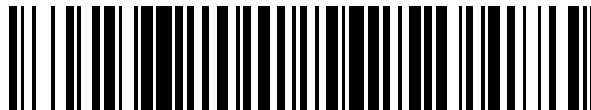


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 204**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2005 E 10187807 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2351766**

54 Título: **Métodos para la amplificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

**18.10.2004 US 619654 P**

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

**17.02.2015**

73 Titular/es:

**BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)  
415 South Street  
Waltham, MA 02454, US**

72 Inventor/es:

**WANGH, LAWRENCE J.;  
RICE, JOHN;  
SANCHEZ, J. AQUILES;  
PIERCE, KENNETH;  
SALK, JESSE;  
REIS, ARTHUR y  
HARTSHORN, CRISTINA**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 529 204 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

Métodos para la amplificación de ácido nucleico

## 5 Campo técnico

Esta invención se relaciona con reacciones de amplificación de ácido nucleico, que incluyen amplificaciones que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa, y ensayos que utilizan tales reacciones en combinación con métodos de detección de sondas de hibridación y de secuenciación.

10

## Antecedentes

Las técnicas y ensayos de amplificación de ácidos nucleicos son bien conocidos. Algunas reacciones de amplificación son isotérmicas, tales como la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA). Otras emplean ciclos térmicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ensayos de amplificación preferidos que emplean detección por fluorescencia del producto amplificado son homogéneos, es decir, que no requieren la separación física de los reactivos para permitir la detección (por ejemplo, separación de sondas unidas de las sondas no unidas) y se pueden realizar en un único recipiente cerrado. Tales ensayos pueden ser de punto final, en donde el producto se detecta después de la amplificación, o pueden ser en tiempo real, en donde el producto se detecta según procede la amplificación.

20

La amplificación de ácido nucleico y los ensayos que emplean PCR se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 4,683,202, 4,683,195 y 4,965,188, y, generalmente, PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis y otros eds., Academic Press (San Diego, CA (USA) 1990). Los ensayos de PCR homogéneos, que incluyen ensayos en tiempo real, en los que el producto amplificado se detecta durante todos o algunos de los ciclos de PCR cuando la reacción procede se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5,994,056, 5,487,972, 5,925,517 y 6,150,097.

25

Las reacciones de amplificación por PCR generalmente se diseñan que sean simétricas, es decir, para fabricar amplicones de cadena doble de forma exponencial por la utilización de iniciador directo e iniciador reverso en concentraciones equimolares y temperaturas iguales de fusión ( $T_m$ 's). Una técnica que ha encontrado un uso limitado para la fabricación de ADN monocatenario directamente en una reacción de PCR es "PCR asimétrica." Gyllensten y Erlich, "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 7652-7656 (1988); y la patente de Estados Unidos 5,066,584. La PCR asimétrica es un método de amplificación por PCR no simétrica que difiere de la PCR simétrica en que uno de los iniciadores se diluye de cinco veces a cien veces para estar presente en la cantidad limitante de 1-20 por ciento de la concentración del otro iniciador. Como consecuencia, la amplificación consiste en una fase exponencial en la que ambos iniciadores se extienden, generando el producto o amplicón, de cadena doble, seguido por una amplificación lineal en la que solo queda un iniciador, generando amplicón monocatenario.

30

35

Más recientemente, se ha desarrollado un método de amplificación por PCR no simétrica conocido como PCR "Lineal Después del Exponencial" o, para abreviar, "LATE-PCR". LATE-PCR es una amplificación por PCR no simétrica que consiste en una fase exponencial en la que ambos iniciadores se aparean y se extienden seguido por una fase lineal después del agotamiento del iniciador limitante, mientras sólo se aparean y se extiende el iniciador de Exceso. Ver Sanchez y otros (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 101: 1933-1938, solicitud internacional de patente publicada WO 03/054233 (3 de julio de 2003), y Pierce y otros (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 102: 8609-8614.

40

45

Un método conveniente y económico para controlar la producción de amplicón de cadena doble en una amplificación por PCR es usar un tinte que fluoresce tras intercarse en, o interaccionar de cualquier otra forma con el ADN de cadena doble, tal como SYBR green o SYBR gold. Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5,994,056. Los análisis de la temperatura de fusión de los amplicones realizados ya sea en tiempo real durante una amplificación por PCR o realizados después de la amplificación se usa para la identificación del producto. Un problema con la utilización de tales análisis de la temperatura de fusión es que la fluorescencia del tinte es una función del tamaño del amplicón. Otro problema es que los tintes se redistribuyen a partir de los productos de amplificación, o amplicones, que tienen temperaturas de fusión bajas a amplicones que tienen temperaturas de fusión más altas durante el análisis, lo que distorsiona de ese modo los resultados. Se han propuesto dos enfoques para resolver estos problemas. Un enfoque, desactivación G, impone severas restricciones en el diseño del iniciador y causa gran fluorescencia de fondo (Crockett AO, Wittwer CT. "Fluorescein-Labeled Oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the Inherent Quenching of Deoxyguanosine Nucleotides" Anal. Biochem. 290:89-97 (2001)). El otro, la sustitución de los tintes SYBR con tinte verde LC, produce un porcentaje de señal muy pequeño para

50

55

las secuencias no presentes en abundancia y requiere de un software y hardware altamente especializado (Wittwer y otros High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen," Clin. Chem. 49:853-860(2003).

5 Se usan sondas marcadas fluorescentes en ensayos de amplificación de ácidos nucleicos homogéneos, que incluyen los ensayos de PCR, para medir la acumulación del amplicón deseado, ya sea en análisis en tiempo real o de punto final. Varios tipos de sondas disponibles son significativamente alelo discriminante en comparación con sondas monocatenarias lineales. Las sondas en tiempo real incluyen sondas lineales de doble etiquetado que se escinden por la actividad exonucleasa 5'-a-3' de la ADN-polimerasa durante la etapa de extensión de un ciclo PCR (ver las patentes de Estados Unidos 5,210,015, 5,487,972 y 5,538,848); sondas de baliza molecular (ver las patentes de Estados Unidos 5,925,517, 6,103,476 y 6,365,729);  
10 sondas de unión al surco menor (ver Afonina y otros "Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence," Biotechniques 32: 946-949 (2002)); pares de sondas lineales FRET cuando hibridan adyacentemente en una cadena objetivo; sondas lineales de doble cadena inactivadas para las que un objetivo compite para hibridar la cadena de sonda marcada (ver Li, Q. y otros (2002), Nucl. Acid. Res. 30: e5); y las denominadas sondas de "iluminación", que son oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) unidos a un tinte de cianina asimétrica que fluoresce cuando la sonda se une a un objetivo para formar una región de doble cadena. Para la LATE-PCR se ha utilizado sondas discriminantes de alelos de baja temperatura, tales como sondas de baliza molecular de baja temperatura (Ver WO 03/045233). Las sondas oligonucleotídicas marcadas se pueden unir a iniciadores mediante  
15 enlazadores tal que durante la amplificación las sondas no se copian sino que están libres para hibridarse con una secuencia objetivo resultante de la extensión del iniciador. Los ejemplos son Scorpions®, iniciadores a los que se unen sondas de baliza molecular, y Anglers®, iniciadores a los que se unen sondas lineales marcadas con fluoróforo. Lee, M.A. y otros (2002), Analytica Clinica Acta 457: 61:70; Whitcombe, D. y otros (1999), Nature Biotechnology 17: 804-807. La porción de la sonda de tales estructuras compuestas, que portan el marcador fluorescente, se hibrida por separado de la porción del iniciador. Así, son sondas marcadas e iniciadores no marcados, como se usan esos términos en la presente descripción. Sin embargo, las sondas específicas al objetivo carecen de la capacidad para controlar la producción total de productos de  
20 cadena doble.

Ciertas sondas son tolerantes a desajustes. Las sondas tolerantes a desajustes se hibridan con y generan la señal detectable para más de una secuencia objetivo a una temperatura de detección en un ensayo, y varios híbridos de esta manera formados tendrán diferentes puntos de fusión. Las sondas monocatenarias lineales, o espirales aleatorias, son generalmente tolerantes a desajustes. Los ejemplos de tales sondas son sondas lineales con una porción fluorescente interna cuyo nivel de fluorescencia aumenta tras la hibridación con una u otra cadena objetivo; sondas lineales marcadas de manera fluorescente usadas en combinación con tintes SYBR gold y SYBR green I, tal que la fluorescencia del marcador se produce por FRET a partir del tinte cuando la sonda se hibrida con uno u otro objetivo (ver la publicación de patente de Estados Unidos US 2002/0119450, 28 de agosto de 2002), denominado "balizas descuidadas", y variaciones de pares de  
30 sondas lineales de esa FRET (ver la patente de Estados Unidos 6,472,156).

Utilizar múltiples sondas que se unen cada una sólo a un amplicón objetivo generado en una reacción de amplificación crea un problema para analizar mezclas de reacción complicadas o para detectar uno o unos pocos objetivos de entre numerosos objetivos posibles. La detección de fluorescencia disponible permite la resolución de un número limitado de fluoróforos, generalmente no más de ocho. Es posible la multiplexación limitada, por ejemplo, diseñando una sonda de baliza molecular discriminante de alelos diferentes para cada objetivo y marcando cada sonda de manera diferente. (Ver, por ejemplo, Tyagi y otros (2000) Nature Biotechnology 18: 1191-1196). Las mezclas de sondas discriminantes de alelos, que comprenden cada una alícuotas de múltiples colores, amplían el número de firmas de sonda y funcionan bien si sólo está realmente presente una de muchas (al menos hasta 56) objetivos, pero encuentra resultados ambiguos si hay más de  
40 un objetivo presente.

Existen muchas situaciones que implican objetivos complejos o uno entre muchos posibles objetivos. Se han desarrollado o propuesto varios esquemas para tales situaciones, pero todos tienen graves inconvenientes y limitaciones. Tyagi y otros publicaron la solicitud de patente internacional WO 01/31062, han descrito una técnica algunas veces referida como "balizas descuidadas", que son sondas de baliza molecular que tienen largas secuencias bucle, haciéndolas tolerantes a desajustes y capaces de unirse en cierta medida a múltiples objetivos a la temperatura de apareamiento de una reacción de amplificación por PCR. Tales sondas tienen escasa cinética de reacción frente a objetivos mal emparejados y tienen buena probabilidad de quedar hibridadas a objetivos perfectamente apareados a la temperatura de extensión de una amplificación por PCR y se escindan por Taq ADN polimerasa. Además, sólo se obtiene una indicación indirecta de temperaturas de fusión de híbridos de sonda-objetivo en las condiciones de ensayo, y esto supone que se ha alcanzado el equilibrio. Se ha descrito la multiplexación en tiempo real en amplificaciones por PCR simétrica con sondas FRET. Para no interferir con la amplificación, las temperaturas de fusión de todos los híbridos de sonda-objetivo se limitan a estar en el intervalo estrecho  
50

de temperatura entre la temperatura de apareamiento del iniciador y la temperatura de extensión del iniciador. Además, ese esquema no es cuantitativo. Los ensayos de múltiples sondas post-amplificación que emplean sondas FRET de diferentes colores se han descrito Wittwer y otros, "Real-Time Multiplex PCR Assays, Methods" 25:430-442 (2001). La mezcla de reacción a continuación de una amplificación por PCR simétrica se enfría rápidamente, después se calienta lentamente para determinar las curvas de fusión para varios fluoróforos presentes. Este enfoque no es cuantitativo. Adicionalmente, debido a la gran dispersión entre las amplificaciones por PCR simétrica repetidas, los ensayos de punto final tienden generalmente a ser sólo cualitativos.

La secuenciación de los productos de la reacción proporciona una alternativa al ensayo con sondas. La secuenciación dideoxi tradicional puede utilizar productos de las reacciones de amplificación, tales como PCR simétrica o LATE-PCR, como materiales de partida para la secuenciación en ciclos. El producto amplificado se purifica utilizando precipitación en etanol o una columna de afinidad para eliminar dNTPs e iniciadores residuales, se somete a una reacción de secuenciación en ciclos utilizando un iniciador de secuenciación y dideoxinucleótidos marcados de manera fluorescente, y se somete a electroforesis en gel capilar. La "pirosecuenciación" es un método de secuencia por síntesis, isotérmico, en tiempo real, conocido en la técnica. Si se usan métodos de amplificación exponencial, por ejemplo PCR, en la preparación del material de partida para la pirosecuenciación, el producto amplificado se debe limpiar por aislamiento de producto monocatenario así como eliminación de dNTPs, pirofosfato e iniciadores no incorporados de la reacción de amplificación. LATE-PCR simplifica la preparación de la muestra, porque genera principalmente producto monocatenario, pero no elimina en y por sí misma la necesidad de limpiar el producto.

La invención proporciona un método de detección homogénea para detectar variantes alélicas de al menos una secuencia objetivo de ácido nucleico mediante el uso de un método de amplificación por PCR no simétrica, que comprende:

(a) formar una mezcla de reacción de amplificación que incluye dicha al menos una secuencia objetivo de ácido nucleico, iniciadores para la amplificación por PCR no simétrica, y al menos una sonda de hibridación marcada con fluoróforo, tolerante a desajustes;

(b) amplificar dicha secuencia objetivo de ácido nucleico mediante dicho método de amplificación por PCR no simétrica generando moléculas de amplicón monocatenarias;

(c) detectar la emisión de fluorescencia a partir de al menos dicha sonda a una primera temperatura de detección y una temperatura de detección inferior, en donde dicha sonda señala tras la hibridación debido a la excitación del marcador de fluoróforo de la sonda y se une a secuencias progresivamente más mal emparejadas a medida que se disminuye la temperatura, en donde dicha sonda es discriminante de alelo a dicha primera temperatura de detección y tolerante a desajustes a la temperatura de detección inferior debido a la  $T_m$  de la sonda para la secuencia objetivo; y

(d) determinar la constitución alélica de dicha al menos una secuencia objetivo normalizando dicha emisión de fluorescencia de la sonda como una relación de las emisiones a dicha primera temperatura de detección y dicha temperatura de detección inferior y comparar la relación con las relaciones esperadas establecidas para los genotipos conocidos.

Un aspecto de esta invención son los métodos para la detección homogénea de los productos de reacción de reacciones de amplificación, ciclado por temperatura o isotérmica, utilizando la detección de fluorescencia a partir de iniciadores oligonucleotídicos lineales marcados con fluoróforo excitados indirectamente por excitación de un tinte fluorescente de ADN tal como SYBR green I o, preferentemente, SYBR gold. Tales tintes se vuelven fluorescentes cuando se asocian con el ADN de cadena doble, en el que se reportan que se intercalan. Los métodos anteriores pueden realizarse en tiempo real o a continuación de la reacción de amplificación, ya sea leyendo la fluorescencia a una temperatura de detección (detección de punto final) o determinando cambios en la fluorescencia como una función de la temperatura por análisis de fusión post-amplificación. A medida que se calienta una mezcla de reacción a través de las temperaturas de fusión de varios productos de reacción, la fluorescencia disminuye progresivamente a medida que varios amplicones que contienen un iniciador que contiene el fluoróforo particular alcanzan sus temperaturas de fusión y se vuelven monocatenarios. Los métodos preferidos incluyen calcular la relación de la señal del iniciador con la señal del tinte.

Se describen en la presente descripción los estuches de reactivos que incluyen tanto tinte fluorescente de ADN como al menos uno de tal iniciador marcado, preferentemente como parte de un par de iniciadores, y opcionalmente reactivos de amplificación.

- Aún otros aspectos de esta invención son métodos homogéneos para detectar productos de reacción de las reacciones de LATE-PCR empleando una etapa de detección a baja temperatura. Ciertas modalidades comprenden incluir en la mezcla de reacción al menos una sonda discriminante de alelos de acuerdo con esta invención, es decir, una sonda de cadena doble inactivada generalmente del tipo descrito por Li, Q. y otros. (2002) Nucl. Acids Res. 30: e5 excepto que es una sonda específica al objetivo de baja temperatura ( $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja) y que se excita indirectamente excitando un tinte fluorescente de ADN intercalado en el híbrido de sonda-objetivo tal como, preferentemente, SYBR gold. Otras modalidades comprenden incluir en la mezcla de reacción al menos una sonda tolerante a desajustes indirectamente excitable de acuerdo con esta invención, es decir, una sonda monocatenaria inactivada generalmente del tipo descrito por Lee y Furst en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos con núm. de pub. US 2002/0119450 excepto que es una sonda de baja temperatura inactivada. Estos diversos métodos incluyen excitar el tinte durante las etapas de detección a baja temperatura de una amplificación por LATE-PCR y detectar la fluorescencia a partir de las sondas en esas condiciones para proporcionar una medida de la secuencia monocatenaria objetivo. Modalidades particulares pueden incluir además medir la cantidad total de producto(s) de cadena(s) doble en la mezcla de reacción detectando fluorescencia de tinte, preferentemente durante, o al final de la etapa de extensión de ciclos de PCR mientras la temperatura de la mezcla de reacción está por encima de la(s) temperatura(s) de fusión de las sondas. Ciertos métodos preferidos incluyen calcular la relación de la señal de la sonda con respecto a la señal del tinte. En el caso de muestras repetidas, tal relación se corrige para las diferencias en los rendimientos de amplificación entre muestras repetidas que se sabe que se producen en las amplificaciones por PCR.
- En la presente son descritas tales sondas discriminantes de alelos y tolerantes a desajustes inactivadas, estuches de LATE-PCR que incluyen al menos una tal sonda específica al objetivo de baja temperatura junto con los reactivos de amplificación y preferentemente el tinte de ADN fluorescente; y conjuntos de oligonucleótidos que comprenden iniciadores de LATE-PCR y al menos una tal sonda.
- Otros aspectos de esta invención son métodos de detección homogéneos para usar cuando múltiples amplicones están presentes o pueden estar presentes, tal método que comprende incluir en una mezcla de reacción de amplificación por LATE-PCR una o más sondas de detección tolerantes a desajustes de baja temperatura que debido a su baja  $T_m$ , no interfieren con la amplificación y no se hidrolizan (cortan) por una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5'-3', y que emiten una señal fluorescente cuando se hibridan y se excitan, ya sea directamente por una fuente de excitación adecuada o indirectamente por un tinte de ADN fluorescente que se excita por una fuente de excitación adecuada. Tales métodos incluyen ensayos con una única sonda y ensayos con múltiples sondas para aplicaciones tales como genotipificación. Se pueden marcar más de una sonda con el mismo fluoróforo, en cuyo caso la discriminación se basa en el cambio de fluorescencia con la temperatura, al igual que cuando se usa una única sonda. Las sondas se pueden marcar con diferentes fluoróforos, en cuyo caso se usa también la diferencia de color para la discriminación. La discriminación entre objetivos para propósitos de identificación y cuantificación puede incluir relaciones de fluorescencia entre fluoróforos a la misma o diferentes temperaturas, así como relaciones de fluoróforo con el tinte. La detección se realiza preferentemente durante la amplificación (en tiempo real) y con mayor preferencia durante una etapa de detección a baja temperatura incluida en un protocolo de amplificación por LATE-PCR, y la etapa de detección puede incluir la detección a múltiples temperaturas. En la presente se describe una sonda lineal monocatenaria útil en tales métodos de detección, siendo tal sonda del tipo descrito en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos U.S. 2002/0119450 (29 de agosto de 2002), es decir, una sonda excitada por la emisión de fluorescencia de un tinte de ADN fluorescente, excepto que es una sonda de baja temperatura ( $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja), es tolerante a desajustes, e incluye una porción de desactivación que inhibe la fluorescencia, que de cualquier otra forma resultaría de la estructura secundaria de a baja temperatura.
- Se describe en la presente un método de amplificación a través de secuenciación que permite que el producto de una amplificación por LATE-PCR que se prepara para pirosecuenciación en la cámara de reacción de amplificación, recipiente, pocillo, portaobjeto o contenedor, una operación "en un único tubo" que se puede utilizar con amplificaciones por LATE-PCR realizados en pequeños volúmenes, preferentemente 17  $\mu$ l o menos.
- Se describe en la presente un método para preparar productos de LATE-PCR para la secuenciación de dideoxi utilizando solo dilución acuosa post-amplificación de las mezclas de reacción de amplificación, que se puede realizar como una operación "en un único tubo".

#### Resumen

En esta solicitud se hacen referencias a las temperaturas de fusión,  $T_m$ , de iniciadores de ácidos nucleicos, sondas y amplicones.  $T_m$  se refiere a la temperatura a la que la mitad del material del sujeto existe en forma de cadena doble y el

resto es monocatenario. Generalmente, excepto para LATE-PCR, la  $T_m$  de un iniciador es un valor calculado usando ya sea el método "%GC" (Wetmar, J.G. (1991) "DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization," Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227-259) o el método "2(A+T) más 4(G+C)", los que son bien conocidos, en una condición estándar de concentración del iniciador y de sal. LATE-PCR, sin embargo, tiene en cuenta las temperaturas de fusión del iniciador presente en una reacción particular, teniendo en cuenta las concentraciones de iniciador en el inicio de la amplificación. Ver Sanchez y otros (2004) PNAS (USA) 101: 1933-1938, y Pierce y otros (2005) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 102: 8609-8614.

En esta solicitud se hace referencia a tal temperatura de fusión ajustada a la concentración al inicio de las amplificaciones como  $T_{m[0]}$ , que se puede determinar empíricamente, según sea necesario cuando se usan nucleótidos naturales, o se calcula de acuerdo con el método del "vecino más cercano" (Santa Lucia, J. (1998), PNAS (USA) 95: 1460-1465; y Allawi, H.T. y Santa Lucia, J. (1997), Biochem. 36: 10581-10594) usando un ajuste de la concentración de sal, que en los ejemplos más abajo fue una concentración del catión monovalente de 0.07 M. LATE-PCR puede tener en cuenta la temperatura de fusión del amplicón, que se calcula utilizando la fórmula:  $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G+\%C) - 500/L + 16.6 \log [M]/(1 + 0.7 [M])$ , donde L es la longitud en nucleótidos y [M] es la concentración molar de cationes monovalentes. Las temperaturas de fusión de sondas lineales, o espirales al azar, se calculan tal como para los iniciadores. Las temperaturas de fusión de sondas estructuradas, por ejemplo sondas de baliza molecular, se pueden determinar empíricamente.

Como se usa en esta solicitud, "LATE-PCR" se refiere a una amplificación de ADN no simétrica utilizando el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un iniciador oligonucleotídico (el "Iniciador de Exceso") en un exceso de al menos cinco veces con respecto al otro iniciador (el "Iniciador Limitante"), que se utiliza a su vez a baja concentración, hasta 200 nM, para que se agote en más o menos suficientes ciclos de PCR para producir amplicón de cadena doble detectable de manera fluorescente, en donde la temperatura de fusión ajustada para la concentración del Iniciador Limitante al comienzo de la amplificación,  $T_{m[0]}^L$ , no es más de 5 °C por debajo de la temperatura de fusión ajustada para la concentración del Iniciador de Exceso al comienzo de la amplificación  $T_{m[0]}^X$ , preferentemente al menos tan alta y con mayor preferencia 3-10 °C superior; y en donde el ciclado térmico se continúa durante múltiples ciclos después del agotamiento del Iniciador Limitante para producir producto monocatenario, es decir, el producto de extensión del Iniciador de Exceso, referido algunas veces la "cadena del Iniciador de Exceso".

Los iniciadores y las sondas útiles en los métodos de esta invención son oligonucleótidos en el sentido amplio, por lo que se quiere decir que pueden ser ADN, ARN, mezclas de ADN y ARN, y pueden incluir nucleótidos no naturales (por ejemplo, 2'-o-metil-ribonucleótidos) y enlaces internucleotídicos no naturales (por ejemplo, enlaces de fosforotioato). Tanto los iniciadores como las sondas funcionan en parte al hibridarse con una secuencia de interés en una mezcla de reacción. Un iniciador es un oligonucleótido monocatenario que se puede hibridar con su secuencia complementaria a la temperatura de apareamiento del iniciador de una reacción de amplificación y puede extenderse en su extremo 3' mediante una ADN polimerasa. Un iniciador útil en los métodos de esta invención es un iniciador que señala la hibridación de su secuencia de iniciador por medio de un fluoróforo que puede excitarse indirectamente. Una sonda útil en los métodos de esta invención es, o incluye, un oligonucleótido monocatenario que puede hibridarse con su secuencia (o secuencias) objetivo pretendida a la temperatura (o temperaturas) de detección en o a continuación de una reacción de amplificación y señala de manera fluorescente ese acontecimiento de hibridación por medio de un fluoróforo que es indirectamente excitable. Como se usa en la presente descripción una "sonda" no se extiende en la reacción de amplificación mediante una ADN polimerasa. Las sondas que son muy específicas para una secuencia objetivo perfectamente complementaria y rechazan fuertemente las secuencias relacionadas que tienen una o unas pocas bases mal emparejadas son "discriminantes de alelos." Las sondas que se hibridan bajo al menos una condición de detección aplicable no sólo con secuencias perfectamente complementarias sino también con secuencias parcialmente complementarias que tienen una o más bases mal emparejadas son sondas "tolerantes a desajustes".

"Tinte de ADN fluorescente" como se usa en la presente descripción se refiere a una composición, por ejemplo SYBR green I o SYBR gold, que se vuelve excitable de manera fluorescente cuando se asocia con el ADN de cadena doble. Se ha reportado que los tintes de ADN fluorescentes se intercalan en el ADN de cadena doble, pero no se desea estar limitado por ninguna teoría de operación.

Los iniciadores útiles en los métodos de esta invención se usan junto con un tinte de ADN fluorescente y son oligonucleótidos monocatenarios lineales marcados con un fluoróforo que es excitable indirectamente, es decir, cuando el iniciador se hibrida con una cadena molde en la mezcla de reacción para formar una región de ADN de cadena doble, y se ilumina (por lo general, pero no necesariamente, luz visible) de una longitud de onda que excita, o se absorbe por, el tinte fluorescente de ADN pero el fluoróforo no brilla en la muestra, el fluoróforo emite. Se ha reportado que se transfiere energía a partir de un tinte de ADN fluorescente a un fluoróforo próximo mediante transferencia de energía por resonancia de

fluorescencia (FRET), pero no se desea estar limitado por ninguna teoría de operación. Se hace referencia a un fluoróforo que emite en esta circunstancia como un fluoróforo que se "excita indirectamente." Las sondas útiles en los métodos de esta invención se usan también junto con un tinte fluorescente que se une al ADN de cadena doble (un "tinte de ADN fluorescente") y marcado con un fluoróforo indirectamente excitable de este tipo tal que cuando la sonda se hibrida con una cadena objetivo en la mezcla de reacción y el tinte se excita, el fluoróforo emite.

Como se usa en la presente descripción "estuche" se refiere a una colección de reactivos para realizar un ensayo de amplificación. Un estuche puede estar "completo", es decir, incluir todos los reactivos necesarios para todas las etapas de una amplificación o de detección de la amplificación. Alternativamente un estuche puede ser "parcial", y omitir ciertos reactivos necesarios para esas operaciones. Ambos estuches completos y parciales descritos en la presente pueden incluir además reactivos para la preparación de la muestra, tales como el aislamiento de ácido nucleico y la transcripción inversa. La secuenciación puede implicar dos estuches, por ejemplo, un estuche completo de amplificación por LATE-PCR y un estuche completo de secuenciación en ciclos, o los dos se pueden combinar en un único estuche.

Como se usa en la presente descripción un "conjunto de oligonucleótidos" se refiere a una recolección de iniciadores o iniciadores y sondas para realizar una amplificación o ensayo. Para la secuenciación un conjunto de oligonucleótidos puede incluir, por ejemplo, Iniciador Limitante e Iniciador de Exceso para una amplificación por LATE-PCR y uno o más iniciadores de secuenciación adicionales para la secuenciación en ciclos. Para un ensayo con sonda de hibridación un conjunto de oligonucleótidos puede incluir, por ejemplo, el Iniciador Limitante e Iniciador de Exceso para una amplificación por LATE-PCR y al menos una sonda de hibridación marcada con fluoróforo.

Como se usa en la presente descripción un método "en un único tubo" se refiere a una serie de al menos dos operaciones, por ejemplo, preparación de muestra, amplificación o secuenciación, que se pueden realizar sin transferir la muestra de un recipiente, ya sea un tubo de ensayo, un pocillo de reacción, una cámara en un dispositivo de microfluído, un portaobjetos de vidrio o cualquier otro aparato capaz de sostener una mezcla de reacción, a otro recipiente.

Se pueden añadir sondas que tienen bajas temperaturas de fusión (es decir, sondas que forman híbridos de sonda-objetivo que tienen bajas temperaturas de fusión) a mezclas de reacción de amplificación antes del inicio de la amplificación y utilizarse sólo cuando se desee. Manteniendo las temperaturas por encima de la temperatura de fusión de una sonda durante toda o partes de una reacción de amplificación, se evita que la sonda hibride con su objetivo y que reduzca posiblemente la eficacia de la reacción. Ciertas modalidades de ensayos de LATE-PCR utilizan sondas de baja temperatura. Como se usa en la presente descripción, "sonda de  $T_m$  Baja" se refiere a una sonda de hibridación que tiene una temperatura de fusión ajustada para el inicio de la amplificación,  $T_{m[0]}$ , al menos 5 °C por debajo de la  $T_{m[0]}$  del Iniciador Limitante en un ensayo de LATE-PCR; y una "sonda de  $T_m$  Super Baja" se refiere a una sonda de hibridación que tiene una  $T_{m[0]}$  que es al menos 5 °C por debajo de la temperatura de apareamiento media del iniciador de la fase exponencial de una reacción de LATE-PCR. Frecuentemente se añaden sondas a las reacciones de LATE-PCR a una concentración de 1 micromolar ( $\mu\text{M}$ ). Por lo tanto, cuando se diseñan sondas, algunas veces se utiliza una  $T_{m[0]}$  nominal calculada como se describió anteriormente pero utilizando una concentración nominal de 1  $\mu\text{M}$ . La mayoría de las sondas de  $T_m$  Baja y sondas de  $T_m$  Super Baja tienen una  $T_{m[0]}$  calculada a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  en el intervalo de 30-55°C.

La detección utilizando las sondas de baja temperatura requiere la detección a baja temperatura, en donde la temperatura de la mezcla de sonda-objetivo se reduce suficientemente para que las sondas marcadas de manera fluorescente se hibriden y señalicen. Esto puede realizarse al final de la amplificación (punto final) o en un análisis de fusión post-amplificación. Alternativamente se puede incluir una etapa de detección a baja temperatura en algunos o todos los ciclos de la fase lineal de una amplificación por LATE-PCR de un ensayo en tiempo real. Preferentemente una etapa de este tipo se produce después de la extensión del iniciador y antes de la fusión de las cadenas a alta temperatura (o "desnaturalización"), aunque puede incluirse en la etapa de apareamiento de iniciadores. Una etapa de detección a baja temperatura en un ensayo de LATE-PCR significa una reducción de la temperatura al menos 5°C por debajo de la temperatura de apareamiento del iniciador.

Ciertos métodos de acuerdo con esta invención utilizan sondas de hibridación o iniciadores marcados con fluoróforo en combinación con tintes fluorescentes que se unen a ADN de cadena doble e incluyen estimular un tinte a una longitud de onda que excita el tinte pero no el/los fluoróforo(s) y detectar la fluorescencia emitida por un fluoróforo estimulado indirectamente por este procedimiento. Algunas modalidades de los métodos de acuerdo con esta invención incluyen detectar la emisión de fluorescencia a partir del tinte. Ciertos métodos preferidos incluyen además calcular la relación de emisión de fluoróforo con la emisión de tinte.

Una modalidad de esta invención incluye añadir a una mezcla de amplificación de ácidos nucleicos un tinte de ADN fluorescente, tal como SYBR green I, o preferentemente SYBR gold, y al menos un iniciador de amplificación de acuerdo con esta invención, es decir, un oligonucleótido monocatenario lineal que es extensible mediante una ADN polimerasa y que se marca con un fluoróforo que es excitable indirectamente para señalar el cebado como se describió anteriormente; realizar una reacción de amplificación, preferentemente una reacción de PCR (que incluyen LATE-PCR), que incluye aparear y extender ese iniciador marcado; y ya sea durante la amplificación (detección en tiempo real) o a continuación de la terminación de la amplificación (ya sea una detección de punto final en la conclusión de la reacción de amplificación o durante un análisis térmico posterior (curva de fusión)) excitando el tinte y detectando la emisión de fluorescencia a partir del fluoróforo, ya sea solo o en combinación con la detección de la emisión de fluorescencia a partir del tinte. Mediante un diseño de protocolo de amplificación adecuado, se puede incluir un análisis de fusión de productos de cadena doble en los puntos deseados en una reacción de amplificación. En esta modalidad sólo fluorescerán los iniciadores que se incorporan en el ADN de cadena doble. Los iniciadores no incorporados no fluorescerán, de esta manera no existe la necesidad de separar físicamente los iniciadores no unidos. El método es homogéneo. La emisión de fluoróforo sólo procede también de regiones de cadena doble de los productos que incluyen un iniciador marcado, no de todos los productos de cadena doble. El Ejemplo 1 más abajo demuestra estas mejoras. Se muestra que en un ciclo de una única extensión diseñado para producir productos de extensión mixtos de varias longitudes, una curva de fusión basada en la detección de emisiones a partir del fluoróforo del iniciador mostró todos los productos, mientras que una curva de fusión basada en la detección de emisiones a partir del tinte no lo hizo. El Ejemplo 1 demuestra también el uso del método de esta modalidad en reacciones isotérmicas.

Como se apreciará por un experto en la técnica, es importante generalmente corregir el solapamiento de la fluorescencia cuando se usa un tinte de ADN fluorescente, por ejemplo SYBR green I, junto con una sonda o iniciador marcado de manera fluorescente que se excita mediante FRET a partir del tinte intercalado. Este es el caso porque los tintes de ADN fluorescentes emiten típicamente luz a través de una amplia variedad espectral que puede incluir la longitud de onda de la luz usada para medir la fluorescencia emitida por el iniciador o la sonda. La corrección deseada se puede lograr por: 1) establecer el espectro de emisión del tinte solo; 2) medir la intensidad de la emisión del tinte en cada muestra a una longitud de onda que es más corta que la longitud de onda de emisión del iniciador o la sonda; 3) calcular la intensidad de la emisión del tinte a la misma longitud de onda de emisión del iniciador o la sonda con el conocimiento de las etapas 1 y 2; y 4) restar la intensidad de tinte calculada de la intensidad total medida a la longitud de onda de emisión del iniciador o la sonda. Muchas máquinas comerciales, tales como el instrumento ABI 7700 y el Cepheid Smart Cycler proporcionan software para llevar a cabo esta corrección. Alternativamente se pueden realizar las mediciones de espectro del tinte, emisión de tinte solo, y emisión total de tinte/sonda y se puede aplicar manualmente una fórmula satisfactoria para la corrección. Por ejemplo, Lee y Fuerst, solicitud de patente publicada de Estados Unidos con núm. de publicación US 2002/0119450 describe una fórmula de este tipo para la medición y corrección manual de solapamiento de fluorescencia de SYBR green I en el ciclador Light Cycler.

Todos los Ejemplos descritos en esta solicitud se llevaron a cabo en el ABI 7700 y el software de la máquina se usó para corregir el solapamiento de fluorescencia en todos los casos en los que se usó un tinte de ADN fluorescente junto con un iniciador o sonda fluorescente indirectamente excitado, independientemente de si se registró la fluorescencia del tinte solo.

Para amplificaciones por PCR utilizando un único par de iniciadores, en donde al menos un iniciador se marca con fluoróforo para su excitación indirecta como se describió anteriormente, un análisis de curva de fusión de acuerdo con esta modalidad puede distinguir entre el/los producto(s) pretendido(s) y productos no específicos. Para las amplificaciones por PCR multiplexadas utilizando múltiples pares de iniciadores, en donde al menos un miembro de cada par se marca con fluoróforo y se utiliza un fluoróforo diferente para cada par, se pueden distinguir diferentes productos pretendidos por el color y por las temperaturas de fusión asociadas con los diferentes fluoróforos. Para las amplificaciones por PCR generalmente se pueden controlar la(s) emisión (emisiones) de fluoróforo y las emisiones de tinte durante la reacción para realizar un seguimiento de la acumulación de producto(s) específico(s) y para realizar un seguimiento de la acumulación de productos de cadena doble, respectivamente.

Los análisis de las reacciones de amplificación pueden utilizar la relación de las emisiones de fluoróforo, una señal específica para iniciadores o sondas hibridadas, con la señal de emisión del tinte, que no es de esta manera específica. Una relación de este tipo, por ejemplo, se corrige para las variaciones entre reacciones repetidas. Los análisis pueden utilizar también el pico de fusión del iniciador-molde, que disminuye en magnitud a medida que se incorpora el iniciador marcado en el producto o productos de extensión.



Descrito en la presente descripción están los estuches de amplificación y estuches parciales que incluyen un tinte de ADN fluorescente, al menos un par de iniciadores que incluye un iniciador marcado con un fluoróforo que se excita indirectamente cuando se excita el tinte, y reactivos para amplificar la región definida por los iniciadores, preferentemente por LATE-PCR.

5 Otra modalidad de un método de acuerdo con esta invención incluye añadir a una mezcla de amplificación de ácido nucleico un tinte de ADN fluorescente, tal como SYBR green I o, preferentemente, SYBR gold, y al menos una sonda de hibridación de  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja discriminante de alelos, inactivada, indirectamente excitable, que puede ser una sonda para usar en los métodos de esta invención. Las sondas discriminantes de alelos en los métodos de esta invención son del tipo de sondas de cadena doble descritas por Li, Q. y otros (2002), "A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization," Nucl. Acid Res. 30: (2)e5 (una cadena de sonda oligonucleotídica lineal marcada con fluoróforo complementaria al objetivo, y una cadena complementaria marcada con el inactivador que es más corta que la cadena de sonda, generalmente en 2-10 nucleótidos), excepto que están marcadas con un fluoróforo que se excita indirectamente excitando el tinte, y que tienen una baja temperatura de fusión adecuada para el uso en amplificaciones por LATE-PCR como sondas de  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja. La capacidad de discriminación de alelos de las sondas de cadena doble se puede ajustar tal como se describió por Li y otros, al igual que el nivel de fluorescencia de fondo. Adicionalmente, la fluorescencia de fondo se puede reducir incluyendo residuos de guanidina adyacentes a la porción fluorescente, denominado "desactivación G."

20 Los métodos de esta modalidad incluyen la amplificación utilizando una mezcla de este tipo y detección a una temperatura a la que la sonda se hibrida de forma discriminante de alelos. Las modalidades preferidas incluyen usar una etapa de detección a baja temperatura durante la fase de amplificación lineal de una reacción de LATE-PCR en donde las sondas anteriores se hibridan con el amplicón monocatenario que se sintetiza, excitar el tinte de ADN fluorescente a una longitud de onda que no excita el fluoróforo o fluoróforos directamente, y leer la fluorescencia a partir del fluoróforo de la sonda o fluoróforos de las sondas, que se excita o excitan indirectamente de esta forma. Otras modalidades incluyen la amplificación seguida por una detección a baja temperatura como determinación de punto final. Algunas modalidades incluyen además detectar la emisión a partir del tinte, y ciertas modalidades preferidas incluyen calcular una relación de emisión de sonda(s) con la emisión de tinte. La detección de la emisión de tinte se realiza con la máxima preferencia en el mismo comienzo de la etapa de detección, mientras que la temperatura de la mezcla de reacción está por encima de las temperaturas de fusión de todas las sondas que están presentes. Se pueden usar datos de moléculas de cadena doble acumuladas o en acumulación (la señal de tinte) y de moléculas monocatenarias acumuladas o en acumulación (la señal de cada sonda) para construir relaciones de la manera descrita. Los métodos de esta modalidad también incluyen el uso de sondas de baliza molecular de baja temperatura, como se describe en la solicitud publicada WO 03/054233, si se estimula el marcador de fluoróforo por la emisión a partir del tinte pero no mediante la longitud de onda usada para excitar el tinte.

35 Se describen en la presente estuches de ensayo de LATE-PCR y estuches parciales que incluyen reactivos para la realización de una amplificación no simétrica, preferentemente una amplificación por LATE-PCR, con una etapa de detección a baja temperatura (punto final o en tiempo real) y que incluye un tinte de ADN fluorescente, al menos un par de iniciadores, preferentemente un par de iniciadores de LATE-PCR que incluye un Iniciador de Exceso e Iniciador Limitante, y al menos una sonda de hibridación de  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja marcada con fluoróforo para un producto monocatenario de la reacción de amplificación (producto de extensión del iniciador presente en exceso), en donde la sonda no es tolerante a desajustes, sino más bien es discriminante de alelos en la temperatura de detección pretendida, y en donde el fluoróforo de la sonda se excita indirectamente por la excitación del tinte. En los estuches preferidos y estuches parciales, al menos una sonda es una sonda discriminante de alelos descrita en la presente. Se describe en la presente también conjuntos de oligonucleótidos que incluyen al menos un par de iniciadores para la amplificación no simétrica, preferentemente amplificación por LATE-PCR, y al menos una sonda  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja de cadena doble discriminante de alelos inactivada marcada con un fluoróforo de manera que sea indirectamente excitable como se describió anteriormente, preferentemente por un tinte SYBR, así como tales sondas de cadena doble entre ellas.

50 Aún otra modalidad de un método de acuerdo con esta invención incluye añadir a una mezcla de reacción de amplificación no simétrica, preferentemente una mezcla de reacción de LATE-PCR, reactivos de detección que comprenden un tinte de ADN fluorescente tal como SYBR gold y al menos una sonda de hibridación lineal monocatenaria tolerante a desajustes que es perfectamente complementaria a una secuencia objetivo de amplicón monocatenario posible que puede o no estar presente para la amplificación en la reacción y es menos que perfectamente complementaria para al menos otra posible secuencia objetivo de amplicón monocatenario que puede estar presente. Las sondas útiles en esta modalidad son monocatenarias marcadas con un fluoróforo que es excitable indirectamente mediante la emisión de fluorescencia a partir del tinte. Son sondas de  $T_m$  Baja o, preferentemente,  $T_m$  Super Baja con respecto a sus objetivos posibles más

complementarios que pueden estar presentes, lo que generalmente significa objetivo perfectamente apareado. Se prefiere que tengan una  $T_{m[0]}$  frente a un objetivo perfectamente complementario que no sea más de unos pocos grados superior, y preferentemente por debajo de, con mayor preferencia al menos 5 °C por debajo de, la temperatura de apareamiento del iniciador durante la fase de amplificación exponencial de la reacción de amplificación. Las sondas pueden ser sondas lineales (o espirales al azar), o sondas espirales al azar para el uso en los métodos de la invención, es decir, inactivadas para eliminar la señal debido a la formación de estructura secundaria a bajas temperaturas. Las sondas lineales inactivadas para el uso en los métodos de esta invención tienen preferentemente un fluoróforo en un extremo y una porción de desactivación no fluorescente en el otro extremo, el que está en el extremo 3' de la sonda sustituyendo la caperuza de fosfato añadida de cualquier otra forma para impedir que la sonda se extienda, es decir, que funcione como un iniciador.

Esta modalidad comprende someter la mezcla anterior a la amplificación no simétrica, preferentemente por LATE-PCR, para generar moléculas de amplicón monocatenario y someter la mezcla de reacción de amplificación a un análisis térmico utilizando al menos una sonda tolerante a desajustes que se señala tras la hibridación. El análisis térmico se puede realizar no sólo después de que se complete la reacción de amplificación sino también durante una etapa de detección a baja temperatura de LATE-PCR durante ciclos térmicos en los que se produce el producto monocatenario, es decir, después del agotamiento del iniciador limitante. El análisis térmico revela objetivos de cada sonda de acuerdo con las temperaturas de fusión de los híbridos de sonda-objetivo que se forman o desestabilizan a medida que se reduce o se aumenta la temperatura, respectivamente. A medida que se reduce la temperatura, en primer lugar una sonda se hibridará con su objetivo perfectamente apareado (si está presente) y emitirá una señal fluorescente. A medida que se reduce adicionalmente la temperatura, la sonda se hibridará sucesivamente con objetivos progresivamente "más mal emparejados" y emitirá una señal fluorescente aumentada en cada ocasión. Como se explicó como resultado de las modalidades anteriores, se puede detectar la emisión a partir del tinte de ADN fluorescente, preferentemente cuando las sondas no se hibridan, es decir, a una temperatura por encima de la (s) sonda (s)  $T_m$  para permitir el control de la acumulación de las moléculas de cadena doble en la reacción y permitir el uso de relaciones para reducir la dispersión entre muestras repetidas.

En la presente descripción se describen los estuches que contienen reactivos para la amplificación no simétrica, preferentemente una amplificación por LATE-PCR, que incluyen un tinte fluorescente de ADN, al menos un par de iniciadores, preferentemente un par de iniciadores de LATE-PCR que incluye un Iniciador de Exceso y un Iniciador Limitante, y al menos una sonda  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja tolerante a desajustes espiral aleatoria, inactivada si es necesario para un (os) producto (s) de amplificación monocatenario, así como estuches parciales y conjuntos de oligonucleótidos que contienen tales iniciadores y sondas, y estas mismas sondas.

Los métodos de acuerdo con esta invención que utilizan una etapa de detección a baja temperatura de ensayos de LATE-PCR, preferentemente una etapa de detección a baja temperatura a continuación de la extensión de iniciadores y antes de la fusión de cadenas, incluyen ensayos de sondas multiplexados que contienen más de un par de iniciadores y generan uno o más amplicones monocatenarios (una sonda para cada objetivo) así como ensayos de múltiples sondas que contienen al menos una sonda para múltiples objetivos. Ciertos métodos preferidos con una etapa de detección a baja temperatura incluyen una etapa de detección a baja temperatura a continuación de la extensión del iniciador y antes de la fusión de cadena. Durante la etapa de detección en tales ensayos la temperatura se puede disminuir tanto como 30 °C o incluso 40 °C por debajo de la temperatura de apareamiento de iniciadores, proporcionando un gran marco de detección para la temperatura. Las sondas discriminantes de alelos, adicionalmente siendo diferenciable por el color (longitud de onda de emisión de fluoróforo) se pueden diferenciar por diferencias en la temperatura de fusión. Por ejemplo, se pueden distinguir cuatro sondas diferentes discriminantes de alelos marcados con FAM con  $T_m$  de 30, 35, 40 y 45 °C, respectivamente, frente a sus objetivos en tiempo real o a continuación de la amplificación como una determinación de punto final, a medida que se reduce o se aumenta la temperatura de reacción, no sólo por el análisis de fusión post-amplificación. Este grado de libertad añadido multiplica significativamente el número de sondas diferentes que se pueden usar en la misma reacción. Las sondas tolerantes a desajustes tendrán  $T_m$  inferiores frente a objetivos mal emparejados que frente a objetivos perfectamente apareados. Las combinaciones de sondas tolerantes a desajustes de baja temperatura de colores diferentes que señalan tras la hibridación, producen patrones de curvas de emisión de fluorescencia dependientes de la temperatura durante la detección a baja temperatura. Los métodos de acuerdo con esta invención incluyen el uso de tales curvas de emisión, curvas derivadas y relaciones de cualquiera de ellas a una temperatura o a diferentes temperaturas para identificar los constituyentes de objetivos mixtos con análisis de fusión después de la amplificación y también en tiempo real controlando la fluorescencia a varias temperaturas dentro del marco de la etapa de detección a baja temperatura de LATE-PCR. Las relaciones pueden incluir relaciones sonda/sonda iguales, sonda/sonda diferentes, relaciones sonda/tinte, y combinaciones de estas.

Los estuches LATE-PCR, estuches parciales y conjuntos de oligonucleótidos pueden incluir al menos dos sondas

discriminantes de alelos del mismo color que se puede distinguir por  $T_m$  o al menos dos sondas tolerantes a desajustes cuya hibridación con diferentes objetivos se pueden distinguir por  $T_m$ , preferentemente sondas espirales al azar que se inactivan indirectamente excitando un tinte de ADN fluorescente.

5 En la presente se describen métodos mejorados para preparar los productos de amplificación de las amplificaciones por LATE-PCR para reacciones de secuenciación, ya sea secuenciación dideoxi o métodos de secuenciación por síntesis, tales como la pirosecuenciación. Particularmente, se ha demostrado la generación y preparación de tales materiales de partida en un único recipiente de reacción, por ejemplo, un tubo de microcentrífuga. Preferentemente se incluye en la mezcla de  
10 reacción de LATE-PCR un reactivo para inhibir el cebado defectuoso, con la máxima preferencia un reactivo descrito en nuestra solicitud de patente Provisional de Estados Unidos con núm. 60/619,620, titulada "Reagents and Methods for Improving Reproducibility and Reducing Mispriming in PCR Amplification,". Para la secuenciación dideoxi se ha demostrado preparar productos de amplificación por LATE-PCR para la secuenciación por la etapa única de dilución de la muestra, un método que se denomina "diluir y ejecutar." Para la pirosecuenciación, se han demostrado métodos que sólo requieren la  
15 adición de reactivos de enzima/sustrato de pirosecuenciación a la mezcla de producto de LATE-PCR antes del apareamiento de los iniciadores.

Los métodos en la presente descripción incluyen también la amplificación por LATE-PCR y la preparación de muestras para la pirosecuenciación en el mismo recipiente, tal como el mismo tubo de reacción o la misma cámara de dispositivo de  
20 microfluído, todos los cuales referimos para abreviar como métodos "en un único tubo". En la pirosecuenciación tradicional, se amplifica el ADN por PCR simétrica donde se marca en 5' un iniciador con una molécula de biotina. Después de la amplificación, se usan perlas recubiertas con estreptavidina junto con equipo de vacío o magnético para aislar ADN monocatenario (ADNmc) y eliminar mediante lavado componentes residuales de la reacción de PCR que interfieren con la pirosecuenciación que incluyen pirofosfato (PPi), dNTPs e iniciadores de PCR. Debido a su capacidad para generar ADNmc, LATE-PCR elimina la necesidad de separación de cadenas y simplifica la preparación de la muestra cuando se combina con  
25 un método en el mismo recipiente para eliminar los cuatro componentes residuales de la PCR que interfieren. En un método de este tipo, se minimiza la necesidad de eliminar dNTPs que quedan al final de la amplificación usando cantidades limitantes de dNTPs en la mezcla de reacción de amplificación por LATE-PCR, teniendo cuidado de utilizar una cantidad suficiente para producir bastante ADNmc para pirosecuenciación. Se añade una enzima con actividad pirofosfatasa, por ejemplo una pirofosfatasa tal como pirofosfatasa de levadura, al producto de amplificación para eliminar PPi y se calienta  
30 la mezcla para desnaturalizar esa enzima antes de proceder a la pirosecuenciación. Debido a que no queda el Iniciador Limitante después la amplificación por LATE-PCR y el Iniciador de Exceso residual no puede cebar la cadena extendida a partir del Iniciador de Exceso durante la amplificación (cadena de Iniciador de Exceso), en muchos casos no se necesita eliminar los iniciadores residuales. Sin embargo, se puede evitar el posible cebado defectuoso incluyendo en la mezcla de reacción por LATE-PCR un oligonucleótido que se hibrida con el Iniciador de Exceso a temperaturas por debajo de la  $T_m$  del  
35 Iniciador de Exceso, incluyendo la temperatura usada para la pirosecuenciación. Como alternativa, se puede añadir un oligonucleótido bloqueado para la extensión en el extremo 3' y totalmente complementario al Iniciador de Exceso después de la amplificación por LATE-PCR pero antes de la pirosecuenciación para evitar el posible cebado defectuoso por el Iniciador de Exceso a temperaturas usadas para la pirosecuenciación. Una tercera estrategia para evitar el cebado defectuoso por el Iniciador de Exceso en el extremo 3' de la cadena extendida a partir del Iniciador Limitante durante la  
40 amplificación (cadena de Iniciador Limitante) implica usar una concentración suficiente de un oligonucleótido bloqueado en 3' que contiene la misma secuencia que el Iniciador de Exceso para ser más competitivo que el Iniciador de Exceso por los sitios de unión.

Nuestro método más preferido de preparación de muestras "en un único tubo" evita la necesidad de determinar  
45 concentraciones de dNTP limitantes adecuadas para las amplificaciones particulares. En este método se añaden en primer lugar reactivos de enzima/sustrato de pirosecuenciación al producto de LATE-PCR, que elimina dNTPs y PPi. Se continúa esto con el apareamiento de iniciadores usando un iniciador de secuenciación añadido y después se añaden dNTPs individuales para la Pirosecuenciación. Como alternativa, uno puede eliminar dNTPs por la adición de una enzima purificada con actividad dNTPasa, tal como apirasa de papa, seguido por calentamiento para inactivar la enzima y puede eliminar el pirofosfato por la adición de una enzima purificada con actividad pirofosfatasa, tal como pirofosfatasa de levadura, seguido por calentamiento para inactivar la enzima. . Si se emplean ambas enzimas se pueden añadir al mismo tiempo.

Los ensayos de acuerdo con esta invención, particularmente ensayos de LATE-PCR, incluyen preferentemente medios para  
55 evitar el cebado defectuoso, que pueden provocar una disminución en la señal de la sonda en las últimas fases de la reacción. Se ha evitado con éxito el "efecto gancho" incluyendo en la mezcla de reacción un reactivo de supresión de cebado defectuoso descrito en nuestra solicitud de patente provisional de Estados Unidos descrita anteriormente. Se ha evitado también ese efecto ajustando la concentración de polimerasa añadida a la reacción. Se puede observar la

disminución de cebado defectuoso ajustando la polimerasa en cuanto a la cinética de la reacción de LATE-PCR usando una sonda del ADNmc, así como por la composición del producto final revelado por varios medios conocidos en la técnica.

5 Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción más abajo. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

#### Descripción de las figuras

10 La Figura 1 muestra el uso de iniciadores marcados de manera fluorescente descritos en la presente para los análisis de curvas de fusión.

15 La Figura 2 muestra la reducción de dispersión de la señal a través del uso de las relaciones de producto monocatenario con el producto de cadena doble de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

20 La Figura 3 muestra la comparación de la identificación de cinco especies de Mycobacteria a través de análisis de curvas de fusión obtenidos ya sea con sondas convencionales tolerantes a desajustes frente al gen de ARN ribosómico 16S o dos versiones diferentes de sondas tolerantes a desajustes inactivadas frente al mismo objetivo diseñadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

25 La Figura 4 muestra la identificación de cinco especies de Mycobacteria usando sólo dos sondas tolerantes a desajustes frente al gen de ARN ribosómico 16S de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

30 La Figura 5 muestra la identificación de cinco especies de Mycobacteria a través de análisis de la derivada de curvas de fusión mostradas en la Figura 3 usando dos sondas tolerantes a desajustes frente al gen de ARN ribosómico 16S diseñados de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

35 La Figura 6 muestra la identificación de cinco especies de Mycobacteria usando las relaciones de señales fluorescentes recogidas a diferentes temperaturas a partir de dos sondas tolerantes a desajustes frente al gen de ARN ribosómico 16S de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

40 La Figura 7 muestra la genotipificación de punto final de muestras homocigotas y heterocigotas para la mutación G269 del gen HexA humano usando LATE-PCR y una única sonda  $T_m$  Baja tolerante a desajustes frente al alelo silvestre de acuerdo con los métodos de la invención.

45 La Figura 8 muestra la identificación separada de tres alelos diferentes del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) humano usando sondas  $T_m$  Baja discriminantes de alelos de LATE-PCR marcadas con el mismo color, y análisis de la primera derivada de curvas de fusión.

50 La Figura 9 muestra la identificación simultánea de diferentes combinaciones de varios alelos del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) humano usando sondas  $T_m$  Baja discriminantes de alelos marcadas con el mismo color, y análisis de primera derivada de curvas de fusión.

55 La Figura 10 muestra la identificación de diferentes combinaciones de alelos del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) humano representando los cambios de fluorescencia a dos temperaturas recogidos de acuerdo con los métodos de la invención.

La Figura 11 muestra ensayos de Normalización a Dos Temperaturas (con corrección de fondo).

La Figura 12 muestra ensayos de Normalización a Dos Temperaturas (sin corrección de fondo).

La Figura 13 muestra ensayos de Normalización a Tres temperaturas.

La Figura 14 muestra una comparación del método de preparación de las muestras de LATE-PCR "diluir y listo" para la pirosecuenciación de acuerdo con los métodos descritos en la presente relativo al método convencional de preparación de muestras de LATE-PCR para el mismo ensayo.

La Figura 15 son pirogramas obtenidos a partir de células individuales preparadas por el método de LATE-PCR en un único tubo. Las flechas indican el sitio IVS 110 de  $\beta$ -globina de células: a) homocigotas silvestres, b) heterocigotas y c) mutantes homocigotas.

5 La Figura 16 es el pirograma de una reacción de pirosecuenciación llevada a cabo para más de cincuenta pares de bases. El orden de dispensación de nucleótidos se indica debajo de cada pico y la secuencia esperada se indica encima.

10 La Figura 17 son cromatogramas de secuenciación dideoxi resultantes del método de preparación de muestras de LATE-PCR "diluir y listo" para la secuenciación dideoxi de acuerdo con los métodos descritos en la presente y del método convencional de preparación de muestras de LATE-PCR para el mismo ensayo.

La Figura 18 es un gel de electroforesis de una amplificación por LATE-PCR de más de un producto del mismo molde de ADN en la misma reacción.

15 La Figura 19 son cromatogramas de la secuenciación dideoxi diluir y listo del producto de la amplificación por LATE-PCR de la Figura 18.

20 La Figura 20 muestra que la cantidad de ADNmc y ADNbc generados por una amplificación de LATE-PCR se puede medir de manera independiente y se puede usar para calcular la relación ADNmc/ADNbc que, a su vez, se puede usar para determinar si la cantidad de ADNmc acumulado hasta el momento es suficiente para la secuenciación posterior a través del método "diluir y listo".

25 La Figura 21 son cromatogramas de secuenciación dideoxi resultantes del método "diluir y listo" empleado en una mezcla 50:50 de amplicones de LATE-PCR que tienen dos secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes.

La Figura 22 muestra el intervalo de sensibilidad de amplicones de LATE-PCR mixtos que tienen secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes, que se pueden distinguir a través del método "diluir y listo".

30 La Figura 23 muestra que se puede usar una LATE-PCR junto con al menos una única sonda tolerante a desajustes para generar curvas de fusión de punto final que, a su vez, se pueden usar para cuantificar las cantidades relativas de dos o más amplicones de LATE-PCR mixtos que tienen secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes.

35 La Figura 24 muestra la cinética de varios ensayos de LATE-PCR llevados a cabo usando dos concentraciones diferentes de Taq polimerasa con cada una de tres cantidades diferentes de ADN genómico.

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

#### Descripción detallada

40 Existen descritos en la presente los ensayos de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo ensayos de PCR, que incluyen la detección de la emisión de fluorescencia a partir de al menos un iniciador marcado con fluoróforo que se excita, no directamente aplicando luz (visible o no) de una longitud de onda fuertemente absorbida por el fluoróforo, sino indirectamente aplicando luz de una longitud de onda que excita un tinte de ADN fluorescente próximo tal como SYBR green o, preferentemente, SYBR gold, así como estuches completos y parciales que contienen todos o algunos de los reactivos de amplificación y conjuntos de oligonucleótidos que contienen tales iniciadores marcados, y también los propios iniciadores.

50 Son bien conocidos los iniciadores de amplificación. Los iniciadores para el uso en los métodos de la invención son oligonucleótidos cortos, generalmente de menos de cincuenta bases de longitud que se hibridan con una cadena objetivo y se extienden por una polimerasa adecuada. Un iniciador puede estar compuesto de oligonucleótidos de origen natural, o puede incluir nucleótidos no naturales y enlaces entre nucleótidos no naturales. Aunque los iniciadores son generalmente oligonucleótidos lineales, pueden incluir una estructura secundaria. (Ver, por ejemplo, Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ (1997), "A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based on Energy Transfer," *Nucleic Acids Res.* 25:2516-2521). Las amplificaciones incluyen frecuentemente el uso de uno o más pares de iniciadores que consisten cada uno en un iniciador directo y un iniciador reverso. En los métodos, de acuerdo con esta invención, un iniciador cualquiera de un par o ambos iniciadores del par se pueden marcar con un fluoróforo unido covalentemente que fluoresce cuando se estimula el tinte de ADN fluorescente próximo. Cuando el iniciador marcado se hibrida (o se aparea) con su secuencia complementaria en una cadena molde, se forma una región de cadena doble. El tinte de ADN fluorescente

se asocia con esa región, intercalándose en la misma o de cualquier otra forma, y se vuelve fluorescente en esa región, que está próxima al fluoróforo del iniciador tal que cuando se estimula el tinte a una longitud de onda que no excita directamente el fluoróforo, el fluoróforo emite en su longitud de onda característica. Estos iniciadores se pueden usar para controlar la síntesis de los productos que resultan por extensión de una ADN polimerasa tales como los que resultan de ensayos de PCR y extensión del iniciador en tiempo real o mediante detección de punto final y/o para evaluar la especificidad del producto mediante análisis de la curva de fusión.

Los iniciadores usados como un sustrato para la extensión mediante una ADN polimerasa, que incluyen iniciadores para la amplificación por PCR (simétrica o no simétrica, que incluyen particularmente LATE-PCR), se marcan en cualquier posición de nucleótido con un fluoróforo unido covalentemente tal que el extremo 3' del iniciador de oligonucleótido queda disponible para la extensión. Los iniciadores pueden tener el diseño de sondas de cadena doble descrito por Li, Q. y otros (2002) ("A New Class of Homogeneous Nucleic Acid Probes Based on Specific Displacement Hybridization," Nucl. Acid Res. 30: (2)e5). La única limitación de secuencia en el oligonucleótido del iniciador es que el oligonucleótido no debe tener ninguna estructura secundaria que por sí misma conduzca a la excitación indirecta del fluoróforo, lo que significa que generalmente no existe ninguna estructura secundaria mayor de 2 pares de bases. La porción de fluoróforo no debe excitarse de manera apreciable directamente por, sino que el tinte debe excitarse directamente por, la longitud de onda de la fuente de excitación usada; el fluoróforo debe emitir cuando el tinte de ADN fluorescente se excita en su inmediata presencia, generalmente no mayor que una distancia a la que el fluoróforo experimenta la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET) que se produce; y el espectro de emisión del fluoróforo elegido debe distinguirse del espectro de emisión del tinte de ADN fluorescente ya sea por el uso de filtros o deconvolución espectral. En estas condiciones, el fluoróforo fluoresce tras la incorporación en un producto de cadena doble a continuación del apareamiento del iniciador, que incluye extensión por una ADN polimerasa. La pérdida de fluorescencia tiene lugar durante el calentamiento cuando se alcanza la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del tramo particular de ADN de cadena doble que contiene el fluoróforo.

Las condiciones para el uso de los iniciadores en los métodos de la invención junto con tintes de ADN fluorescentes (concentración de iniciador y tinte de ADN, longitud de onda de excitación del tinte de ADN) son iguales que las conocidas en la técnica para controlar la síntesis de productos de reacciones de extensión del iniciador (que incluyen PCR) en el transcurso de la reacción y para evaluar la especificidad del producto de extensión mediante análisis de la curva de fusión usando sólo tintes de ADN fluorescentes con la excepción de que la fluorescencia se recoge a la longitud de onda de emisión correspondiente al primer fluoróforo en lugar de o adicionalmente a la longitud de onda de emisión del tinte. En estas condiciones, las señales de fluorescencia se originan a partir de las secuencias de cadena doble que contienen los iniciadores, en vez de todas las secuencias de cadena doble en la reacción.

La comparación del rendimiento del tinte de ADN con los métodos y sistemas descritos en la presente se realizó mediante el experimento reportado más abajo en el Ejemplo 1 y en la Figura 1. Un iniciador marcado con fluoróforo se extendió por una ADN polimerasa en presencia de tinte SYBR green y en presencia de un oligonucleótido no extensible relativamente largo hibridado con la cadena molde cerca de la región de extensión del iniciador. Esto resultó en una mezcla de productos que tiene híbridos de cadena molde-iniciador no extendido, productos de extensión del iniciador cortos y el oligonucleótido no extensible, tal que los híbridos con el molde tuvieron  $T_m$  en el intervalo de 60 °C (el iniciador marcado con fluoróforo (Cy5)) a 79 °C (el oligonucleótido no extensible), con productos de extensión del iniciador que caen entre esas dos  $T_m$ .

Se realizó el análisis de la curva de fusión estándar en la mezcla de reacción final (muestras duplicadas) usando tanto lecturas de fluorescencia del tinte como lecturas de fluorescencia del fluoróforo. Las curvas de fusión se presentan en la Figura 1. El panel A son las curvas de fusión 1 obtenidas usando las emisiones del tinte. El único pico está a 79 °C, la temperatura de fusión del oligonucleótido no extensible. No se observa ningún otro pico, ni siquiera el del iniciador no extendido. El panel A demuestra la migración del tinte SYBR green al híbrido de  $T_m$  superior durante la generación de una curva de fusión, que enmascara la presencia de híbridos de  $T_m$  inferior. El panel B son las curvas de fusión 2 obtenidas utilizando las emisiones de fluoróforo. Esto muestra un pico a 60 °C, la  $T_m$  del híbrido iniciador no extendido-molde, y un pico adicional a una temperatura entre 69 °C y 79 °C, es decir, un pico indicativo de un producto de extensión del iniciador. Se observan  $T_m$  inferiores a pesar de la tendencia del tinte a migrar, tal como se muestra por las curvas de fusión 1. El control de la emisión del fluoróforo de acuerdo con esta invención revela que cada especie de híbrido marcado con el fluoróforo en la mezcla está en su concentración correcta.

En el caso de las amplificaciones por PCR que utilizan un único par de iniciadores, en donde al menos un miembro del par es un iniciador para el uso en los métodos de la invención, el análisis de la curva de fusión puede distinguir entre productos específicos y no específicos usando un único fluoróforo debido a que el producto específico tiene una temperatura de fusión esperada y el producto no específico tiene una temperatura de fusión no esperada. En el caso de las amplificaciones por

5 PCR múltiples, que utilizan más de un par de iniciadores, en donde al menos un miembro de cada par de iniciadores es un iniciador para el uso en los métodos de la invención, se pueden distinguir entre sí dos productos específicos diferentes ya sea porque tienen valores  $T_m$  diferentes, pero esperados y o porque los dos iniciadores diferentes empleados se marcan con diferentes fluoróforos. Además, el análisis de la curva de fusión usando iniciadores para el uso en los métodos de la invención puede llevarse a cabo durante una reacción de amplificación en curso o al final de una reacción.

10 Se puede usar también la incorporación de uno o más iniciadores para el uso en los métodos de la invención durante el transcurso de una reacción para medir cuantitativamente el grado de amplificación de uno o más objetivos durante el transcurso de una PCR, o la síntesis de uno o más tramos de ADN de cadena doble durante el transcurso de una reacción de extensión isotérmica. En cualquier caso, la cantidad de la molécula o moléculas de producto de cadena doble completas se puede seguir a lo largo del tiempo por la detección repetida de la fluorescencia creciente, o se puede medir al final de una reacción. Adicionalmente, se puede usar la incorporación de uno o más iniciadores para el uso en los métodos de la invención durante el transcurso de ya sea las reacciones isotérmicas o reacciones de ciclado térmico para medir la existencia y/o acumulación de productos parciales, es decir, los que han comenzado la extensión a lo largo de una cadena molde pero que no han alcanzado su máxima longitud posible. En tales casos, las temperaturas de fusión de los productos parciales son inferiores a la temperatura de fusión del producto completo, pero son superiores a la temperatura de fusión del iniciador marcado a partir del cual se derivan. Adicionalmente, concomitante con la incorporación del iniciador marcado en una cadena completa o parcial de producto, la magnitud del pico de temperatura de fusión generado a partir del híbrido ADN-ADN de iniciador/molde disminuye, y se puede usar como medición adicional de la síntesis de ADN.

20 Como se estableció anteriormente, cada tramo de ADN de cadena doble o amplicón sintetizado mediante la incorporación de un iniciador para el uso en los métodos de la invención genera una señal fluorescente a la longitud de onda de emisión del fluoróforo unido covalentemente del iniciador, cuando se estimula indirectamente por FRET u otro mecanismo del tinte SYBR unido, una "señal específica de iniciador". El mismo ADN de cadena doble genera también una señal fluorescente a la longitud de onda de emisión del tinte SYBR, la "señal de SYBR total", la suma de todas las secuencias de cadena doble presentes en la reacción, ya que todas las secuencias de cadena doble fluorescen, independientemente de si han incorporado un iniciador marcado. Así, se pueden usar los iniciadores en los métodos de la invención para analizar las señales fluorescentes en cuanto a la siguiente relación: (señal específica de iniciador/señal de SYBR total), de aquí en adelante el valor (PSS/TSS). El análisis de datos en cuanto al valor (PSS/TSS) corrige las variaciones en la señal de tinte de ADN fluorescente (TSS) entre reacciones repetidas. Esto es particularmente útil en el caso de amplificaciones por LATE-PCR porque la velocidad de síntesis del amplicón monocatenario es proporcional a la cantidad de amplicón de cadena doble acumulada al final de la fase exponencial de la reacción. Así, pequeñas diferencias en el nivel de ADN de cadena doble entre reacciones repetidas alteran la velocidad de acumulación del amplicón monocatenario.

35 Es posible también utilizar más de un iniciador marcado con el mismo fluoróforo, siempre y cuando los amplicones sean diferenciables mediante un análisis de la curva de fusión post-amplificación. Ver la Figura 1, Panel B, para ejemplificación de este principio. La señal del fluoróforo común al final de una etapa de extensión, que puede ser la etapa de extensión final (punto final), o etapas de extensión intermedias, proporciona una indicación de los amplicones totales que incorporan el fluoróforo. El análisis de la curva de fusión distingue entre los productos y proporciona una medición cuantitativa de sus concentraciones.

40 LATE-PCR es una amplificación por PCR no simétrica que entre otras ventajas, proporciona un "espacio de temperatura" grande en el que pueden tomarse acciones. Ver WO 03/054233 y Sanchez y otros. (2004), citado anteriormente. LATE-PCR permite el uso de sondas de hibridación " $T_m$  Baja" y " $T_m$  Super Baja" para detectar productos de amplificación ("amplicones") que son monocatenarios. Diversos tipos de sondas que son específicas a un único objetivo en un ensayo particular, que incluyen sondas discriminantes de alelos capaces de discriminar frente a un único desajuste de par de bases, tales como sondas de baliza molecular discriminantes de alelos, se pueden usar con LATE-PCR como sondas  $T_m$  Baja y  $T_m$  Super Baja, como pueden ser sondas tolerantes a desajustes tales como sondas de baliza molecular tolerantes a desajustes o sondas lineales (espiral al azar) o que tienen un fluoróforo indirectamente excitable mediante emisión a partir de un tinte SYBR. Se ha ideado una nueva clase de sondas discriminantes de alelos útiles como las sondas  $T_m$  Baja y  $T_m$  Super Baja en ensayos de LATE-PCR que permiten la determinación de las relaciones monocatenario/de cadena doble dentro de una reacción, como pueden ser sondas de baliza molecular discriminantes de alelos marcadas con un fluoróforo de este tipo.

55 Las sondas discriminantes de alelos para el uso en los métodos de la invención pueden ser sondas inactivadas discriminantes de alelos, de cadena doble modificadas de acuerdo con Li, Q. y otros (2002), Nucl. Acid Res. 30: (2)e5). Tienen las siguientes modificaciones: se marcan con un fluoróforo que es indirectamente excitable por la excitación de un tinte fluorescente de ADN de cadena doble tal como SYBR green o SBYR oro pero no es excitable directamente por la

longitud de onda utilizada para estimular el tinte (en este sentido, similar a los iniciadores discutidos anteriormente), y se construyen para que sean sondas  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja. Cuando no está unida a su secuencia objetivo, una sonda de ese tipo se une a un oligonucleótido complementario más corto. Se prefiere que el oligonucleótido complementario incluya un inactivador tal como Dabcyl o un inactivador Black Hole™ para reducir la fluorescencia de fondo de la sonda. Como alternativa o adicionalmente la fluorescencia de fondo se puede reducir incluyendo residuos de guanidina adyacentes al fluoróforo (desactivación por G). En presencia de la cadena objetivo totalmente complementaria, la cadena complementaria más corta se desplaza, la cadena más larga marcada con fluoróforo se hibrida con el objetivo y el fluoróforo está no inactivado y se vuelve capaz de recibir energía del tinte de modo que fluoresce a su longitud de onda característica. Se pueden usar para múltiples ensayos varias de estas sondas para diferentes objetivos, marcadas con diferentes fluoróforos.

Tales sondas discriminantes de alelos se diseñan para tener una temperatura de fusión ajustada a la concentración,  $T_{m[0]}$ , en el ensayo que produce una  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja. La  $T_{m[0]}$  del híbrido sonda-objetivo se determina de manera conveniente y se ajusta de manera empírica, aunque se puede emplear un valor calculado al menos como buen punto de partida para minimizar el ajuste. La longitud y concentración de la cadena de sonda complementaria relativo a la cadena marcada con fluoróforo se ajustan de manera empírica para la discriminación máxima de los alelos. Se comienza con una longitud de 1-3 nucleótidos más corto que la cadena marcada con fluoróforo y una concentración de 1-1.2 veces la concentración de la cadena marcada con fluoróforo.

En un ensayo de LATE-PCR, estas sondas discriminantes de alelos se utilizan en una etapa de detección a baja temperatura, preferentemente a continuación de la etapa de extensión del iniciador en ciclos a continuación del agotamiento del Iniciador Limitante. Para lecturas en tiempo real a lo largo de múltiples ciclos, se excita el tinte SYBR y se lee la fluorescencia tanto del tinte como del fluoróforo (o fluoróforos). Se prefiere leer la señal del tinte durante o a la conclusión de la etapa de extensión de la PCR cuando la temperatura está por encima de la  $T_m$  de la sonda (o sondas), y leer la emisión del fluoróforo durante la etapa de detección a baja temperatura cuando se hibridan las sondas (ya sea una sonda discriminante de alelos para el uso en los métodos de la invención o una sonda de baliza molecular adecuadamente marcada). Después se determina la relación de fluorescencia de cada sonda con la señal de SYBR total. Esta relación minimiza las diferencias entre ensayos repetidos debido a diferencias en la acumulación de producto. Debido a que las diferencias se minimizan, tales relaciones se pueden usar también para el análisis de punto final.

El uso de las relaciones de producto monocatenario con el producto de cadena doble permitidas por iniciadores y sondas para el uso en los métodos de la invención es una técnica para reducir la dispersión entre ensayos repetidos, tal como se ha establecido. Esto es particularmente importante para los ensayos de punto final, que no revelan la cinética de la reacción. Un ejemplo es un ensayo de LATE-PCR para distinguir muestras homocigotas de muestras heterocigotas utilizando un par de iniciadores para ambos alelos y una sonda discriminante de alelos para el uso en los métodos de la invención. La Figura 2 ilustra la reducción de la dispersión lograda cuando se aplica a una amplificación por LATE-PCR con una etapa de detección a baja temperatura realizada con un tinte SYBR (en este caso SYBR gold), una sonda discriminante de alelos para un alelo marcado con Cy5, excitación del tinte y lecturas de señales del tinte (a 72 °C, la temperatura de extensión) y el fluoróforo (a 55 °C, una detección a baja temperatura a continuación de la extensión del iniciador). El panel A presenta las lecturas en tiempo real del fluoróforo para las muestras homocigotas repetidas (círculo 21) y muestras heterocigotas repetidas (círculo 22). Como resulta evidente, la dispersión entre las repeticiones no aclara la diferencia. El panel B, sin embargo, representa la relación de señales de Cy5 con señales de SYBR para las muestras homocigotas (círculo 23) y muestras heterocigotas (círculo 24). La reducción de la dispersión es suficiente para permitir un ensayo de punto final.

Los métodos de la invención incluyen también el uso de sondas monocatenarias lineales de  $T_m$  Baja o  $T_m$  Super Baja tolerantes a desajustes que se marcan, preferentemente marcadas de manera terminal, con un fluoróforo excitable mediante la emisión de un tinte de ADN fluorescente (por ejemplo, SYBR green I o SYBR gold) y que se inactivan para reducir la fluorescencia de fondo. Estas sondas portan una porción de desactivación que suprime la fluorescencia en ausencia del objetivo. Las sondas lineales tolerantes a desajustes tienen una tendencia a plegarse y formar regiones de cadena doble cortas a medida que se disminuye la temperatura. El uso de una etapa de detección de LATE-PCR a baja temperatura exagera esta tendencia. Esto no se produce cuando la secuencia de la sonda se hibrida con la secuencia objetivo. Si la sonda incluye un fluoróforo que se excita mediante emisión de un tinte SBYR que está presente en la mezcla de reacción, el tinte se intercala en o se asocia de cualquier otra forma con la región de cadena doble no prevista de las moléculas de sondas no unidas y así excita el fluoróforo de la sonda por FRET El resultado es un aumento de la fluorescencia de fondo a baja temperatura.

La desactivación de las sondas tolerantes a desajustes para el uso en los métodos de la invención se puede obtener por la adición de una porción de desactivación, por ejemplo, un inactivador DABCYL o Black Hole™ (BHQ), a la sonda en un lugar



en el que se inactiva la fluorescencia del fluoróforo que resulta de la estructura secundaria no prevista dentro de la sonda no unida. Se prefiere añadir el inactivador en el extremo opuesto al fluoróforo siempre que sea posible. El Ejemplo 2 más abajo ejemplifica dos técnicas posibles, simplemente añadir un inactivador o construir una horquilla inactivada, es decir, una estructura secundaria diseñada específicamente que atrae el inactivador estrechamente al fluoróforo, con la estructura secundaria o ambos. Preferentemente la  $T_m$  de la estructura secundaria construida es al menos 5 °C superior a la  $T_m$  de cualquier estructura secundaria alternativa pero que en ausencia del objetivo, la mayoría de las moléculas de sondas están en la configuración de horquilla y la fluorescencia de fondo es baja. La  $T_m$  del tallo construido está por debajo de la  $T_m$  de la sonda hibridada para el objetivo perfectamente apareado y similar a la  $T_m$  de la sonda hibridada con sus objetivos mal emparejados tal que no se impide la hibridación a los objetivos de secuencia dentro del tallo por la formación del tallo.

La detección e identificación de los objetivos de ácido nucleico se pueden lograr utilizando una o múltiples sondas tolerantes a desajustes a baja temperatura que señalizan cuando se hibridan, que incluyen sondas de baliza molecular tolerantes a desajustes, sondas monocatenarias lineales que se excitan indirectamente excitando un tinte de ADN fluorescente, y sondas lineales inactivadas de acuerdo con esta invención. Una mezcla de sondas, para ciertas modalidades, incluye también al menos una sonda específica de alelo para el uso en los métodos de la invención. Una técnica útil es utilizar la relación de fluorescencia de dos sondas como función de la temperatura para distinguir entre los objetivos que tienen una  $T_m$  similar con respecto a al menos una de las sondas. Algunas veces se hace referencia a las curvas de una relación de ese tipo como "firma de fluorescencia" de un objetivo.

Con LATE-PCR que incluye una etapa de detección a baja temperatura es posible combinar el efecto de temperatura de detección con el efecto de firma de fluorescencia. Se ha usado un ensayo con múltiples sondas tolerantes a desajustes, que incluyen pero sin limitarse a sondas inactivadas, monocatenarias, indirectamente excitables de acuerdo con esta invención, es una amplificación por LATE-PCR que consiste en una etapa a alta temperatura para desnaturalizar ADN de cadena doble (95 °C durante 2 min.), seguida por amplificación de la fase exponencial utilizando tanto Iniciador Limitante como Iniciador de Exceso (30 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 15 s y 78 °C durante 40 s), seguida por la finalización de la fase exponencial y la fase lineal posterior durante la que se incluyen etapas de detección de la sonda (40 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 15 s, 78 °C durante 40 s, 55 °C durante 20 s, 50 °C durante 20 s, 45 °C durante 20 s y 40 °C durante 20 s). Esto proporciona cuatro temperaturas de detección por debajo de la temperatura de apareamiento del iniciador, 60 °C. Se puede controlar la producción de cadena doble por la emisión del tinte SYBR a la temperatura de extensión del iniciador, 78 °C, que está por encima de la  $T_m$  de cualquier sonda. Se puede controlar la emisión del fluoróforo a cada baja temperatura desde 55 °C a 40 °C. A continuación del último ciclo, la temperatura se puede disminuir hasta un valor bajo, por ejemplo 30 °C y aumentarse lentamente para el análisis de fusión. Adicionalmente a los niveles de fluorescencia detectados, se pueden usar las relaciones de fluorescencia del fluoróforo con la fluorescencia del tinte y las relaciones de fluorescencia del fluoróforo para generar información de diferenciación de amplicones.

Algunas de las Figuras son ilustrativas de las técnicas que aprovechan las posibilidades anteriores. La Figura 4 muestra el comportamiento de fusión de dos sondas tolerantes a desajustes frente al gen de ARN ribosómico 16s de varias especies de *Mycobacteria*. Se usaron dos sondas: la sonda inactivada, formadora de horquilla descrita en el Ejemplo 2, que tiene la secuencia 5'-Cy5 - CTG GAT AGG ACC ACG AGG CCA G - BHQ II -3' (sec. con núm. de ident: 2) y una sonda marcada TAMRA que tiene la secuencia 5'-G CAT GTC TTG TGG TGG-TAMRA-3' (sec. con núm. de ident. 3). Se encontró que esta última sonda, que no se inactivó, producía señales discernibles por encima del fondo para varias especies. El panel A de la Figura 4 presenta curvas de fusión para la sonda de horquilla sin objetivo (línea 41), *M. asiaticum* (línea 42), *M. gordonae* (línea 43), *M. heidelbergense* (línea 44), *M. malmoense* (línea 45) y *M. marinum* (línea 46). El panel B presenta curvas de fusión para la sonda marcada con TAMRA sin objetivo (línea 47), *M. asiaticum* (línea 48), *M. gordonae* (línea 49), *M. heidelbergense* (línea 50), *M. malmoense* (línea 51), y *M. marinum* (línea 52). El panel C de la Figura 4 representa la relación de fluorescencia de TAMRA con la fluorescencia de Cy 5), *M. asiaticum* (línea 53), *M. gordonae* (línea 54), *M. heidelbergense* (línea 55), *M. malmoense* (línea 56) y *M. marinum* (línea 57).

Otra técnica analítica es para representar la velocidad de cambio de fluorescencia de los fluoróforos como función de la temperatura. La Figura 5 presenta tales gráficas para la sonda de horquilla inactivada marcada con Cy5 anterior y la sonda no inactivada marcada con TAMRA, ambas descritas anteriormente. El panel A es la sonda de horquilla inactivada, y el Panel B es la sonda marcada con TAMRA. Las gráficas muestran los picos de fusión para *M. asiaticum* (líneas 61, 71), *M. gordonae* (líneas 62, 72), *M. heidelbergense* (líneas 63, 73), *M. malmoense* (líneas 64, 74) y *M. marinum* (líneas 65, 75). Usando ambas sondas, es posible distinguir los cinco objetivos mediante los picos de fusión. La sonda marcada con Cy5 pudo distinguir por sí misma *M. gordonae* (línea 62) de las otras. La sonda marcada con TAMRA pudo distinguir por sí misma cada uno de *M. asiaticum* (línea 71), *M. gordonae* (línea 72) y *M. marinum* (línea 75) de uno a otro. Conjuntamente, las sondas pueden distinguir *M. heidelbergense* de *M. asiaticum*, porque *M. heidelbergense* produjo un pico alto con la

sonda de Cy5 y un pico bajo con la sonda de TAMRA, mientras que *M. asiaticum* produjo lo contrario. Con una única sonda por amplicón, las alturas relativas de los picos pueden reflejar diferencias en la concentración del producto. En este caso, sin embargo, ambas sondas detectan el mismo amplicón, de esta manera las alturas relativas de los picos reflejan diferencias en las características de fusión de la sonda-objetivo.

5

Otra herramienta analítica, descrita anteriormente, es usar una o más relaciones de fluorescencia, tales como, en la modalidad particular discutida en este caso, la relación de fluorescencia de TAMRA con la fluorescencia de Cy5 a la misma temperatura o a diferentes temperaturas durante la PCR. Una estrategia útil para el diseño de la sonda incluye diseñar una sonda que se une a una región conservada común a múltiples especies para que sirva como una referencia, o incluyendo, cuando sea necesario, la utilización de una porción de la secuencia del Iniciador Limitante como una región conservada. Esto es una opción para la LATE-PCR, porque las sondas  $T_m$  están por debajo de la  $T_m$  del Iniciador Limitante y la temperatura de apareamiento, de esta manera una sonda con una secuencia común no interfiere con la amplificación. La Figura 6 muestra los resultados usando una combinación de relaciones de fluorescencia. En esta modalidad se utilizó como una relación los valores de fluorescencia de TAMRA/Cy5 recogidos cada uno a la temperatura de detección de 40 °C y como la otra relación de señales de fluorescencia de TAMRA/Cy5 recogidas a la temperatura de detección de 45 °C y 55 °C, respectivamente. La Figura 6 representa ambas relaciones en un ciclo particular, en este caso el ciclo 50. Seis repeticiones produjeron datos no solapantes para varias especies *M. asiaticum* (círculo 81), *M. gordonae* (círculo 82), *M. heidelbergense* (círculo 83), *M. malmoense* (círculo 84), y *M. marinum* (círculo 85).

10

15

20

La medición de la fluorescencia de la sonda a diferentes temperaturas durante la PCR tiene ventajas sobre limitar el análisis a las fusiones post-PCR. Una ventaja es la capacidad de comparar los valores de fluorescencia a un número específico de ciclos después de que se alcanza el ciclo umbral, valor  $C_T$ . Esto permite el uso de relaciones con tintes SYBR (u otros tintes de intercalación) como se describió anteriormente. Otra ventaja es que cada muestra tiene una fluorescencia de fondo medida a cada temperatura durante los ciclos antes de la detección de los amplicones. Así, se pueden hacer ajustes precisos para las variaciones muestra a muestra en la fluorescencia de fondo. Es posible medir la fluorescencia a muchas temperaturas durante la PCR, proporcionando un análisis de fusión casi completo a lo largo del intervalo de temperatura en el que una sonda muestra diferencias en la hibridación a diferentes objetivos. El número y la duración de estas etapas dependen en parte de las capacidades del equipo de detección. La detección continua de la fluorescencia durante aumentos o disminuciones de la temperatura es posible con algunos termocicladores. No es necesario comenzar la detección a múltiples temperaturas hasta cierto momento poco antes de que se espere una subida inicial de la fluorescencia. La detección a múltiples temperaturas se puede realizar en cada ciclo, o a algún otro intervalo, por ejemplo cada cinco ciclos. La eliminación de múltiples etapas de detección durante los ciclos iniciales y la reducción de la frecuencia de esas etapas reduce el tiempo global requerido para completar la reacción de amplificación. Cuando se utiliza la relación de fluorescencia de la sonda con la fluorescencia del tinte, la fluorescencia de la sonda se mide preferentemente a todas las temperaturas a las que la sonda se hibrida con sus objetivos, y la fluorescencia de SYBR se mide a temperaturas a las que las sondas no están unidas. Con la máxima preferencia, la fluorescencia de SYBR se mide a la temperatura de extensión. Desde que la fluorescencia de la sonda aumenta a ciclos más allá del valor del ciclo umbral ( $C_T$ ) mientras que la fluorescencia de SYBR alcanza una meseta, estas relaciones cambiarán durante la reacción de amplificación. Por lo tanto, es importante comparar las relaciones de muestras individuales a un número de ciclos específico después del valor de  $C_T$  de cada muestra.

25

30

35

40

El análisis de los productos de ADN monocatenario se puede lograr usando también una única sonda tolerante a desajustes cuya señal se mide a más de una, por ejemplo dos o tres, temperaturas diferentes. Los datos resultantes se pueden procesar como relaciones usando los valores de fluorescencia a dos o más temperaturas. La relación reduce significativamente las diferencias de señal entre muestras repetidas y proporciona una medición cuantitativa del alelo examinado. La Figura 11 muestra los niveles de fluorescencia de la sonda a dos temperaturas. Como se ilustra en la Figura 11, las señales de la sonda que surgen de la hibridación de la sonda con la cadena del Iniciador de Exceso se recogen a una alta temperatura donde la sonda es discriminante de alelos y se une sólo al alelo totalmente complementario, así como a temperaturas inferiores donde la sonda es totalmente tolerante a desajustes y se une a todas las posibles variantes alélicas de la secuencia objetivo. La medición de la fluorescencia a alta y baja temperatura y el cálculo de las relaciones resultantes también puede llevarse a cabo como un ensayo de punto final. Se hace referencia a estos ensayos como "Ensayos de Normalización a dos Temperaturas (sin corrección del fondo)." Se distinguen fácilmente genotipos homocigotos y heterocigotos como se ilustra en la Figura 11. Este tipo de ensayo puede llevarse a cabo como ensayos de LATE-PCR homogéneo de punto final, ensayos de QE-LATE-PCR.

45

50

55

La Figura 11 reporta señales de fluorescencia corregidas con los valores iniciales. Como se discute en el Ejemplo 5, se prefiere usar señales de fluorescencia sin procesar en vez de corregidas con los valores iniciales del ABI 7700, como se muestra en la Figura 12. La corrección con los valores iniciales introduce posiblemente artefactos en las relaciones

fluorescentes normalizadas de muestras individuales, debido a que el factor de corrección es sensible a fluctuaciones falsas en las señales de fluorescencia de fondo usadas para definir el valor inicial. Las lecturas de fluorescencia sin procesar no son sometidas a este artefacto. La confianza en las señales fluorescentes sin procesar hace el ensayo aplicable a cualquier termociclador de PCR con capacidades de fluorímetro o a termocicladores regulares usados en combinación con un fluorímetro regulado por la temperatura para lecturas de fluorescencia de punto final.

La genotipificación mediante QE-LATE-PCR se puede refinar además construyendo relaciones de señales detectadas a más de dos temperaturas. Se proporciona un método de tres temperaturas para normalizar los datos de punto final mediante la siguiente fórmula: Valor de Fluorescencia Normalizado =  $(F_s - F_t) / (F_b - F_t)$ , donde ( $F_t$  = fluorescencia a la temperatura superior), ( $F_b$  = fluorescencia a la temperatura inferior), ( $F_s$  = fluorescencia a cualquier tercer temperatura dada). El método de tres temperaturas aplicado a los genotipos homocigotos y heterocigotos de un sitio SNP dentro del gen p53 humano se describe en el Ejemplo 6 y se ilustra en la Figura 13.

La pirosecuenciación es un método de secuenciación por síntesis, isotérmico, en tiempo real, conocido en la técnica. Se catalizada por cuatro enzimas cinéticamente equilibradas: ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa, y apirasa. El método incluye un iniciador de secuenciación apareado con ADN monocatenario. Cada nucleótido se dispensa y se prueba individualmente para su incorporación en el extremo 3' del iniciador de secuenciación de acuerdo con la secuencia del ADN molde. Un evento de incorporación exitosa se acompaña por la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. ATP sulfurilasa convierte cuantitativamente el PPi liberado en ATP en presencia de adenosina 5' fosfosulfato. ATP conduce después la conversión mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz se detecta por una cámara del dispositivo acoplado a la carga (CCD) y se muestra como un pico en un pirograma. dNTP no incorporado y el exceso de ATP se degradan continuamente por Apirasa. La secuencia de nucleótidos se determina a partir de la orden de dispensación de nucleótidos y las alturas del pico en el pirograma, que son proporcionales a las cantidades de nucleótidos incorporados.

LATE-PCR genera de manera eficiente ADN monocatenario y así elimina la necesidad de métodos convencionales de preparación de muestras para la pirosecuenciación necesarios para generar moldes monocatenario a partir de los productos de PCR tradicionales de cadena doble. El uso de productos de LATE-PCR para la pirosecuenciación, sin embargo, requiere la eliminación eficaz de los reactivos residuales de la reacción de amplificación (dNTP, pirofosfato, e Iniciador de Exceso que interferirán con la química de pirosecuenciación. La eliminación de los reactivos residuales se puede lograr mediante la purificación en columna, precipitación con etanol o cualquier enfoque conocido de purificación del producto de PCR para la eliminación de dNTP, pirofosfato e iniciadores de excesos de la reacción de amplificación. Después de la limpieza, el ADN monocatenario de LATE-PCR se aparea directamente al iniciador de secuenciación y se procesa para la pirosecuenciación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Es importante que las muestras de LATE-PCR no se deben calentar a una temperatura que desnaturalice el producto de cadena doble generado en la reacción para garantizar que los únicos moldes disponibles al iniciador de secuenciación son los productos de ADN monocatenario. De hecho, puede que no sea necesario calentar las muestras de LATE-PCR para el apareamiento del iniciador en absoluto ya que el molde de ADN ya es monocatenario.

Se combina la amplificación por LATE-PCR con métodos de limpieza simplificados para preparar las muestras para las operaciones de secuenciación. Ver Ejemplo 7 y Fig. 14. Se inventan dos métodos de preparación de la muestra de LATE-PCR para pirosecuenciación que no implican la purificación física del producto de PCR y se pueden realizar en un tubo simple. En el primer método, se direcciona el problema de los dNTP residuales a partir de una amplificación por LATE-PCR usando cantidades limitantes de los dNTP durante la amplificación, de manera que se agotan los dNTP en el transcurso de la reacción (pero no antes de originar la producción insuficiente del ADN monocatenario, concretamente, la cadena del iniciador en exceso), que se puede determinar por experimentos de rutina. El problema del pirofosfato residual a partir de la LATE-PCR se direcciona mediante el tratamiento de la muestra de LATE-PCR con una enzima que contiene una actividad pirofosfatasa, por ejemplo una pirofosfatasa tal como la pirofosfatasa de levadura, seguido por la inactivación por calor. El iniciador en exceso residual de una amplificación por LATE-PCR no debe interferir con la pirosecuenciación ya que la secuencia objetivo de apareamiento para los iniciadores en el extremo 3' del producto de extensión del iniciador limitante (la cadena del iniciador limitante) está: A) unida en forma de doble cadena y por lo tanto no se encuentra fácilmente disponible y B) 5-20 veces menos abundante que la cadena del iniciador en exceso, dependiendo de las relaciones de iniciadores de LATE-PCR. Sin embargo, para descartar cualquier posibilidad de cebado defectuoso en los productos de PCR por los iniciadores en exceso a la temperatura usada para la pirosecuenciación, se puede opcionalmente añadir un oligonucleótido complementario al iniciador en exceso al inicio de la amplificación por LATE-PCR. Este oligonucleótido complementario puede tener una  $T_m$  que está al menos 5-10 °C por debajo de la  $T_m$  del iniciador en exceso, por ejemplo, siendo unos pocos

nucleótidos más corto que el iniciador en exceso en su extremo 3', y puede bloquearse en el extremo 3' por cualquier método conocido por aquellos con experiencia en la materia para prevenir la extensión del oligonucleótido por las ADN polimerasas (por ejemplo, mediante la inclusión del grupo fosfato). Al diseñarse en esta forma, el oligonucleótido complementario no interfiere con la amplificación por LATE-PCR, sino que forma un híbrido de cadena doble estable con el iniciador en exceso a la temperatura usada para la pirosecuenciación, evitando así el cebado defectuoso por el iniciador en exceso de otros sitios complementarios en el material amplificado. Alternativamente, el oligonucleótido complementario puede tener la misma longitud o una  $T_m$  que es 5-10 °C por debajo menos que la del iniciador en exceso, o ambas, si se añade después de la reacción de LATE-PCR. Además, puede añadirse un oligonucleótido bloqueado en 3' que contiene la misma secuencia que el iniciador en exceso, con o sin otras modificaciones para aumentar su  $T_m$  (por ejemplo bases extra en el extremo 3' o uso de análogos de LNA etc.), después de la reacción LATE-PCR en una concentración suficiente que compite con los iniciadores en exceso por el sitio complementario en el extremo 3' de la cadena del iniciador limitante.

El segundo método incluye el pretratamiento de las muestras de LATE-PCR con las mismas mezclas de enzima y sustrato usadas para la pirosecuenciación seguido por el apareamiento del iniciador y la adición de dNTPs individuales para la pirosecuenciación. En este método se invierte el orden del protocolo recomendado por el fabricante (es decir, el protocolo normal demanda el apareamiento del iniciador seguido de la adición de la mezcla de reacción de la pirosecuenciación). En este método, la apirasa presente en la mezcla de pirosecuenciación degrada los dNTP mientras que la ATP sulfúrilasa y luciferasa convierte el pirofosfato en ATP y luz. La luciferasa y luciferina contenida en las soluciones proporciona un sistema útil para controlar la descomposición de PPi así como los dNTP. Tanto ATP como dATP sirven como sustratos para la luciferasa, por lo que el cese de la salida de luz de la muestra, como se detecta por la cámara CCD en la máquina de pirosecuenciación, sirve como una buena aproximación de limpieza. Previo al inicio de la secuenciación del ADN, si es necesario para una preparación particular, especialmente si los amplicones que se secuenciarán son más largos que aproximadamente 100 pares de base o más que aproximadamente veinte pares de base, se reponen después los sustratos agotados en las reacciones (fosfosulfato de adenosina 5' y luciferina). En algunos casos, el tratamiento inicial requerirá más mezcla de sustrato que el protocolo del fabricante. En los casos donde se requiere calentar y enfriar para el apareamiento posterior del iniciador, estos reactivos se destruirán y necesitarán ser reemplazados previo a la pirosecuenciación.

Una variación del segundo método es añadir una enzima purificada con una actividad dNTPasa, por ejemplo una apirasa tal como apirasa de la papa, y una enzima purificada con actividad pirofosfatasa, por ejemplo una pirofosfatasa tal como pirofosfatasa de levadura, seguido de la inactivación por calor de las enzimas, apareamiento del iniciador y después la pirosecuenciación convencional. Una vez más, los iniciadores residuales en exceso a partir de la LATE-PCR no interferirán generalmente con la pirosecuenciación pero en el caso de que lo hagan, los iniciadores pueden tratarse usando la estrategia del oligonucleótido complementario descrita anteriormente. Este segundo método no requiere ajustes de la concentración de dNTP para diferentes amplificaciones por LATE-PCR, y así ahorra un tiempo apreciable.

La pirosecuenciación directa de los productos de PCR-LATE requiere 0.5-4 pmoles, a veces 2-4 pmoles, de los productos monocatenarios hibridados preparados con 3-15 pmoles, a veces 10-15 pmoles de iniciador de secuenciación, en función del instrumento de pirosecuenciación usado. En los métodos de preparación de la segunda y tercera muestra, es importante que el volumen de muestra de LATE-PCR añadido sea menos que la mitad, a veces menos de un tercio, del total de la reacción de pirosecuenciación para preservar el pH óptimo de la mezcla de pirosecuenciación (pH 7.5 en comparación con pH 8.0 o superior, por ejemplo 8.3, para la PCR). Alternativamente, los productos de LATE-PCR pueden comprender más de la mitad del volumen de reacción si por consiguiente se ajustan la concentración del tampón y el pH. Los reactivos usados para el control de la diversas fases de una amplificación por LATE-PCR, tales como tintes fluorescentes de ADN y sondas de hibridación, son compatibles con la pirosecuenciación y no necesitan que se remuevan excepto cuando una sonda de hibridación está diseñada para unirse a una región a ser secuenciada o donde se une el iniciador de la pirosecuenciación. En este caso, una de las estrategias descritas anteriormente para bloquear el iniciador en exceso se pueden emplear para bloquear la sonda de hibridación. Se determina que los reactivos para inhibir el cebado defectuoso durante la amplificación, descritos en nuestra solicitud de patente provisional de Estados Unidos presentada simultáneamente, titulada "Reactivos y métodos para mejorar la reproducibilidad y reducir el cebado defectuoso en la amplificación por PCR", son compatibles con la pirosecuenciación cuando la concentración final de los compuestos en la reacción de pirosecuenciación es 300 nM o inferior, preferentemente 200 nM o inferior, y se usa la ADN polimerasa estándar para la pirosecuenciación (fragmento de la ADN polimerasa Klenow deficiente de exonucleasa). Al utilizar una técnica de preparación de muestra de PCR que permite la preparación y la amplificación en la misma cámara o recipiente (ver, por ejemplo la publicación de patente de Estados Unidos US-2003-022231-A1), en combinación con una amplificación por LATE-PCR llevada a cabo en pequeños volúmenes, preferentemente menos que o igual a 10  $\mu$ l, por ejemplo 2-10  $\mu$ l, es posible obtener información de la pirosecuenciación a partir de pequeños grupos de células (de uno a 10,000 células) en formato de tubo único. De acuerdo con el ensayo de "célula-para-secuencia", se preparan pequeños grupos de células (de

uno a 10,000 células) para la amplificación de acuerdo con la técnica de preparación de muestra de PCR, tal como la descrita en Pierce y otros. (2002) *Biotechniques* 32(5): 1106-1111 (ver publicación de patente de Estados Unidos US-2003-022231-A1), someten a la amplificación por LATE-PCR, y procesan directamente para la pirosecuenciación en un único recipiente, pocillo, tubo o cámara de reacción como se describió anteriormente. Como se demostró en el ejemplo 8 más abajo y mostró en la Fig. 15, el método de único tubo permite el genotipado preciso y seguro, incluso a nivel de una única célula, única molécula.

Una preocupación general de los enfoques de la PCR de limpieza basado en enzima para la pirosecuenciación es la sobreproducción de subproductos de la degradación que pueden conducir a la inhibición de las enzimas por retroalimentación durante la secuenciación posterior y acortar las longitudes de lectura. Estos incluyen  $\text{SO}_4^{2-}$ , oxiluciferina, fosfato inorgánico (Pi), dNMPs y AMP. Una forma de limitar la mezcla de Pi y dNMPs es reducir la concentración de dNTP usados durante la PCR (aunque, no necesariamente hasta el punto donde se consuman totalmente durante la reacción como se discutió anteriormente en el método uno). Mediante las observaciones de la PCR cuantitativa en amplicones LATE-PCR de hasta seis cientos bases de largo, se encuentra que las concentraciones de dNTP se pueden rutinariamente disminuir hasta 100 nM sin afectar la eficiencia de la amplificación. Bajo tales condiciones, se puede lograr la pirosecuenciación de las reacciones de LATE-PCR enzimáticamente preparadas por más de cincuenta bases consecutivas como se demostró en el ejemplo 9, Fig. 16.

En el caso de la secuenciación didesoxi se desarrolla un protocolo que incluye la dilución como el único tratamiento necesario del producto amplificado por LATE-PCR. La secuenciación didesoxi convencional del amplicón monocatenario a partir de una amplificación por LATE-PCR mediante la secuenciación por ciclos requiere 50 fmoles del producto y una cantidad conocida del producto, como la electroforesis capilar es sensible para la cantidad de producto. Utilizando tinción de unión a ADN SYBR green I fluorescente para controlar la síntesis de ADN de cadena doble y una sonda lineal marcada con Cy5 para controlar la síntesis de amplicón monocatenario, se puede supervisar una amplificación por LATE-PCR, que incluye preferentemente un reactivo de inhibición de cebado defectuoso descrito en nuestra patente provisional de Estados Unidos titulada "Reactivos y métodos para mejorar la reproducibilidad y reducir el cebado defectuoso en la amplificación por PCR." Ninguno de estos tres aditivos interfiere con las reacciones de secuenciación posteriores. En una reacción de LATE-PCR la extensión de la amplificación exponencial y síntesis del producto de cadena doble se define por la cantidad del iniciador limitante y es independiente de la cantidad del molde de partida. La extensión de la producción monocatenaria se puede limitar restringiendo de la cantidad de al menos un dNTP o restringiendo el número de ciclos de amplificación, si se desea.

Se determina que, para la secuenciación de la cadena del iniciador en exceso (es decir, la cadena fabricada a partir del iniciador en exceso en la LATE-PCR) diluyendo con agua un total de al menos 20 veces o más la amplificación por LATE-PCR se obtiene el producto del iniciador en exceso adecuado como material de partida para la secuenciación didesoxi. Para asegurar que la cantidad utilizada con nuestro secuenciador capilar contiene la cantidad mínima requerida de 50 finoles de material a ser secuenciado después de la dilución, la fase lineal de la reacción de LATE-PCR debe rendir al menos 200 femtomoles (fmoles) de ADN monocatenario/microlitro ( $\mu\text{l}$ ) cuando la concentración del iniciador limitante es 25 nanomolar (nM) (25 fmoles/ $\mu\text{l}$ ) y se necesita aproximadamente un exceso de 8 veces de ADN monocatenario. Para estimar la concentración de ADN monocatenario generada por una amplificación por LATE-PCR, se añade a la concentración de cadenas presentes en el ADN de cadena doble al final de la reacción (que participan en la secuenciación por ciclos, y cuya concentración se define por la concentración del iniciador limitante), además la concentración del ADN monocatenario elaborado por ciclo (se estima que, generalmente, cada ciclo de la síntesis lineal rinde aproximadamente el 50% del producto teórico, el producto teórico que es igual a la cantidad de ADN de cadena doble en la reacción, veces el número de ciclos, mientras que la reacción permanece lineal Si la acumulación de producto deja de ser lineal en el transcurso de la reacción como se muestra por el aplanamiento de la curva de fluorescencia en tiempo real para el fluoróforo, la cantidad de ADN monocatenario elaborado durante la fase no lineal se infiere a partir del aumento en veces de las señales fluorescentes entre el último ciclo, cuando la reacción fue lineal, con el ciclo final de la reacción de amplificación. Típicamente, si la concentración de producto monocatenario producido en una amplificación por LATE-PCR es 200 fmoles/ $\mu\text{l}$ , se diluye la cadena del iniciador en exceso 1:8 para 25 fmoles/ $\mu\text{l}$  y se usa 2  $\mu\text{l}$  de productos diluidos (50 fmoles) directamente en una reacción de secuenciación didesoxi de 20  $\mu\text{l}$ . Bajo estas condiciones el factor de dilución total de los productos de LATE-PCR en la reacción de secuenciación es de 80 veces. Se puede usar tanto como 8  $\mu\text{l}$  de productos LATE-PCR diluidos (200 fmoles) en la reacción de secuenciación para una dilución total de 20 veces y aún así obtener cromatogramas de secuencia interpretables.

La purificación de la muestra es necesaria debido a que los reactivos residuales de la amplificación por PCR, tales como dNTP e iniciadores, interferirán con la secuenciación didesoxi. LATE-PCR reemplaza la preparación de la muestra por

precipitación con etanol o columnas de afinidad con una etapa simple de dilución en agua. La preparación de LATE-PCR para la secuenciación didesoxi sólo requiere de la dilución en agua de los productos de ADN monocatenarios en exceso al menos 8-10 veces a una concentración de 25 fmoles/ $\mu$ l, seguido de la adición de 50-200 fmoles del producto de ADN monocatenario a una reacción de secuenciación didesoxi por ciclo que contiene 10 pmoles del iniciador de secuenciación. El factor de dilución total en la mezcla final de secuenciación didesoxi es al menos 20 veces. Bajo estas condiciones, los dNTP residuales a partir de la LATE-PCR están demasiado diluidos para interferir con la secuenciación didesoxi. El iniciador en exceso remanente a partir de la LATE-PCR también no es un problema, porque el molde al que se unen los iniciadores, la cadena del iniciador limitante, está presente en una concentración muy baja después de la etapa de dilución y está totalmente hibridada con la cadena del iniciador en exceso. Por estas dos razones, el iniciador en exceso no sirve como un iniciador de secuenciación. El Ejemplo 10 y la Fig. 17 demuestran la eficacia de nuestro método de "diluir y ejecutar". La Fig. 17 presenta cromatogramas de la secuencia obtenida usando PCR simétrica y el método convencional de preparación de la muestra (purificación de productos de ADN usando columnas Qiagen, seguido de la cuantificación mediante electroforesis en gel; tiempo total de preparación: 1 hora) y cromatogramas de la secuencia obtenida con LATE-PCR y dilución en agua (tiempo total de preparación: 30 segundos). Los cromatogramas de secuencias son casi idénticos.

El Ejemplo 11 y las Figs. 18-19 ilustran estrategias de amplificación por LATE-PCR de más de un producto del mismo molde de ADN en la misma reacción. Así, estas reacciones contienen dos pares de iniciadores (cada uno compuesto de un iniciador en exceso y un iniciador limitante) que amplifican dos secuencias separadas dentro de un molde contiguo. Los dos pares de iniciadores pueden estar dispuestos tal que ambos iniciadores en exceso y en ambos iniciadores limitantes hibridan con la misma cadena del molde, o en cadenas opuestas del molde. Como se apreciará por un experto en la técnica, cuando iniciadores parecidos hibridan con cadenas opuestas del molde, los dos iniciadores en exceso pueden extenderse ya sea "hacia adentro" o "hacia afuera" en sus respectivas cadenas del molde. La Fig. 19 muestra además que las secuencias de ambas cadenas de iniciador en exceso pueden obtenerse a partir de la misma mezcla de reacción a través del método "diluir-y-ejecutar".

El Ejemplo 12 y la Fig. 20 muestra que la cantidad de ADN<sub>mc</sub> y ADN<sub>bc</sub> generados con una amplificación por LATE-PCR puede ser independientemente medida y se puede usar para calcular la relación de ADN<sub>mc</sub>/ADN<sub>bc</sub> que, a su vez, se puede usar para determinar si la cantidad de ADN<sub>mc</sub> acumulado hasta ahora es suficiente para la secuenciación posterior a través del método de "diluir-y-ejecutar".

El Ejemplo 13 y la Fig. 21 muestran el método de "diluir-y-ejecutar" empleado en una mezcla de amplicones de LATE-PCR 50:50 que tienen dos secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes. La Fig. 22 muestra que las mezclas compuestas de las relaciones 90:10 y 10:90 de dos amplicones de LATE-PCR que tienen secuencias estrechamente relacionados, pero diferentes se pueden distinguir a partir de mezclas puras 100:0 y 0:100, así como las mezclas 30:70 y 70:30 a través del método "diluir-y-ejecutar". Para realizar este tipo de análisis es necesario corregir las amplitudes observadas de cada pico de nucleótidos en cada posición heteroplásmica en términos de la amplitud esperada del nucleótido "puro" equivalente en esa posición. Una vez que se hace, las cantidades relativas de cada secuencia se pueden calcular como la relación de amplitudes (nucleótido corregido 1)  $\div$  (nucleótido corregido 1 + nucleótido corregido 2). Así, como en el caso de las secuencias de ADN mitocondrial que se pueden usar métodos diferentes, LATE-PCR y "diluir y ejecutar" didesoxi descritos en la presente para detectar heteroplasmia. El método didesoxi para medir heteroplasmia es particularmente ventajoso porque se puede usar para examinar muchos cientos de nucleótidos en un único análisis. Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría, se cree que los métodos descritos en el presente trabajo, a diferencia de intentos previos se basan en PCR simétrica y secuenciación didesoxi, ya que LATE-PCR genera poblaciones altamente homogéneas de amplicones monocatenarios. PCR simétrica en contraste tiende a generar poblaciones de moléculas completas junto con algunos amplicones parciales y algunos amplicones de cebado defectuoso.

El Ejemplo 14 y la Fig. 23 muestran que un LATE-PCR junto con al menos una única sonda tolerante al desajuste se puede usar para generar las curvas de fusión de punto final que a su vez se pueden usar para cuantificar las cantidades relativas de dos o más amplicones LATE-PCR mezclados que tienen secuencias estrechamente relacionadas, pero diferentes. El análisis cuantitativo de fusión de punto final de la LATE-PCR (QE) de mezclas de amplicones relacionados se hace posible en virtud del hecho de que la LATE-PCR genera productos monocatenarios. Así, cuando una o más sondas tolerantes al desajuste marcadas están presentes en la reacción, la sonda(s) se hibrida primero a la secuencia objetivo más complementaria y después, si la temperatura se reduce suficientemente, a todas las secuencias objetivo relacionadas. Así cada híbrido sonda/objetivo en el conjunto tiene su propia temperatura de fusión y la magnitud del pico de fusión derivado de cada híbrido sonda/objetivo refleja con precisión la cantidad de cada secuencia objetivo acumulada. Las mediciones cuantitativas de cualquier amplitud, o área bidimensional de cada curva de fusión se puede usar después para calcular la abundancia relativa de cada secuencia objetivo. Los datos mostrados en la Fig. 23 demuestran que este método se puede

usar con 99.7% de confianza para distinguir entre mezclas 0:100 - 10:90 - 50:50 - 90:10 -100:0 de dos secuencias que difieren en un único nucleótido.

Los ensayos de acuerdo con esta invención, llevados a cabo en presencia o ausencia del reactivo descrito en nuestra solicitud de patente provisional de Estados Unidos 60/619,620 se pueden optimizar independientemente para evitar o minimizar el cebado defectuoso mediante el ajuste de la concentración de la ADN polimerasa, por ejemplo Taq polimerasa, añadida a la reacción. Disminuir el cebado defectuoso ajustando la polimerasa se puede observar en términos de la cinética de la reacción de LATE-PCR usando una sonda del ADNmc, así como por la composición del producto final revelado mediante varios instrumentos conocidos en la técnica. Se sabe que es experimentalmente conveniente comenzar con una concentración típica en exceso de Taq polimerasa y después disminuir gradualmente esta concentración. Mientras que muy poca polimerasa puede provocar que la reacción se torne ineficaz (manifiesta como una disminución significativa en la velocidad o extensión de la amplificación del producto), niveles óptimos de polimerasa resulta en un ensayo de amplificación por LATE-PCR con amplificación del ADNmc eficaz y síntesis del ADNmc sostenida durante muchos ciclos. El Ejemplo 15 demuestra que el nivel óptimo de la polimerasa se puede juzgar por la señal observada del ADNmc usando un tinte de doble cadena tal como SYBR green, más la curva de fusión del producto de ADNmc, observado también usando SYBR green. El Ejemplo 16 y la Fig. 24 muestran que cuando tales ensayos se sondean para un producto de ADNmc específico generado a partir de diferentes cantidades de material de partida, las curvas resultantes son lineales y paralelas durante muchos ciclos de producción del ADNmc.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1. Tinte de unión contra tinte de unión más iniciadores marcados

Para comparar el rendimiento de un tinte intercalante con el rendimiento del tinte usado en combinación con un iniciador que incluye un fluoróforo de interacción, se realizó un ensayo de extensión. El tinte utilizado fue SYBR green I a una dilución de 1:40,000.

Se incluyeron tres cadenas de nucleótidos. Un molde de ADN, un iniciador de ADN extensible (marcado en 5' con Cy5, complementario al molde, y que tiene una  $T_m$  de 60 °C), y un oligonucleótido de ADN no-extensible (bloqueado en el terminal 3' con un grupo fosfato) se complementaron además con el objetivo, en una posición 3' al iniciador, marcado además con el fluoróforo Cy5, y que tiene una  $T_m$  mayor de 79 °C. Se escogió el separador entre el iniciador y el nucleótido no extensible de manera que los productos de extensión del iniciador hasta el oligonucleótido no extensible todos pueden tener  $T_m$  por debajo 79 °C.

La mezcla de reacción para el ensayo de extensión del iniciador incluyó 0.5 micromolar ( $\mu\text{M}$ ) de ADN molde, 1.5  $\mu\text{M}$  de iniciador y 1.5  $\mu\text{M}$  del oligonucleótido no extensible. La mezcla también incluyó tampón de PCR 1X, 3 milimolar (mM) de  $\text{MgCl}_2$ , 250 nanomolar (nM) de cada dNTP, 1:40,000X SYBR green I, y Taq ADN-polimerasa. Se calentó la mezcla de reacción a 50 °C durante 2 minutos para unir el iniciador y el oligonucleótido no extensible, y para generar productos de extensión del iniciador próximos a alcanzar el oligonucleótido no extensible. Se procesaron las muestras por duplicado.

Después de la reacción de extensión del iniciador, el producto se sometió al análisis de fusión en el cual el tinte SYBR green se excitó a medida que cambió la temperatura. A medida que la temperatura aumentó a través del intervalo de temperaturas de fusión que abarca el iniciador no extendido y el oligonucleótido no extensible se tomaron las lecturas de fluorescencia a la longitud de onda de la emisión del tinte y a la longitud de onda de la emisión del fluoróforo. En la Fig. 1 se presentan las curvas de fusión, la primera derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura representada gráficamente frente a la temperatura, en donde el panel A presenta las curvas 1 para las dos muestras, datos de emisiones del tinte y el panel B presenta las curvas 2 para las dos muestras, datos a partir de las emisiones de Cy5.

### Ejemplo 2. Sondas tolerantes al desajuste inactivas.

Se diseñó una sonda marcada para que presentara una secuencia consenso complementaria al gen de ARN ribosómico 16S de Mycobacterium. La estructura secundaria se pronosticó según los programas Mfold (Zucker, M (2003), "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," Nucleic Acids Res 31: 3406-3415) con una concentración de sodio fijada a 70 milimolar (mM) y una concentración de magnesio fijada a 3 mM. La secuencia de la sonda fue Cy5-AATACTGGATAGGACC ACG AGG (sec. con. núm. de ident. 1), con la estructura secundaria prevista formada por la hibridación de las regiones subrayadas. La  $T_m$  prevista de la estructura secundaria de la sonda fue 37 °C. Se probó la sonda en muestras que contienen sin objetivo, *M. gordonae*, o *M. asiaticum*, en mezclas que contienen tinte SYBR green I, en

donde el tinte se excitó directamente y a su vez el fluoróforo se excitó indirectamente. En la Fig. 3 se presentan los resultados de la fluorescencia de Cy5 frente a la temperatura, panel A. La línea 31 (sin objetivo) muestra una alta fluorescencia de fondo pero la línea 32 (*M. gordonae*) y la línea 33 (*M. asiaticum*) muestran señales discernibles por encima del fondo. Para inactivar la fluorescencia de fondo, se añadió un inactivador no fluorescente (un inactivador Black Hole™ II) al nucleótido terminal en 3' de la sonda. La sonda modificada se probó de manera similar y los resultados se muestran en el panel B de la Fig. 3. Como puede observarse, la fluorescencia de fondo (línea 34, sin objetivo) disminuyó notablemente, y las señales a partir de *M. gordonae* (línea 35) y *M. asiaticum* (línea 36) estuvieron muy por encima del fondo.

Otra técnica para desactivar una sonda consiste en construir la sonda para que presente una estructura de horquilla marcada en los terminales con un fluoróforo adecuado en un extremo y con un inactivador en el otro. Hemos construido una sonda que tiene la secuencia Cy5-CTGGATAGGACCACGAGGCCAG-BHQII (sec. con núm. de ident. 2), en donde las secuencias subrayadas son complementarias y forman un tallo horquilla. Se añadieron los tres nucleótidos en el terminal 3' con el propósito de lograr el tallo. La temperatura de fusión prevista de la sonda con un objetivo perfectamente apareado es 60 °C. La  $T_m$  prevista del tallo es de aproximadamente 48 °C (basándose en la  $T_m$  prevista de 40 °C del nucleótido no modificado del tallo que no responde por la afinidad aumentada de la interacción fluoróforo-inactivador). La sonda se sometió a prueba además como se describió anteriormente y los resultados se presentan en el panel C de la Fig. 3. La fluorescencia de fondo (línea 37, sin objetivo) fue bastante baja, y las señales de *M. gordonae* (línea 38) y *M. asiaticum* (línea 39) fueron superiores al fondo.

Ejemplo 3. Genotificación en tiempo real y de punto final usando sondas tolerantes a desajustes.

Este ejemplo ilustra la identificación de muestras homocigotas y muestras heterocigotas para el alelo G269 del gen de hexosaminidasa A humana (Hex A) responsable de la enfermedad de Tay-Sachs usando la amplificación mediante LATE-PCR en tiempo real y una sonda lineal tolerante a desajustes, marcada con Cy5, de  $T_m$  baja, excitada indirectamente con la emisión de un tinte SYBR. La hibridación de la sonda se controló dos veces durante cada ciclo de amplificación dentro del espacio de detección de la temperatura de LATE-PCR, primero en 55 °C, una temperatura en la cual la sonda es discriminante de alelos en el ensayo y se une exclusivamente a su objetivo perfectamente apareado, y después a 40 °C, una temperatura en la cual la sonda es tolerante a desajustes y se une a la totalidad de alelos de su secuencia objetivo en la reacción de amplificación. La detección de alelos específicos y alelos totales con la sonda tolerante a desajustes permite la corrección de variaciones estocásticas tubo a tubo en el rendimiento del amplicón entre muestras repetidas. La relación de alelo específico para alelos totales en la reacción (Cy5 a 55 °C/Cy5 a 40 °C) permite la normalización de la muestra repetida para el genotipado de punto final. La información genotípica se deriva de los valores de la relación. En el caso de las muestras homocigotas, las señales de la sonda detectada bajo condiciones discriminantes de alelos son las mismas que las señales de la sonda detectada bajo condiciones tolerantes a desajustes, ya que en ambos casos la sonda se une al 100% de los alelos de la secuencia objetivo. A diferencia, en el caso de muestras heterocigotas, las señales de las sondas detectadas bajo condiciones discriminantes de alelos son la mitad de intensas que las señales de la sonda detectada bajo condiciones tolerantes a desajustes, ya que la sonda se une sólo al 50% de los alelos de la secuencia objetivo bajo condiciones discriminantes de alelos pero al 100% de los alelos bajo condiciones tolerantes a desajustes. Por tanto, las muestras homocigotas tienen relaciones mayores de Cy5 a 55 °C/Cy5 a 40 °C que las muestras heterocigotas. Este método de genotificación se basa sólo en la detección de un único alelo.

Las secuencias y la temperatura de fusión ajustada a la concentración,  $T_m[0]$ , de los iniciadores de LATE-PCR y la sonda son los siguientes. El iniciador limitante tiene la secuencia 5'CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (sec. con núm. de ident. 3). Tiene una  $T_m [0]$  ajustada a la concentración a 25 nM de 63.2 °C. El iniciador en exceso tiene la secuencia 5'TAACAAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (sec. con núm. de ident. 4). Tiene una  $T_m[0]$  ajustada a la concentración a 1 µM de 61.8 °C. La sonda tiene la secuencia 5' Cy5-GGGACCAGGTAAGAA 3' (sec. con núm. de ident.5). Tiene una  $T_m$  de 56.3 °C. Es una sonda de  $T_m$ -baja y también una sonda de  $T_m$ -super-baja cuando se usa con una temperatura de apareamiento de 65 °C.

Se establecieron ensayos repetidos de LATE-PCR (n=15) para cada genotipo diferente (G269 homocigoto y G269 heterocigoto) en tampón de PCR 1X, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 micromolar (µM) de dNTP, 25 nM iniciador limitante, 1000 nM iniciador en exceso, 1.25 unidades de Taq ADN-polimerasa, 0.6 µM sonda marcada con Cy5, y una dilución 1:40,000 de SYBR gold I. Los parámetros de los ciclos de PCR fueron 95 °C durante 3 minutos, luego 25 ciclos a 95 °C durante 10 s, 65 °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s, seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 10 s, 65 °C durante 20 s, 72 °C durante 20 s, 55 °C durante 20 s y 40 °C durante 20 s con captación de fluorescencia a 55 °C y 40 °C en el canal de Cy5. La Fig. 7 muestra el análisis de las relaciones de señales de Cy5 a 55 °C con respecto a las señales de Cy5 a 40 °C y demuestra que las relaciones son adecuadas para el genotipado de punto final en cualquier ciclo de amplificación pasado el umbral de



detección de la sonda. En esta figura, las muestras homocigotas (círculo 91) presentan relaciones de aproximadamente dos veces la relación de las muestras heterocigotas (círculo 92).

Ejemplo 4. Análisis de objetivos múltiples usando sondas específicas al objetivo con diferentes temperaturas de fusión.

Se pueden usar en combinación múltiples sondas, marcadas cada una con el mismo fluoróforo, para detectar y cuantificar diferentes secuencias a lo largo de un oligonucleótido único, más largo (por ejemplo, un producto de PCR asimétrica, LATE-PCR, o amplificación por círculo rodante) o en diferentes oligonucleótidos. El uso de sondas de  $T_m$  baja aumenta la especificidad para tales objetivos, reduciendo o eliminando grandemente las señales generadas a partir de objetivos mal-emparejados. Una posible aplicación de esta tecnología es el genotipado del ADN humano para identificar alelos conocidos que producen enfermedad genética. Este ejemplo describe los análisis de temperatura para el diseño de sondas y para la detección de productos.

Como punto de partida se seleccionan los siguientes objetivos que pueden potencialmente presentarse en un producto de amplificación: la secuencia normal del gen regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) en la región que codifica para el aminoácido 542 de la proteína; la secuencia de la mutación Delta F508, la mutación más común de CFTR; y la secuencia normal correspondiente a la mutación Delta F508.

Se diseñan sondas discriminantes de alelos de  $T_m$  baja para cada una de las tres secuencias objetivos. Las sondas fueron sondas de baliza molecular de baja temperatura, marcadas cada una con el fluoróforo FAM y un inactivador. Se diseñaron las tres sondas para que tengan diferentes  $T_m$  contra sus objetivos en mezclas que contienen 70 mM de Tris-HCl y 3 mM  $MgCl_2$ . La "sonda 542" tuvo una  $T_m$  de 40 °C (valor previsto 41 °C mediante cálculo del vecino más próximo); la "sonda normal 508" tuvo una  $T_m$  de 47 °C (valor previsto 46 °C mediante cálculo del vecino más próximo); y la "sonda Delta F508" tuvo una  $T_m$  de 54 °C (valor previsto 53 °C mediante cálculo del vecino más próximo). La Fig. 8 presenta las curvas de fusión de las que se obtuvieron los valores de  $T_m$ . La Fig. 8 muestra la primera derivada negativa de lecturas de fluorescencia como función de la temperatura para la sonda 542 (línea 96), la sonda de DF508 (línea 97) y la sonda normal 508 (línea 98) en muestras duplicadas. Se obtuvieron alturas de pico aproximadamente iguales usando concentraciones objetivo de 1  $\mu M$ , y concentración de la sonda 542 de 2  $\mu M$ . Se probó cada sonda contra el objetivo mal emparejado para comprobar discriminación de alelos, y se encontró que la fluorescencia frente al objetivo perfecto fue 5-10 veces la fluorescencia frente al objetivo mal emparejado.

A partir de la Fig. 8 puede observarse que incluso pequeñas diferencias de  $T_m$  se podrían resolver fácilmente. A partir de una gráfica tal como la Fig. 8, se pueden resolver diferencias de 4-5 °C. La deconvolución utilizando el software suministrado con los termocicladores de PCR en tiempo real puede permitir la resolución de las  $T_m$  diferenciándose en la mitad de esa cantidad.

Examinar la primera derivada negativa de la fluorescencia es un método para determinar qué oligonucleótidos objetivo están presentes en una muestra dada. La Fig. 9 muestra un análisis de este tipo, utilizando fluorescencia por encima del fondo. Las muestras que contienen el objetivo 508 normal, pero no el objetivo Delta F508 (círculo 101) presentan un pico de fusión a 54 °C, indicativo de ese híbrido baliza molecular-objetivo. Las muestras que contienen el objetivo Delta F508, pero no el objetivo normal (círculo 102) presentan un pico de fusión en aproximadamente 47°C, indicativo de hibridación de la baliza con la secuencia mutante. Las muestras que contienen ambos objetivos (círculo 103) presentan un pico amplio sobre ese intervalo de temperaturas, lo que indica fluorescencia de ambos híbridos baliza molecular-objetivo. La presencia y la concentración relativa de la secuencia normal en el aminoácido 542 se indica con la presencia y la altura relativa del pico de fusión en aproximadamente 40°C. Las muestras con objetivo 542 normal (línea sólida para cada grupo numerado) presentan un pico grande a esa temperatura, las muestras con objetivo mutante 542 que contienen un único cambio de nucleótido en esta región idéntica a la segunda mutación más común de CFTR (línea punteada para cada grupo numerado) no presentan ningún pico a esa temperatura, y las muestras con ambos objetivos 542 (línea discontinua para cada grupo numerado) presentan picos de altura intermedia. La altura del pico en las muestras con ambos objetivos 542 está afectada por la presencia del pico de fusión del vecino Delta F508.

No siempre puede ser posible o deseable obtener un perfil de fusión completo durante el transcurso de una reacción de amplificación. El análisis adicional de las muestras descritas anteriormente muestra que un número limitado de etapas de detección puede proporcionar la información requerida para identificar los oligonucleótidos específicos en una mezcla. Puede usarse disminuir, en lugar de aumentar la temperatura. Las muestras se calentaron a 70 °C, y se disminuyeron después en decrementos de 5 °C hasta 30 °C con detección de 30 segundos en cada etapa. Las muestras que contienen el objetivo normal 508 pero no el objetivo Delta F508, o que contienen el objetivo Delta F508 pero no el objetivo normal pueden

distinguirse basándose en cambios en la fluorescencia entre 60 °C y 50°C. Cada combinación de oligonucleótidos objetivo produjo un patrón único de cambio de fluorescencia. Un gráfico de dispersión del porcentaje de cambio en el aumento de fluorescencia a 55 °C vs. el porcentaje de cambio en el aumento de fluorescencia a 45 °C se muestra en la Fig. 10. Este análisis distingue la combinación de objetivos que están presentes en cada muestra. Usando cambios en la fluorescencia en lugar de la intensidad de fluorescencia en sí, se puede realizar una evaluación precisa aun cuando las muestras difieran considerablemente en la concentración total de objetivos, como puede ocurrir en las muestras repetidas de la amplificación. La Fig. 10 incluye muestras por duplicado de cada combinación de objetivos 508 normal más 542 normal (círculo marcado 111), objetivos 508 normal más ambos 542 (112), objetivos 508 normal más 542 mutante (113), ambos objetivos 508 más 542 normal (114), ambos objetivos 508 más ambos 542 (115), ambos objetivos 508 más 542 mutante (116), objetivos Delta 508 más 542 normal (117), objetivos Delta 508 más ambos 542 (118), y objetivos Delta 508 más 542 mutante (119). Se puede realizar un análisis similar usando este perfil de temperatura durante cada ciclo o ciclos seleccionados de una reacción de amplificación. Se pueden amplificar diversas muestras con ADN de genotipos conocidos y usar los datos de detección para establecer un intervalo de valores esperado. Esto proporciona un método para la determinación rápida de genotipos de muestras desconocidas.

Aunque en este ejemplo sólo se usaron 3 sondas, es posible el uso combinado de un número mucho mayor de sondas. Las principales limitaciones en el número total de sondas son el intervalo de temperatura para la detección y la diferencia de  $T_m$  mínima entre el híbrido sonda-objetivo. A su vez, éstas son dependientes de la naturaleza de la reacción de amplificación y las capacidades del equipo y el software de deconvolución. Por ejemplo, 10 combinaciones diferentes de sonda-objetivo pueden distinguirse a lo largo de un intervalo de temperatura de 30 grados si la diferencia de  $T_m$  mínima de la deconvolución es de 3 grados. Este número puede aumentarse varias veces usando múltiples fluoróforos.

Ejemplo 5. Normalización de dos temperaturas con y sin corrección de fondo.

Se realizó el genotipado mediante QE LATE-PCR del SNP rs858521 con muestras de ADN desconocidas y control homocigoto rs858521 (alelos CC) y control heterocigoto (alelos CG) usando una única sonda tolerante a desajustes marcada con Cy5. Se realizaron la amplificación y la detección usando un detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), que normalmente genera señales fluorescentes corregidas con valores iniciales. Para nuestro análisis utilizando relaciones, se obtuvieron sin embargo, relaciones de señales fluorescentes tanto a partir de señales de fluorescencia corregidas con valores iniciales (Fig. 11) como a partir de señales fluorescentes sin procesar (Fig. 12). La Fig. 11 presenta la relación de la fluorescencia de la sonda a 50°C con respecto a su fluorescencia a 25°C en función del número de ciclos de la reacción de amplificación utilizando las señales fluorescentes corregidas con valores iniciales del instrumento. En la Fig. 11, el círculo 113 son repeticiones del control homocigoto, el círculo 114 son repeticiones del control heterocigoto, mientras que los círculos 111 y 112 son las desconocidas. La Fig. 12 presenta los mismos resultados utilizando señales de fluorescencia sin procesar. En la Fig. 12, el círculo 116 son repeticiones del control homocigoto, el círculo 117 son repeticiones del control heterocigoto, y el círculo 115 son las desconocidas. El uso de señales de fluorescencia corregidas con valores iniciales para la normalización resultó en una genotipificación ambigua para una muestra en la Fig. 11, círculo 112. A diferencia, el uso de señales de fluorescencia sin procesar para la normalización proporcionó el genotipado correcto para todas las muestras. Este resultado demuestra que la corrección con los valores iniciales en el software del detector de secuencias ABI Prism 7700 puede introducir artefactos que afectan la normalización de la señal y preferentemente no debe usarse.

Ejemplo 6. Normalización de tres temperaturas.

Repeticiones de las reacciones de amplificación por LATE-PCR que contienen los iniciadores SNP rs858521 y una única sonda ResonSense tolerante al desajuste se realizaron con el ADN genómico purificado para cada genotipo del gen SNP rs858521 (1800 genomas equivalentes, 18 repeticiones de reacciones de cada genotipo homocigoto CC, heterocigoto CG, y homocigoto GG). Los productos amplificados se analizaron mediante curvas de fusión, mostradas en la Fig. 13, panel A y mediante la normalización de los datos, como se muestra en el panel B y panel C. La Fig. 13A muestra una gráfica de las señales de fluorescencia sin procesar recogidas durante el análisis de curva de fusión tras la amplificación mediante LATE-PCR. La sonda que se utilizó fue discriminante de alelos a temperaturas superiores pero se hacía cada vez más tolerante a desajustes a medida que se redujo la temperatura. La variabilidad intrínseca en el rendimiento del producto entre las muestras repetidas impide la discriminación de estos genotipos por señales de fluorescencia sin procesar (círculo 131) dentro del marco de temperatura de discriminación de alelos para esta sonda (40°C-60°C, determinada anteriormente con objetivos de oligonucleótido sintético, datos no mostrados). La Fig. 13B muestra las señales de cada muestra normalizada a cada temperatura frente a la señal recogida a una temperatura completamente tolerante a desajustes (25°C) para cada muestra. En la Fig. 13B, las señales normalizadas para los alelos CC homocigotos son el círculo 132, las señales

normalizadas para los alelos CG heterocigotos son el círculo 133, y las señales normalizadas para los alelos GG homocigotos son el círculo 134. Como muestra la Fig., la normalización reduce la dispersión de la señal y permite la identificación de cada genotipo dentro del marco de discriminación de alelos. Se observó la separación máxima a 52°C, que corresponde con la T<sub>m</sub> de la sonda ResonSense que se usó. Aunque la dispersión de la señal se redujo significativamente en la Fig. 13B en comparación con la Fig. 13A, todavía hay cierta variabilidad en la intensidad de la señal entre las muestras repetidas a juzgar por la diseminación de los gráficos cinéticos. La Fig. 13C muestra que el mejor método para eliminar la dispersión residual de la señal fue normalizando las señales fluorescentes a cada temperatura de las señales fluorescentes recogidas a las temperaturas superior e inferior del marco de discriminación de alelos observado en la Fig. 13B donde las curvas de fusión comienzan a divergir (es decir, 40°C y 60°C respectivamente). En la Fig. 13C, las señales normalizadas para los alelos CC homocigotos son el círculo 135, las señales normalizadas para los alelos CG heterocigotos son el círculo 136, y las señales normalizadas para los alelos GG homocigotos son el círculo 137. Si F<sub>b</sub> y F<sub>t</sub> son las lecturas de fluorescencia hacia la parte superior y la parte inferior del marco de temperatura de discriminación de alelos, respectivamente, y F<sub>s</sub> es la lectura fluorescente a cualquier temperatura dada durante el análisis de fusión, entonces las relaciones fluorescentes normalizadas se calculan como:

$$\text{Relación de fluorescencia normalizada a tres temperaturas} = (F_s - F_t) / (F_b - F_t)$$

La normalización simultánea de las señales fluorescentes a cada temperatura para las señales fluorescentes a 40 °C y 60 °C dentro de cualquier muestra dada redujo además la dispersión de la señal fluorescente y causó que las curvas de fusión repetidas de cada genotipo se volvieran muy ajustadas (ver la Fig. 13C). Las relaciones fluorescentes calculadas a una única temperatura, concretamente, la T<sub>m</sub> de la sonda (52°C) normalizada usando las señales fluorescentes hacia las temperaturas superior e inferior del marco de discriminación de alelos (es decir, a 60°C, 40°C) definen excepcionalmente cada genotipo con más del 99.7% de seguridad (es decir, las cajas de error que consisten en tres desviaciones estándar que abarcan el 99.7% de todas las posibles relaciones fluorescentes para cada genotipo están completamente separadas entre sí, datos no mostrados). Se obtuvieron resultados mejorados de manera similar para el sitio SNP rs2270517 cuando se calcularon las señales fluorescentes a la T<sub>m</sub> de la sonda (57°C) normalizada para las temperaturas superior e inferior correspondientes del marco de discriminación de alelos (es decir, a 71°C, 45°C).

Ejemplo 7. Pirosecuenciación directa del producto de LATE-PCR.

Repeticiones de las amplificaciones por LATE-PCR se llevaron a cabo en volumen de 25 µl consistente de tampón de PCR 1X, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 nanomolar (nM) de dNTP, 25 nM iniciador limitante, 1000 nM iniciador en exceso, 1.25 unidades de Taq ADN-polimerasa Platinum, y 100 ADN de genomas humanos. La secuencia del iniciador limitante fue 5' CCGCCCTTCTCTGCCCCCTGGT 3' (sec. con núm. de ident.: 6) y la secuencia del iniciador en exceso fue 5' GCCAGGGTTCCACTACGTAGA 3' (sec. con núm. de ident.: 7). Estas secuencias amplifican un segmento de 94 pares de base a partir del exón 11 del gen de la hexosaminidasa A humana. Para la amplificación por LATE-PCR, el perfil de ciclado térmico fue de 95 °C durante 3 min seguido por 10 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, y 72 °C durante 20 segundos, seguido por 55 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 67 °C durante 20 segundos, y 72 °C durante 20 segundos. Después 16.6 µl de la reacción (el equivalente de 3 pmoles de ADN monocatenario (ADNmc) como estimado empíricamente a partir de los experimentos previos de pirosecuenciación) se mezclaron con 20 microlitro (µl) de 10 mM de Tris-Cl pH 8.5 y colocaron en un pocillo de una placa de microtitulación usada para la pirosecuenciación. Para la eliminación de dNTP y pirofosfato remanente del producto amplificado-LATE-PCR, la mezcla estándar de enzima de pirosecuenciación consistente de ADN polimerasa Klenow-deficiente de exonucleasa, apirasa, luciferasa, ATP sulfurilasa y la mezcla estándar de sustrato de pirosecuenciación consistente de luciferina y adenosina 5' fosfosulfato como se proporciona en el estuche reactivo de SNP PSQ 96 (Pyrosequencing, Inc, Westboro, Massachusetts) se dispensaron secuencialmente en el pocillo que contiene la muestra de la LATE-PCR usando un instrumento PSQ 96 (Pyrosequencing Inc., Westboro, Massachusetts) de acuerdo con las instrucciones del fabricante e incubó durante 60 segundos a 37 °C. Las adiciones de dNTP posteriores normalmente llevadas a cabo automáticamente por el instrumento PSQ 96 se reemplazaron por una única adición de 10 mM Tris-Cl pH 7.5 usando el volumen predeterminado programado en el instrumento. Después de esta etapa, el pocillo que contiene la muestra de LATE-PCR recibió 2.5 µl de 10 µM del iniciador de secuenciación (5' CTGGTACCTGAACCGTAT 3') (sec. con núm. de ident.: 8). Teniendo en cuenta el volumen de las mezclas de enzima y sustrato de la pirosecuenciación añadidos a la muestra de LATE-PCR, la concentración final del iniciador de secuenciación se estimó siendo 0.5 µM y el volumen final 50 µl. La muestra con el iniciador de secuenciación se retornó nuevamente al instrumento PSQ 96 procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que las adiciones de la enzima y sustrato de la pirosecuenciación normalmente llevadas a cabo por el instrumento se reemplazaron por la adición de volúmenes similares de 10 mM de Tris-Cl pH 7.5 seguido por adición de dNTP. El pirograma resultante se muestra en la Fig. 14, panel A, que muestra la señal de luz resultante de la incorporación de nucleótidos particulares. La altura de los picos corresponde con el número de nucleótidos

incorporados durante cada adición. Refiriéndose al panel C de la Fig. 14, se observa que uno de cada uno de los dos primeros nucleótidos (A, T) se incorporó en el molde, seguido por dos de los siguiente nucleótidos (C, C), y así sucesivamente. Basándose en la altura de los picos y el orden de las adiciones de nucleótidos de una secuencia se derivó: 5' ATCCTATGGCCC3' (sec. con núm. de ident.: 9) y posteriormente se confirmó usando la secuencia de GenBank para el gen de la hexosaminidasa A humana (número de acceso al GenBank: S62068). Estos resultados demuestran que el pretratamiento de las muestras de LATE-PCR con las mezclas de enzima y sustrato usados para la pirosecuenciación permite la pirosecuenciación directa del producto amplificado por LATE-PCR tras el apareamiento del iniciador y adición iterativa del dNTP. La alteración del protocolo anterior para seguir las instrucciones del fabricante (es decir, realizar el apareamiento del iniciador seguido de la adición de las mezclas de enzima y sustrato de la pirosecuenciación) resultó en el 80% de picos falsos positivos tras la adición del dNTP que no supusieron se incorporara en el molde. Estos picos falsos positivos fueron debido a la extensión parcial del iniciador de secuenciación a partir del dNTP residual de la amplificación por LATE-PCR antes de la pirosecuenciación.

En un experimento separado, la misma muestra de LATE-PCR descrita anteriormente se sometió a la purificación usando un estuche de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, California) según las instrucciones del fabricante y se recuperó a 0.375 pmoles/μl en 10 mM de Tris-Cl pH. 7.5. Ocho microlitros (μl) de esta solución (3 pmoles en total) se mezclaron con el iniciador de secuenciación descrito anteriormente a una concentración final del iniciador de secuenciación de 0.5 μM en un volumen final de 50 μl en 10 mM de Tris-Cl pH. 7.5. La muestra se sometió a la pirosecuenciación usando el instrumento PSQ 96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El pirograma resultante se muestra en la Fig. 14, panel B. La preparación convencional, aunque consume tiempo y es costosa, no dio datos superiores en comparación con nuestro método que produjo el panel A.

#### Ejemplo 8. Pirosecuenciación directa de los productos de LATE-PCR.

Para determinar el genotipo de células individuales, amplificaciones por LATE-PCR repetidas se llevaron a cabo en un volumen de 25 μL consistente de tampón de PCR 1X, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM dNTP, 100 nM iniciador limitante, 1000 nM iniciador en exceso, 1.25 unidades ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se inició con un único linfoblasto humano preparado como se describe en Pierce y otros (2002) *Biotechniques* 32(5): 1106-1111 (ver publicación de patente de Estados Unidos US-2003-022231-A1) con uno de los tres posibles genotipos para la mutación IVS-110. La secuencia del iniciador limitante fue 5' GGCCATCACTAAAGGCACCGAGCACT 3' (sec. con núm. de ident.:10) y la secuencia del iniciador en exceso fue 5' GGGTTTCTGATACGCACTGACTCTCTC 3' (sec. con núm. de ident.: 11). Estas secuencias amplifican un segmento de 191 pares de base a partir del gen de la β-globulina en el cromosoma humano 11p. Para la amplificación por LATE-PCR, el perfil de ciclado térmico fue 95 °C durante 10 min seguido por 65 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 66°C durante 15 segundos y 72 °C durante 20 segundos. Después de la amplificación, 5 μl se mezclaron con 6.64 μl de 20 mM de Tris-Acetato pH 7.6 y colocaron en un pocillo de una placa óptica usada para la pirosecuenciación. Para la eliminación de los dNTP y PPI remanentes del producto de amplificación por LATE-PCR un volumen estándar de la mezcla enzimática de pirosecuenciación (consistente de ADN polimerasa Klenow deficiente de exonucleasa, apirasa, luciferasa, ATP sulfurilasa) y aproximadamente dos veces el volumen estándar de la mezcla de sustrato (consistente de luciferina y adenosina 5' fosfosulfato) como se proporciona en el estuche reactivo Pyro Gold (Biotage AB, Uppsala, Suecia) se dispensaron secuencialmente en los pocillos que contienen las muestras de LATE-PCR usando un instrumento PSQ HS 96A (Biotage AB, Uppsala, Suecia) usando los siguientes parámetros del instrumento: tiempo de pulso de la mezcla enzimática: 23.5 ms; tiempo de pulso de la mezcla de sustrato: 44.0 ms; presión de dispensación del reactivo : 400 mbar. Las muestras se incubaron durante 60 segundos a 28 °C hasta que la salida de la luz cayó más abajo del fondo. A continuación, 0.36 μL de un iniciador de secuenciación de 10μM: 5' GACCACCAGCAGCCTAAG 3' (sec. con núm. de ident.: 12) se añadió a cada muestra para un volumen de reacción total de 12μl y se apareó después a 80°C durante 2 min seguido por enfriamiento a temperatura ambiente durante 10 min. Adicionalmente, una concentración de 900 μM de una versión fosforilada 3' del iniciador limitante de LATE-PCR (sec. con núm. de ident.: 7) se añadió también aquí para prevenir que el extremo 3' de la cadena molde se pliegue sobre sí y se extienda. Las muestras con el iniciador de secuenciación se retornaron después al instrumento PSQ HS 96A nuevamente y procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluyendo las adiciones de la mezcla normal de enzima y sustrato. Los pirogramas resultantes de las células con unos genotipos tipo silvestre homocigoto, mutantes heterocigotos y homocigotos se muestran en la Fig. 15, paneles A-C, respectivamente. Unidades de luz y alturas de los picos son como se explica en el Ejemplo 7. La altura relativa de los picos corresponde al número de nucleótidos incorporados en cada posición. Refiriéndose al panel A de la Fig. 15, se observa que el segundo pico (T) es mitad tan alto como el primer pico (G), un tercio tan alto como el tercer pico (G), un cuarto tan alto como el cuarto pico (A) y la misma altura como los picos 5-8 (TAGA). La secuencia para los primeros ocho picos se lee así como: GGTGGGAAAATAGA (sec. con núm. de ident.: 13). Basado en la altura de los picos y el orden de adiciones de nucleótidos, se derivó la secuencia β-globina de tipo silvestre en la Fig. 15,

panel A y se confirmó posteriormente usando la secuencia de GenBank para el gen de la  $\beta$ -globina humana. Una mutación heterocigoto (panel B) u homocigoto (panel C) se confirmó en el sitio IVS-110, indicado por flechas. Se señala en el panel B que la unidad 1.5 del pico "C", seguido por una unidad de 0.5 del pico "T" indica una base "C" en ambos alelos seguido por una "C" en un alelo y una "T" en el otro alelo. Estos resultados demuestran que el pretratamiento de las muestras de LATE-PCR con las mezclas de enzima y sustrato usados para la pirosecuenciación permite la pirosecuenciación directa de LATE-PCR tras el apareamiento del iniciador y adiciones iterativas del dNTP. La alteración del protocolo anterior para seguir las instrucciones del fabricante (es decir, realizar el apareamiento del iniciador seguido por la adición de las mezclas de enzima y sustrato de la pirosecuenciación) resultó en el 80% de picos falsos positivos tras la adición del dNTP que no supusieron se incorporara en el molde. Estos picos falsos positivos se debieron a la extensión parcial del iniciador de secuenciación con dNTPs residuales.

Ejemplo 9. Pirosecuenciación de los productos de LATE-PCR para secuencias largas.

Una amplificación por LATE-PCR se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l consistente de tampón de PCR 1X, 3 mM  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ M dNTP, 100 nM iniciador limitante, 1000 nM iniciador en exceso, 1.25 unidades ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Estados Unidos) y 50nM de reactivo reductor del cebado defectuoso 9-22DD como se describe en nuestra solicitud de patente provisional de Estados Unidos presentada, titulada "Reactivos y métodos para mejorar la reproducibilidad y reducir el cebado defectuoso en la amplificación por PCR". El reactivo 9- 22DD es un oligonucleótido en horquilla que tiene un tallo de nueve nucleótidos de largo y un bucle monocatenario de 22 nucleótidos de largo. El oligonucleótido se modifica por la adición de porciones de DabcyI en el 'terminal 5' y terminal 3'. Su secuencia de nucleótido es 5' CGCGGCGTCAGGCATATAGGATACCGGGACAGACGCCGCG 3' (sec. con núm. de ident.14). La reacción se inició con 20 equivalentes de genoma de ADN humano. La secuencia del iniciador limitante fue 5' GGTGAGCGCCGGCTGCAAGTGTAGA 3' (sec. con núm. de ident.: 15) y la secuencia del iniciador en exceso fue 5' GATGGGTGGAGCTTGTCTTGAGG 3' (sec. con núm. de ident.: 16). Estas secuencias amplifican un segmento de 78 pares de base cercano al gen p53 en el cromosoma humano 17p. Para la amplificación por LATE-PCR, el perfil de ciclado térmico fue 95 °C durante 10 min seguido por 60 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 66°C durante 10 segundos and 72 °C durante 20 segundos. Después de la amplificación, 7.5  $\mu$ l del producto se mezcló con 9.96  $\mu$ l de 20 mM Tris-Acetato pH 7.6 y colocó en un pocillo de una placa óptica usada para la pirosecuenciación. Para la eliminación de los dNTP y PPI remanentes de LATE-PCR un volumen estándar de la mezcla enzimática de la pirosecuenciación (consistente de ADN polimerasa Klenow deficiente de exonucleasa, apirasa, luciferasa, ATP sulfurilasa) y aproximadamente dos veces el volumen estándar de la mezcla de sustrato (consistente de luciferina y adenosina 5' fosfosulfato) como se proporciona en el estuche reactivo Pyro Gold (Biotage AB, Uppsala, Suecia) se dispensó secuencialmente en el pocillo que contiene las muestras de LATE-PCR usando un instrumento PSQ HS 96A (Biotage AB, Uppsala, Suecia) usando los siguientes parámetros del instrumento: tiempo de pulso de la mezcla enzimática: 23.5 ms; tiempo de pulso de la mezcla de sustrato: 44.0 ms; presión de dispensación del reactivo : 400 mbar. La mezcla se incubó después durante 60 segundos a 28 °C hasta que la salida de luz cayó más abajo del fondo. En este amplicón, el iniciador limitante de LATE-PCR (sec. con núm. de ident.: 10) se usó como iniciador de la pirosecuenciación y 0.54  $\mu$ l de 10  $\mu$ M solución de este se añadió a cada muestra para un volumen de reacción total de 18  $\mu$ l y se apareó después a 80°C durante 2 min seguido por enfriamiento a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras con el iniciador de secuenciación se retornaron después al instrumento PSQ HS 96A nuevamente y procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluyendo las adiciones de la mezcla normal de enzima y sustrato. El pirograma resultante se muestra en la Fig. 16. La altura relativa de los picos se corresponde con el número de nucleótidos incorporados en cada posición, como se describió en el Ejemplo 8. La secuencia correctamente apareada esperada, como determinado a partir de la base de datos GenBank, se observa por encima de los picos con subíndices que indican el número de una base dada en una fila (es decir,  $G_1C_1A_1G_2 = GCAGG$ ). Estos resultados demuestran que el pretratamiento de muestras de LATE-PCR con las mezclas de enzima y sustratos usados para la pirosecuenciación permite lecturas de más de cincuenta pares de bases de largo.

Ejemplo 10. Secuenciación didesoxi directa del producto LATE-PCR

Amplificaciones de PCR se realizaron utilizando un detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) para amplificar un segmento del exón 7 del gen de la hexosaminidasa A humana que contiene la mutación G269, que es responsable por la enfermedad de Tay-Sachs. La secuencia se corresponde con el número de acceso al GenBank M16417. Una amplificación fue una amplificación por LATE-PCR, y el producto se sometió directamente a secuenciación didesoxi. Como un control de las concentraciones del iniciador se cambiaron a equimolar, se realizó una amplificación por PCR simétrico convencional, y el producto amplificado se sometió a purificación convencional antes de la secuenciación didesoxi.

Mezclas de la reacción de amplificación (concentraciones finales)

5 Volumen: 25  $\mu$ l  
 1x tampón PCR (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.)  
 3 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10  $\mu$ M dNTPs  
 0.6  $\mu$ M sonda (LATE-PCR solamente)  
 dilución 1:41,666 del tinte SYBR gold (Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE. UU.)  
 1.25 unidades ADN polimerasa Taq platino (Invitrogen)  
 10 6 ng ADN genómico humano (equivalente a 1000 genomas)  
 iniciadores: para LATE-PCR, 25 nM iniciador limitante y 1000 nM iniciador en exceso; (para el control, 300 nM de cada una de los mismos iniciadores).

Secuencias de oligonucleótidos

15 Iniciador limitante: 5' CGAGGTCATTGAATACGCACGGCTCC 3' (sec. con núm. de ident. 17)  
 Iniciador en exceso: 5' TAAACAAGCAGAGTCCCTCTGGT 3' (sec. con núm. de ident. 18)  
 20 Sonda: 5' Cy5 GGGACCAGGTAAGAA- fosfato 3' (sec. con núm. de ident.19)

Ciclo Mezcla de reacción de secuenciación

25 Volumen: 20  $\mu$ l  
 100 femtomoles (fmoles) producto a secuenciarse 5 picomoles (pmoles) iniciador de secuenciación (ya sea el iniciador limitante o el iniciador en exceso)  
 1x mezcla maestra de inicio rápido DTC5 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, EE.UU.)  
 [incluye dNTPs, ddNTP, tampón, MgCl<sub>2</sub>].

30 Secuenciación didesoxi

Las mezclas de reacción de secuenciación se sometieron a la secuenciación por ciclos y electroforesis capilar en un secuenciador de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, EE.UU.) usando el estuche de secuenciación por ciclo de terminación marcada CEQ 2000 (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.  
 35

Amplificación por LATE-PCR y preparación de la secuenciación

40 La mezcla de reacción para la amplificación por LATE-PCR se sometió a un termociclador como sigue: 95 °C durante 3 min; 20 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 65 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 20 segundos, y 70 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 65 °C durante 20 segundos, 72 °C durante 20 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 40 °C durante 20 segundos. Se controló la síntesis del amplicón bicatenario excitando el tinte SYBR y leyendo su fluorescencia durante la etapa de extensión del iniciador a 72 °C. Se controló la síntesis del producto monocatenario después del agotamiento del iniciador limitante excitando el tinte SYBR y leyendo la fluorescencia del fluoróforo Cy5 de la sonda de T<sub>m</sub>-baja durante la etapa de detección a baja temperatura a 40 °C.  
 45

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del iniciador en exceso, la dilución del producto de amplificación fue necesaria. Se estimó la cantidad de producto en 25  $\mu$ l del producto de reacción de la siguiente manera. En primer lugar, la cantidad de ese producto en el producto de doble cadena elaborado durante los ciclos iniciales de amplificación se determinó por la cantidad de iniciador limitante. En este ejemplo fue 25 nM, que se traducen en 25 fmoles/ $\mu$ l. La concentración del producto de extensión monocatenario elaborado durante la fase lineal de la amplificación por LATE-PCR, es decir, después de agotamiento del iniciador limitante, se estimó dividiendo esa fase en dos partes determinadas por la inspección de la curva de fluorescencia de Cy5: una primera parte en la que la amplificación procede aritméticamente y una segunda parte en la que la acumulación de producto se redujo. Para la primera parte, que en este ejemplo fue de seis ciclos, se asumió una eficacia de amplificación del 50%, basándose en Gyllensten, U.B.H. y Erlich, A. (1988), "Generation of ADN monocatenario by the Polymerase Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. La producción de monocadenas durante los seis ciclos se calculó como la  
 50  
 55

concentración de partida (25 fmoles/ $\mu$ l) por el número de ciclos (6) por la eficacia (0.5). Se estimó además la producción como el aumento de porcentaje en la señal de Cy5 durante el resto de la reacción, que en este caso fue 233.3%. La producción total durante la fase lineal fue por lo tanto de 175 fmoles/ $\mu$ l ( $25 \times 6 \times 0.5 \times 2.333$ ), y se estimó que la concentración total de ese producto, incluyendo 25 fmoles/ $\mu$ l en el amplicón bicatenario, era de 200 fmoles/ $\mu$ l. Para obtener 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación por ciclos, se diluyó el producto de amplificación 1:8 con agua y se usó 4  $\mu$ l del producto diluido en los 20  $\mu$ l de mezcla de reacción. Como se apreciará, esto significó que el producto de amplificación se diluyó finalmente 1:40.

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del iniciador limitante, el punto de partida fue que el producto de la reacción de amplificación contenía 25 nM de ese producto, o 25 fmoles/ $\mu$ l. Se usaron simplemente 4  $\mu$ l del producto de amplificación en los 20  $\mu$ l de mezcla de reacción de la secuenciación por ciclos para obtener la cantidad de partida deseada de 100 fmoles.

Control de la amplificación y preparación de la secuenciación.

La mezcla de reacción de la amplificación se sometió al mismo perfil de ciclado térmico, excepto que sólo se llevaron a cabo 18 (en lugar de 70) de los ciclos de cinco temperaturas, porque un gráfico en tiempo real de la señal de tinte de intercalación indicó que la amplificación alcanzaba una meseta en este punto y sólo se obtuvo el producto de amplificación deseado en ese punto. Se purificaron los productos de amplificación en la mezcla de amplificación al final de la amplificación de una manera convencional usando el estuche de purificación por PCR QUIA quick (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron los amplicones purificados mediante electroforesis en gel en un gel de agarosa al 3% con TBE 0.5x frente a diferentes cantidades conocidas de marcadores de ADN de  $\Phi$ X174 Hind III seguido por la visualización mediante tinción con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml). Se usó un volumen que contiene 100 fmoles en la mezcla de reacción de la secuenciación por ciclos con cada iniciador de secuenciación.

Resultados

Los métodos de LATE-PCR y control produjeron ambas secuencias correspondientes a la información de secuencia de Genbank (número de registro M 16417). La Fig. 17 incluye cuatro cromatogramas obtenidos a partir de la secuenciación didesoxi. El panel A es del método de LATE-PCR con secuenciación por ciclos utilizando el iniciador limitante como iniciador de secuenciación. El panel B es del método de LATE-PCR con secuenciación por ciclos utilizando el iniciador en exceso como iniciador de secuenciación. El panel C es el método de control utilizando el iniciador en exceso como el iniciador de secuenciación. El panel D es el método de control utilizando el iniciador limitante como el iniciador de secuenciación. Cada cromatograma incluye las curvas de fluorescencia obtenidas a partir de los nucleótidos didesoxi marcados y la secuencia de nucleótidos determinada.

Ejemplo 11. Estrategias para la amplificación por LATE-PCR de más de un producto a partir del mismo molde de ADN en la misma reacción.

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando un detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) para amplificar dos amplicones de 549 y 464 bases designados como cadenas H y L de HV1 y HV2 en la misma reacción dúplex dentro de la región bucle-d en el ADN mitocondrial humano, basándose en que las secuencias se amplificaron usando un iniciador en exceso.

Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

Volumen: 25  $\mu$ l  
 tampón de PCR 1X (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.)  
 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)  
 250  $\mu$ M dNTPs (Promega)  
 1.0  $\mu$ M sonda (sólo LATE-PCR)  
 dilución 10x de tinte SYBR green (FMC Bioproducts, Rockland ME, EE.UU.)  
 1.25 unidades ADN polimerasa Taq platino (Invitrogen)  
 ADN genómico de linfocitos de sangre humana (equivalente a 100 genomas de ADNmt)  
 Iniciadores: para LATE-PCR, 50 nM iniciador limitante y 1000 nM iniciador en exceso.

## ES 2 529 204 T3

### Secuencias de oligonucleótidos

Sonda: 5' Cy5 - TGCTAATGGTGGAG -fosfato 3' (sec. con núm. de ident. 20) HV1-H

5 iniciador limitante: 5' GCCCGGAGCGAGGAGAGTAGCACTCTTG 3'(sec. con núm. de ident. 21)

Iniciador en exceso: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAA 3' (sec. con núm. de ident. 22)

HV2-H

10 Iniciador limitante: 5' GTATGGGAGTGGGAGGGGAAAATAATGTGTTAG 3' (sec. con núm. de ident. 23)

Iniciador en exceso: 5' AGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCA3' (sec. con núm. de ident. 24)

15 HV1-L

Iniciador limitante: 5' CACCAGTCTTGTAACCGGAGATGAAAACC 3' (sec. con núm. de ident. 25)

Iniciador en exceso: 5' CGAGGAGAGTAGCACTCTT3' (sec. con núm. de ident.26)

20

HV2-L

Iniciador limitante: 5' AGGTCTATCACCCCTATTAACCACTCACGGG 3' (sec. con núm. de ident. 27)

25 Iniciador en exceso: 5' GGAGGGGAAAATAATGTGTTAGT 3' (sec. con núm. de ident. 28)

### Mezcla de reacción de secuenciación por ciclo

Volumen: 25 µl

30 100 fmoles del producto a secuenciarse

5 pmoles iniciador de secuenciación (ya sea el iniciador limitante o el iniciador en exceso)

1x mezcla maestra de inicio rápido DTC5 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, EE.UU.)

[incluye dNTPs, ddNTP, tampón, MgCl<sub>2</sub>].

35 Secuenciación didesoxi

Las mezclas de reacción de secuenciación se sometieron a la secuenciación por ciclos y electroforesis capilar en un secuenciador de ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, EE.UU.) usando el estuche de secuenciación por ciclo de terminación marcada CEQ 2000 (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40

### Amplificación por LATE-PCR y preparación de la secuenciación

La mezcla de reacción para la amplificación por LATE-PCR se sometió a un termociclador como sigue: 95 °C durante 3 min; 15 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 64 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 45 segundos, y 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 64 °C durante 10 segundos, 72 °C durante 45 segundos, y para HV1-H solo 50 °C durante 20 segundos. Se monitorizó la síntesis del amplicón bicatenario excitando el tinte SYBR green y leyendo su fluorescencia durante la etapa de extensión del iniciador a 72 °C. Se controló la síntesis del producto monocatenario después del agotamiento del iniciador limitante excitando el tinte SYBR y leyendo la fluorescencia del fluoróforo Cy5 de la sonda de Tm baja durante la etapa de detección a baja temperatura a 50 °C sólo para la región HV1-H.

50

Para obtener 100 fmoles del producto de extensión del iniciador en exceso, la dilución del producto de amplificación fue necesaria. Se estimó la cantidad de producto en 25 µl del producto de reacción de la siguiente manera. En primer lugar, la cantidad de ese producto en el producto de doble cadena elaborado durante los ciclos iniciales de amplificación se determinó por la cantidad de iniciador limitante. En este ejemplo fue 50 nM, que se tradujo en 50 fmoles/µl. La concentración del producto de extensión monocatenario elaborado durante la fase lineal de la amplificación por LATE-PCR, es decir, después de agotamiento del iniciador limitante, se estimó dividiendo esa fase en dos partes determinadas por la inspección

55



de la curva de fluorescencia de Cy5: una primera parte en la que la amplificación procede aritméticamente y una segunda parte en la que la acumulación de producto se redujo. Para la primera parte, que en este ejemplo fue de once ciclos, se asumió una eficacia de amplificación del 50%, basándose en Gyllensten, U.B.H. y Erlich, A. (1988), "Generation of ADN monocatenario by the Polymerase Chain Reaction and its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA LOCUS," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656. La producción de monocadenas durante los once ciclos se calculó como la concentración de partida (50 fmoles/ $\mu$ l) por el número de ciclos (11) por la eficacia (0.5). Se estimó además la producción como el aumento de porcentaje en la señal de Cy5 durante el resto de la reacción, que en este caso fue 100%. La producción total durante la fase lineal fue por lo tanto de 275 fmoles/ $\mu$ l (50 x 11 x 0.5 x 1.0), y se estimó que la concentración total de ese producto, incluyendo 50 fmoles/ $\mu$ l en el amplicón bicatenario, era de 325 fmoles/ $\mu$ l. Para obtener 100 fmoles en la mezcla de reacción de secuenciación por ciclos, se diluyó el producto de amplificación 1:13 con agua y se usó 4  $\mu$ l del producto diluido en los 25  $\mu$ l de mezcla de reacción.

#### Resultados

Existen cuatro combinaciones posibles: 1) HV1-H con HV2-H, 2) HV1-L con HV2-L, 3) HV 1-H con HV2-L, 4) HV1-L con HV2-H. La Fig. 18 muestra un gel de agarosa al 4% de la electroforesis de los controles sin molde (NTC), tres carriles de la izquierda; amplicones de reacciones que comenzaron con 100 copias de ADN genómico, tres carriles siguientes; y en el carril más a la derecha un marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases. La Fig. 18 muestra la formación de los amplicones de ADNbc HV1-H y HV2-H de 549 y 464 pares de bases utilizando 100 copias de ADN genómico al inicio de la reacción. Los controles sin molde, NTC, no se amplificaron.

Como apreciará un experto en la materia, al amplificar dos amplicones monocatenarios en la misma reacción a partir de un único molde, pueden generarse las dos cadenas de iniciador en exceso a partir de la misma cadena de ADN o a partir de cadenas de ADN complementario. Se emplearon satisfactoriamente ambos enfoques. En las combinaciones HV1-H con HV2-H y HV1-L con HV2-L se generan ambos amplicones a partir de la misma cadena de ADN molde. En las combinaciones HV1-H con HV2-L y HV1-L con HV2-H los dos amplicones se generan a partir de cadenas de ADN complementario. La Fig. 19A muestra información de secuencia para el amplicón HV1-H en el dúplex HV1-H con HV2-H en la región de bases 16209-16169. La Fig. 19B presenta información de secuencia para el amplicón HV2-H en el dúplex HV1-H con HV2-H en la región de bases 289-326. La Fig. 19C presenta información de secuencia para el amplicón HV1-H en el dúplex HV1-H con HV2-L en la región de bases 16209-16169. La Fig. 19D presenta información de secuencia para el amplicón HV2-L en el dúplex HV1-H con HV2-L en la región de bases 289-326. La LATE-PCR produjo secuencias correspondientes a la información de la secuencia de GenBank.

#### Ejemplo 12. Determinación del ADNmc necesario.

La cantidad de ADN monocatenario y ADN de cadena doble generados por una amplificación por LATE-PCR puede usarse para determinar la cantidad de ADNmc necesario para la secuenciación didesoxi mediante "diluir y ejecutar". Se realizaron amplificaciones por PCR utilizando un detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) para amplificar el amplicón de 549 bases designado como HV1 H dentro de la región de bucle-d del ADN mitocondrial humano. Se extrajo el ADNmt en condiciones de lisis (como se describe en Peirce y otros (2002) Biotechniques 32(5); 1106-1111 con la inclusión de 4  $\mu$ l de DTT en 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción de lisis) a partir del vástago de pelo humano. Todas las amplificaciones fueron por LATE-PCR, y el producto se sometió directamente a secuenciación didesoxi

#### Mezclas de reacción de amplificación (concentraciones finales)

Volumen: 25  $\mu$ l

1x tampón PCR (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.)

3 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

250  $\mu$ M dNTPs (Promega)

1.0  $\mu$ M Sonda (LATE-PCR solamente)

dilución 10x de tinte SYBR green (FMC Bioproducts, Rockland ME, EE.UU)

1.25 unidades ADN polimerasa Taq platino (Invitrogen)

1  $\mu$ l solución lisis ADN (equivalente a ~10 genomas de ADNmt)

Iniciadores: para LATE-PCR, 50 nM iniciador limitante y 1000 nM iniciador en exceso.

Secuencias de oligonucleótidos

HV1H: iniciador limitante, iniciador en exceso y Sonda como en el Ejemplo 11.

5 Mezcla de reacción de secuenciación por ciclo

Como en el Ejemplo 11.

10 Secuenciación didesoxi

Como en el Ejemplo 11.

Amplificación por LATE-PCR y preparación de la secuenciación

15 Como en el Ejemplo 11. Los datos fluorescentes sin procesar tanto de CY5 como de SYBR green se usaron para determinar la cantidad de producto disponible en una reacción de secuenciación. Se usó la relación CY5/SYBR green para normalizar todas las fluctuaciones en los datos sin procesar.

Resultados

20

En la Fig. 20 se presenta los datos de fluorescencia de las amplificaciones por LATE-PCR, paneles A y B. En la Fig. 20A, por ejemplo, la línea 201 muestra todos los datos representados gráficamente del vástago de pelo frente a los números de ciclos de amplificación como la relación ADNmc/ADNbc (señal de sonda con respecto a señal de tinte). Este método de análisis minimiza la variación debida a cuándo se comienza la amplificación exponencial, o en qué nivel se alcanza la meseta, y demuestra que la eficacia de la amplificación del ADNmc es prácticamente la misma en todas las muestras excepto la única que comienza muy tarde.

25

La Fig. 20B representa un método para controlar un conjunto de ensayo de LATE-PCR para establecer su facilidad para la secuenciación de diluir y ejecutar. La gráfica muestra las relaciones calculadas de ADNmc/ADNbc (señal de sonda con respecto a señal de tinte frente a señal de tinte) para todas las muestras amplificadas en el ciclo 45 (cuadrados) y en el ciclo 65 (rombos). Sólo las muestras que presentan relaciones de entre 0.06 y 0.10 y valores de SYBR de entre 300 y 600 (las del cuadro) están listas para la secuenciación. La Fig. 20B se extiende el uso del análisis cuantitativo de punto final (QE LATE-PCR) para demostrar que tras 65 ciclos, todas excepto una muestra tuvo suficiente ADNmc acumulado para su uso en la secuenciación de "diluir y ejecutar".

30

35

Ejemplo 13. Amplicones con Múltiples SNPs.

La sensibilidad del método de LATE-PCR y secuenciación de "diluir y ejecutar" puede distinguir una mezcla de amplicones que presentan múltiples SNP al nivel de resolución del 10%. Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de un vástago de pelo humano de 2 mm o una única huella dactilar humana adherida a un portaobjetos de vidrio. Todas las amplificaciones fueron por LATE-PCR, y el producto se sometió directamente a secuenciación didesoxi. Las mezclas finales de la reacción de amplificación, las secuencias de oligonucleótidos (HV1-H), la mezcla de reacción para secuenciación por ciclos, y la secuenciación didesoxi, y la amplificación por LATE-PCR y la preparación de la secuenciación se realizaron todos como en el Ejemplo 11.

40

45

Las mezclas desde 10:90 hasta 90:10 de los productos de LATE-PCR monocatenarios de cada una de las tres reacciones se secuenciaron usando el protocolo didesoxi de "diluir y ejecutar" descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Fig. 21 y Fig. 22.

La Fig. 21 muestra un segmento de 10 bases que comprende las bases 16320 y 16311 de la mezcla 50:50 de linfocitos de sangre humana y huella dactilar humana. Las alturas de pico reflejan las alturas 100% reales en la secuencia de didesoxi y no las alturas iguales esperadas de una mezcla 50:50. La línea 211 muestra el pico para la base G en esta secuencia y la línea 202 muestra el pico para la base A en la misma posición en la secuencia. El pico 212 es mayor que el pico 211 en una mezcla 50:50 de linfocitos de sangre humana y vástago de pelo humano que presentan diferentes secuencias genéticas, debido a las características fluorométricas de la secuenciación didesoxi como puede demostrarse mediante el análisis de las secuencias puras para la misma región.

50

La Fig. 22 muestra los porcentajes recíprocos (90:10, 70:30, 50:50, 30:70 y 10:90) de dos muestras en cada una de las cinco ubicaciones de los SNP. La muestra 1 procede de un vástago de pelo humano y la muestra 2 procede de una huella dactilar humana de otro individuo. Las alturas de cada pico en cada posición se midieron a partir de las impresiones de las secuencias didesoxi y se representaron después a escala basándose en la misma base de una muestra 1 al 100% o una muestra 2 control al 100%. En la Fig. 22, la línea 222 es el porcentaje previsto de la muestra 1 en la mezcla representada gráficamente frente al porcentaje previsto de la muestra 2 en la mezcla. La línea 221 es una línea ajustada a los resultados reales, es decir, el porcentaje observado de la muestra 1 en la mezcla representado gráficamente frente al porcentaje previsto de la muestra 2. El porcentaje observado para cada porcentaje previsto de la muestra 2 es de cinco puntos, uno para cada base. Los datos demuestran que hay muy poca dispersión entre las diferentes bases en cada porcentaje, pero los datos muestran también que la línea 221 de los valores observados no caen en la parte superior de la línea de los valores pronosticados (línea 222), probablemente debido a que la cantidad de la muestra 1 y muestra 2 en la mezcla no fueron exactamente iguales.

#### Ejemplo 14. Distinción de mezclas.

Para distinguir las muestras consistente de un 100% de ADN genómico heterocigoto a partir de muestras consistente de 90% de ADN heterocigoto y un 10% de ADN genómico homocigoto para un único cambio de nucleótido, se creó en primer lugar una mezcla de ADN consistente de un 90% de ADN heterocigoto para el sitio SNP rs858521 ubicado en el cromosoma 17 humano (alelos C/G) más un 10% de ADN homocigoto para el mismo sitio SNP (alelos C/C). El sitio SNP se enumera en la base de datos de dbSNP del NCBI accesible a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=SNP>. Esta mezcla de ADN se preparó mezclando concentraciones coincidentes de los ADN heterocigotos y homocigotos correspondientes proporcionados por el Laboratorio Reid en la Universidad de Washington en Seattle. Para fines de mezclado se estimaron las concentraciones de ADN para cada ADN genómico basándose en los valores de Ct de la fluorescencia de SYBR derivados del análisis en tiempo real de las muestras de LATE-PCR similar a lo descrito más abajo. Una vez que se preparó la mezcla de ADN, se realizaron reacciones de LATE-PCR repetidas que contenían ya sea un 100% de ADN heterocigoto o 90% de ADN heterocigoto + un 10% de ADN homocigoto. Cada muestra de LATE-PCR consistió de tampón Taq Platinum 1X (Invitrogen, Carlsbad, California), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 μM mezcla dNTP, 0.24X SyberGold I (Invitrogen, Carlsbad, California), 200 nM reactivo de prevención de cebado defectuoso que denominamos compuesto elixir 9-3iDD, 1.25 unidades de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California), 1 μM iniciador en exceso rs858521, 50 nM iniciador limitante rs858521, y 2.4 μM sonda ResonSense frente al alelo G de SNP rs858521, y 1800 equivalentes de genoma del ADN genómico adecuado en un volumen final de 25 μl. La secuencia del iniciador en exceso rs858521 es 5' CAATCCCTTGACCTGTTGTGGAGAGAA 3' (sec. con núm. de ident. 29)

La secuencia del iniciador limitante rs858521 es 5' TCCCCAGAGCCCAGCCGGTGTCAATTTTC 3'(sec. con núm. de ident. 30)

La secuencia de la sonda ResonSense frente al alelo G SNP rs858521 es 5' [Cy5] CTTACAGCTCAAACAATA [Phos] (sec. con núm. de ident. 31)

La secuencia de reactivo de prevención de cebado defectuoso es 5' DabcyI-CGCTATAATGAAATTATAGCG-DabcyI (sec. con núm. de ident. 32)

Estas muestras se sometieron a la amplificación con un instrumento ABI 7700 usando un perfil de ciclado térmico consistente de un ciclo de 95°C durante 3 min, seguido por 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 66 °C durante 10 segundos y 72°C durante 20 segundos. Al final de la reacción, se fundió la reacción desde 95°C hasta 25 °C a intervalos de 1°C durante 1 min. a cada temperatura con adquisición de fluorescencia en el canal de Cy5. Las señales de fluorescencia de Cy5 recortadas sin corrección de los valores iniciales se exportaron al programa informático Excel. El cálculo de la primera derivada de las señales de fluorescencia se realizó restando las señales de fluorescencia de una temperatura de las señales de fluorescencia de la siguiente temperatura durante la fusión. Los resultados se muestran en la Fig. 23, paneles A y B. La Fig. 23A muestra la gráfica de la primera derivada de las señales de fluorescencia contra la temperatura, es decir, las curvas de fusión. Las curvas de fusión en la Fig. 23A se suavizaron usando la función promedio móvil de Excel para eliminar el ruido debido a las fluctuaciones térmicas en el ABI 7700. La Fig. 23A representa los picos de fusión correspondientes a la unión de la sonda con su objetivo del alelo G apareado a temperaturas superiores y al objetivo del alelo C mal emparejado a temperaturas inferiores. La Fig. 23A muestra que las muestras 90% heterocigotas + 10% homocigotas, círculo 231, muestran un pico del alelo G inferior y un pico de fusión del alelo C superior con respecto a las alturas de los picos de fusión del alelo C y el alelo G en las muestras 100% heterocigotas, círculo 232. Estas diferencias están de acuerdo con la proporción superior esperada del alelo C en la muestra 90% heterocigotas + 10% homocigotas

(55% de alelo C: 45% de alelo G) en comparación con la muestra 100% heterocigotas (50% de alelo G: 50% de alelo C). La relación de la altura del pico del alelo C con respecto a la altura del pico del alelo G se muestra en una gráfica de barras en la Fig. 23B. El conjunto de barras de la derecha son de las muestras 90% heterocigotas + 10% homocigotas, correspondiente al círculo 231. Las barras más oscuras de la izquierda son para las muestras 100% heterocigotas. Los recuadros de error convencional 233 y 234 se muestran en los conjuntos de barras, respectivamente. Esta relación distingue muestras 100% heterocigotas de muestras 90% heterocigotas + 10% homocigotas con un 99.7% de certeza basándose en la falta de solapamiento de los recuadros de error que reflejan tres desviaciones estándar del error de la media.

Ejemplo 15. Sensibilidad de las reacciones de LATE-PCR a la concentración inicial de la polimerasa.

Se realizaron ampliaciones por PCR utilizando un instrumento ABI 7700 para amplificar el amplicón de 549 bases designado como HVI-H dentro de la región de bucle-d del ADN mitocondrial humano. Las mezclas de reacción para ADN genómico humano, secuencias de oligonucleótidos (HVI-H) y ampliaciones por LATE-PCR se realizaron como se describe en el ejemplo 11, excepto que las unidades de Taq ADN polimerasa Platinum variaron entre las muestras, de la siguiente forma: 0.125, 0.250, 0.375, 0.50, 0.625 y 1.25 unidades.

Se realizaron los análisis de la curva de fusión (fluorescencia de SYBR green contra temperatura). Las curvas de fusión mostraron cómo la concentración de Taq influyó en la especificidad del producto de ADNbc para esta reacción de LATE-PCR. A medida que la concentración de Taq Platinum disminuyó desde 1.25 unidades hasta 0.375 unidades, la especificidad de la reacción aumentó, tal como se refleja en los picos de fusión de las repeticiones. Disminuir la concentración, hasta 0.250 unidades, también disminuyó la especificidad. A 0.125 unidades, no se produjo la reacción. La mayor especificidad se produjo con una concentración de Taq de 0.375 unidades.

Ejemplo 16. Variación de la pendiente en función de la concentración de Taq en una LATE-PCR en tiempo real y en una LATE-PCR dúplex en tiempo real.

Se diseñó un ensayo de LATE-PCR dúplex en tiempo real para la amplificación simultánea de secuencias dentro de exones de los genes Oct4 y Xist murinos (número de registro de GenBank NM 013633 y L04961, respectivamente). Se ejecutó cada reacción en un volumen final de 50  $\mu$ l y contuvo los siguientes reactivos: 1 X tampón de PCR (Invitrogen, Carlsbad, California) compuesto por 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, y 50 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de cada dNTP, 50 nM iniciador limitante Oct4 que presenta la secuencia 5' TGGCTGGACACCTGGCTTCAGACT 3' (sec. con núm. de ident.: 33), 2  $\mu$ M iniciador en exceso Oct4 que presenta la secuencia 5' CAACTTGGGGGACTAGGC 3' (sec. con núm. de ident.: 34), 100 nM iniciador limitante Xist que presenta la secuencia 5' GGTCGTACAGGAAAAGATGGCGGCTCAA 3' (sec. con núm. de ident.: 35), 2  $\mu$ M iniciador en exceso Xist que presenta la secuencia 5' TGAAAGAAACCACTAGAGGGCA 3' (sec. con núm. de ident.:36 ), 1  $\mu$ M de una sonda de baliza molecular de Oct4 de bajo punto de fusión que presenta la secuencia 5' TET-CCG CCT GGG ATG GCA TAC TGT GGA AGG CGG-Dabcyl 3' (sec. con núm. de ident.: 37) y 300 nM de un reactivo de prevención del cebado defectuoso (que se denomina compuesto 9-3bDD) que presenta la secuencia 5'Dabcyl-CGTTATAATGAAATTATAACG-Dabcyl 3' (sec. con núm. de ident. 38 ). Se incluyó también en la mezcla de PCR la Taq ADN polimerasa Platinum® en complejo con anticuerpo (Invitrogen, Carlsbad, California) a concentraciones de 1, 2 o 3 unidades por ensayo). No se añadió en este ejemplo una sonda de baliza molecular para la detección de amplicones de Xist.

En paralelo con estas LATE-PCR dúplex, se realizó también una serie de ensayos de amplificación por LATE-PCR del único amplicón de Oct4. Estos ensayos tuvieron idéntica composición que los ensayos dúplex mencionados anteriormente, excepto por la omisión del iniciador limitante de Xist y el iniciador en exceso de Xist.

Se añadió ADN genómico de ratón (Sigma, St Louis, Missouri) a todos los ensayos y se proporcionaron los moldes para la amplificación por PCR. Se calculó el número de genomas añadidos a cada tubo como 1000, basándose en un tamaño de 6 pg/genoma (ver Vendrely y Vendrely (1949) *Experientia* 5: 327-329).

Todos los ensayos se ejecutaron por duplicado. Se llevó a cabo la amplificación en un detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, California) con un perfil de ciclado térmico compuesto por 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos; 6 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 63°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos; y 54 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 25 segundos, 72°C durante 35 segundos y 45°C durante 30 segundos, con adquisición de la fluorescencia a 45°C en el canal de TET.

Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 24, que representa gráficamente las señales fluorescentes

generadas por la acumulación de amplicones de Oct4 a través de la hibridación con la sonda de baliza molecular TET-Oct4. Cuando sólo estuvo presente un par de iniciadores, el aumento de la concentración de Taq polimerasa desde 1 unidad/ensayo (círculo 241) hasta 2 unidades/ensayo (círculo 242) o 3 unidades/ensayo (círculo 243) tuvo el efecto de hacer la pendiente de las señales más pronunciada, debido a una eficacia de amplificación aumentada. Las señales identificadas por círculos 242 y 243 (2 y 3 unidades/ensayo, respectivamente) se intercalaron, lo que sugiere que se alcanzó la eficacia máxima aproximadamente en estos niveles. Como se esperaba, las pendientes de las líneas generadas por las reacciones dúplex (círculos 244, 245 y 246) fueron en todos los casos inferiores a las generadas por amplificación de un único amplicón, debido a que la Taq polimerasa se usó al doble de esa tasa. Como en el caso de la LATE-PCR de amplicón único, aumentar la concentración de Taq en la reacción doble desde 1 unidad/ensayo (círculo 244) hasta 2 unidades/ensayo (círculo 245) o 3 unidades/ensayo (círculo 246) resultó en un aumento de la pendiente de la señal. No se experimentó ningún aumento adicional en la pendiente inicial de las 3 unidades/ensayo (círculo 246) en comparación con la pendiente inicial de las 2 unidades/ensayo (círculo 245), lo que sugiere de nuevo que se había alcanzado la eficacia máxima. Sin embargo, las muestras de 3 unidades/ensayo (círculo 246) alcanzaron rápidamente una meseta y la pendiente comenzó a disminuir, a diferencia de una de las muestras de 2 unidades/ensayo (círculo 245), lo que indica la probable aparición de cebado defectuoso en presencia de la concentración más alta de Taq probada, que no era el caso de las muestras 243, que contienen también 3 unidades de Taq/ensayo pero sólo un par de iniciadores. A pesar de la cantidad superior de Taq disponible en los ensayos de un único amplicón en comparación con los ensayos dúplex (que se usan 3 unidades para generar un amplicón en vez de dos amplicones al mismo tiempo), se produjo más cebado defectuoso en los ensayos dúplex debido a la adición de los iniciadores de Xist. Para obtener una eficacia máxima sin cebado defectuoso, es necesario por tanto optimizar la concentración de Taq polimerasa en consideración del número y secuencias de los iniciadores añadidos a la reacción.

## Reivindicaciones

- 5
1. Un método de detección homogéneo para detectar variantes alélicas de al menos una secuencia objetivo de ácido nucleico mediante el uso de un método de amplificación por PCR no simétrica, que comprende:
- 10
- (a) formar una mezcla de reacción de amplificación que incluye dicha al menos una secuencia objetivo de ácido nucleico, iniciadores para la amplificación por PCR no simétrica, y al menos una sonda de hibridación marcada con fluoróforo, tolerante a desajustes;
- 15
- (b) amplificar dicha secuencia objetivo de ácido nucleico mediante dicho método de amplificación por PCR no simétrica generando moléculas de amplicón monocatenarias;
- (c) detectar la emisión de fluorescencia a partir de dicha al menos una Sonda. a una primera temperatura de detección y una temperatura de detección inferior, en donde dicha sonda señala tras la hibridación debido a la excitación del marcador de fluoróforo de la sonda y se une a secuencias progresivamente más coincidentes a medida que la disminuye la temperatura, en donde dicha sonda es discriminante de alelo a dicha temperatura la primera detección y tolerante a desajustes a la temperatura de detección inferior debido a la  $T_m$  de la sonda para la secuencia objetivo; y
- 20
- (d) determinar la constitución alélica de dicha al menos una secuencia objetivo normalizando dicha emisión de fluorescencia de la sonda como una relación de las emisiones a dicha primera temperatura de detección y dicha temperatura de detección inferior y comparar la relación con las relaciones esperadas establecidas para los genotipos conocidos.
2. El método de la reivindicación 1 en donde la etapa de amplificar dicha secuencia objetivo de ácido nucleico incluye al menos una temperatura de hibridación del iniciador por encima de la primera temperatura de detección.
- 25
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el método de amplificación por PCR no simétrica es LATE-PCR.
- 30
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la mezcla de reacción comprende adicionalmente un tinte de ADN fluorescente y en donde dicha sonda señala tras la hibridación debido a la excitación indirecta del marcador de fluoróforo de la sonda por el tinte.
- 35
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha etapa para detectar la emisión de fluorescencia a partir de dicha sonda implica detectar la fluorescencia a dos temperaturas inferiores de la primera temperatura de detección, una temperatura baja y una temperatura intermedia, y dicha relación se determina por la fórmula  $(F_s - F_t)/(F_b - F_t)$ , donde  $F_t$  es la fluorescencia en dicha primera temperatura de detección,  $F_b$  es la fluorescencia en dicha temperatura baja, y  $F_s$  es la fluorescencia en dicha temperatura intermedia.
- 40
6. El método de la reivindicación 5 en donde la etapa de detectar la emisión de fluorescencia a partir de dicha sonda se lleva a cabo en tiempo real durante dicha etapa de amplificación de la secuencia objetivo de ácido nucleico.
7. El método de la reivindicación 5 en donde dicha etapa de detección se realiza después de la terminación de la reacción de amplificación como una detección de punto final.
- 45
8. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección se realiza después de la terminación de la reacción de amplificación como un análisis de fusión.

FIGURA 1

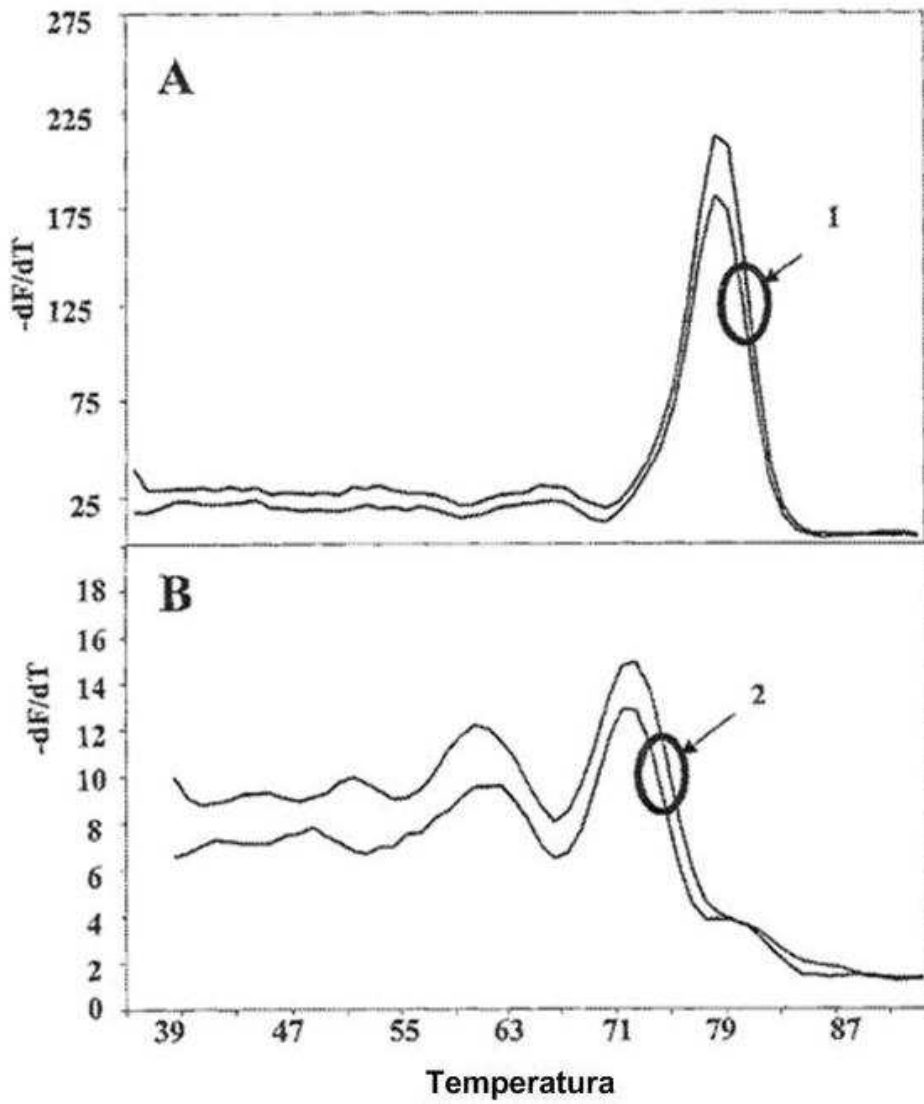


FIGURA 2

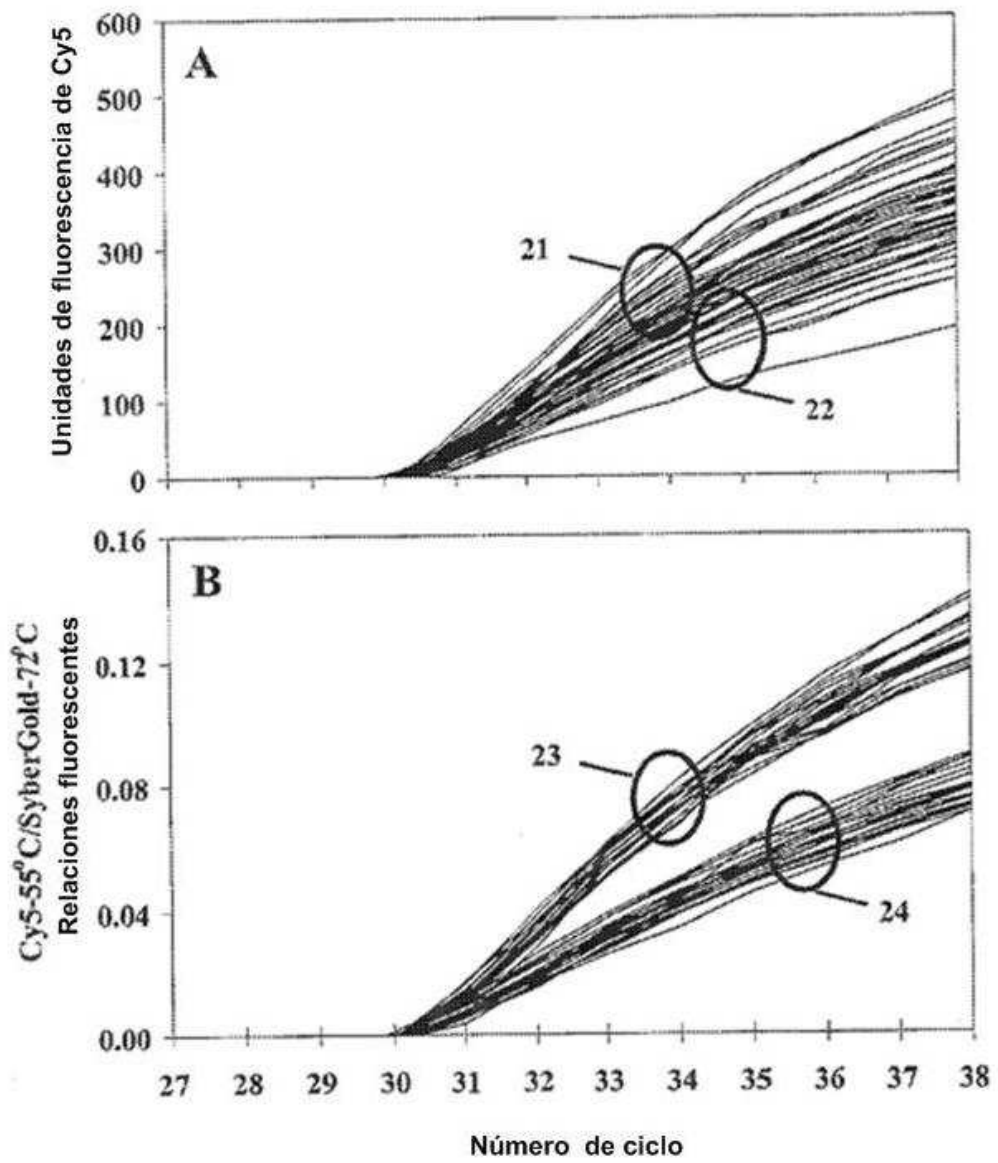




FIGURA 3

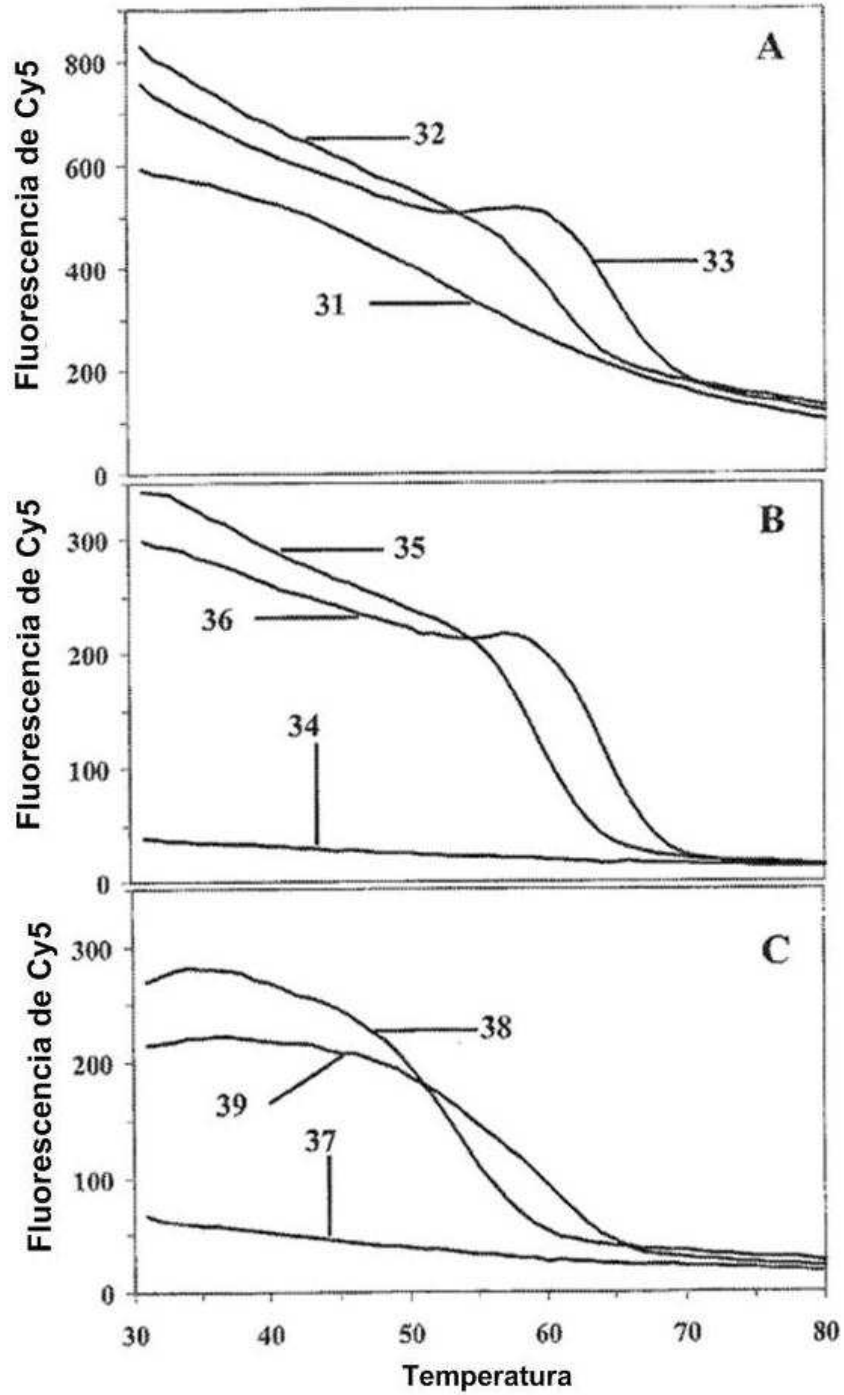


FIGURA 4

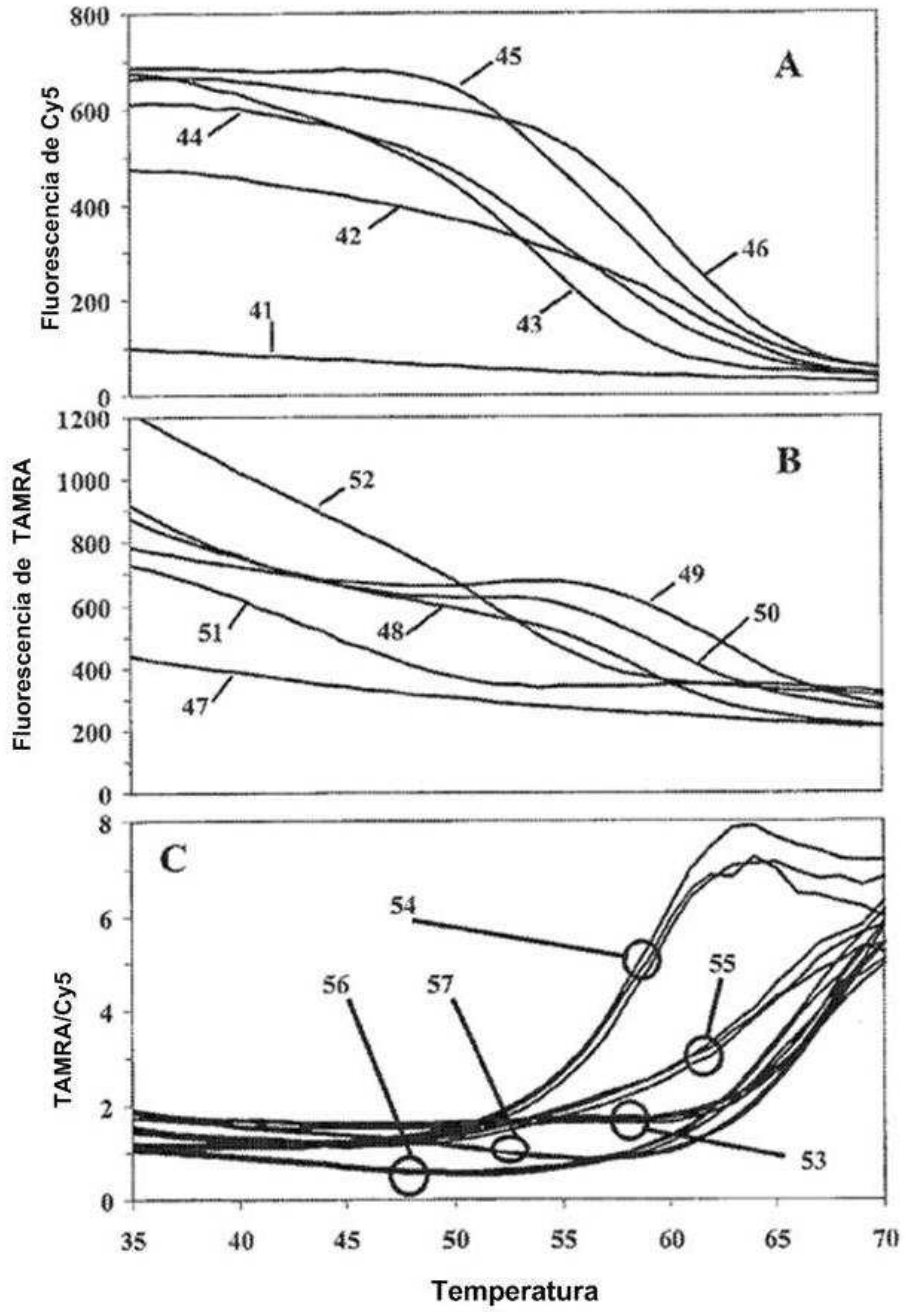


FIGURA 5

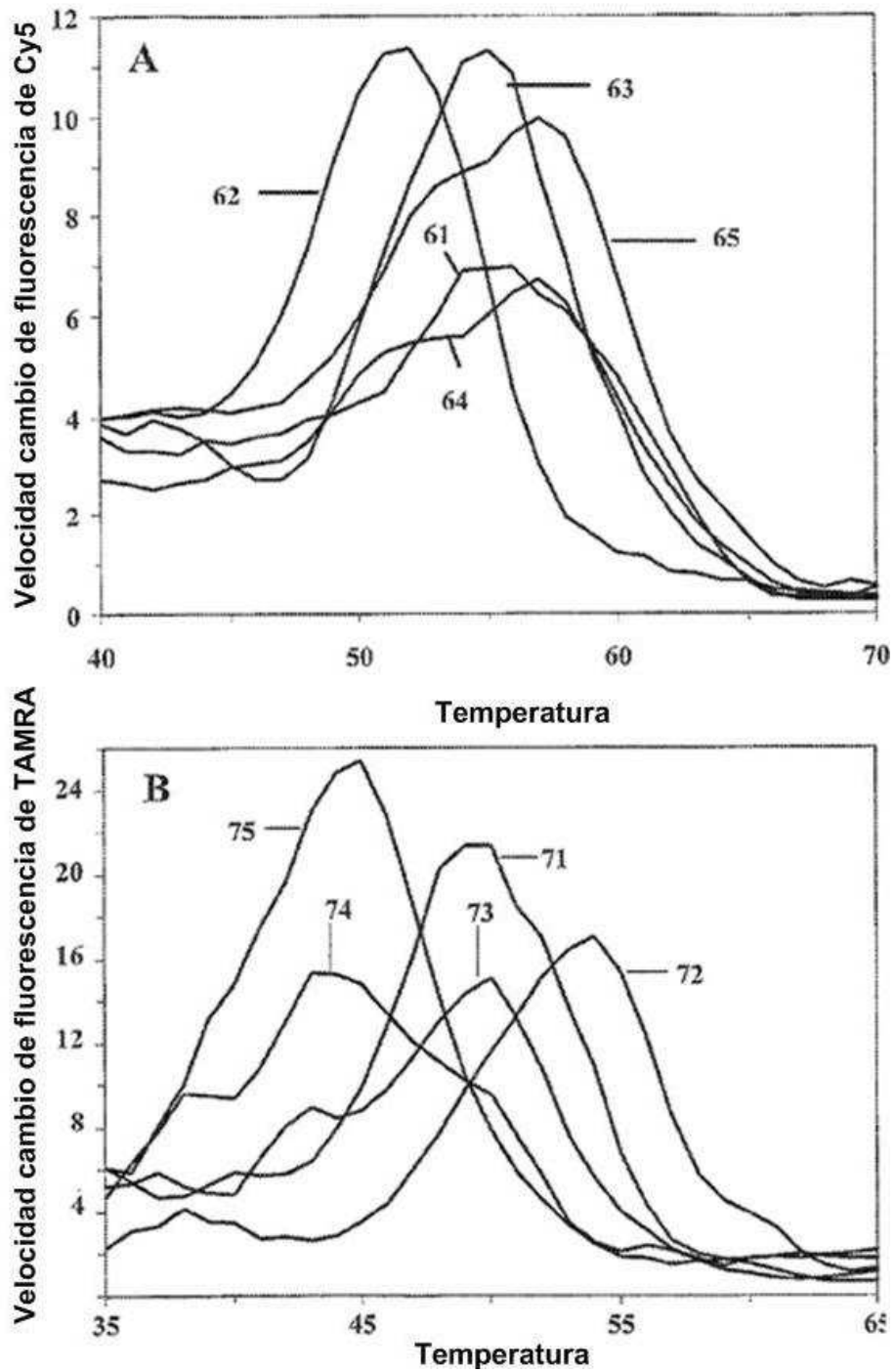


FIGURA 6

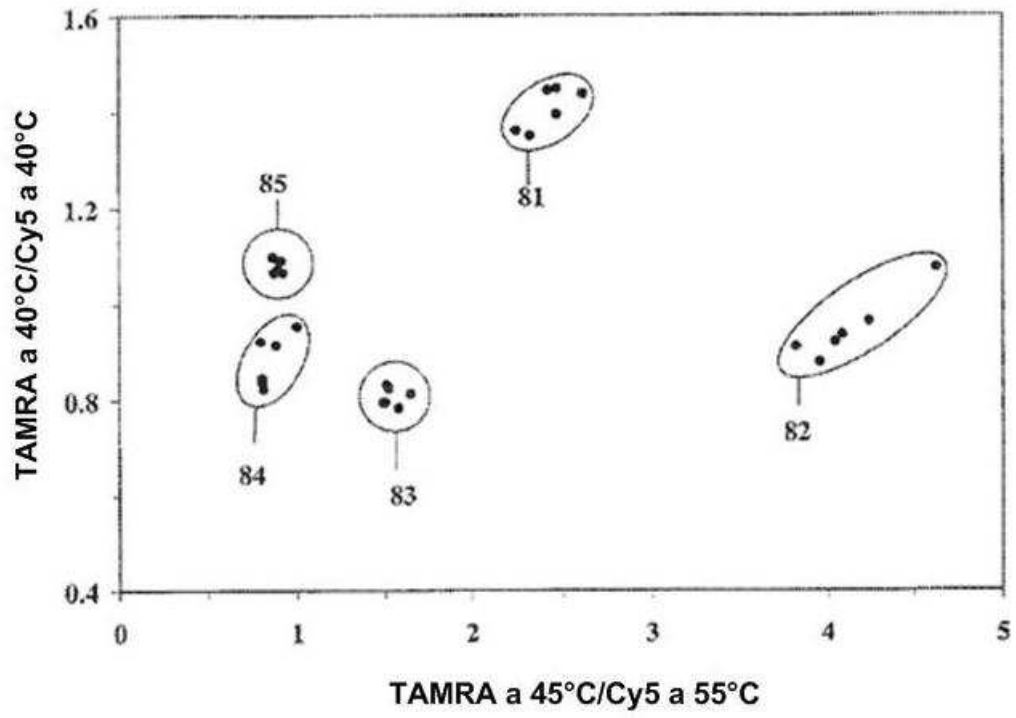


FIGURA 7

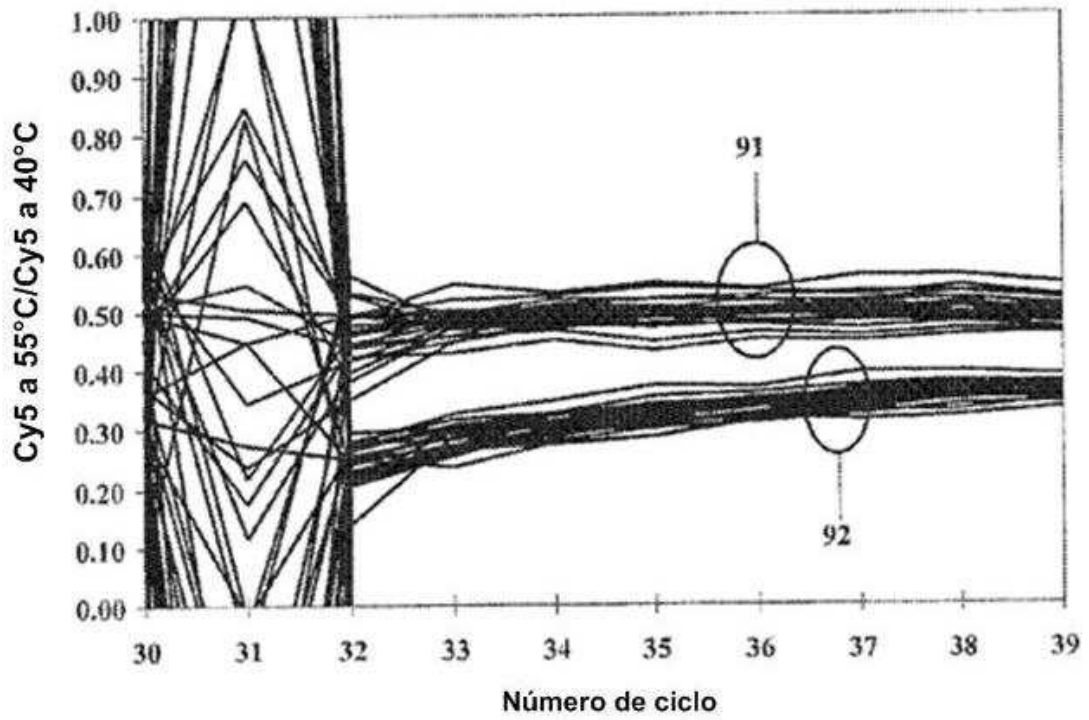


FIGURA 8

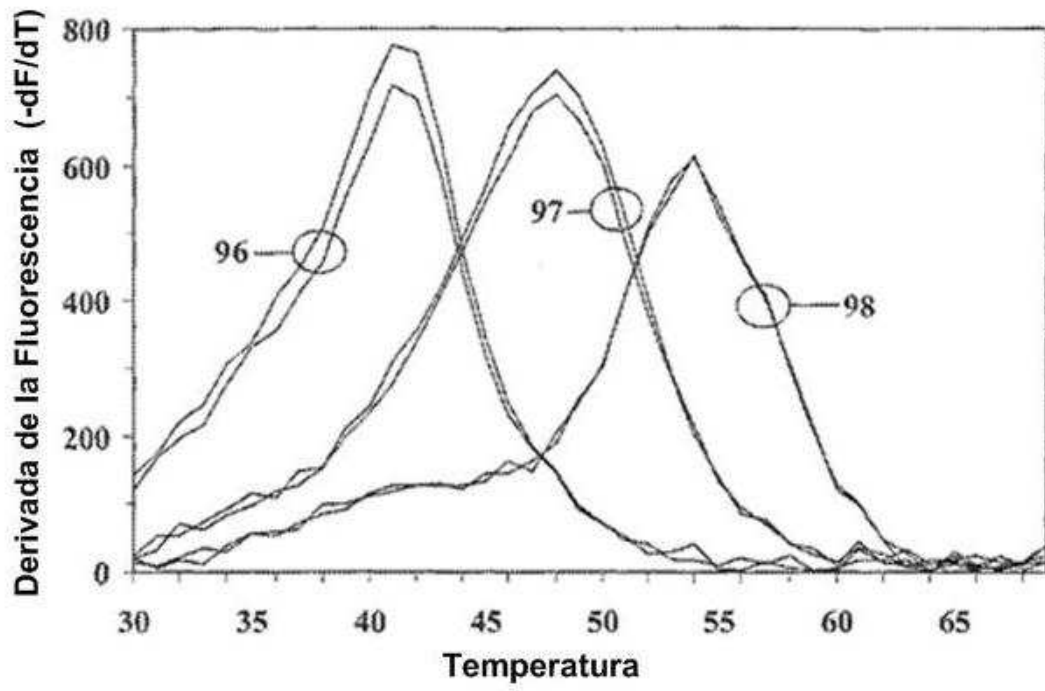


FIGURA 9

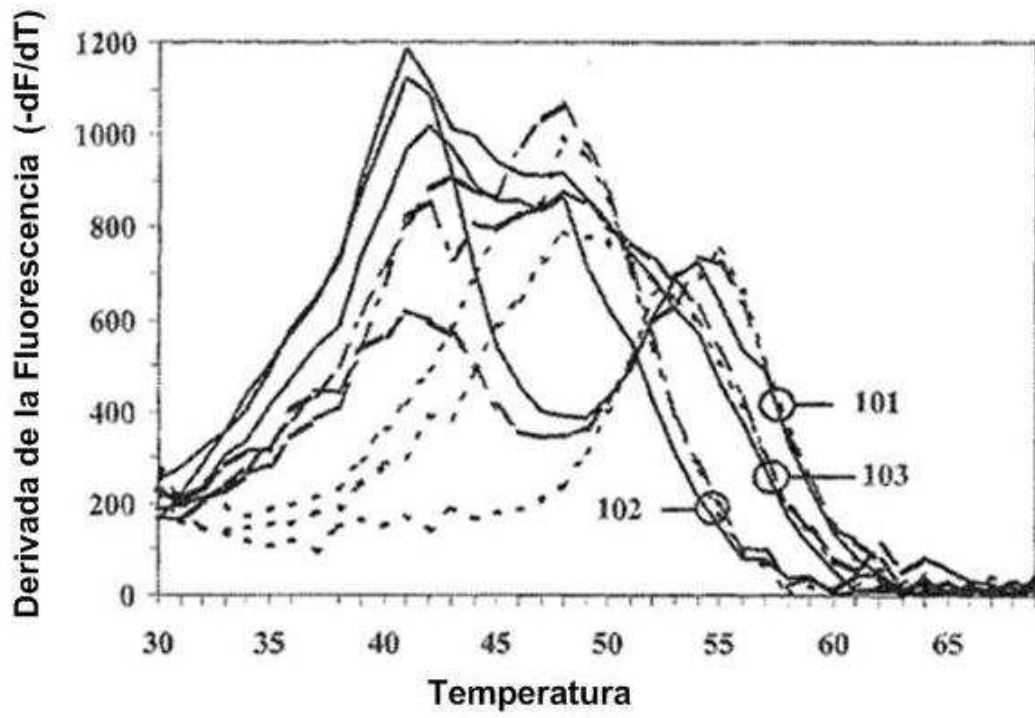


FIGURA 10

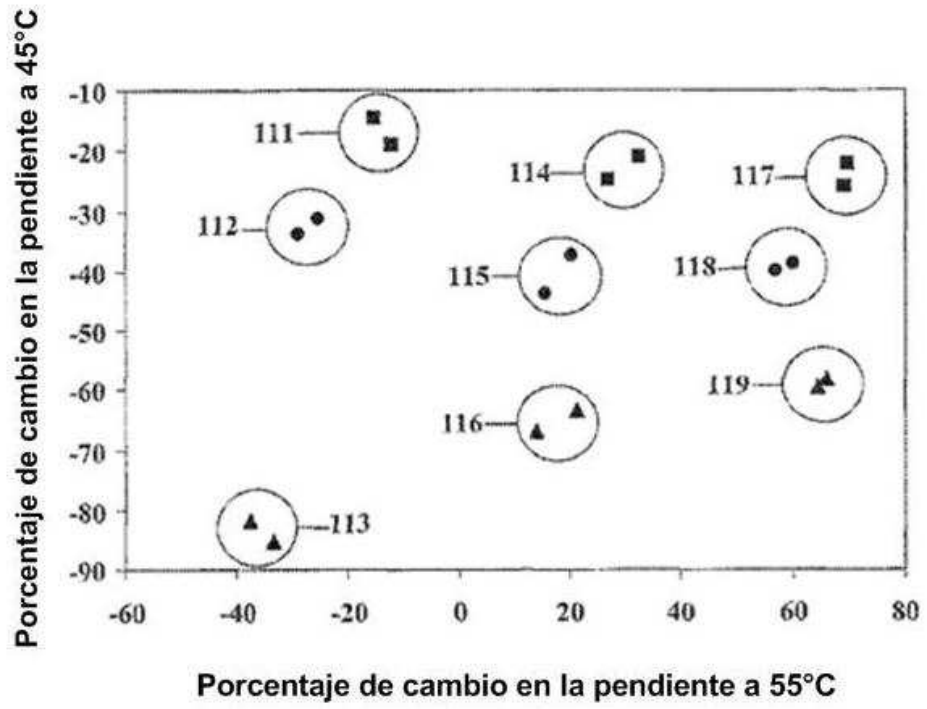




FIGURA 11

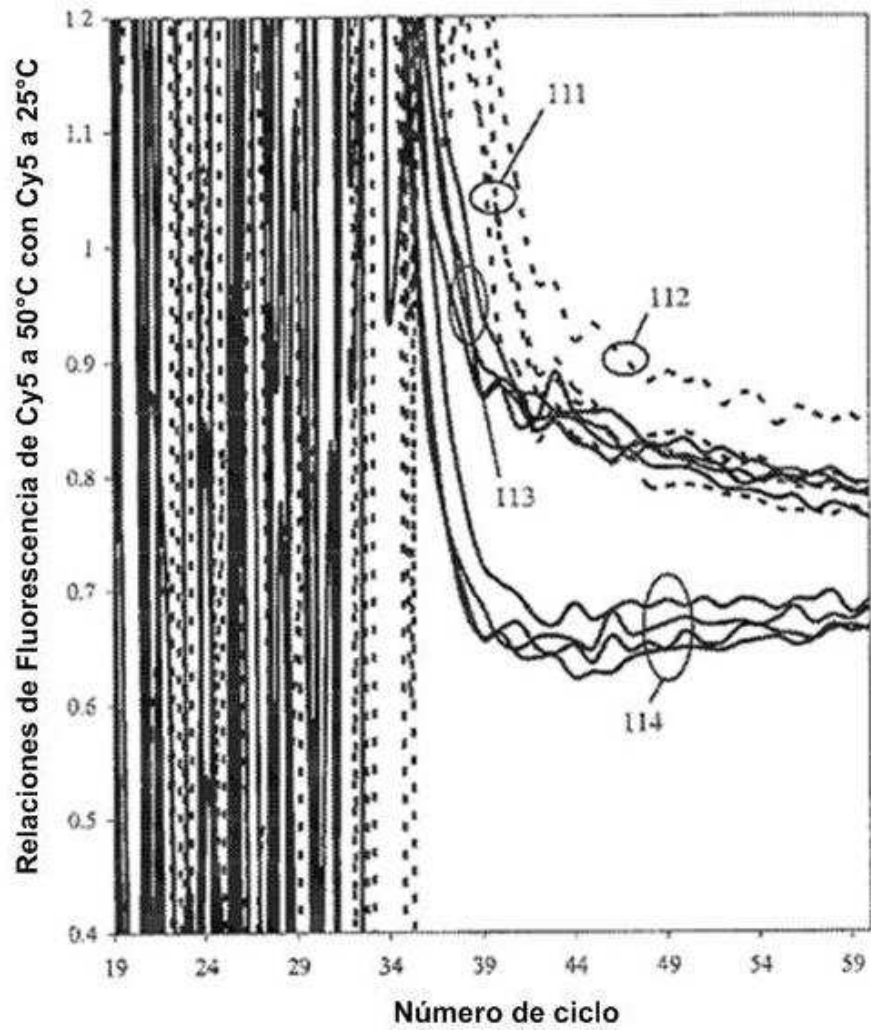


FIGURA 12

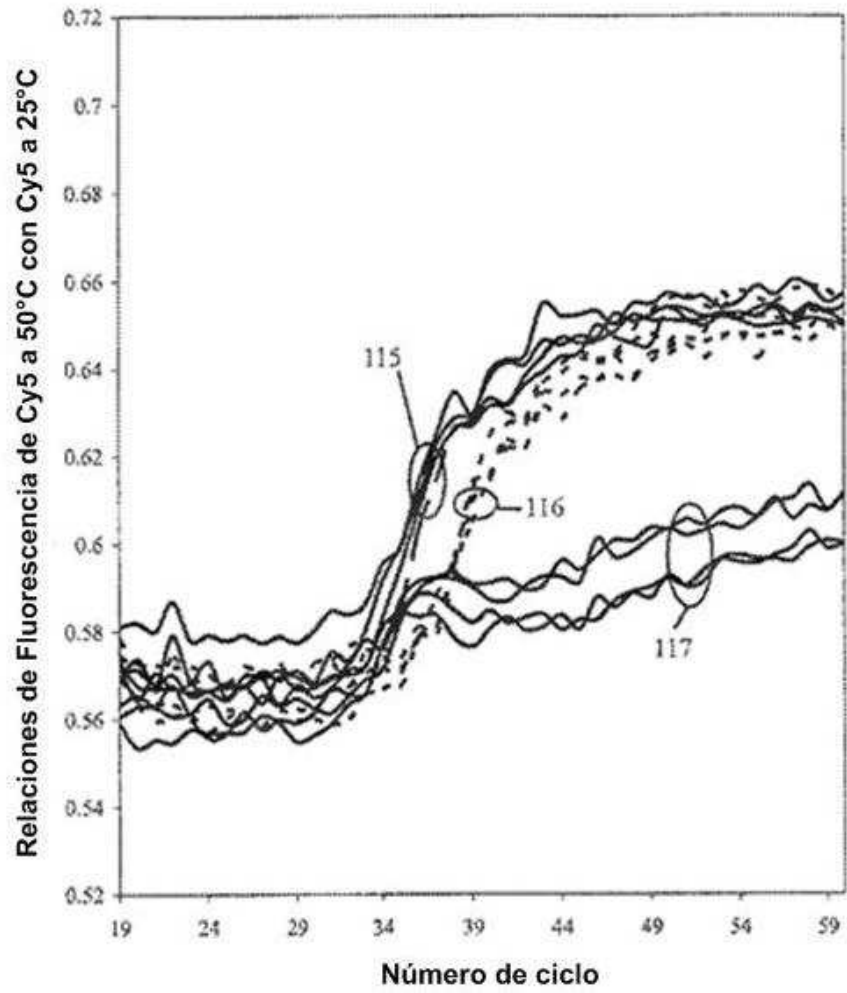


FIGURA 13

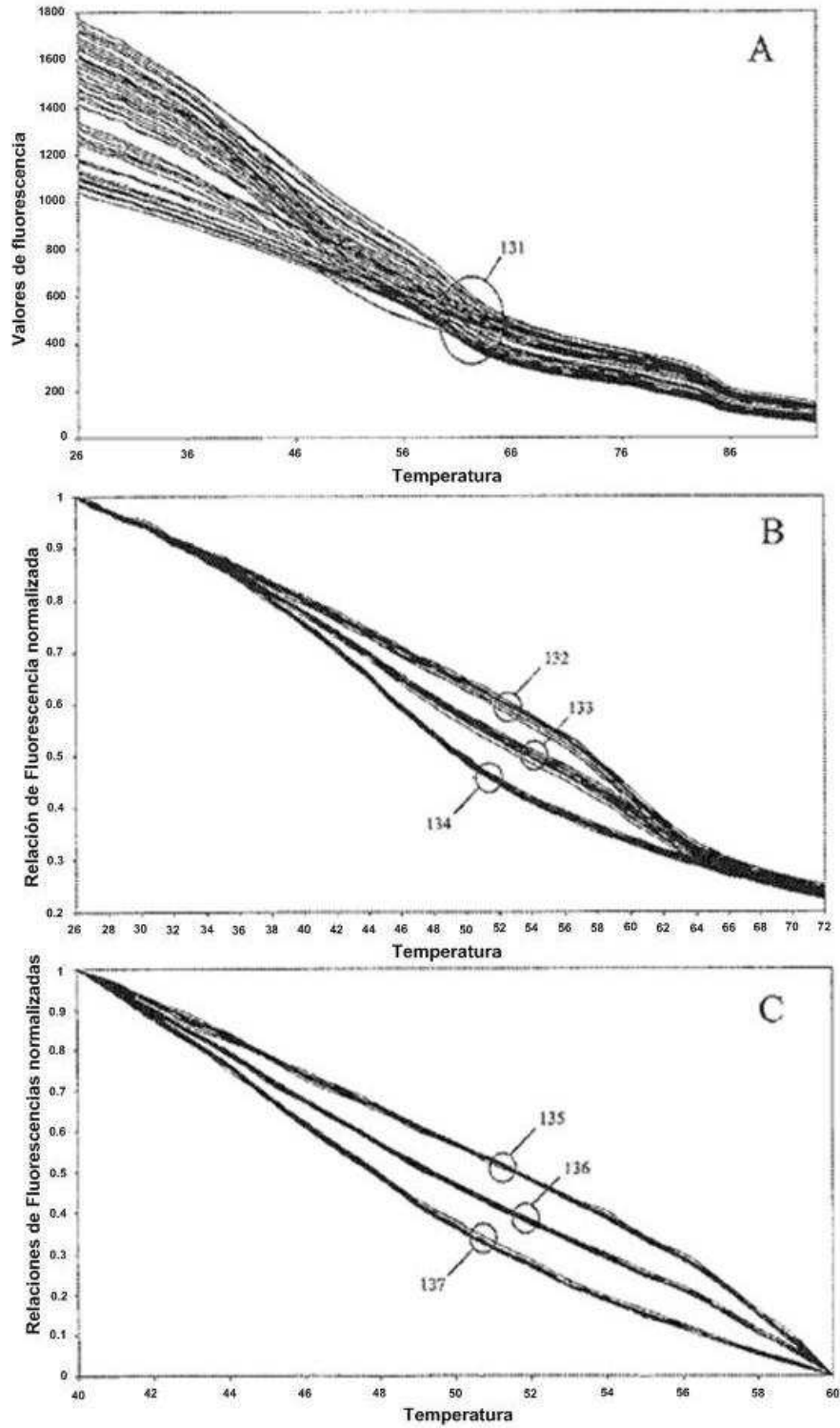
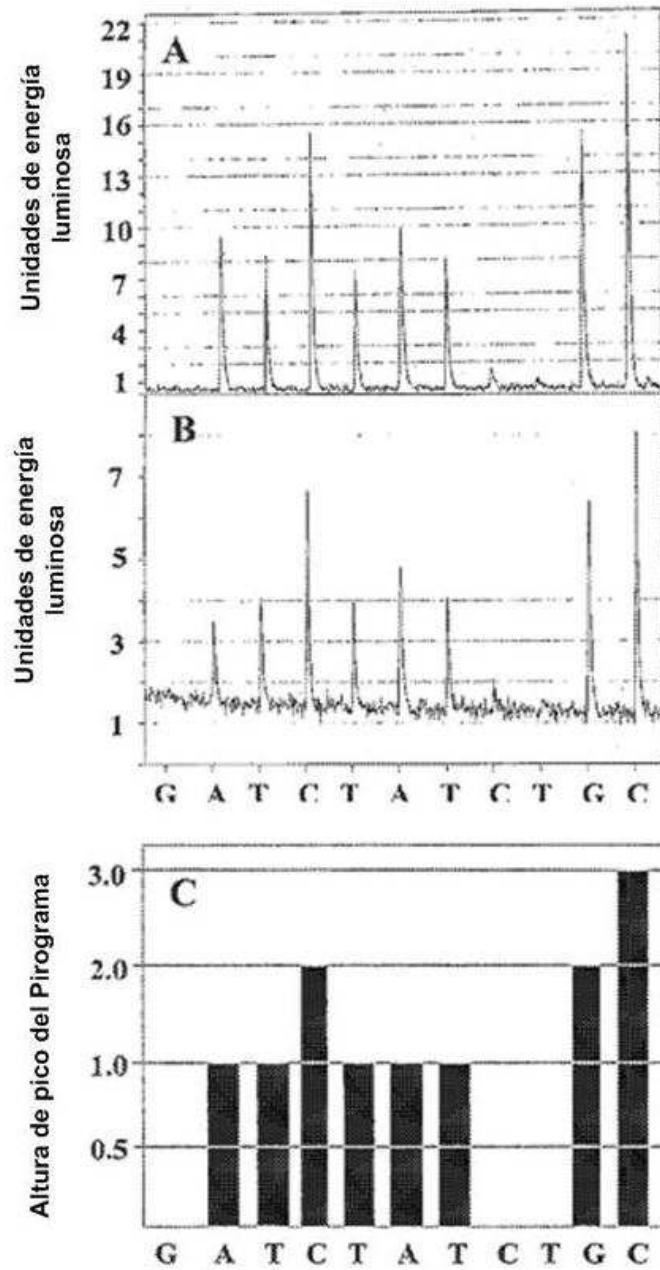
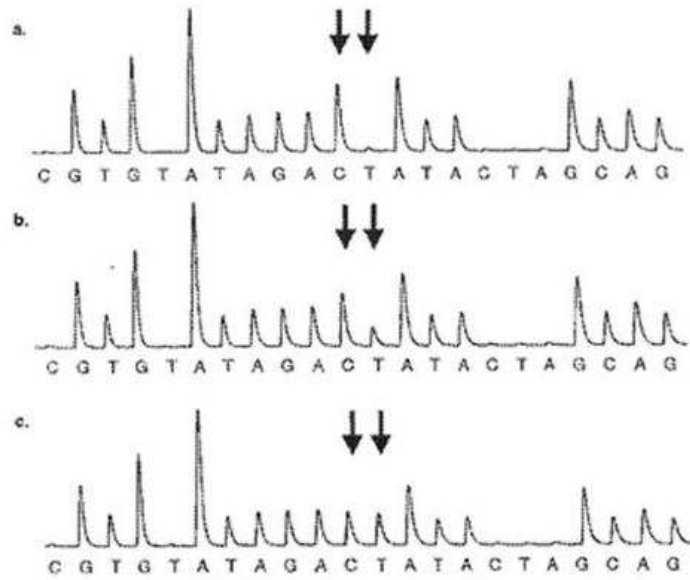


FIGURA 14



**FIGURA 15**



**FIGURA 16**

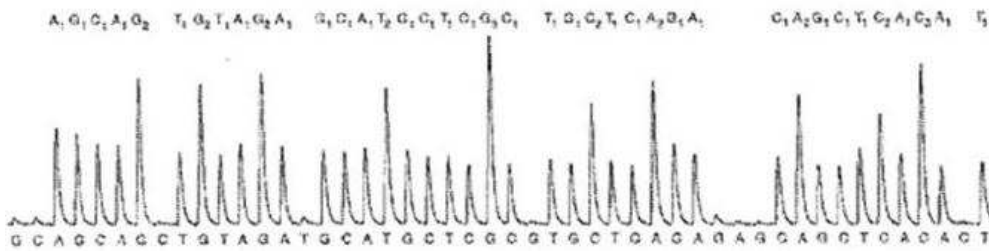
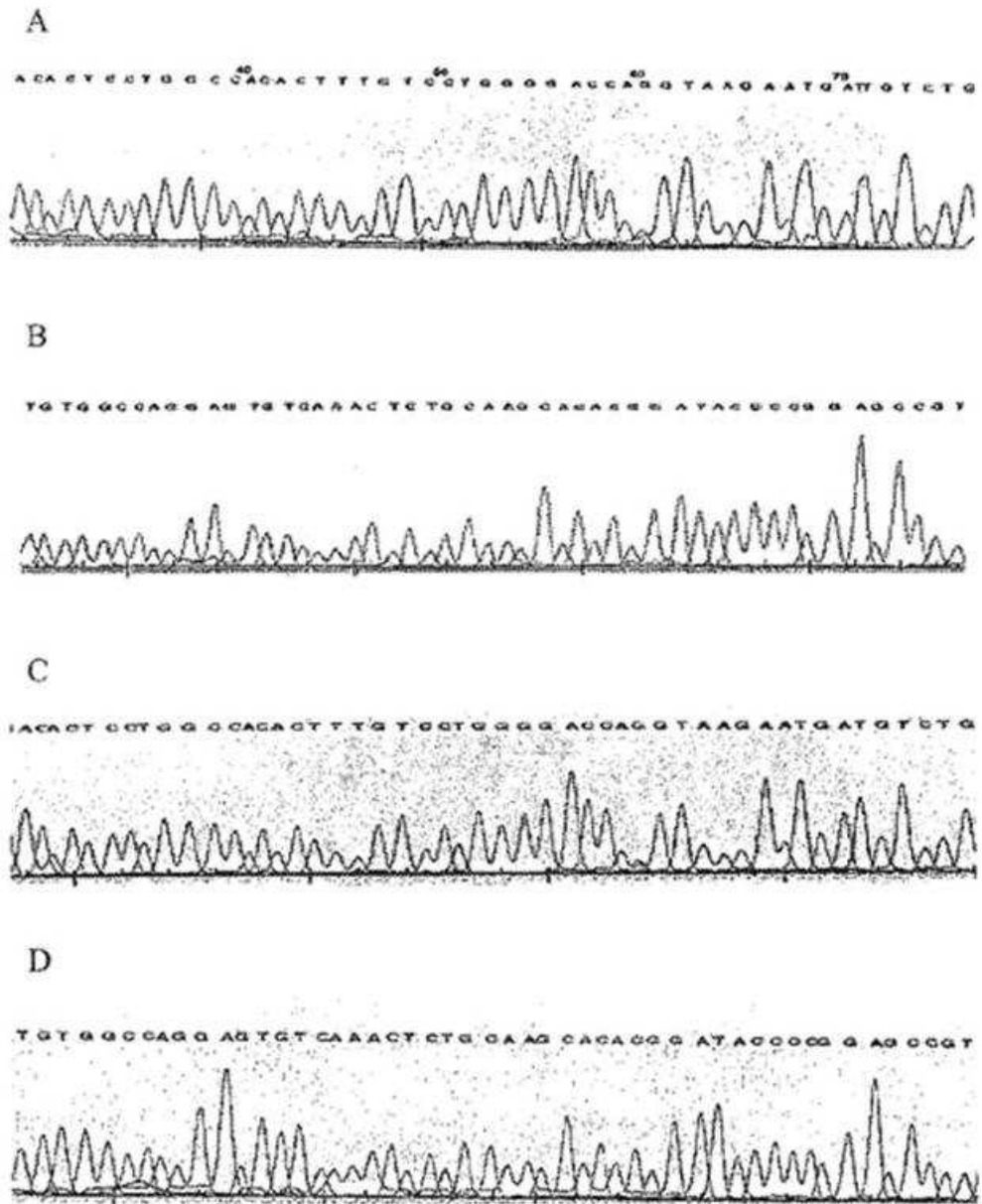
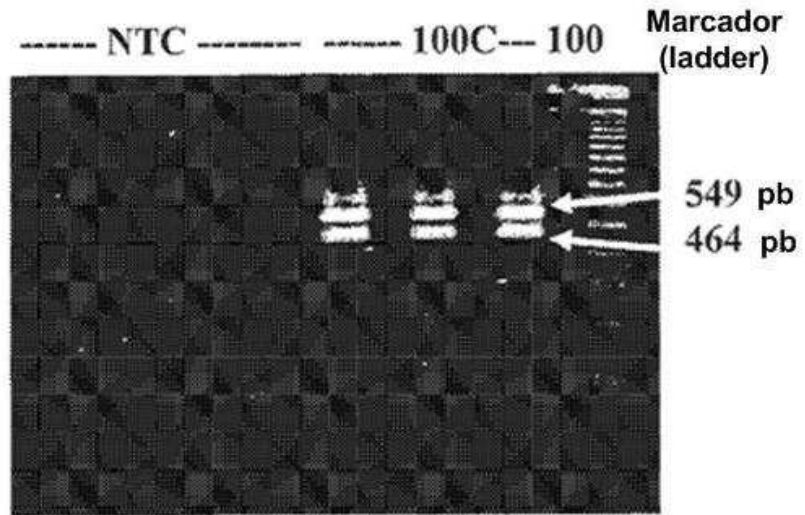


FIGURA 17



**FIGURA 18**



**FIGURA 19**

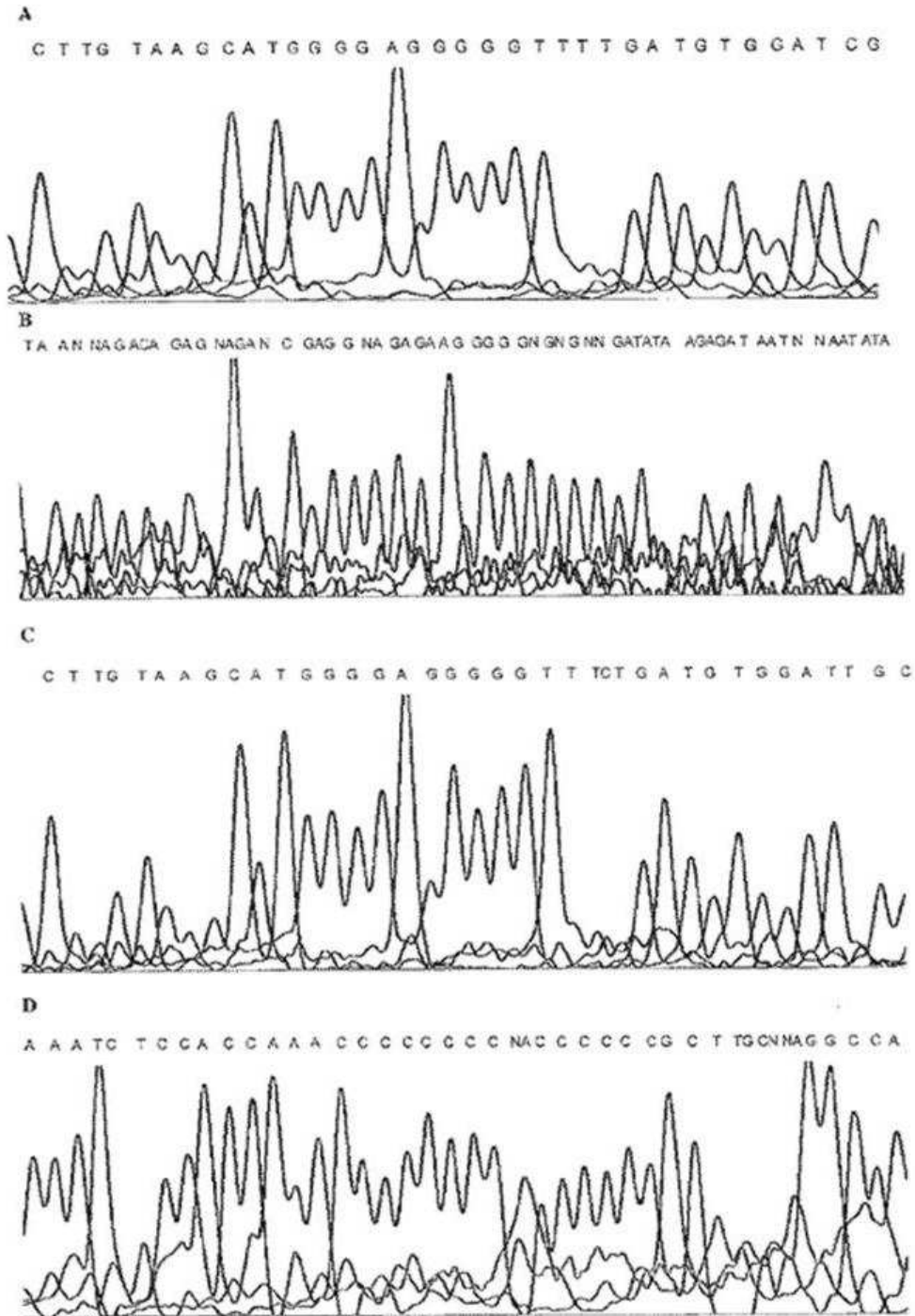
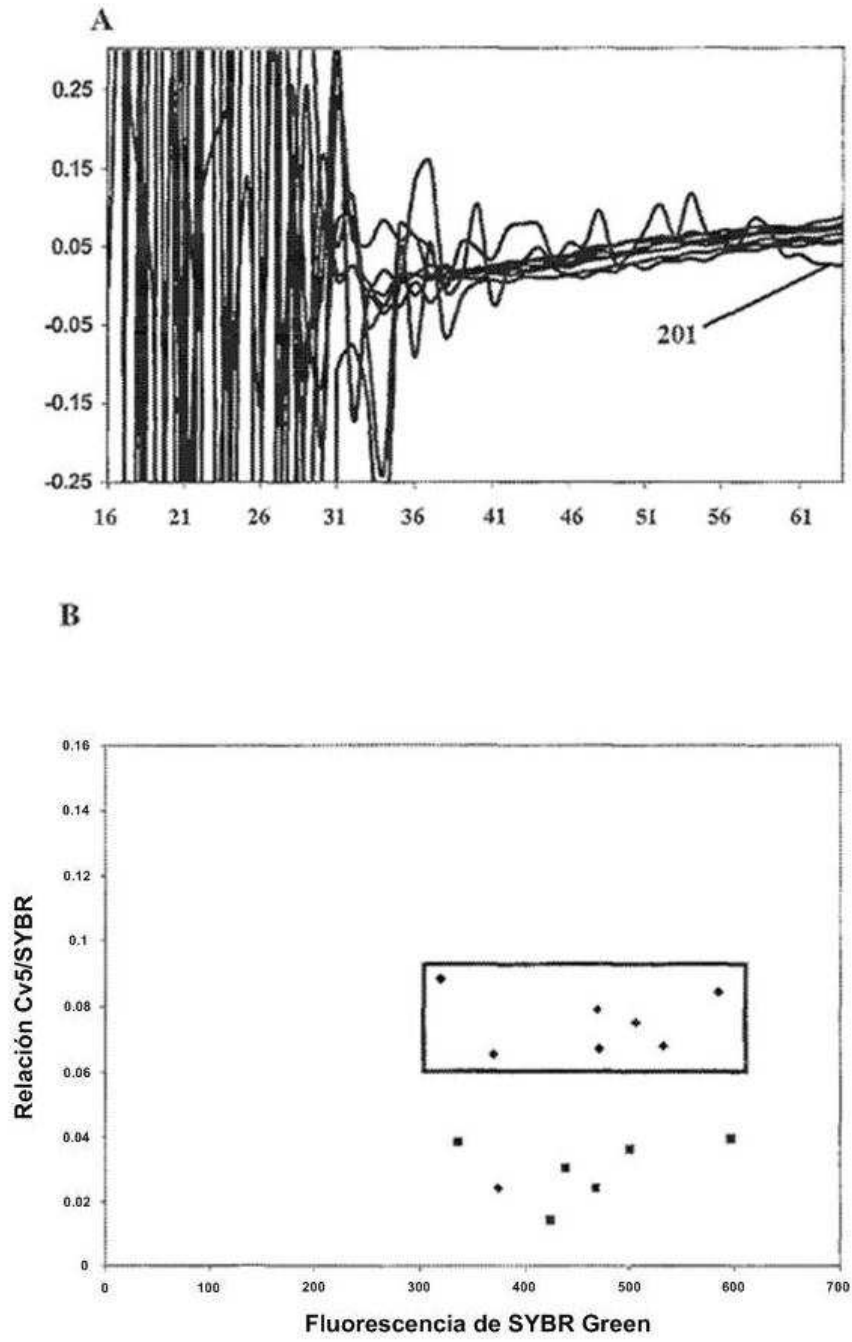




FIGURA 20



**FIGURA 21**

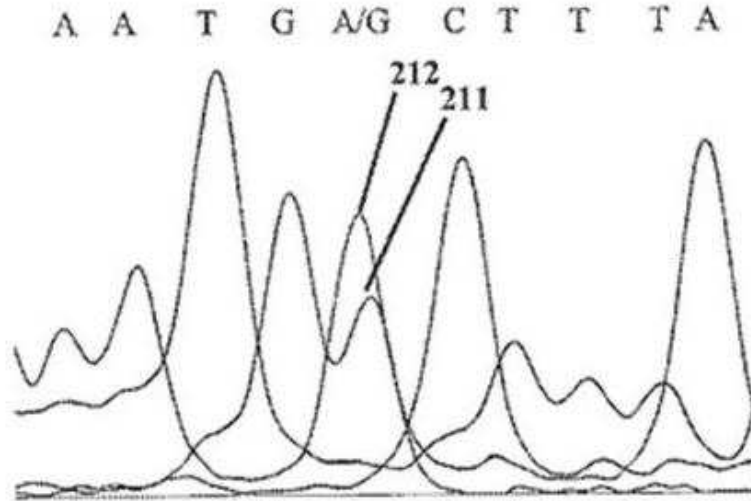


FIGURA 22

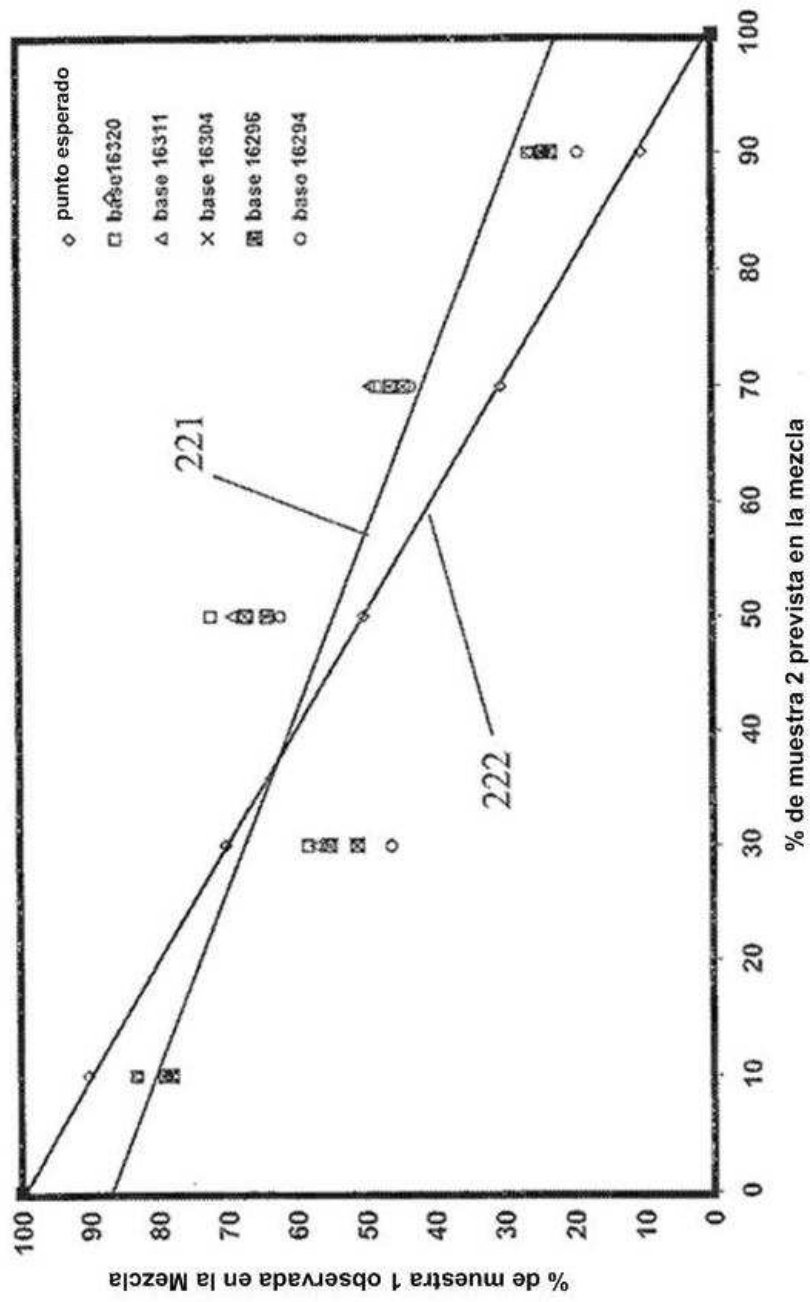


FIGURA 23

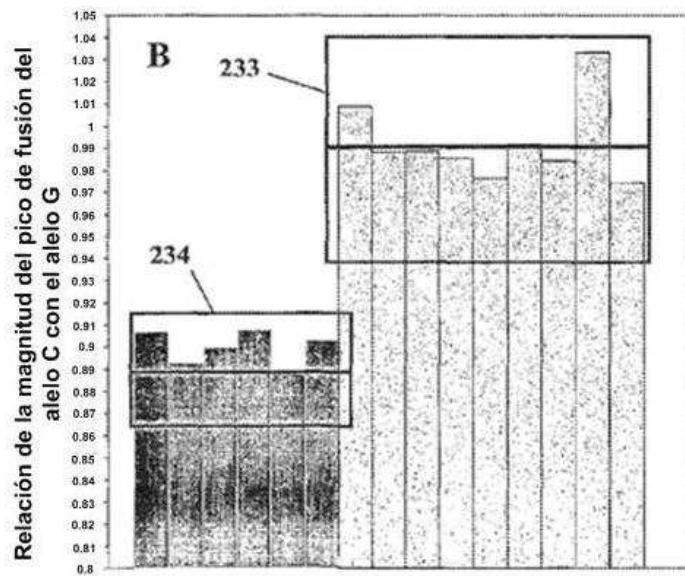
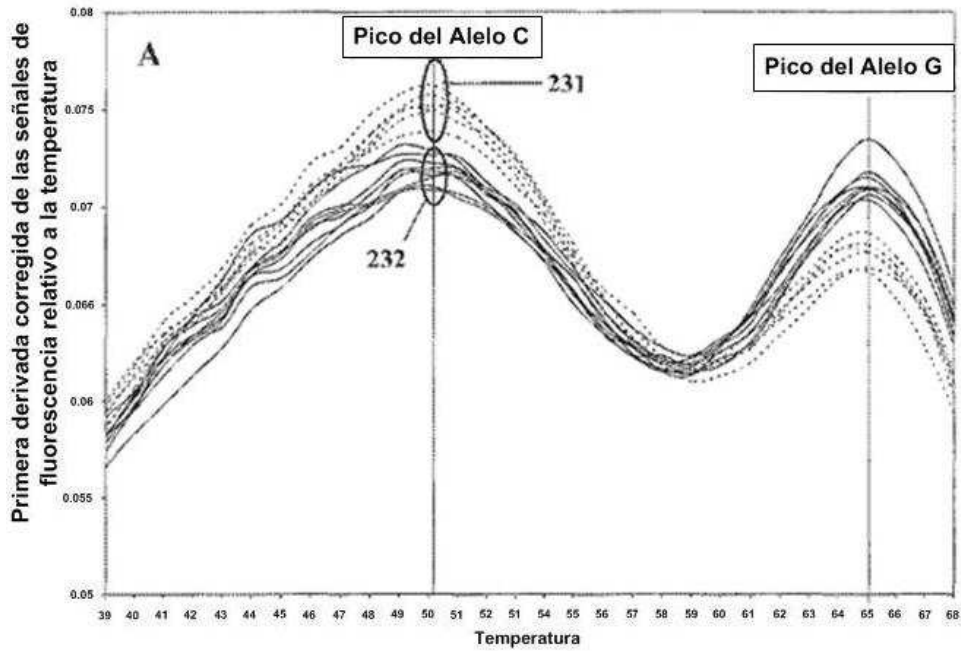


FIGURA 24

