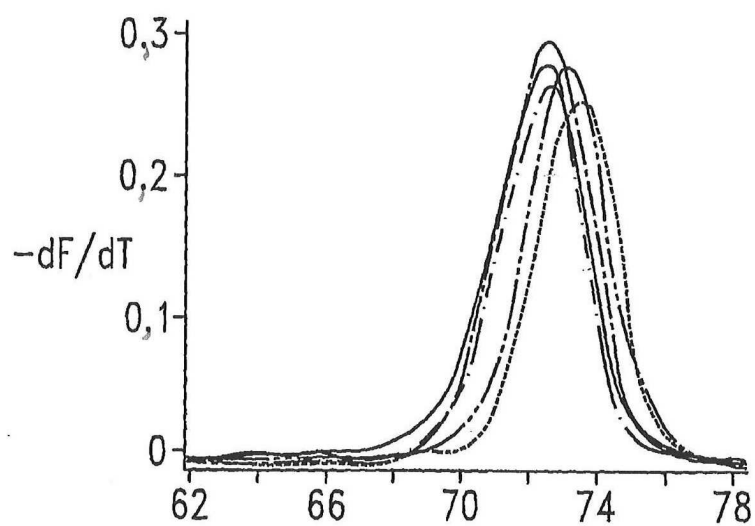


Fig. 5D

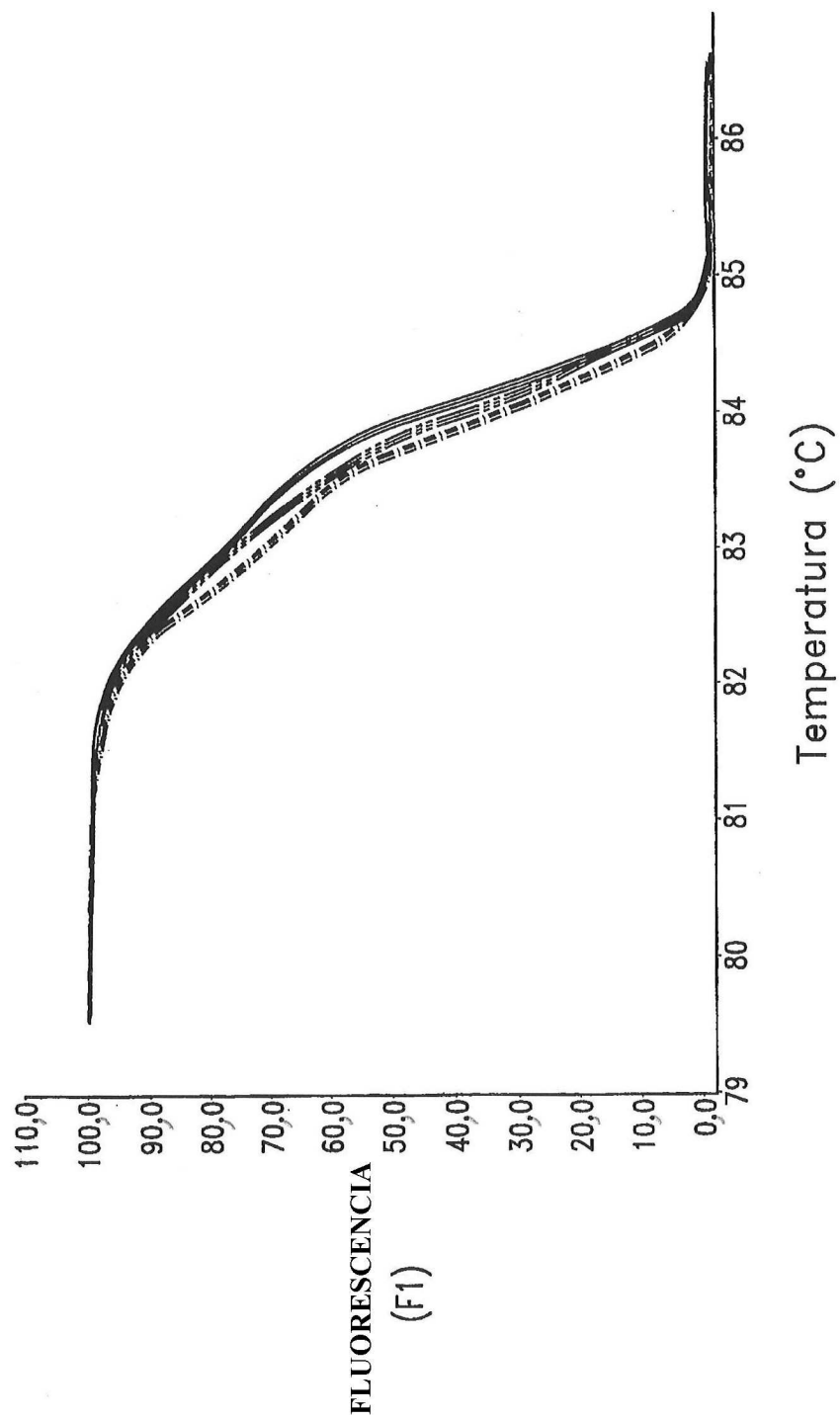


Fig. 6

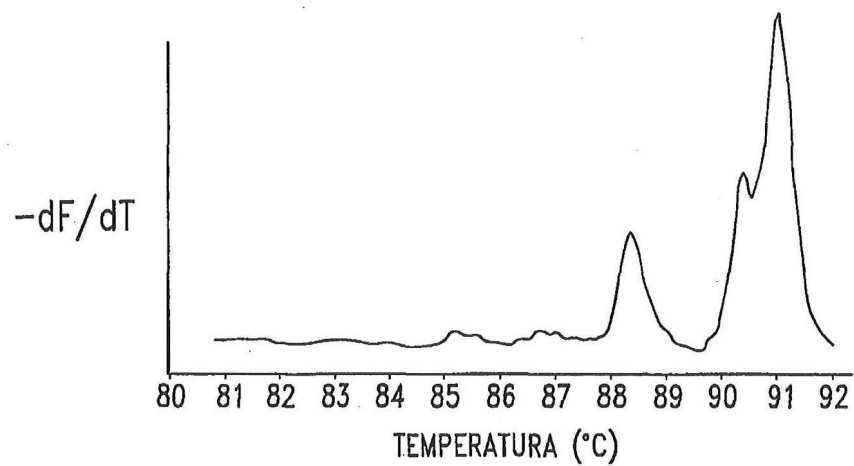


Fig. 7A

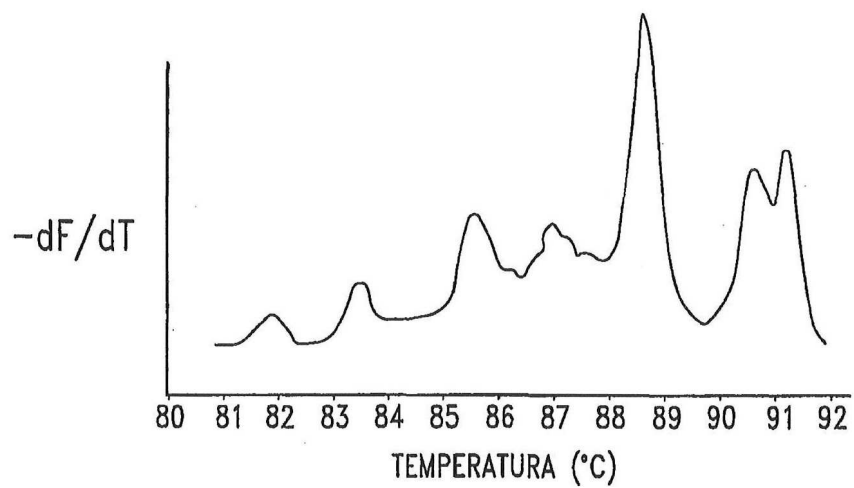


Fig. 7B

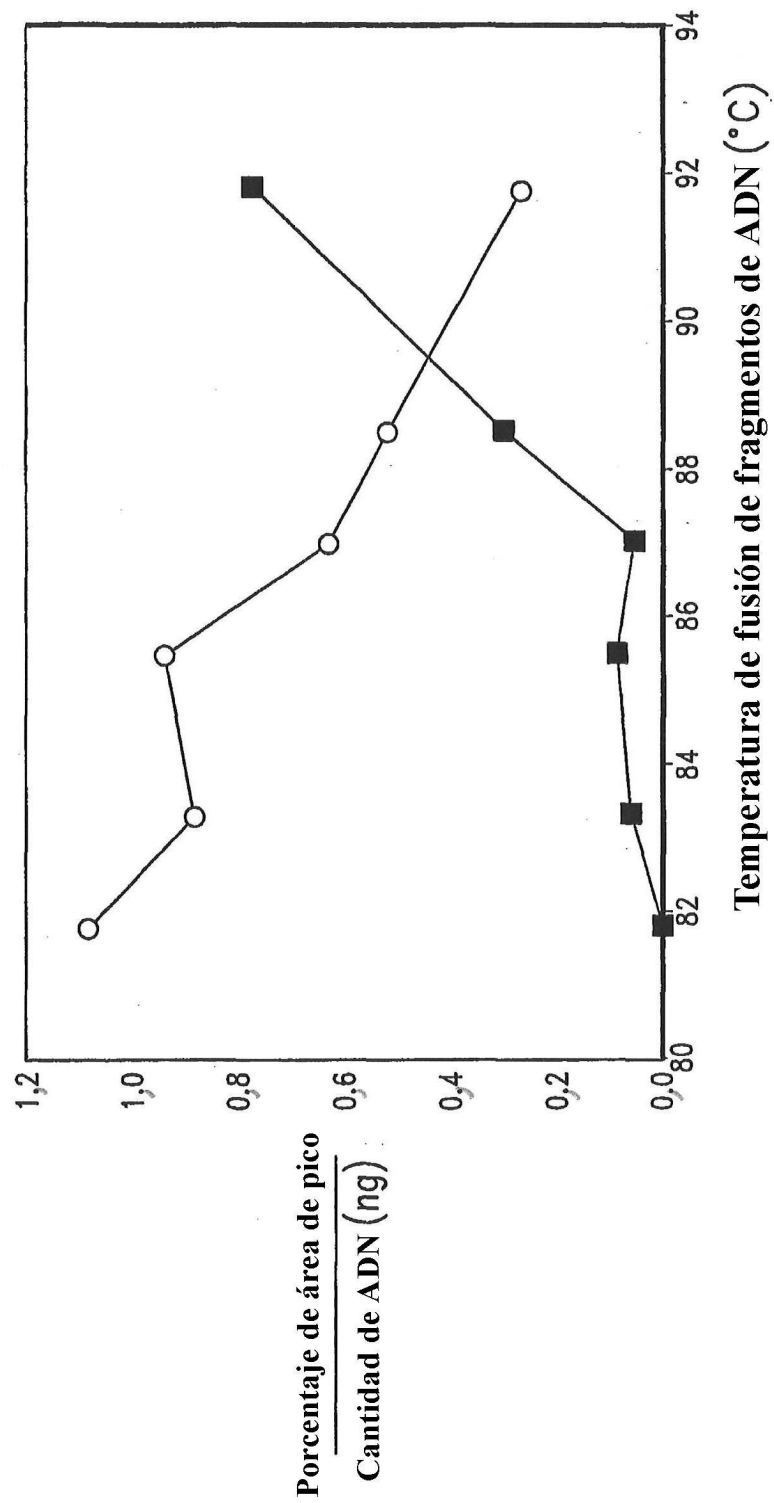


Fig. 8

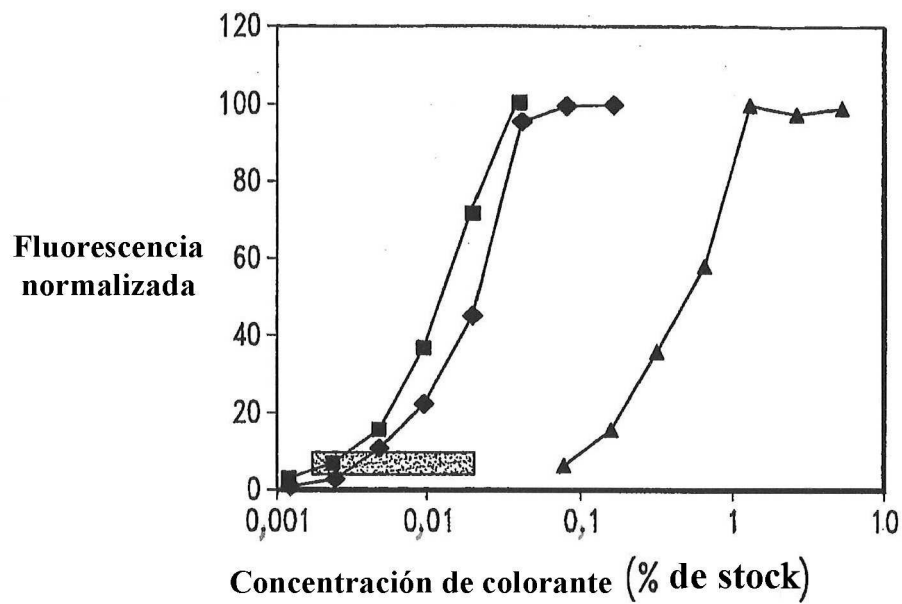


Fig. 9A

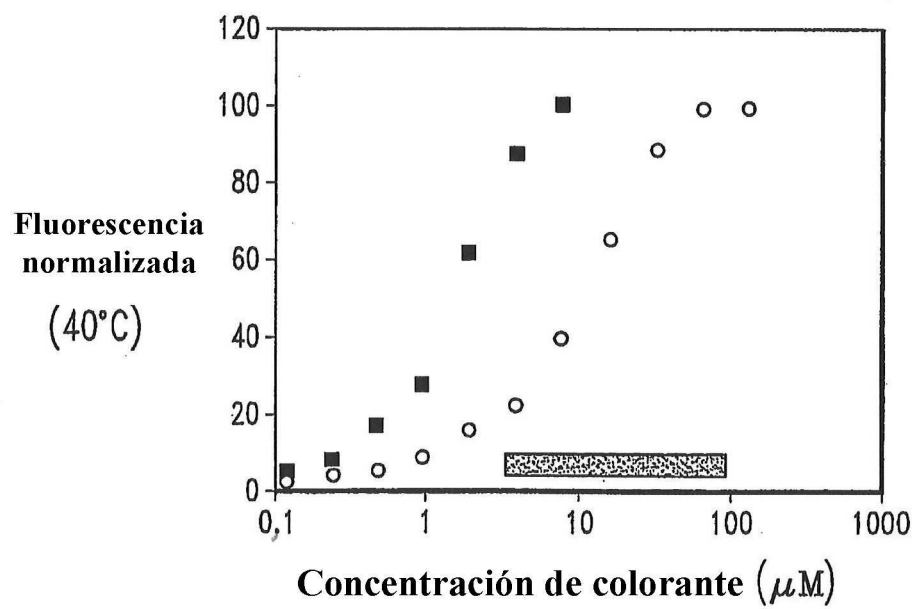


Fig. 9B

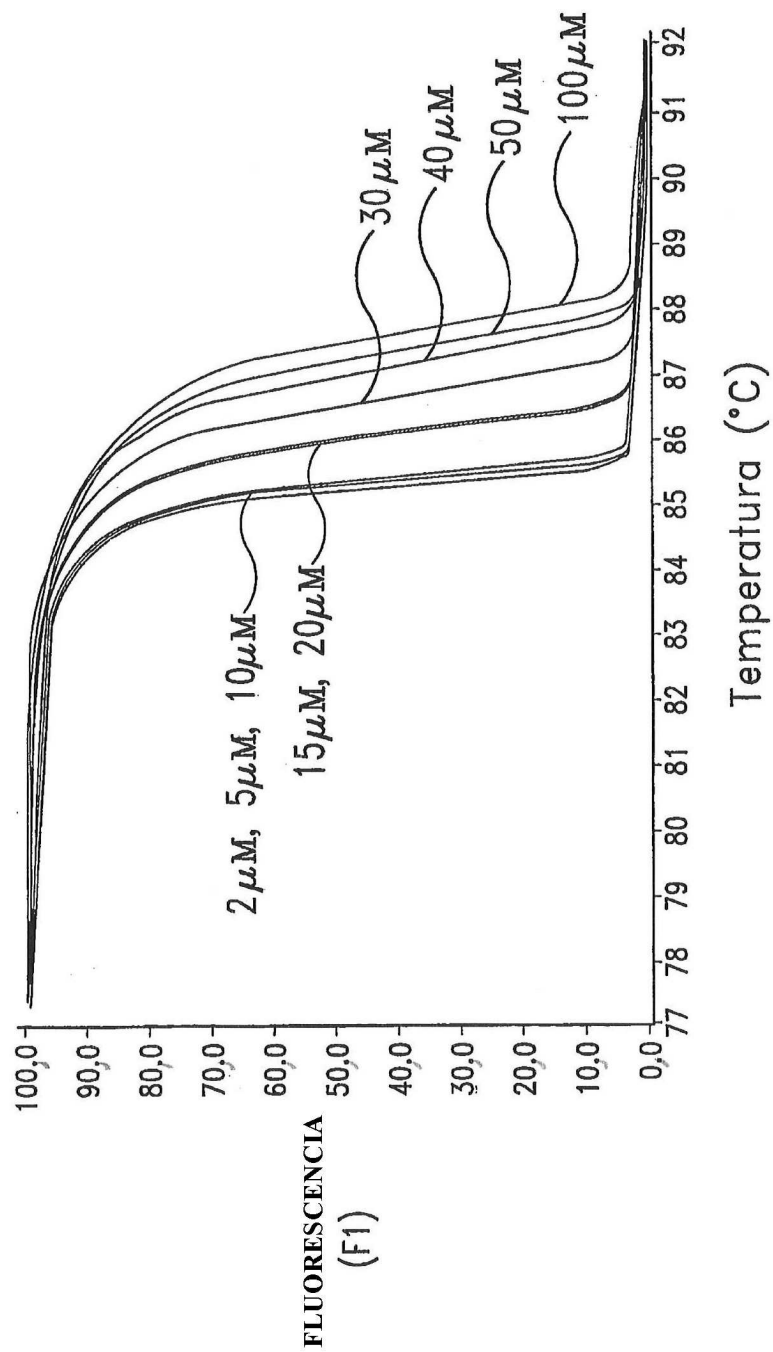
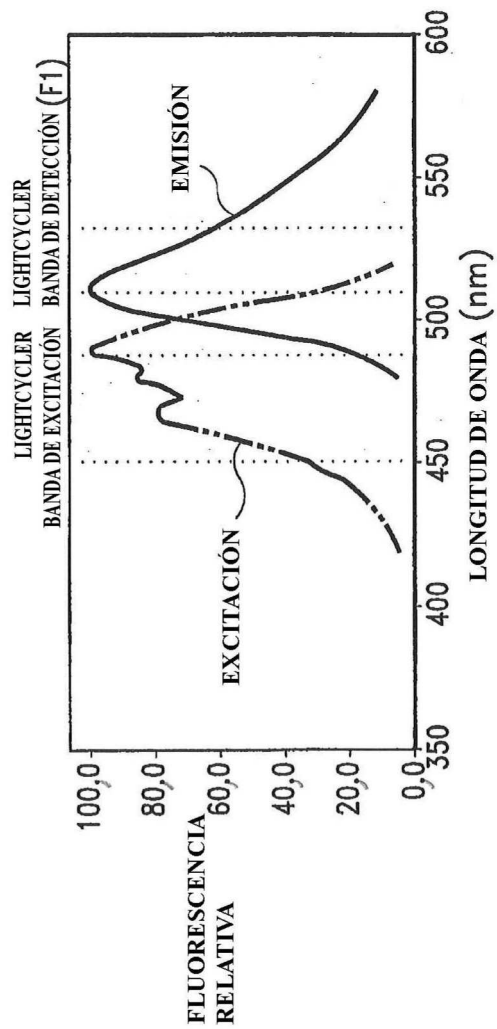
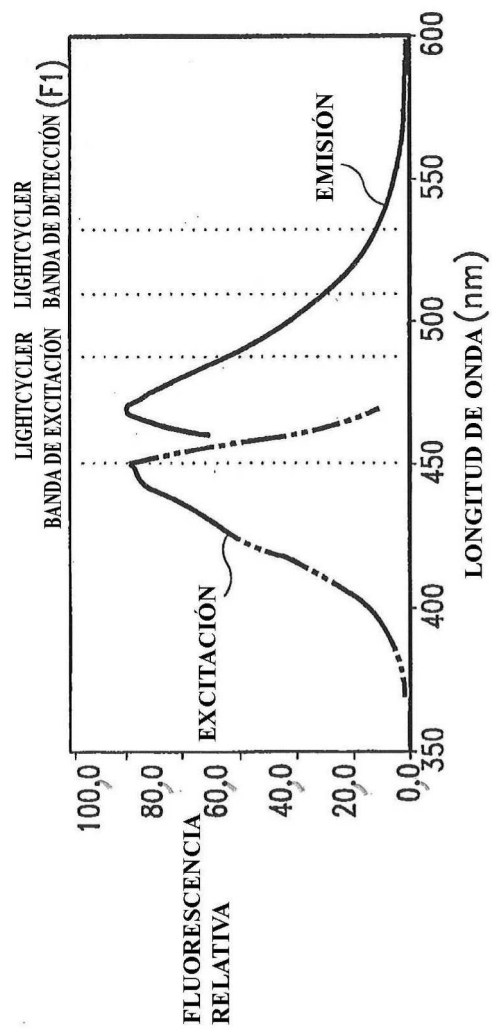


Fig. 10



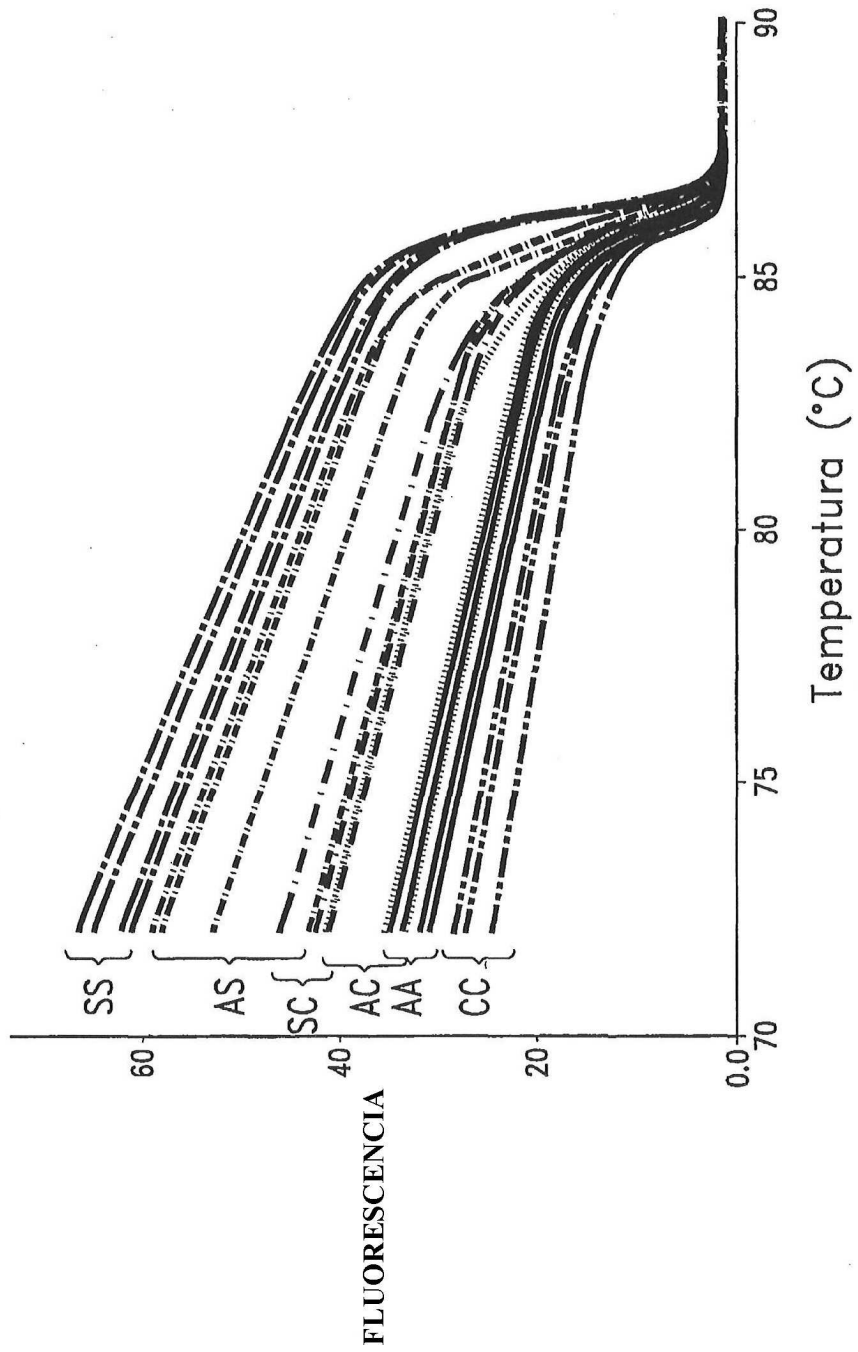


Fig. 12A

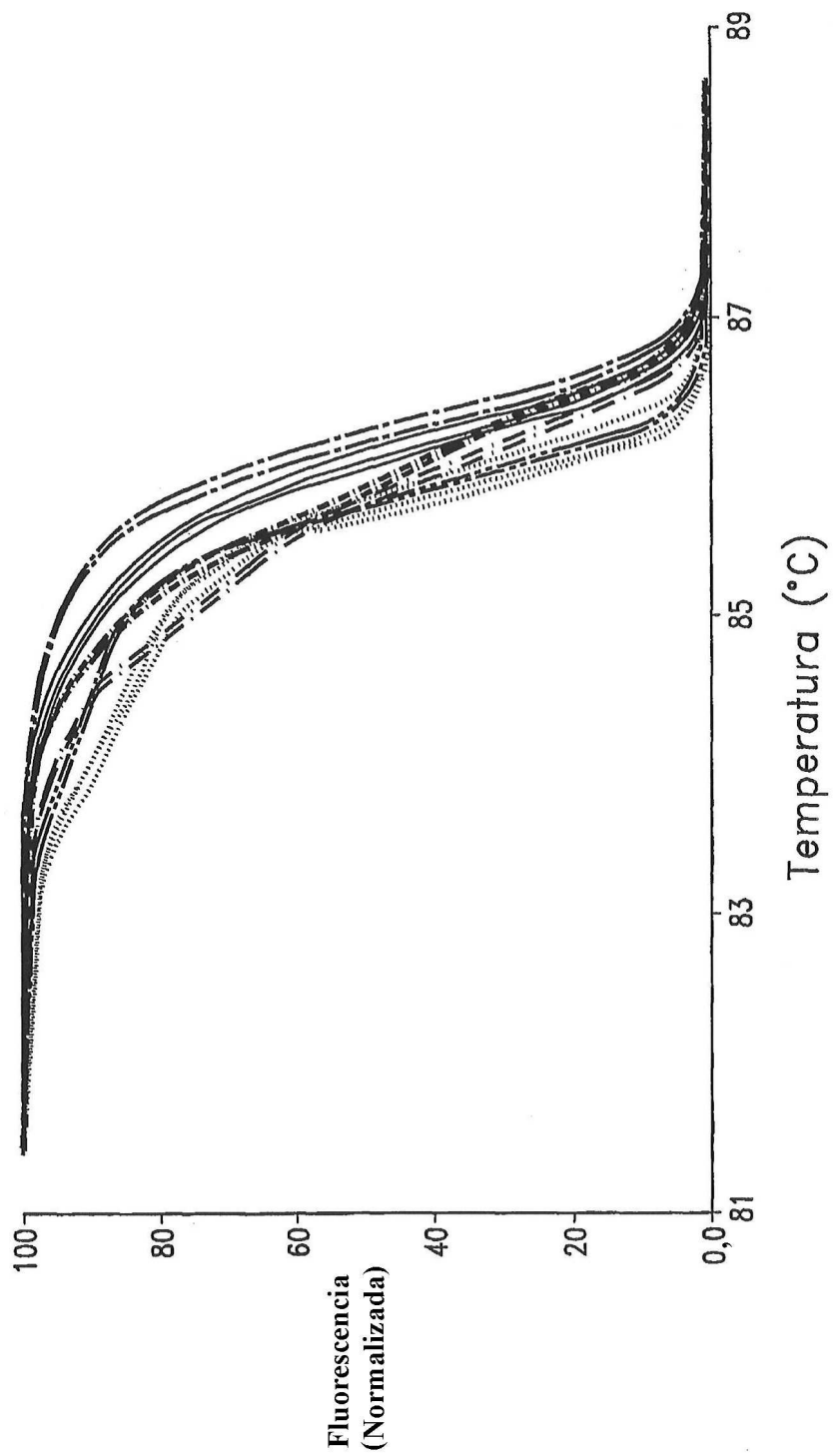


Fig. 12B

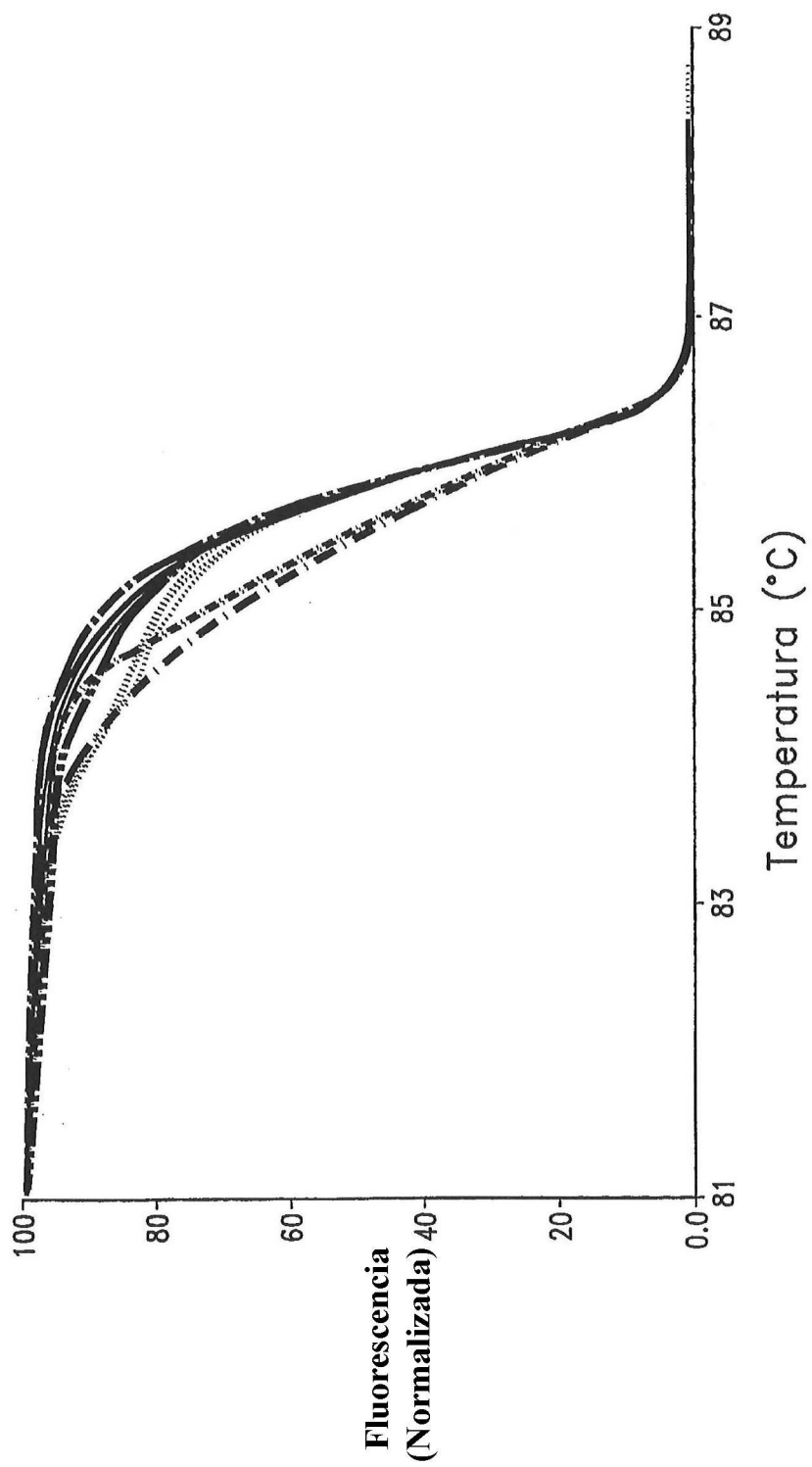


Fig. 12C

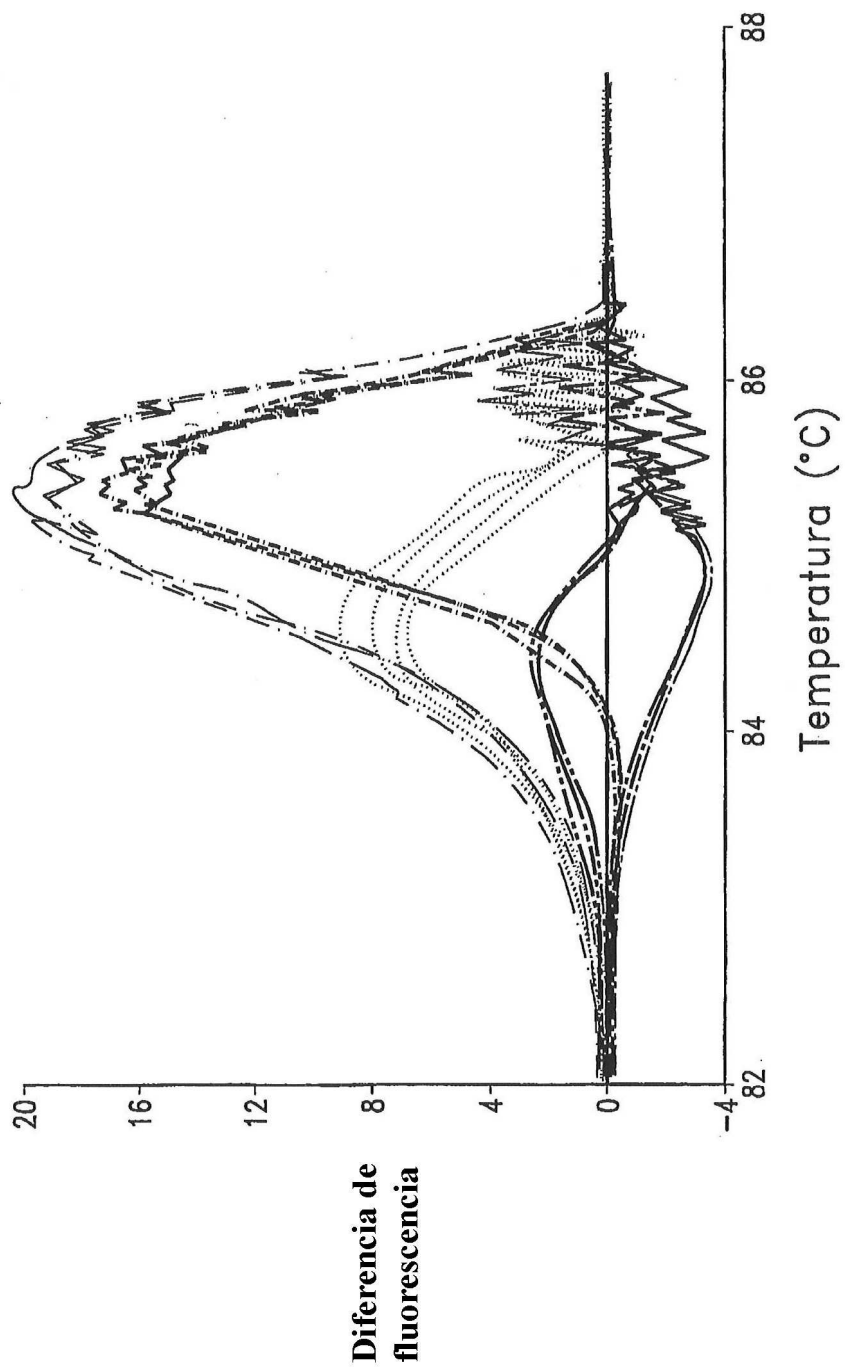


Fig. 12D

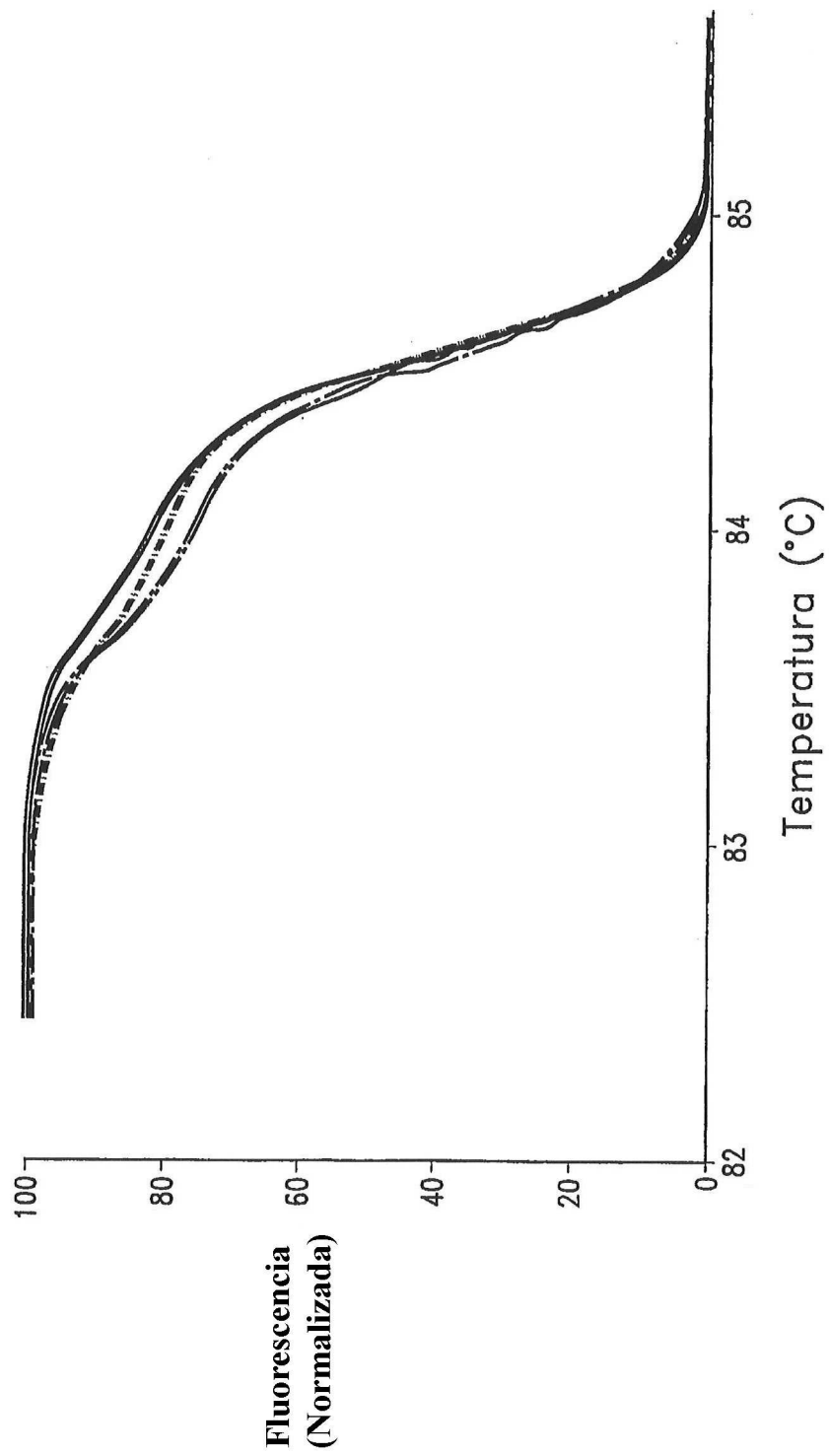
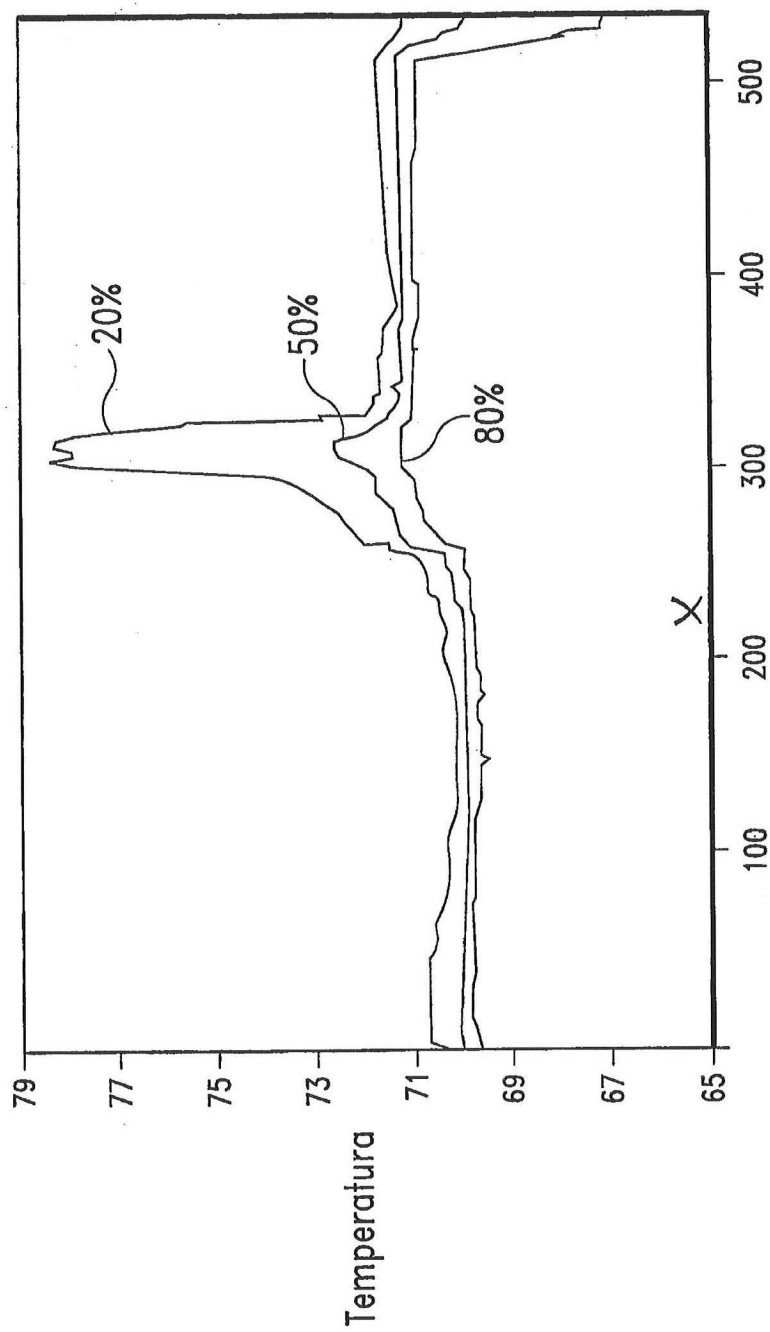


Fig. 13A



Pares de bases

Fig. 13B

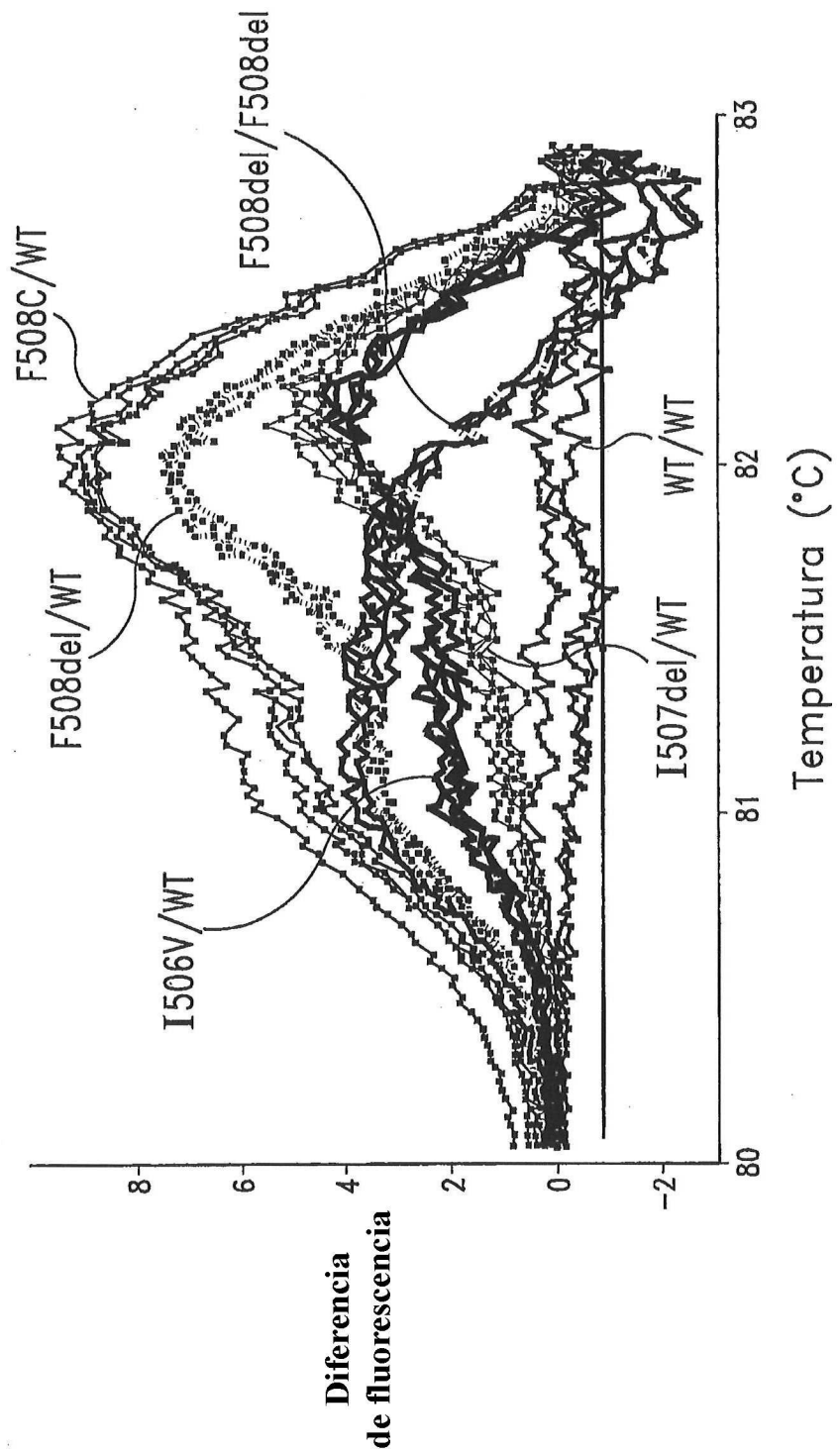


Fig. 14

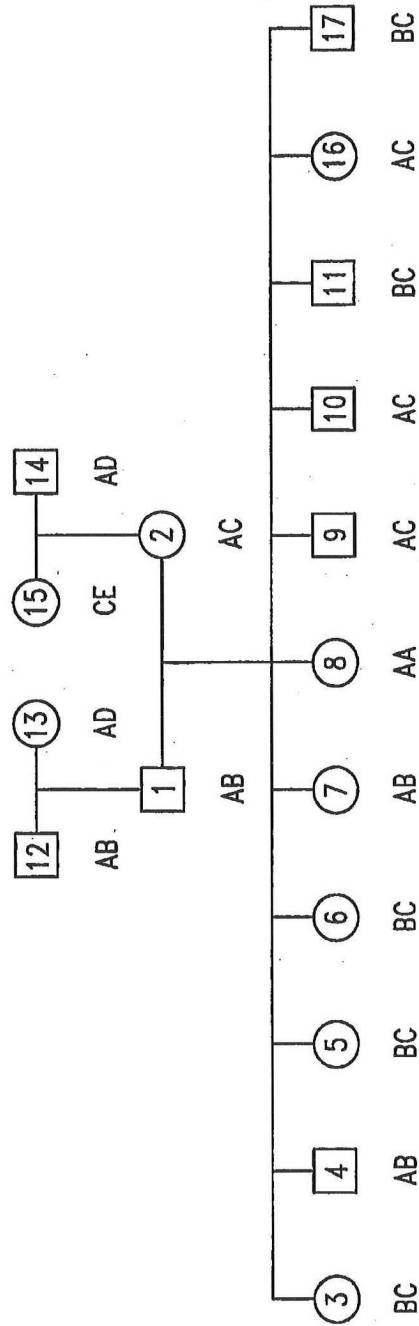


Fig. 15

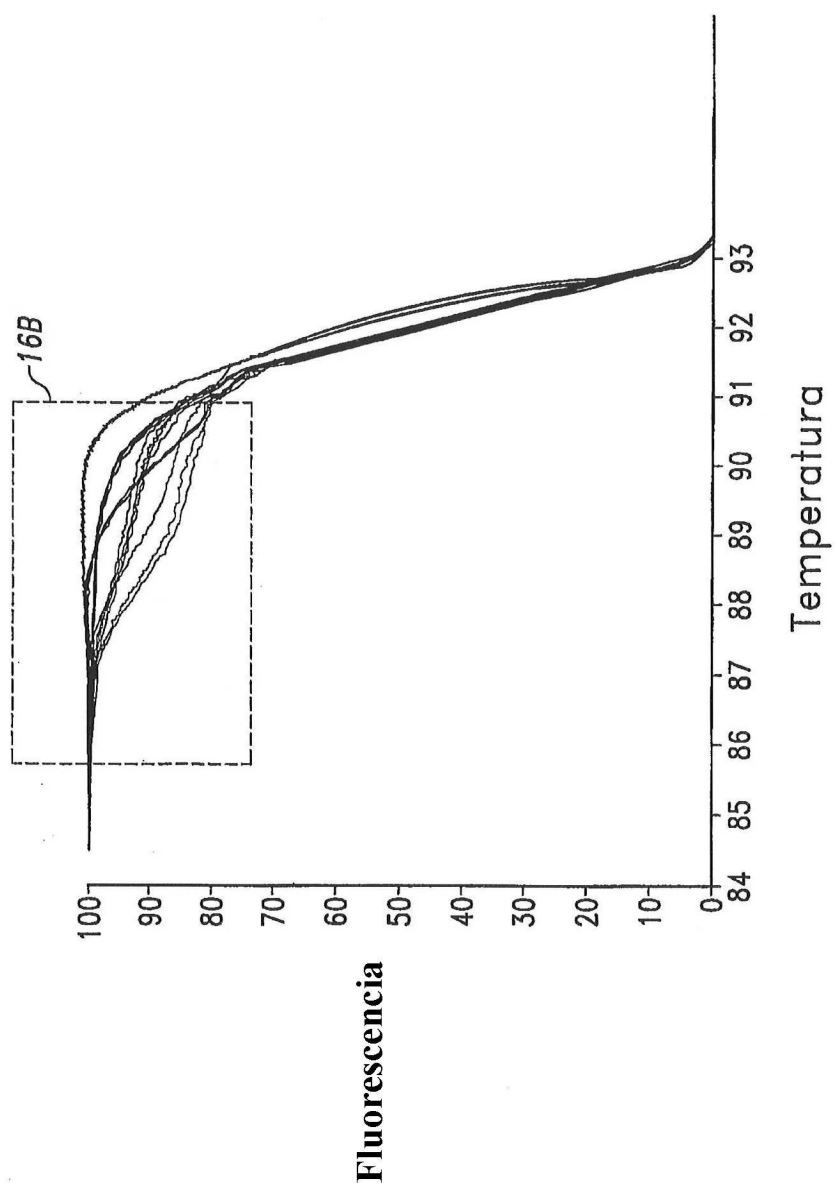


Fig. 16A

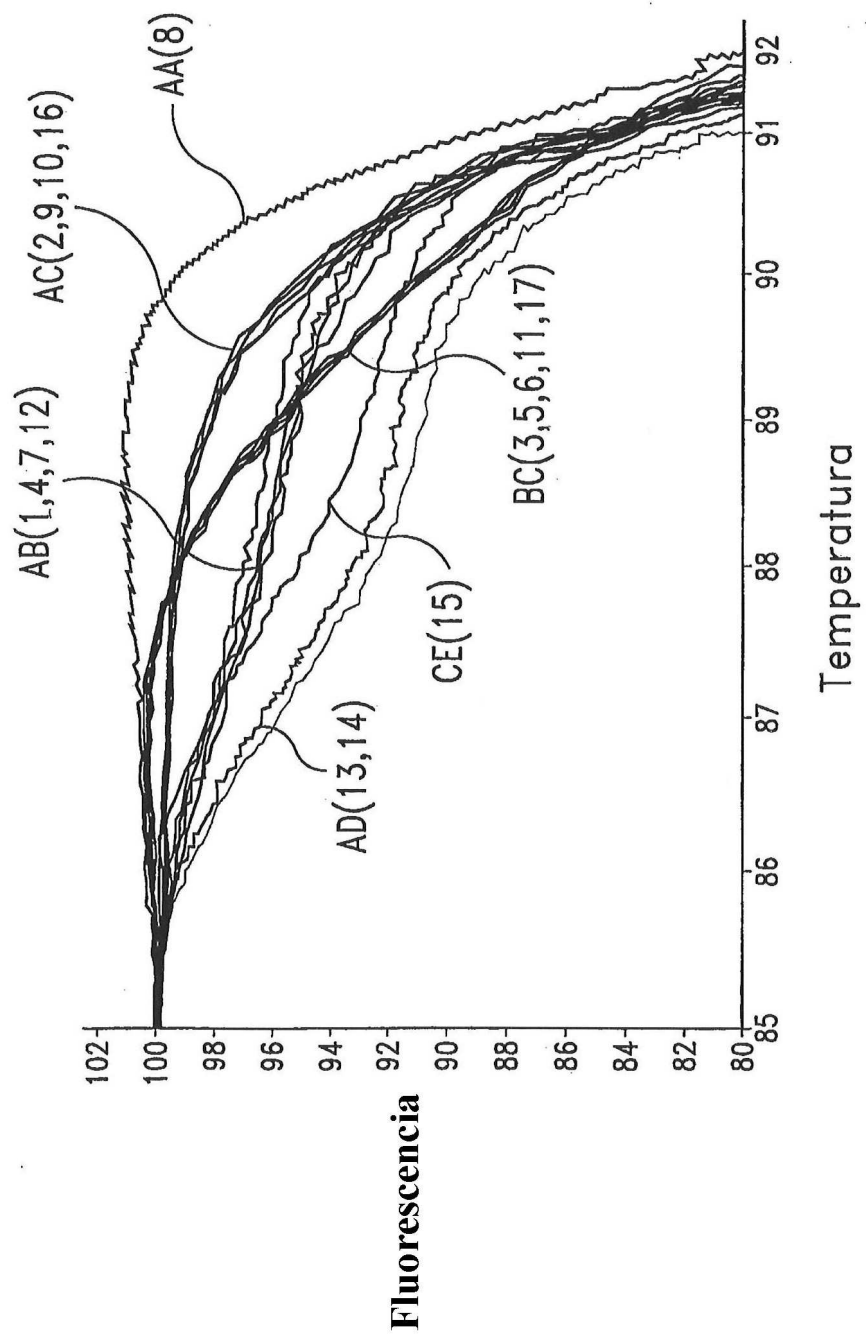


Fig. 16B

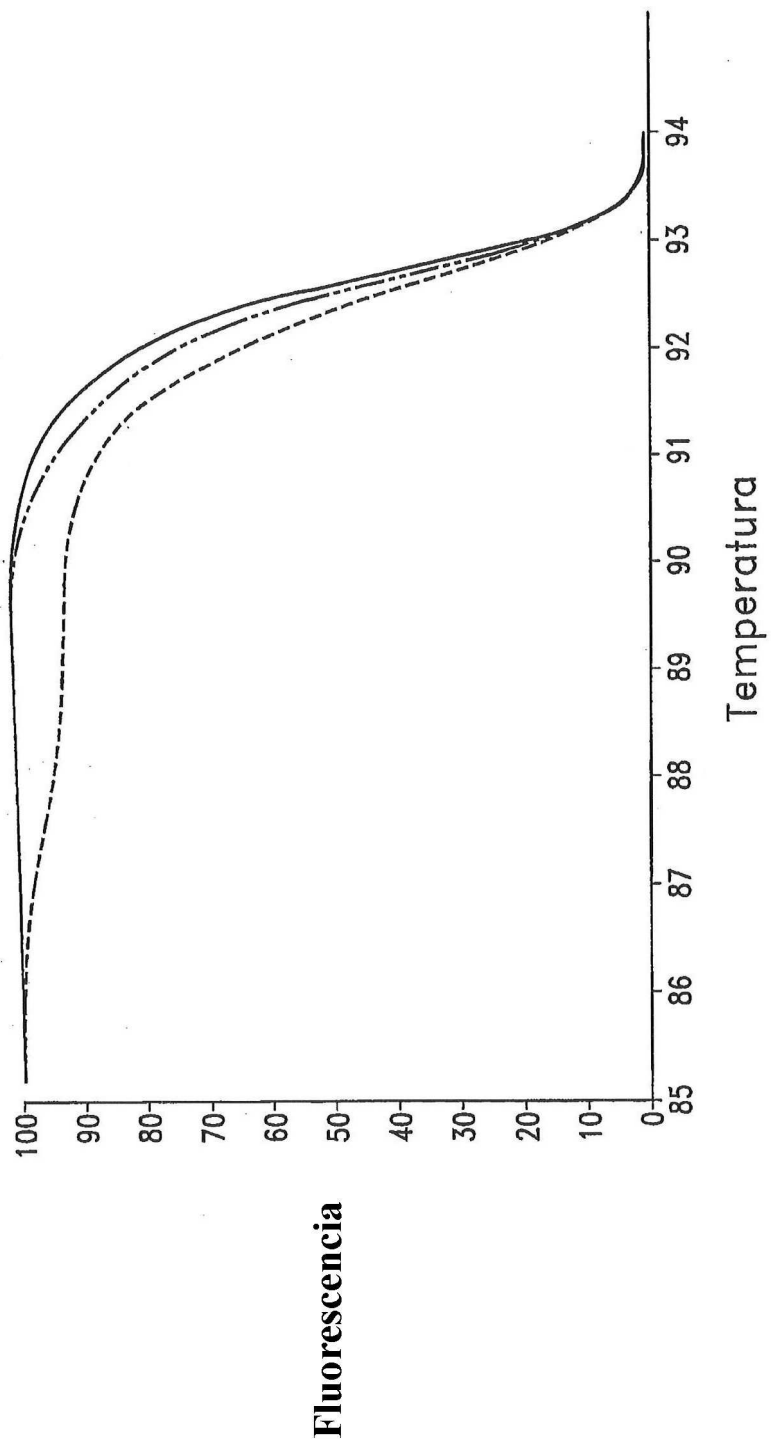


Fig. 17

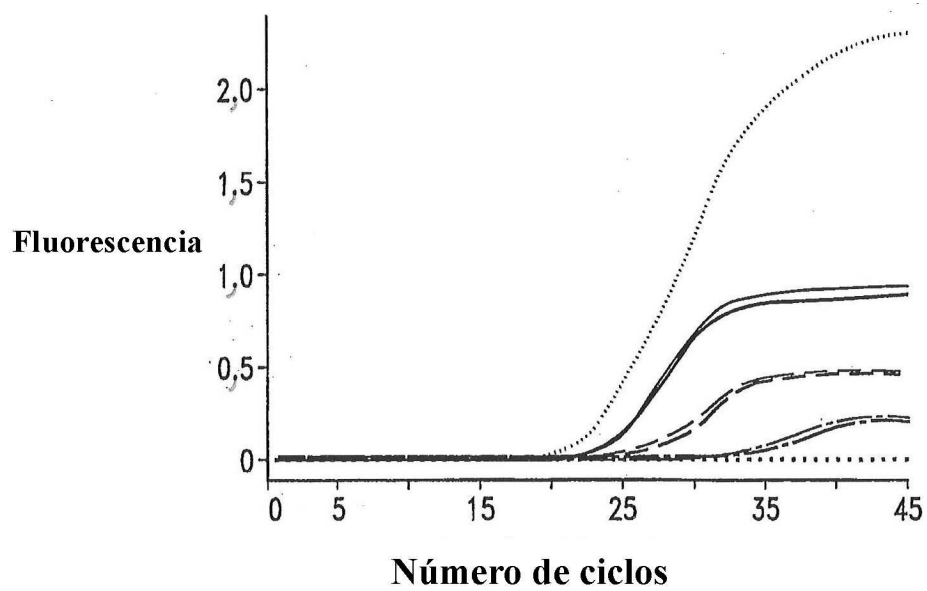


Fig. 18A

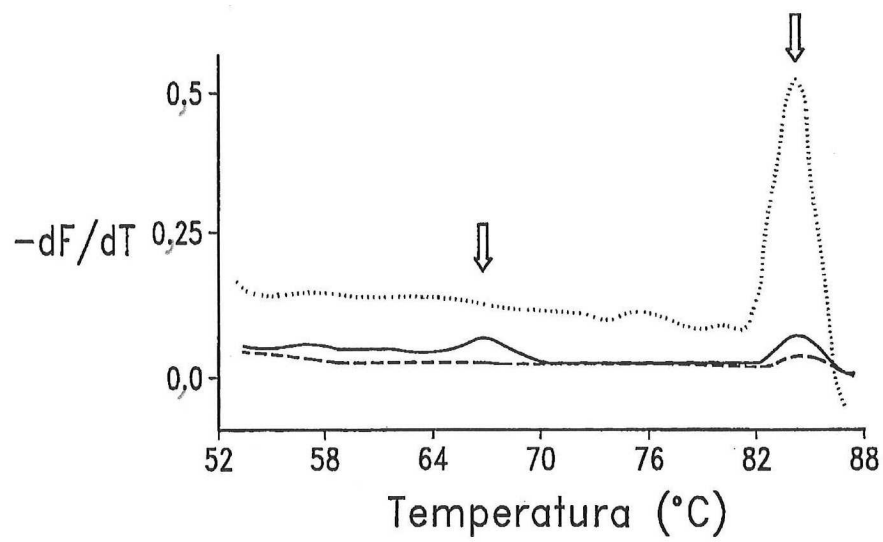


Fig. 18B

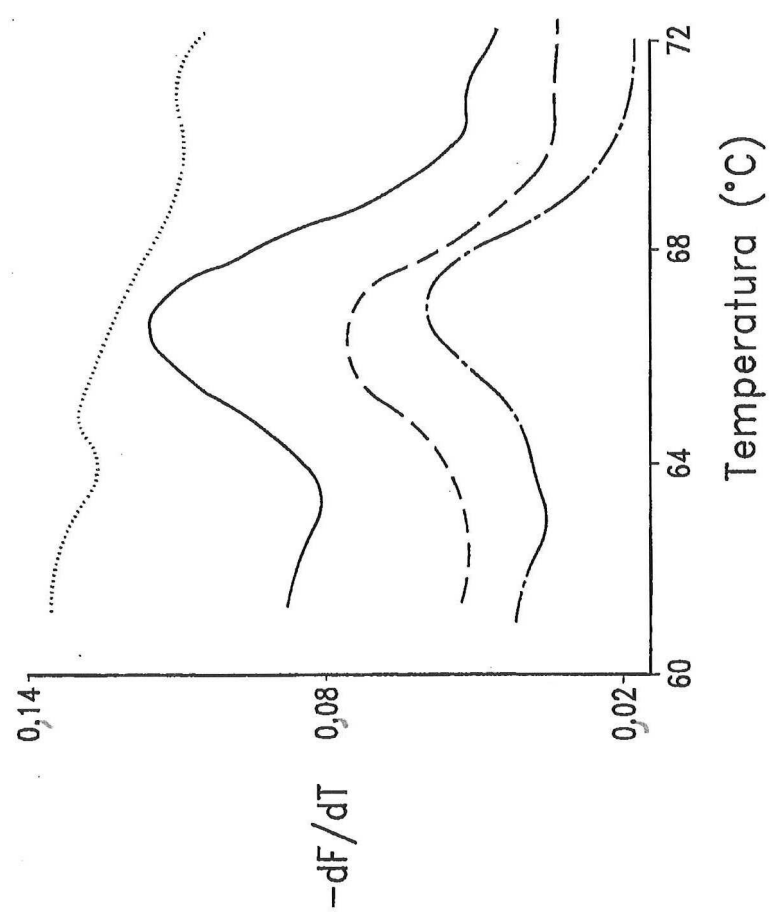


Fig. 19

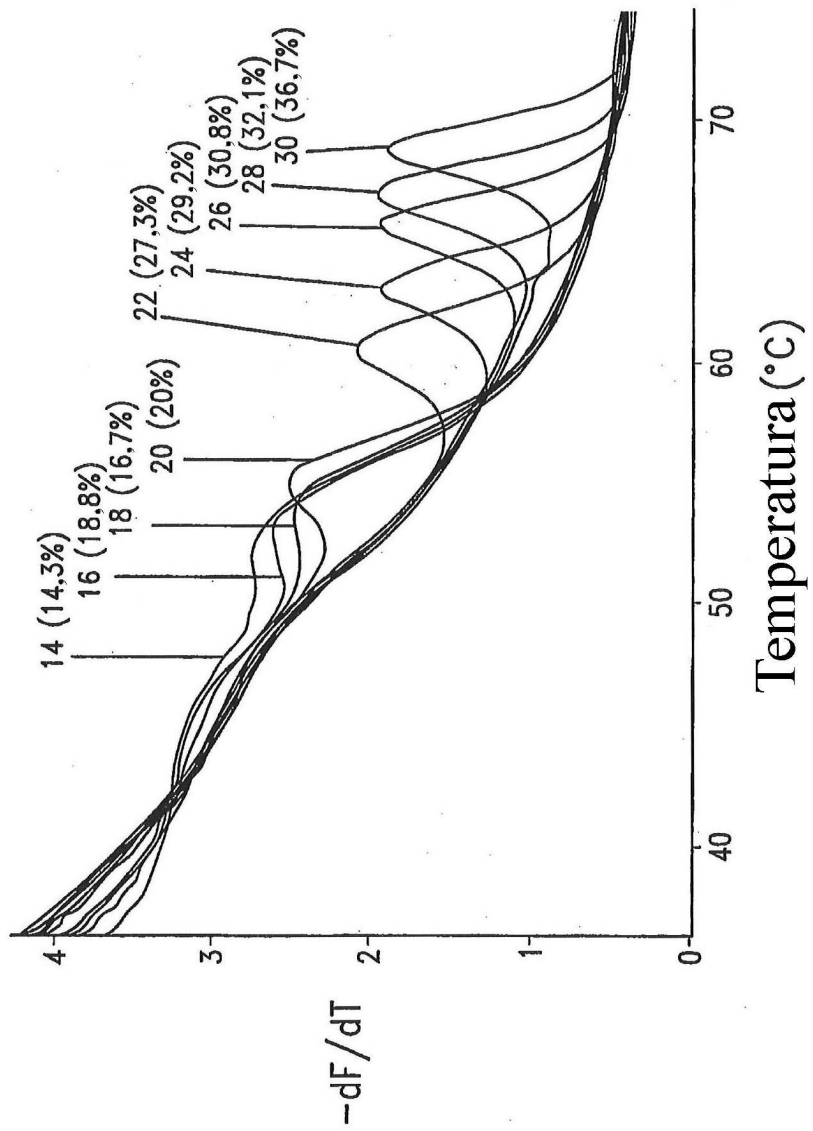


Fig. 20

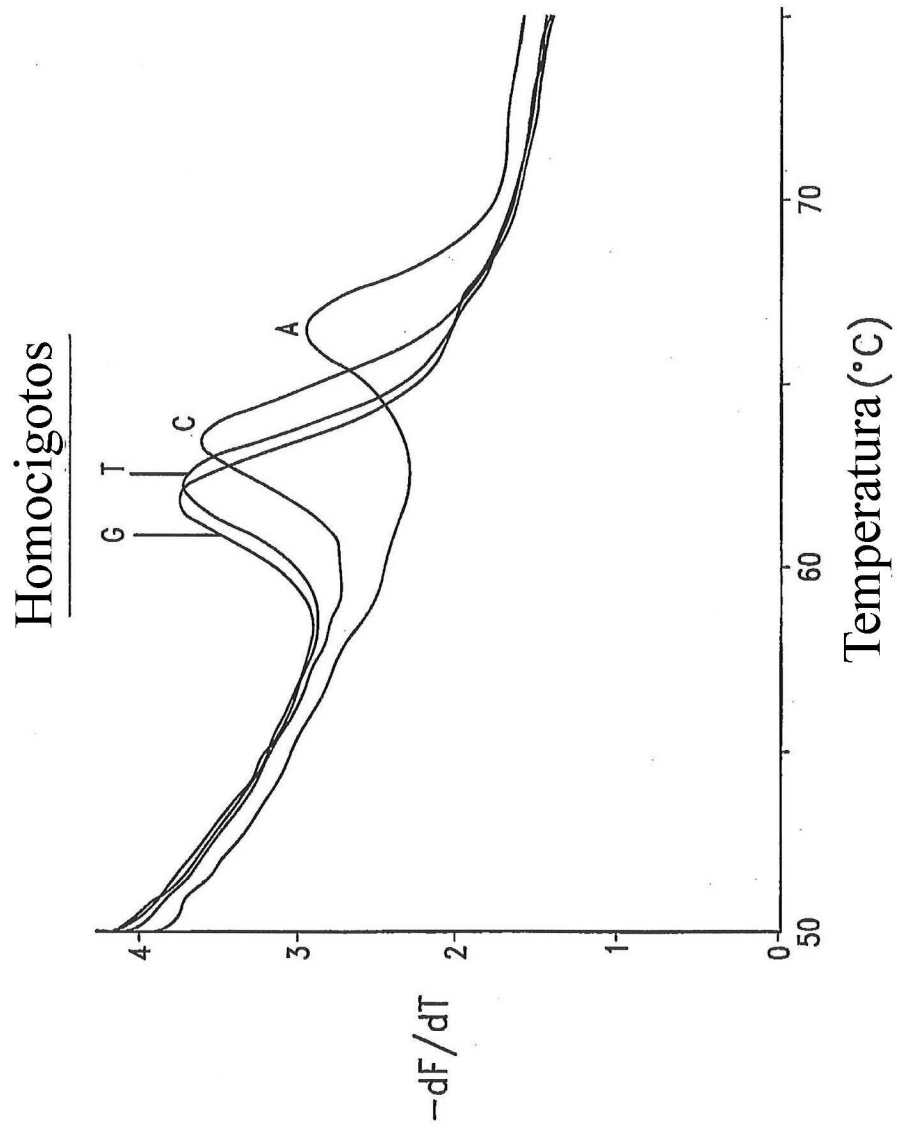


Fig. 21A

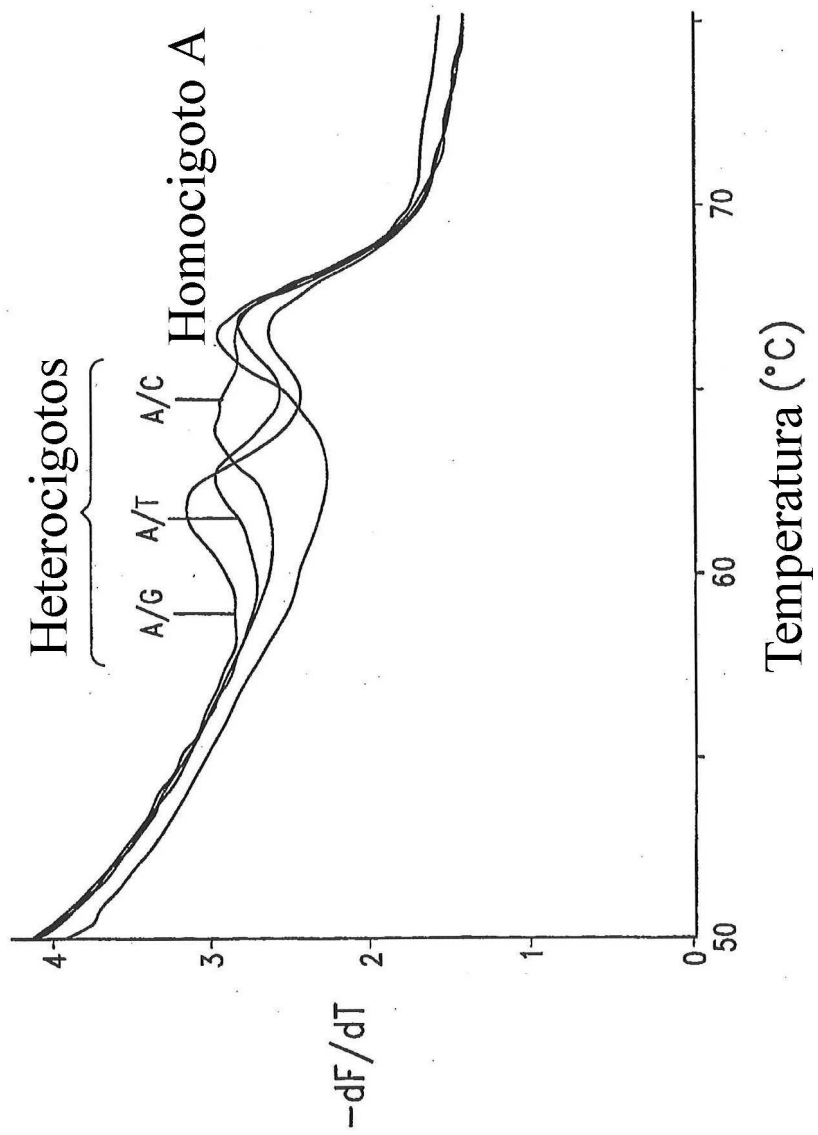


Fig. 21B

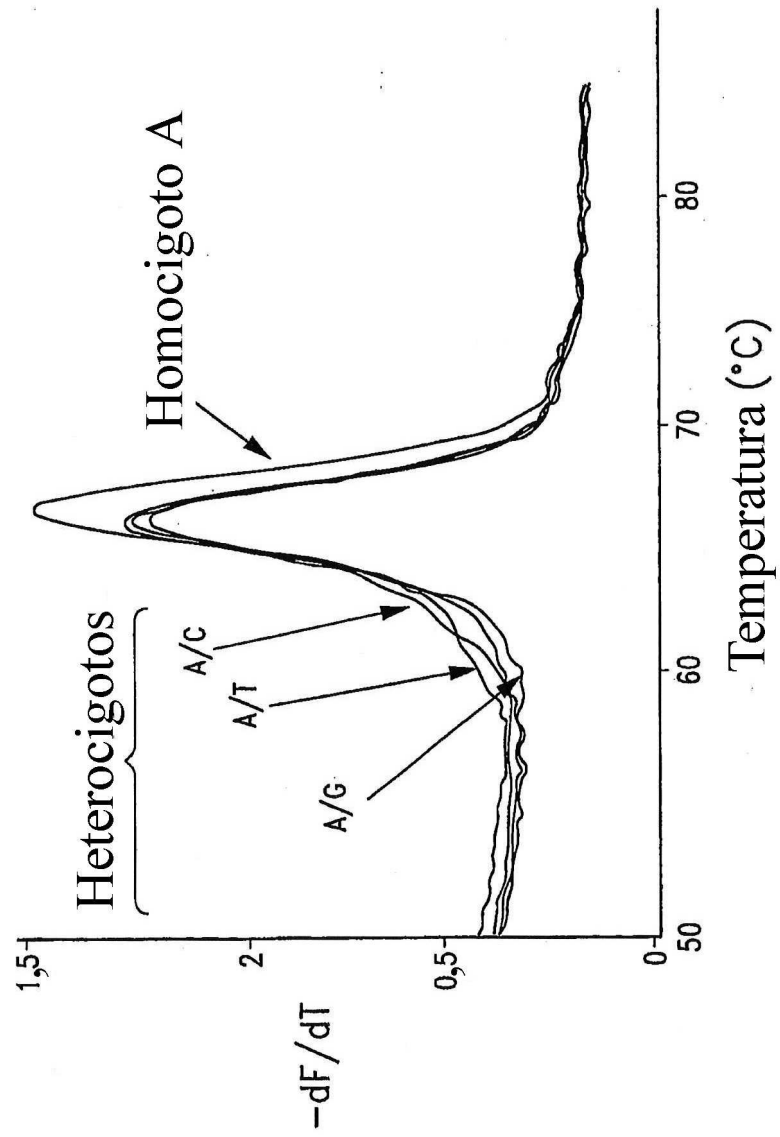


Fig. 21C

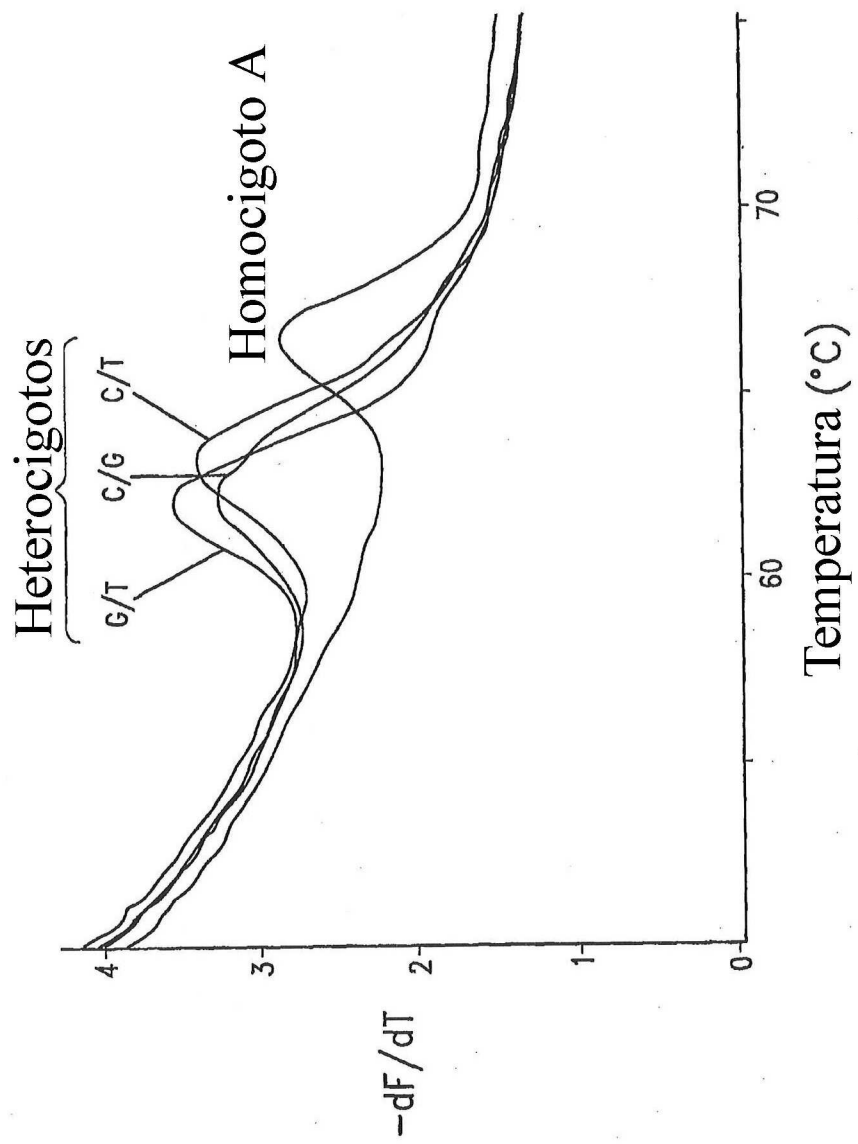
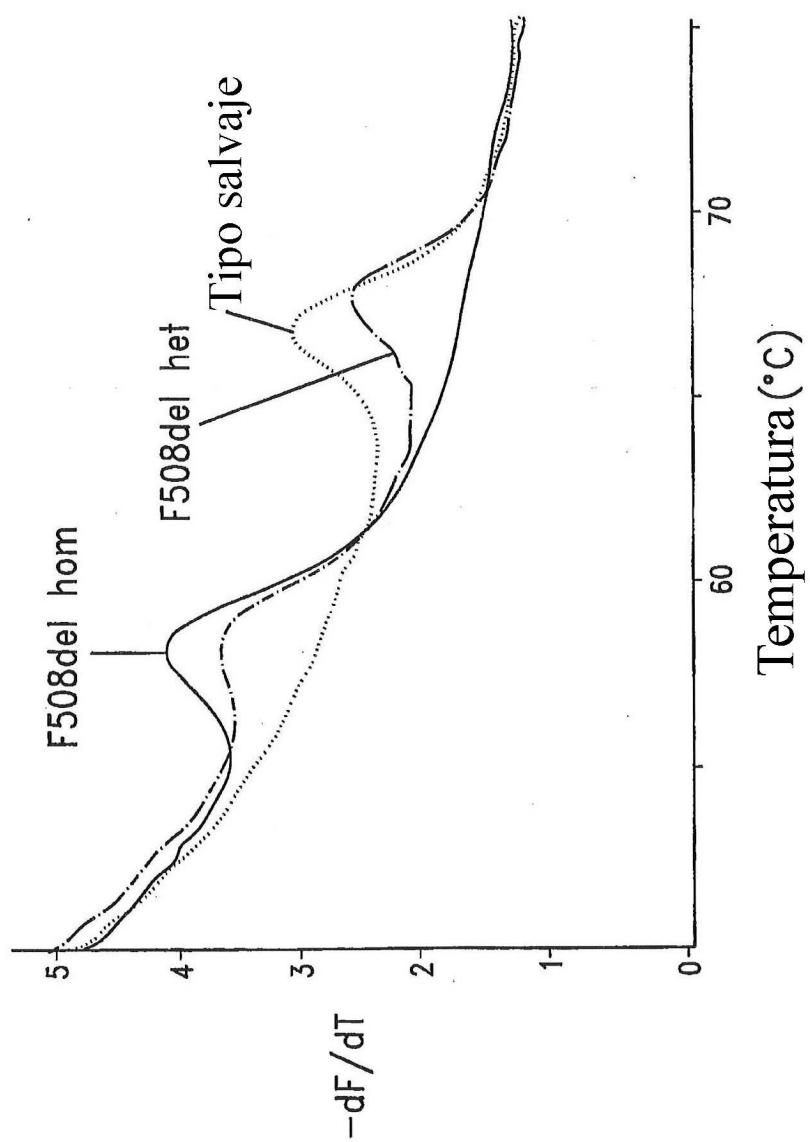
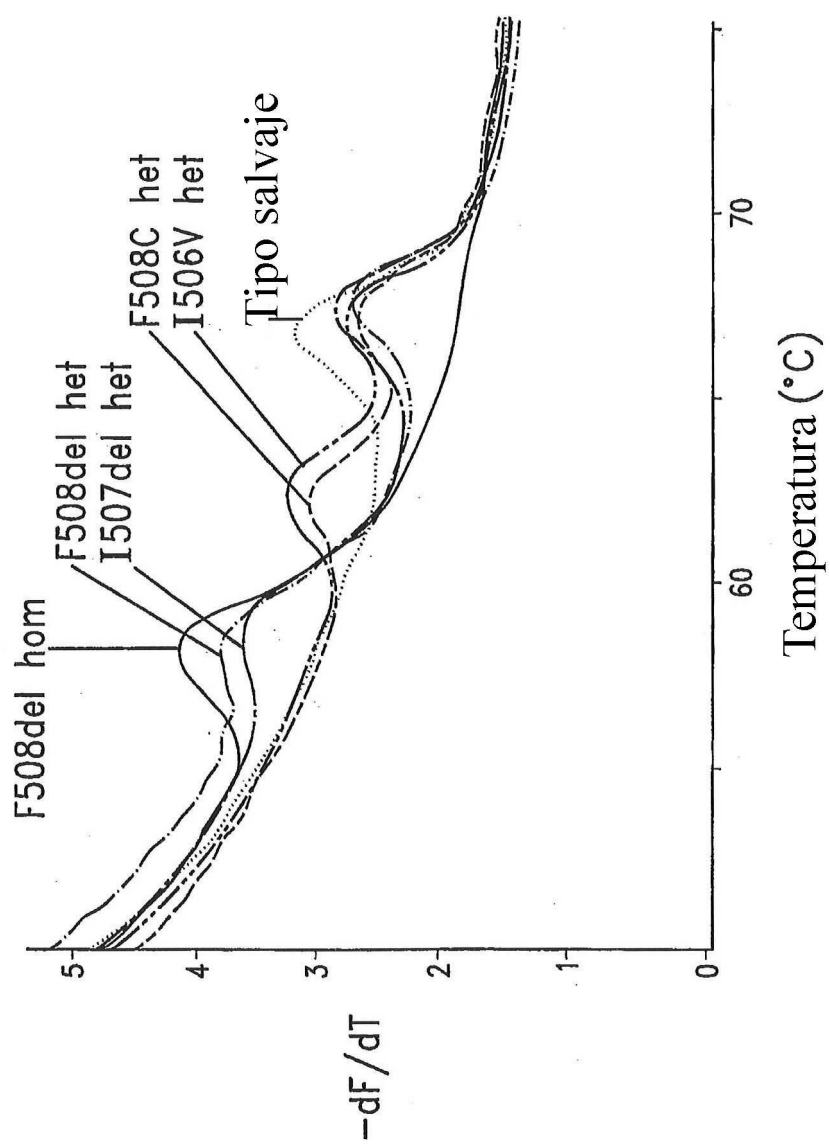


Fig. 21D

**Fig. 22A**

**Fig. 22B**

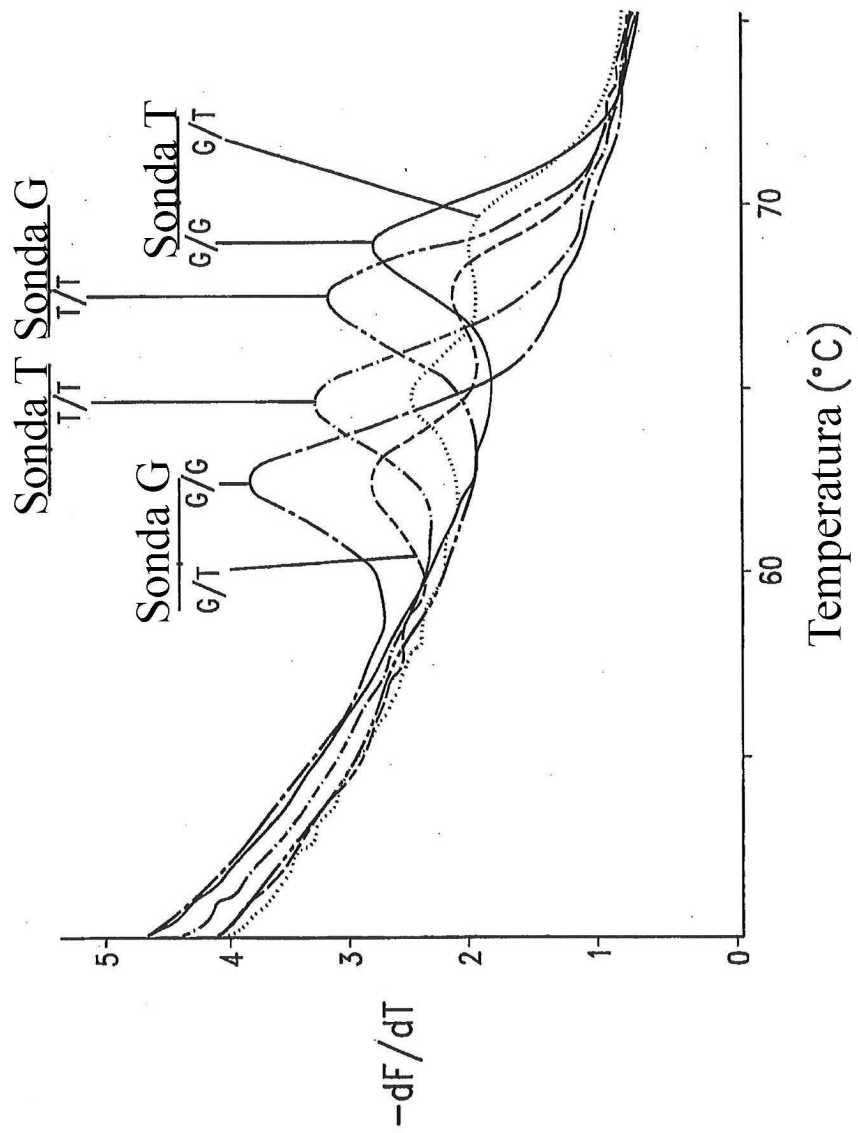
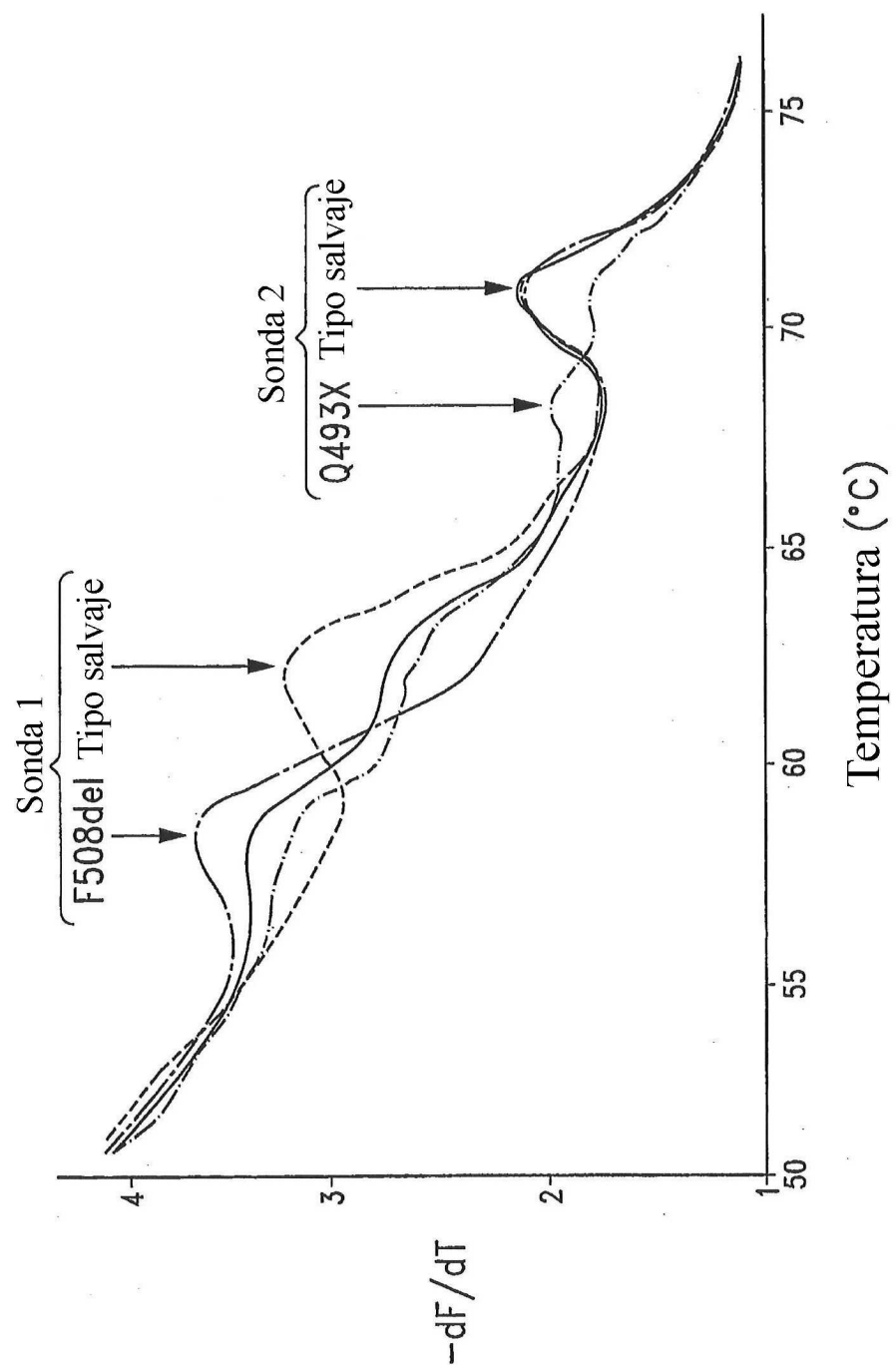


Fig. 23

**Fig. 24**

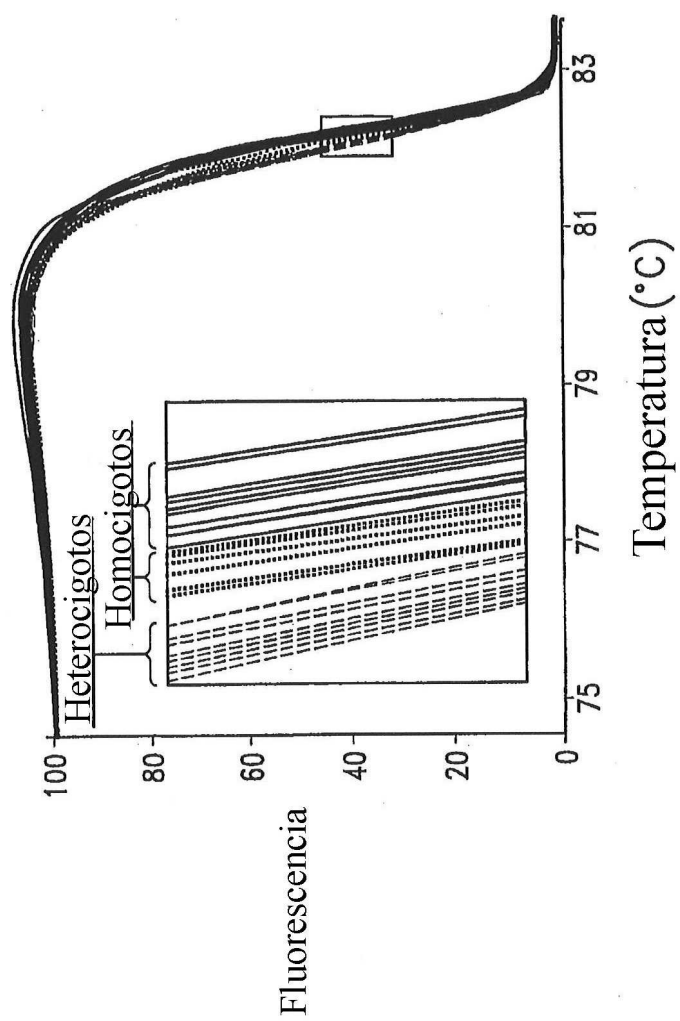


Fig. 25A

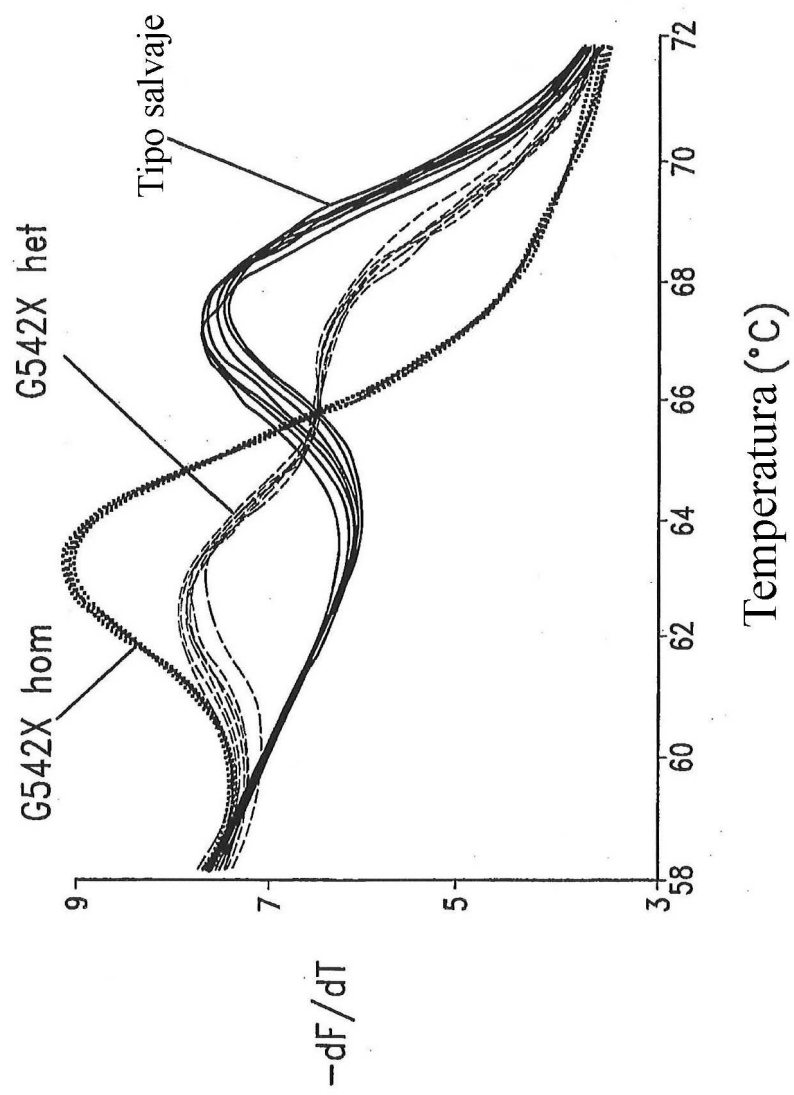


Fig. 25B

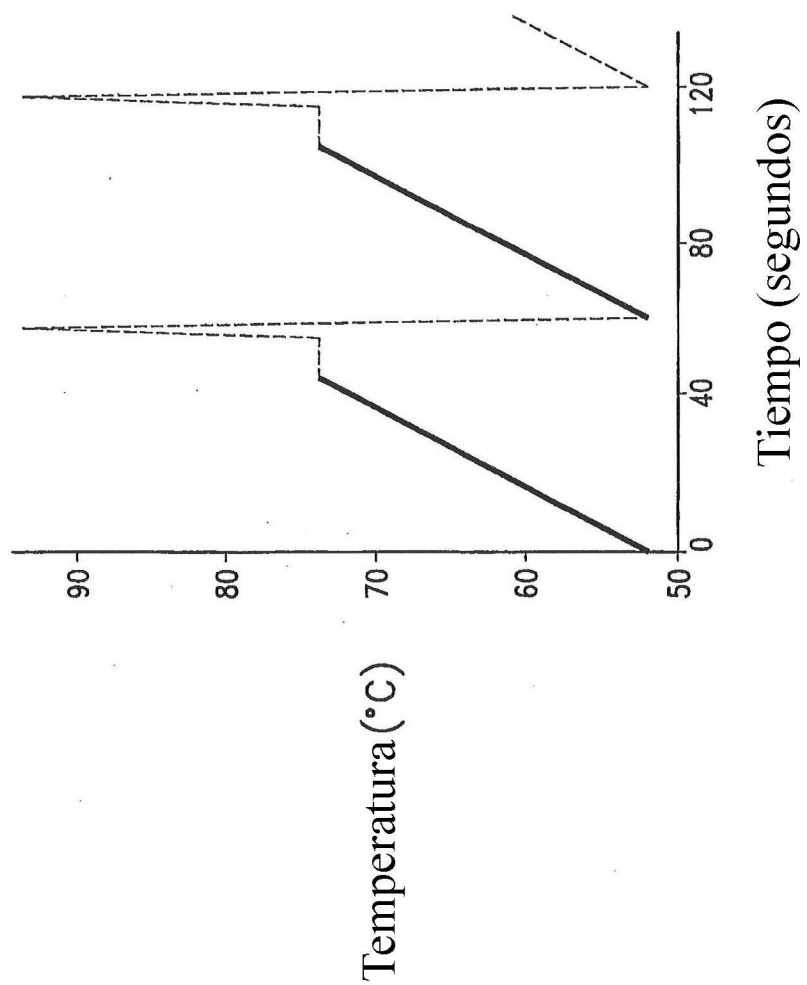


Fig. 26

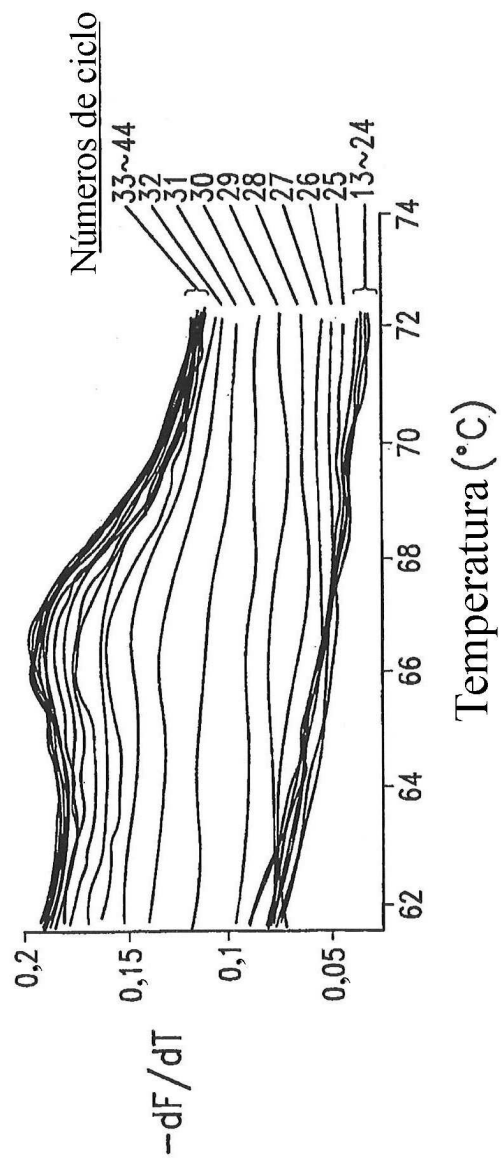


Fig. 27

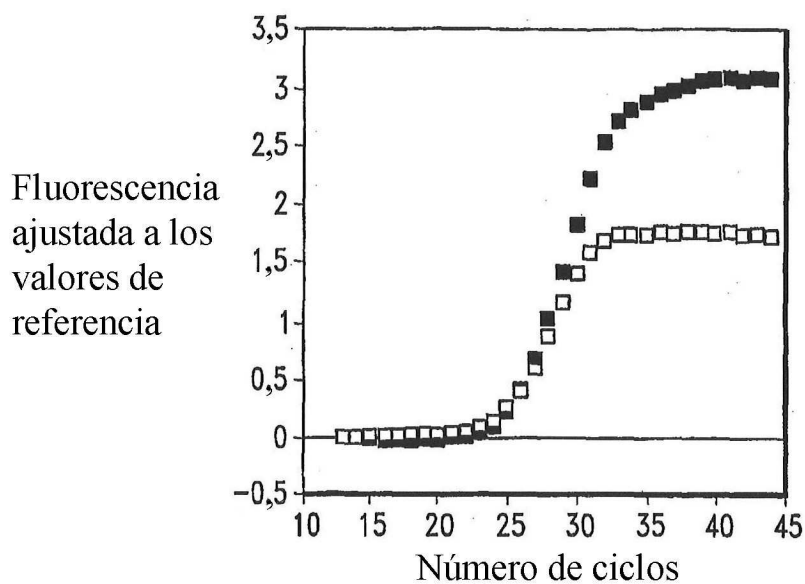


Fig. 28A

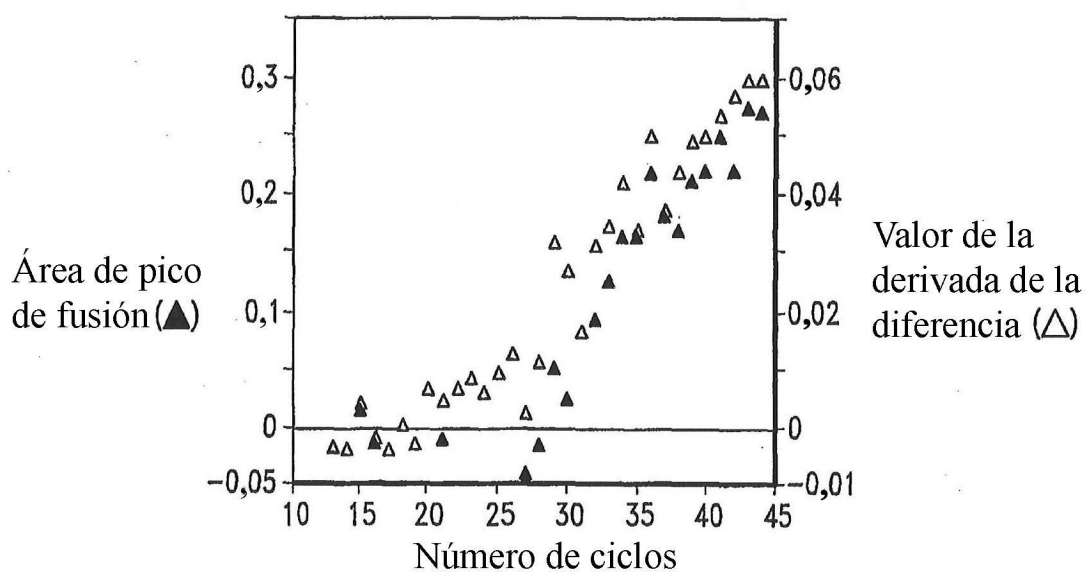


Fig. 28B

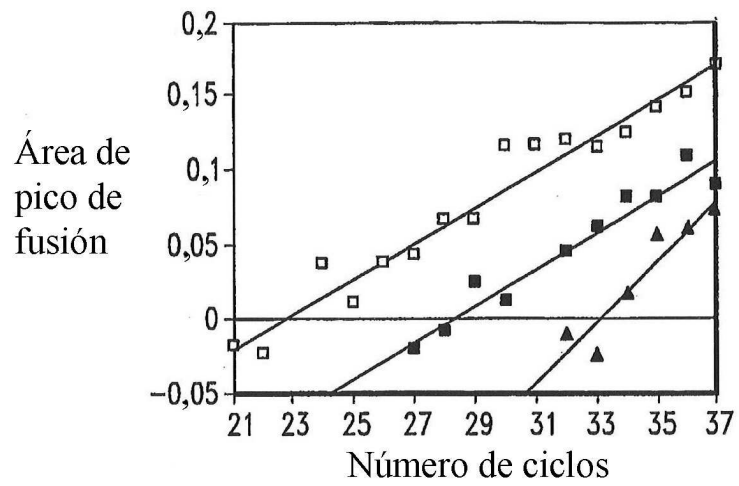


Fig. 28C

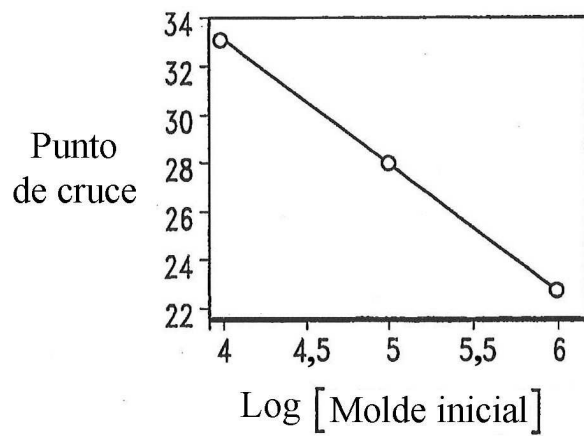


Fig. 28D

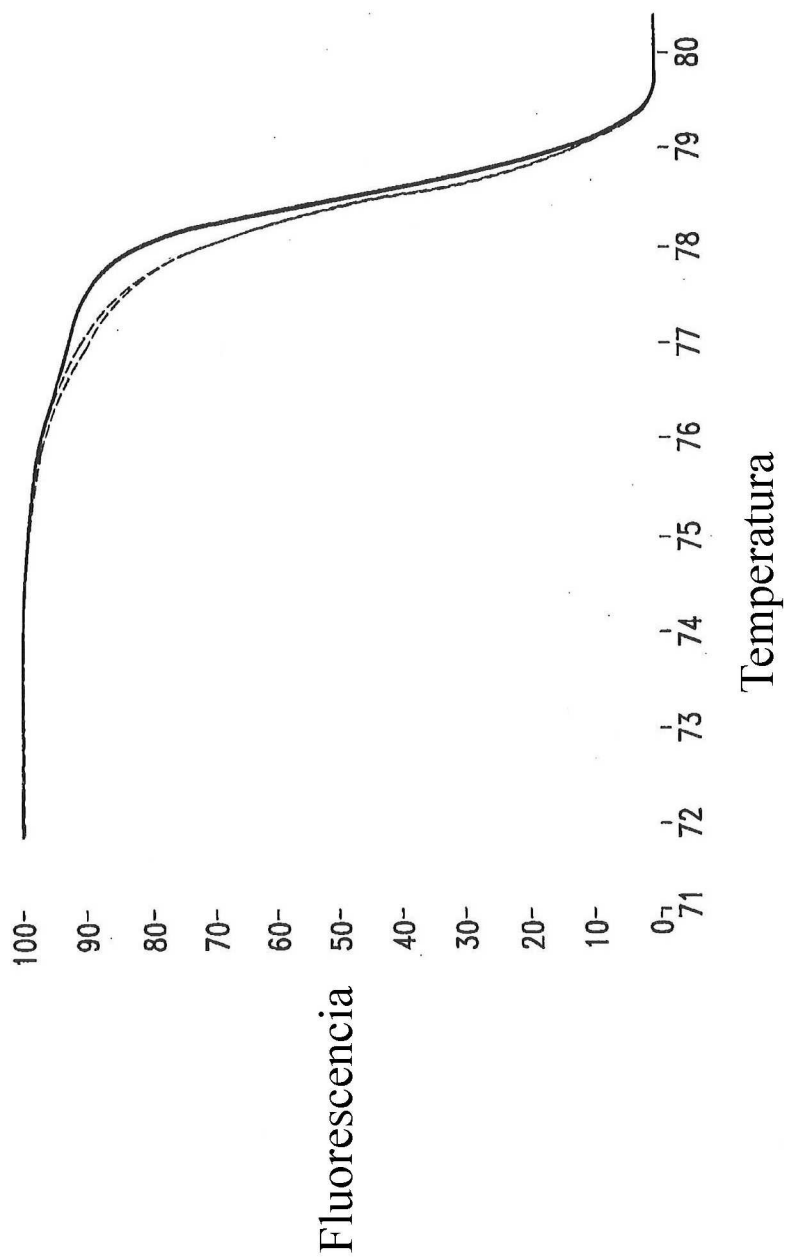


Fig. 29

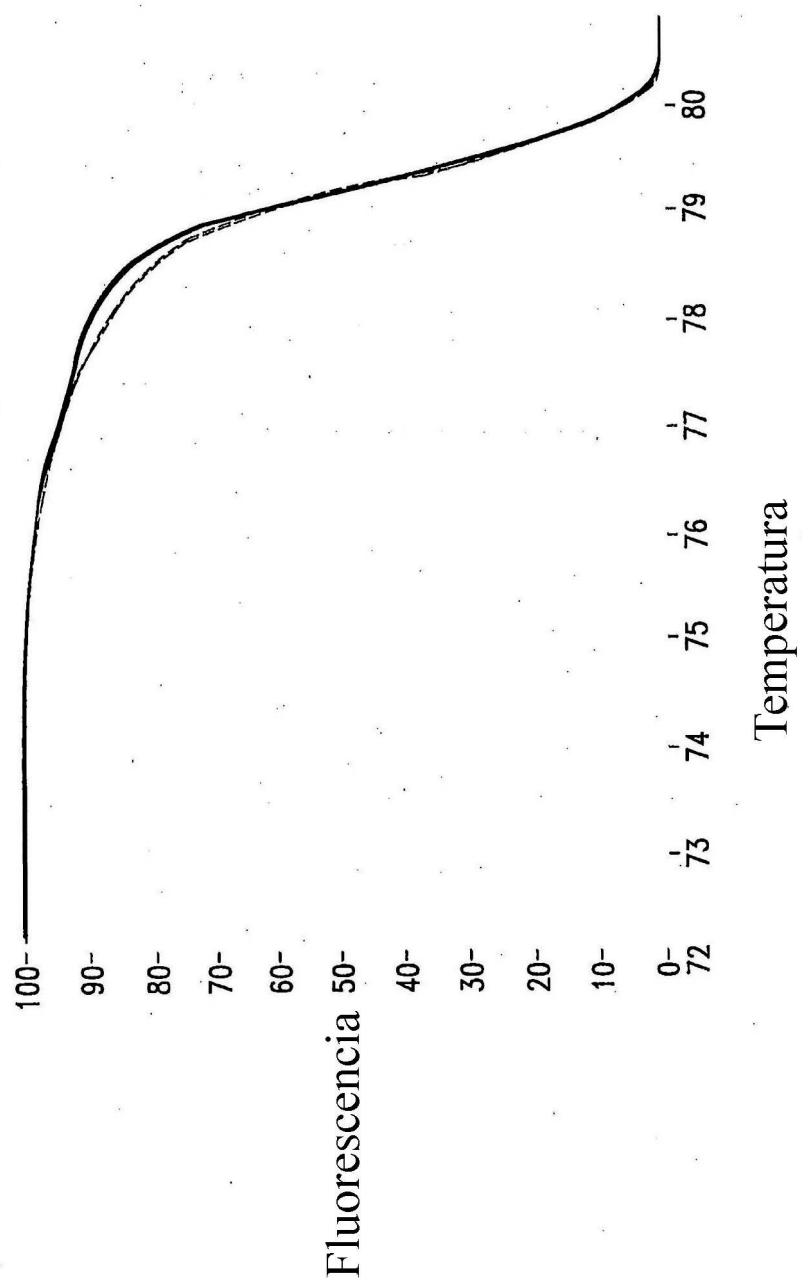


Fig. 30

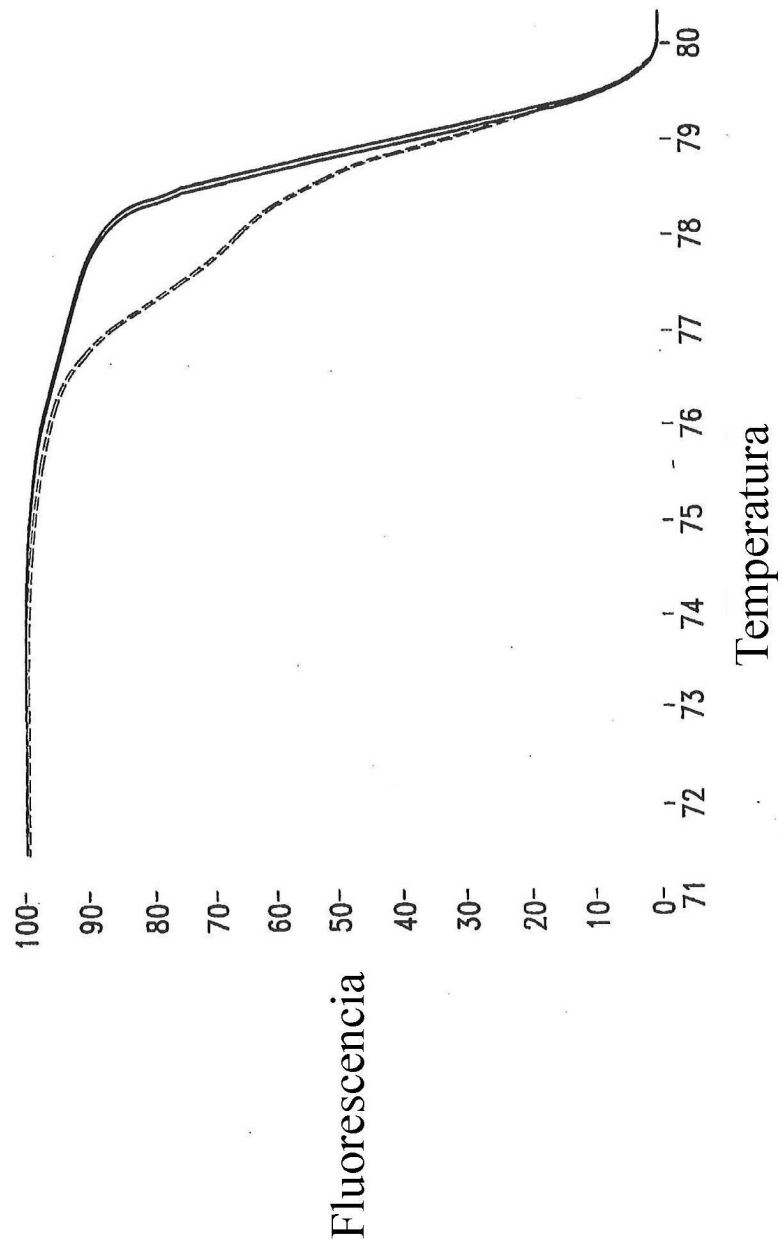


Fig. 31

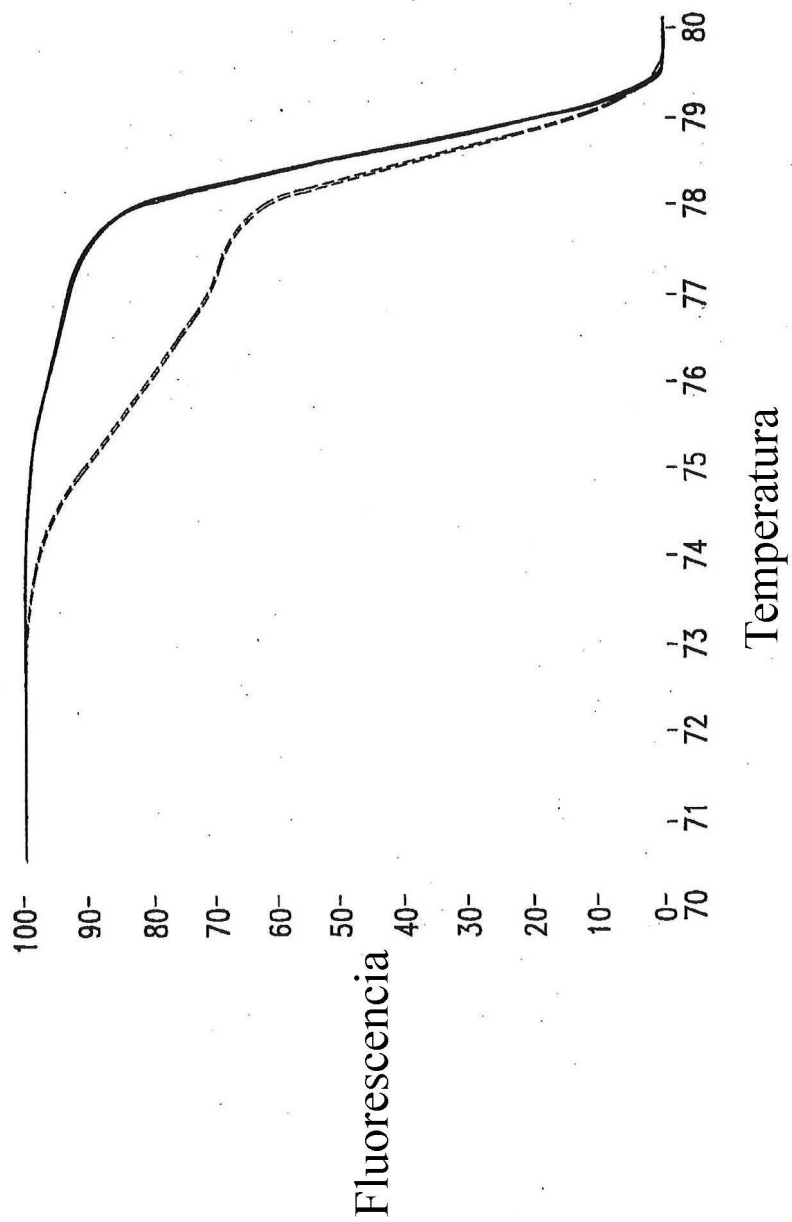


Fig. 32