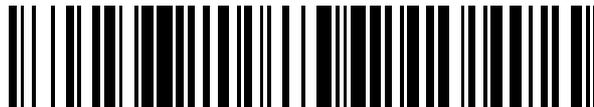


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 793**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2009 E 09851131 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2496709**

54 Título: **Procedimientos de detección de diana con cebador HDD**

30 Prioridad:

07.11.2009 KR 20090107262

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

14.04.2015

73 Titular/es:

**SEEGENE, INC. (100.0%)
8, 9F Taewon Bldg. 65-5, Bangi-dong Songpa-gu
Seoul 138-050, KR**

72 Inventor/es:

**CHUN, JONG YOON;
HWANG, IN TAEK y
LEE, YOUNG JO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 793 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

Procedimientos de detección de diana con cebador HDD

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la detección de una secuencia de ácido nucleico diana usando un cebador de hibridación y detección de dianas (HDD)

Descripción de la técnica relacionada

- 10 Un proceso de amplificación de ácido nucleico diana está implicado predominantemente en la mayoría de las tecnologías para la detección de secuencias de ácido nucleico diana. La amplificación de ácido nucleico es un proceso fundamental para una amplia variedad de procedimientos en biología molecular, de tal forma que se han propuesto varios procedimientos de amplificación. Por ejemplo, Miller, H. I. y col., (WO 89/06700) amplificaron una de secuencia de ácido nucleico en base a la hibridación de una secuencia cebadora/promotora a un ADN monocatenario ("ssADN") diana, seguido de transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos incluyen sistemas de amplificación basados en la transcripción (Kwoh, D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:1173(1989); y Gingeras TR. y col., WO 88/10315).

- 15 El proceso más predominante para la amplificación de ácidos nucleicos conocido como reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo denominado en el presente documento "PCR") se basa en ciclos repetidos de desnaturalización de ADN bicatenario seguido de hibridación del cebador oligonucleotídico al molde de ADN y extensión del cebador mediante una ADN polimerasa (Mullis y col., patentes de EE.UU. N° 4.683.195, 4.683.202, Y 4.800.159; Saiki et al., (1985) Science 230, 1350 - 1354).

- 20 Las técnicas basadas en PCR se han usado ampliamente, no solo para la amplificación de una secuencia de ADN diana sino también para aplicaciones científicas o procedimientos en los campos de investigación biológica y médica, tal como PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR de expresión diferencial (DD-PCR), clonación de genes conocidos o desconocidos mediante PCR, amplificación rápida de los extremos ADNc (RACE), PCR con cebado arbitrario (AP-PCR), PCR multiplexada, tipado del genoma de SNP y análisis genómico basado en PCR (McPherson y Moller, (2000) PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, NY).

A continuación, se resumen procedimientos para detectar ácidos nucleicos diana basados en la amplificación de ácidos nucleicos propuesta hasta ahora, del siguiente modo:

1. Procedimiento de detección post-PCR

- 30 El procedimiento post-PCR que normalmente es heterogéneo implica amplificación de ácido nucleico y, después, detección de los productos amplificados para analizar la secuencia del ácido nucleico diana. El procedimiento de detección post-PCR convencional requiere separar los productos amplificados en base a un diferencial de tamaño, que normalmente se consigue mediante el uso de electroforesis en gel, o a través de la inmovilización del producto. No obstante, el proceso de separación produce problemas serios, tales como contaminación de arrastre y bajo rendimiento.

2. Procedimientos de detección en tiempo real

Para superar los problemas del procedimiento post-PCR se sugirió un procedimiento de PCR en tiempo real para detectar los productos amplificados de un modo en tiempo real y con ausencia de contaminantes, lo que permite analizar de forma cuantitativa las secuencias del ácido nucleico diana.

40 2.1 Procedimientos que usan reacciones de hibridación y extensión

2.1.1 Procedimiento con cebadores Sunrise

- 45 Este procedimiento usa cebadores de tipo Sunrise que forman bucles en horquilla en sus extremos 5' para acercar un par de fluoróforo e inactivador de modo que se garantiza una baja fluorescencia. Cuando estos cebadores se incorporan en un producto de PCR, las colas se convierten en bicatenarias y la horquilla se desenreda, lo que hace que la fluorescencia aumente (Nazarenko et al, 2516 - 2521 Nucleic Acids Research, 1997, v. 25 N° 12 y patente de EE.UU. N° 6.117.635). No obstante, el procedimiento con cebadores Sunrise es muy inconveniente en cuanto a que los cebadores están diseñados de un modo muy elaborado para que contengan una secuencia complementaria a las secuencias del ácido nucleico diana y una secuencia capaz de formar bucles de horquilla en sus extremos 5'.

2.1.2 Procedimiento del cebador en cola (procedimiento del cebador Scorpion)

- 50 Este procedimiento usa un cebador con cola (cebador Scorpion) y un sistema de señalización integrado El cebador tiene una región de unión al molde y la cola que comprende un enlazador y una región de unión a la diana. La región de unión a la diana hibrida con una secuencia complementaria en un producto de extensión del cebador. Después,

este acontecimiento de hibridación específica de diana se acopla a un sistema de señalización en el que la hibridación conduce a un cambio detectable. El enlazador en el cebador con cola impide la copia de la cadena mediada por la polimerasa de la región de cola del molde del cebador (Whitcombe y col., 804 - 807, Nature Biotechnology v.17 AUGUST 1999 y patente de EE.UU. N° 6.326.145). Como el procedimiento del cebador Sunrise, este cebador con cola también tiene una dificultad por el diseño y síntesis de los cebadores debido a la incorporación de un enlazador para generar señales dependientes de amplificación y una región de unión a la diana que puede hibridar con un producto de extensión del cebador en un cebador.

2.2 Procedimientos que usan reacciones de hibridación

2.2.1 Procedimiento con balizas moleculares

Las balizas moleculares contienen pigmentos fluorescentes y de inactivación, pero solo se produce FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) cuando el pigmento inactivador es directamente adyacente al pigmento fluorescente. Las balizas moleculares están diseñadas para adoptar una estructura de horquilla cuando están libres en solución de modo que hace que ambos pigmentos se acerquen considerablemente. Cuando una baliza molecular hibrida con una diana se separan los pigmentos fluorescente e inactivador. La FRET no se produce y el pigmento fluorescente emite luz tras la irradiación (Indian J Med Res 124: 385 - 398(2006) y Tyagi y col., Nature Biotechnology v.14 MARCH 1996).

No obstante, hay algunos inconvenientes en el procedimiento con balizas moleculares.

En primer lugar, las dos repeticiones invertidas de la estructura en horquilla deben tener homólogos complementarios en el ácido nucleico diana, que a su vez requiere la presencia de repeticiones invertidas en la diana también, una condición que normalmente no se cumple.

En segundo lugar, la T_m de la porción en bucle de la estructura en horquilla con una secuencia de ácido nucleico complementaria y la T_m de la porción principal tiene que equilibrarse cuidadosamente con respecto a la temperatura del ensayo para permitir el desplegamiento específico de la sonda en horquilla en presencia de la diana sin un desplegamiento inespecífico.

Por último, este procedimiento demanda cebadores adicionales para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos diana.

2.2.2 Procedimientos de sondas de hibridación

Este procedimiento usa cuatro oligonucleótidos: dos cebadores y dos sondas. Las sondas de hibridación tienen un único marcador, uno con un fluoróforo donante y uno con un fluoróforo aceptor. La secuencia de las dos sondas se selecciona de forma que pueden hibridar con las secuencias diana en una disposición cabeza-cola, acercando mucho los pigmentos TOW, lo que permite que se produzca la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). El pigmento aceptor en una de las sondas transfiere energía, lo que permite que el otro disipe fluorescencia a una longitud de onda diferente. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN diana generada durante el proceso de PCR (385 - 398, Indian J Med Res 124, artículo de revisión, octubre 2006 y 303 - 308, y Bernad y col., 147 - 148 Clin Chem 2000; 46).

No obstante, este procedimiento no lo puede adoptar la detección multiplexada y requiere cebadores adicionales para amplificar la secuencias del ácido nucleico diana.

2.3 Procedimientos que usan hibridación y actividad nucleasa

2.3.1 Procedimiento con la sonda TaqMan (actividad nucleasa 5' a 3')

Las sondas TaqMan están diseñadas para hibridar con una región interna de un producto de PCR. Durante la PCR, cuando la polimerasa replica un molde sobre el que se ha unido una sonda TaqMan, la actividad exonucleasa 5' de la polimerasa escinde la sonda. Esto separa los pigmentos fluorescente e inactivador y no se sigue produciendo la FRET (385 - 398, Indian J Med Res 124, artículo de revisión, octubre de 2006 and 303 - 308, patente de EE.UU. N° 5.210.015).

No obstante, este procedimiento está limitado en el sentido en que emplea tres oligonucleótidos (una sonda con marcador doble y dos cebadores). Esto complica seriamente el diseño y la síntesis de la sonda y la optimización de la condición de la reacción.

2.3.2. Procedimiento con cebador marcado (actividad nucleasa 3' a 5')

Este procedimiento usa un cebador marcado con apareamiento erróneo deliberado en al menos un nucleótido en el extremo 3' del cebador. El cebador marcado se incuba con una muestra en condiciones suficientes para permitir la hibridación y dicha muestra se expone después a la ácido nucleico polimerasa que tiene actividad correctora de 3' a 5', de modo que se libera dicho marcador o parte del sistema marcador (patente de EE.UU. N° 6.248.526).

No obstante, el cebador de apareamiento incorrecto debe diseñarse de forma intrincada de modo que contenga un

nucleótido de apareamiento erróneo en su extremo 3'. Para empeorar las cosas, es probable que el cebador de apareamiento erróneo genere señales falsos positivos por la actividad correctora de 3' a 5', incluso cuando el extremo 3' se aparee erróneamente con secuencias no diana.

5 Como se ha descrito anteriormente, la mayoría de los procedimientos de detección de diana convencionales desarrollados hasta ahora tiene inconvenientes intrínsecos que se consideran difíciles de superar.

De acuerdo con lo anterior, desde hace tiempo existe la necesidad de un nuevo abordaje para detectar secuencias de ácido nucleico diana de un modo más rentable y eficaz en cuanto al tiempo y la técnica.

10 A lo largo de esta solicitud se mencionan varias patentes y publicaciones y se proporcionan citas entre paréntesis. La divulgación de estas patentes y publicaciones en su totalidad se incorporan en el presente documento por referencia en esta solicitud con el fin de describir más completamente la presente invención y la técnica actual a la que pertenece la presente invención.

Sumario de la invención

15 Los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para superar los inconvenientes asociados con tecnologías convencionales para la detección de secuencias de ácido nucleico diana. Los presentes inventores han concebido nuevos cebadores analíticos-funcionales con una función de vigilancia doble, es decir como sonda y como cebador, y, a su vez, han construido varios protocolos usando los cebadores para la detección de secuencias de ácido nucleico diana. Como resultado, los inventores han verificado que los nuevos protocolos o procesos exhiben un funcionamiento plausible en la detección de secuencias de ácido nucleico diana, entre otros detección en tiempo real, y producen señales que indican una secuencia de ácido nucleico diana de un modo mucho más fuerte y más rápido.

20 El descubrimiento clave de los presentes inventores es que cuando un cebador hibridaba con una secuencia de ácido nucleico diana entra en contacto con una ácido nucleico polimerasa dependiente del molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en condiciones para la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente del molde, su extremo 3' se extiende y su porción terminal en 5' también se escinde, que es la base que dirige la presente invención. En base a estos hallazgos y descubrimientos, cuando un marcador que genera una señal detectable se ha incorporado en un cebador para generar amplicones en las reacciones de PCR, se ha encontrado que se genera una señal durante las reacciones de PCR en tiempo real. Esta solicitud ha resultado más eficiente en la detección de dianas que los procedimientos existentes en los que se requieren sondas adicionales o modificación de cebadores. El cebador marcado de la presente invención no solo puede proporcionar una herramienta flexible e incomparablemente potente para la detección eficaz de las secuencias de ácido nucleico diana, sino que también hacen que el proceso de desarrollo de los ensayos de PCR en tiempo real sea más sencillo, más corto y más económico.

25 En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD).

30 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada con una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD).

40 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD).

Otros objetos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente, junto con las reivindicaciones y figuras adjuntas.

45 Este objeto se ha alcanzado con los procedimientos y kits de acuerdo con las reivindicaciones independientes. Realizaciones preferidas son el resultado de las subreivindicaciones

Breve descripción de las figuras

Los principios básicos de la presente invención se resumen en las FIG. 1 - 4.

50 La FIG. 1 muestra las etapas esquemáticas implicadas en un ensayo para detectar una secuencia de ácido nucleico diana usando la reacción escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' de un cebador HDD mediante una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3'. La FIG. 1A muestra el uso del cebador HDD que tiene una estructura convencional para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana. La FIG. 1B muestra el uso del cebador HDD que tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) para la especificidad de hibridación del cebador en la detección de una secuencia de ácido nucleico diana.

La FIG. 2 muestra una representación esquemática para un ensayo de amplificación de señal en tiempo real para detectar una secuencia de ácido nucleico diana sin la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana usando la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' de un cebador HDD mediante una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3'. La FIG. 2A muestra el uso del cebador HDD que tiene una estructura convencional para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana. La FIG. 2B muestra el uso del cebador HDD que tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) para la especificidad de hibridación del cebador en la detección de una secuencia de ácido nucleico diana.

La FIG. 3 muestra una representación esquemática para la amplificación en tiempo real de un ácido nucleico diana y la señal durante una PCR en tiempo real usando un cebador HDD de la presente invención. La FIG. 3A muestra el uso del cebador HDD que tiene una estructura convencional para una amplificación por PCR en tiempo real. La FIG. 3B muestra el uso del cebador HDD que tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) para la especificidad de hibridación del cebador en una amplificación por PCR en tiempo real.

La FIG. 4 muestra una representación esquemática de diversas combinaciones de cebadores de HDD en una amplificación por PCR en tiempo real. La FIG. 4A muestra el uso del cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos. La FIG. 4B muestra el uso de una sonda marcada combinada con un cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos. La FIG. 4C muestra el uso del cebador HDD como cebador directo combinado con un cebador HDD adicional como cebador en dirección 5', cebador inverso o ambos. La FIG. 4D muestra el uso de un cebador interno combinado con un cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos.

La FIG. 5 muestra la detección de una secuencia de ácido nucleico diana usando un cebador HDD de la presente invención y una ADN polimerasa *Taq* sin la repetición de la desnaturalización, la hibridación, la escisión y la extensión a un intervalo de tiempo predeterminado.

La FIG. 6 muestra los resultados de la amplificación de señal en tiempo real usando un cebador HDD y una ADN polimerasa *Taq* con la repetición de la desnaturalización, la hibridación, la escisión y la extensión a diversas concentraciones de dNTP.

La FIG. 7 muestra la comparación de un cebador HDD y una sonda marcada en la amplificación por PCR en tiempo real para el gen de *Streptococcus pneumoniae* (SP). La FIG. 7A muestra los resultados de la amplificación por PCR en tiempo real. La FIG. 7B es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados de la amplificación por PCR en tiempo real.

La FIG. 8 muestra la comparación de un cebador HDD y una sonda marcada en la amplificación por PCR en tiempo real para el gen de *Neisseria meningitides* (NM). La FIG. 8A muestra los resultados de la amplificación por PCR en tiempo real. La FIG. 8B es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados de la amplificación por PCR en tiempo real.

La FIG. 9 muestra la especificidad de la PCR en tiempo real para el gen de *Streptococcus pneumoniae* (SP) usando un cebador HDD como cebador directo en la amplificación por PCR en tiempo real.

La FIG. 10 muestra la especificidad de la PCR en tiempo real para el gen de *Neisseria meningitides* (NM) usando un cebador HDD como cebador directo en la amplificación por PCR en tiempo real.

La FIG. 11 muestra la sensibilidad de la PCR en tiempo real para el gen de *Streptococcus pneumoniae* (SP) usando un cebador HDD como cebador directo en la amplificación por PCR en tiempo real.

La FIG. 12 muestra la sensibilidad de la PCR en tiempo real para el gen de *Neisseria meningitides* (NM) usando un cebador HDD como cebador directo en la amplificación por PCR en tiempo real.

La FIG. 13 muestra la especificidad de la PCR en tiempo real para el gen de *Streptococcus pneumoniae* (SP) usando un cebador HDD como cebador directo en la amplificación por PCR en tiempo real anidada.

La FIG. 14 muestra la sensibilidad de la PCR en tiempo real para el gen de *Streptococcus pneumoniae* (SP) usando un cebador HDD como cebador directo en la amplificación por PCR en tiempo real anidada.

La FIG. 15 muestra los resultados usando un cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

La FIG. 16 muestra los resultados usando la sonda marcada combinada con un cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

La FIG. 17 muestra los resultados usando un cebador HDD como cebador directo combinado con un cebador HDD adicional como cebador en dirección 5', cebador inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

La FIG. 18 muestra los resultados usando el cebador interno combinado con un cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

5 La FIG. 19 muestra la comparación de procedimientos usando un cebador HDD y la sonda TaqMan en la amplificación por PCR en tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

Descripción detallada de la presente invención

10 La presente invención está dirigida a un nuevo procedimiento para detectar una secuencia de ácido nucleico diana usando un cebador con un marcador y una actividad nucleasa 5' a 3' de una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde. Específicamente, la presente invención se refiere a una propuesta plausible para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de una forma en tiempo real.

15 El cebador marcado denominado cebador de detección e hibridación de diana (cebador HDD) hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana y después se extiende para sintetizar una secuencia complementaria de la secuencia de ácido nucleico diana y escindir para liberar el marcador del cebador, generando de este modo una señal indicativa de la presencia de la secuencia del ácido nucleico diana. En otras palabras, el cebador HDD sufre la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3'.

20 Los presentes inventores han descubierto que cuando el cebador HDD que tiene un sistema de marcaje interactivo que contiene una molécula indicadora fluorescente y una molécula inactivada hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana y después se incuba con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3', el marcador (fragmento marcado) se libera del cebador HDD para generar una señal que indica la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana.

25 Adicionalmente, los presentes inventores han descubierto que la extensión en el extremo 3' del cebador HDD garantiza mucha menos variación en la intensidad de la señal con respecto al cambio de la temperatura de reacción, lo que conduce a razonar que se podrían obtener resultados de señal más fiables y estables mediante la extensión en el extremo 3' del cebador HDD con poca o ninguna influencia sobre la señal tras el cambio de temperatura de la reacción. Además de esto, el cebador HDD también puede servir como cebador de amplificación en el presente procedimiento de forma que la secuencia del ácido nucleico diana se amplifica junto con la amplificación de la señal.

30 De acuerdo con la presente invención, las secuencias de ácido nucleico diana podrían detectarse de un modo en tiempo real con una eficiencia y fiabilidad espectacularmente potenciadas usando los cebadores marcados y la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde. Según el saber y entender de los inventores, estos hallazgos científicos y estrategias tecnológicas han sido propuestos por primera vez por los presentes inventores.

La reacción de extensión en 3' es responsable de la estabilización de la hibridación del cebador HDD con la secuencia del ácido nucleico diana y mucha menos variación en la intensidad de la señal con respecto al cambio de la temperatura de reacción.

35 En base a los hallazgos de los inventores descritos en lo que antecede, se propone un procedimiento general de la presente invención del siguiente modo: Un cebador marcado mediante procedimientos convencionales y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa en 5' a 3' se incuban con una muestra que contiene una secuencia de ácido nucleico diana, tal como se inducen una reacción de extensión en 3' y una reacción de escisión en 4' del cebador para inducir la liberación de un marcador desde el cebador, dando, por último, una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

40 De acuerdo con la presente invención, un marcador interactivo como los marcadores que se usan en el fenómeno FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) permite detectar convenientemente la secuencia del ácido nucleico diana de un modo en tiempo real.

45 Adicionalmente, la repetición de dos etapas sucesivas, es decir hibridación del cebador con la secuencia de ácido nucleico diana e incubación con la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' permite la amplificación de la señal para la secuencia de ácido nucleico diana. Por tanto, la amplificación de la señal contribuye significativamente a la elevación de la sensibilidad de la detección de la diana.

50 Cuando el cebador HDD se usa junto con un cebador homólogo capaz de amplificar la diana en la presente invención, la amplificación de la señal así como la amplificación de la secuencia diana se consiguen de forma simultánea, lo que proporciona con éxito un procedimiento de ensayo homogéneo.

El procedimiento de ensayo homogéneo de la presente invención es claramente diferente de los procedimientos convencionales desarrollados hasta ahora.

55 Como los procedimientos que usan cebadores marcados para la detección de la diana, se propusieron el procedimiento Sunrise (Nazarenko y col., 2516 - 2521 Nucleic Acids Research, 1997, v.25 n° 12, y la patente de EE.UU. N° 6.117.635) y el procedimiento Scorpion (Whitcombe y col., 804 - 807, Nature Biotechnology v.17

AUGUST 1999 y la patente de EE.UU. Nº 6.326.145). Estos procedimientos generan señales indicativas de la diana mediante únicamente extensión del cebador y no usan la actividad nucleasa de 5' a 3' de las ácido nucleico polimerasas; no obstante, esta actividad nucleasa es responsable de la generación de la señal en el presente procedimiento. Dicha diferencia en el mecanismo de la generación de la señal permite a la presente invención detectar más fácilmente una secuencia de ácido nucleico diana incluso sin uso de cebadores con una estructura compleja necesaria para los procedimientos existentes.

La patente de EE.UU. Nº 6.248.526 divulga un procedimiento de detección de la diana usando cebadores marcados y ácido nucleico polimerasas. Este procedimiento usa la actividad correctora 3' a 5' de las ácido nucleico polimerasas para escindir la porción del extremo 3' de los cebadores marcados para la generación de la señal. En resumen, el procedimiento convencional usa una actividad nucleasa diferente del presente procedimiento. En el caso del uso de la actividad nucleasa correctora de 3' a 5' de las ácido nucleico polimerasas, supone un problema diseñar cebadores hibridables con la diana que portan un apareamiento erróneo en el extremo 3'. Cuando el cebador hibrida con una secuencia no diana a excepción de su secuencia de apareamiento erróneo en el extremo 3', la secuencia de apareamiento erróneo se escinde mediante la actividad correctora de la nucleasa de 3' a 5' para generar señales falsas positivas. No obstante, la presente invención no necesita una secuencia de apareamiento erróneo y, por tanto, carece de los problemas del procedimiento convencional.

EL procedimiento de la sonda TaqMan que usa la actividad nucleasa de 5' a 3' de las ácido nucleico polimerasas se usa predominantemente en la técnica para la detección de dianas (patente de EE.UU. Nº 5.210.015). El procedimiento requiere sondas marcadas y cebadores en dirección 5' para la generación de señal indicativa de la diana.

La tecnología de la sonda TaqMan sugiere dos abordajes para la generación de la señal: escisión dependiente de la polimerización y escisión independiente de la polimerización. En la escisión dependiente de la polimerización, la extensión del cebador en dirección 5' debe producirse antes de que una ácido nucleico polimerasa se encuentre con el extremo 5' de la sonda marcada. A medida que la reacción de extensión continúa, la polimerasa escinde progresivamente el extremo 5' de la sonda marcada. En la escisión independiente de la polimerización, el cebador en dirección 5' y la sonda marcada hibridan con un ácido nucleico diana en proximidad estrecha de forma que la unión de la ácido nucleico polimerasa al extremo 3' del cebador en dirección 5' lo pone en contacto con el extremo 5' de la sonda marcada para liberar el marcador. Como se ha descrito en lo que antecede, la tecnología de la sonda TaqMan no solo demanda sondas marcadas sino también cebadores en dirección 5' para la generación de señal. Las sondas marcadas no están implicadas en la amplificación de la diana.

Al contrario que la tecnología de la sonda TaqMan, la presente invención usa la actividad nucleasa 5' a 3' de las ácido nucleico polimerasas de un modo independiente para la generación de la señal, en la que la actividad nucleasa 5' a 3' exhibe su actividad nucleolítica sin ayuda de otras actividades (por ejemplo, actividad de polimerización) y otros aditivos (por ejemplo, cebadores en dirección 5'). La presente invención une marcadores a cebadores no a sondas como la tecnología de sonda TaqMan.

Los presentes inventores han realizado intensas investigaciones para superar los inconvenientes asociados con tecnologías convencionales para la detección de secuencias de ácido nucleico diana. Los presentes inventores han concebido nuevos cebadores analíticos-funcionales con una función de vigilancia doble, es decir como sonda y como cebador, y, a su vez, han construido varios protocolos usando los oligonucleótidos para la detección de secuencias de ácido nucleico diana. Como resultado, los inventores han verificado que los nuevos protocolos o procesos exhiben un funcionamiento plausible en la detección de secuencias de ácido nucleico diana, entre otros detección en tiempo real, y producen señales que indican una secuencia de ácido nucleico diana de un modo mucho más fuerte y más rápido.

El descubrimiento clave de los presentes inventores es que cuando un cebador hibridaba con una secuencia de ácido nucleico diana entra en contacto con una ácido nucleico polimerasa dependiente del molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en condiciones para la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente del molde, su extremo 3' se extiende y su porción terminal en 5' también se escinde, que es la base que dirige la presente invención. En base a estos hallazgos y descubrimientos, cuando un marcador que genera una señal detectable se ha incorporado en un cebador para generar amplicones en las reacciones de PCR, se ha encontrado que se genera una señal durante las reacciones de PCR en tiempo real. Esta solicitud ha resultado más eficiente en la detección de dianas que los procedimientos existentes en los que se requieren sondas adicionales o modificación de cebadores. El cebador marcado de la presente invención no solo puede proporcionar una herramienta flexible e incomparablemente potente para la detección eficaz de las secuencias de ácido nucleico diana, sino que también hacen que el proceso de desarrollo de los ensayos de PCR en tiempo real sea más sencillo, más corto y más económico.

En un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD), que comprende la etapa de:

(a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD, en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores;

5 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

(c) detector la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con la presente invención, el oligonucleótido que va a hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana muestra una función doble tras la hibridación con una secuencia de ácido nucleico diana: una primera función, síntesis de la secuencia complementaria; una segunda función, generación de señales que indican una secuencia de ácido nucleico diana.

Por tanto, el oligonucleótido se denomina un "cebador de hibridación y detección de dianas" (cebador HDD) y el presente procedimiento denominado "Ensayo de detección de la diana con el cebador HDD".

De acuerdo con la presente invención, primero se hibrida una secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD.

20 La expresión usada en el presente documento "ácido nucleico diana", "secuencia de ácido nucleico diana" o "secuencia diana" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico de interés para detección que hibrida con un cebador o sonda en condiciones de hibridación o amplificación.

El término "cebador", como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se introduce en las condiciones en las que la síntesis de un producto de extensión del cebador, que es complementario a una hebra de ácido nucleico (molde), se induce, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para polimerización, tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. Preferentemente, el dejador es monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador de la presente invención puede estar compuesto por dNMP de origen natural (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales. El cebador también puede incluir ribonucleótidos.

El cebador debe ser lo bastante largo como para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluidos la temperatura, la aplicación y la fuente del cebador. El término "anealeación" o "cebado" como se usa en el presente documento hace referencia a la yuxtaposición de un oligodesoxinucleótido o ácido nucleico a un ácido nucleico molde, de modo que la yuxtaposición permite que la polimerasa polimerice los nucleótidos en una molécula de ácido nucleico que es complementaria al ácido nucleico molde o una porción del mismo.

El término usado "hibridar" usado en el presente documento hace referencia a la formación de un ácido nucleico bicatenario a partir de ácidos nucleicos monocatenarios complementarios. No existe una distinción prevista entre los términos "renaturalizar" e "hibridar", y estos términos se usarán de forma intercambiable.

40 La expresión "cebador HDD" usada en el presente documento significa un cebador en el que la hibridación con la secuencia de ácido nucleico diana induce la producción de una secuencia complementaria del ácido nucleico diana y su porción terminal en 5' se escinde por acción de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3'.

45 La expresión usada en el presente documento "cebador directo" significa un cebador complementario a una hebra de una secuencia de ácido nucleico alineada en una dirección de 3' a 5'. El cebador inverso tiene una secuencia complementaria a la otra hebra de la secuencia de ácido nucleico.

El término usado en el presente documento "cebador en dirección ascendente" hace referencia a un cebador que va a hibridar con un sitio ascendente de un sitio hibridado de un cebador de interés y tiene la misma orientación que el cebador de interés.

50 El término usado en el presente documento "cebador en dirección descendente" hace referencia a un cebador que va a hibridar con un sitio descendente de un sitio hibridado de un cebador de interés y tiene la misma orientación que el cebador de interés.

55 El cebador HDD comprende (i) una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores. El término "complementario/a" se usa en el presente documento para indicar que los cebadores o sondas son

suficientemente complementarios como para hibridar de forma selectiva con una secuencia de ácido nucleico diana en las condiciones de hibridación designadas o condiciones rigurosas, y abarca las expresiones “sustancialmente complementario/a” y “perfectamente complementario/a”, preferentemente perfectamente complementario/a.

5 De acuerdo con una realización preferida, el extremo 5' o una porción terminal en 5' del cebador HDD tiene una perfectamente complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana.

10 La expresión usada en el presente documento “porción terminal en 5'” junto con el cebador HDD hace referencia a una porción o región que comprende secuencias consecutivas de cualquier longitud desde el extremo 5' del cebador HDD. Preferentemente, la porción terminal en 5' del cebador HDD está compuesta por una secuencia que comprende 1 - 10 nucleótidos (más preferentemente, 1 - 5 nucleótidos, todavía más preferentemente 1 - 3 nucleótidos) desde su extremo 5'.

El marcador que genera una señal detectable útil en la presente invención incluye cualquier marcador conocido por un experto en la técnica. La mayoría de los marcadores está compuesta por una única molécula o un único marcador atómico; no obstante, algunos marcadores (por ejemplo, sistema marcador interactivo) compuestos por al menos dos o más moléculas o átomos marcadores.

15 De acuerdo con una realización preferida, el cebador HDD comprende al menos un marcador en su porción terminal en 5' (más preferentemente, cualquier sitio de una secuencia que comprende 1 - 10 nucleótidos desde su extremo 5', todavía más preferentemente, cualquier sitio de una secuencia que comprende 1 - 5 nucleótidos desde su extremo 5', todavía mucho más preferentemente, cualquier sitio de una secuencia que comprende 1 - 3 nucleótidos desde su extremo 5'). Lo más preferentemente, el cebador HDD comprende al menos un marcador en su extremo 5'.

20 Cuando la actividad nucleasa 5' a 3' de las ácido nucleico polimerasas dependientes de molde es una actividad exonucleasa de 5' a 3', el marcador unido al extremo 5' del cebador HDD puede ser escindido por la actividad exonucleasa. Cuando la actividad nucleasa 5' a 3' de las ácido nucleico polimerasas dependientes de molde es una actividad endonucleasa de 5' a 3', el marcador unido a un sitio alejado 1 - 3 nucleótido del extremo 5' del cebador HDD puede ser escindido por la actividad endonucleasa.

25 Uno o más marcadores (preferentemente un marcador) pueden estar unidos a su porción en el extremo 5' del cebador HDD, a excepción del sistema marcador interactivo que contiene al menos dos moléculas indicadoras. Por ejemplo, en el caso de usar el sistema marcador interactivo compuesto por un par de una molécula donante y una molécula aceptora, un miembro del par se puede unir a la porción del extremo 5' del cebador HDD y el otro miembro a cualquier sitio del cebador HDD siempre que se produzca una transferencia de energía entre dos moléculas.

30 De acuerdo con una realización preferida, el marcador que genera la señal detectable es un marcador químico, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador quimioluminiscente o un marcador metálico (por ejemplo, oro).

El marcador químico incluye biotina. La especificidad de unión de la biotina a estreptavidina (o avidina) permite la generación de una señal indirecta indicativa de secuencias de ácido nucleico diana.

35 El marcador enzimática incluye fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, β -glucosidasa, luciferasa, citocromo P₄₅₀ y peroxidasa de rábano. Usando sustratos para los marcadores enzimáticos se puede obtener la señal indicativa de las secuencias de ácido nucleico diana. Cuando se usa fosfatasa alcalina, se puede usar bromocloroindolilfosfato (BCIP), azul de nitrotetrazolio (NBT) o ECF como sustrato para las reacciones de desarrollo de color; en el caso de usar peroxidasa de rábano, se pueden usar cloronaftol, aminoetilcarbazol, diaminobencidina, D-luciferina, lucigenina (nitrate de bis-N-metilacridinio), resorufina, éter bencílico, luminol, reactivo Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), HYR (p-fenilendiamina-HCl y pirocatecol), TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), ABTS (2,2-azindil[3-etilbenctiazolina sulfonato]), o-fenilendiamina (OPD) o naftol/pironina como sustrato; y en el caso de usar glucosa oxidasa, se pueden usar t-NBT (azul de nitrotetrazolio) o m-PMS (metosulfato de fenzaína) como sustrato.

El marcador radioactivo incluye C¹⁴, I¹²⁵, P³² y S³⁵.

45 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el marcador unido al cebador HDD es un único marcador capaz de proporcionar una señal en tiempo real. Por ejemplo, el marcador único es quelato de terbio fluorescente (Nurmi y col., Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28 N° 8). Nurmi y col., divulgan que el marcador emite niveles bajos de fluorescencia en una forma unida a la sonda, pero cuando el marcador se libera del dúplex sonda-molde mediante la actividad nucleolítica 5' a 3', la señal de fluorescencia se potencia. Por tanto, el quelato de terbio fluorescente permite la detección de la diana en tiempo real, incluso cuando un único marcador está unido a una sonda o al cebador HDD para la presente invención.

El sistema marcador interactivo es un sistema de generación de señal en el que la energía se pasa de forma no radiactiva entre una molécula donante y una molécula aceptora.

55 Como representativo del sistema marcador interactivo, el sistema marcador de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) incluye una molécula indicadora fluorescente (molécula donante) y una molécula inactivadota (molécula aceptora). En la FRET, el donante de energía es fluorescente, pero el aceptor de energía

puede ser fluorescente o no fluorescente.

En otra forma de sistemas marcadores interactivos, el donante de energía es no fluorescente, por ejemplo un cromóforo y el aceptor de energía es fluorescente. En otra forma más de sistemas marcadores interactivos, el donante de energía es luminiscente, por ejemplo bioluminiscente, quimioluminiscente, electroquimioluminiscente, y el aceptor es fluorescente.

Más preferentemente, la señal indicativa de la secuencia de ácido nucleico diana se genera mediante sistemas marcadores interactivos, lo más preferentemente el sistema marcador FRET.

Cuando se usa el marcador FRET, los dos marcadores (la molécula indicadora fluorescente y una molécula inactivadora colocada en el cebador HDD para inactivar la fluorescencia de la molécula indicadora) están separados por un sitio dentro del cebador HDD susceptible a la escisión por nucleasa, de modo que permite que la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde separe la molécula indicadora fluorescente de la molécula inactivadora escindiendo en el sitio susceptible, obteniendo de este modo la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, la molécula indicadora fluorescente se localiza en una porción terminal en 5' (más preferentemente en el extremo 5') del cebador HDD y la molécula inactivadora se localiza en 3' de la molécula indicadora fluorescente. Como alternativa, la molécula inactivadora se localiza en una porción terminal en 5' (más preferentemente en el extremo 5') del cebador HDD y la molécula indicadora fluorescente se localiza en 3' de la molécula inactivadora.

La molécula indicadora y la molécula inactivadora útiles en la presente invención pueden ser materiales fluorescentes. Las moléculas indicadoras y las moléculas inactivadoras conocidas en la técnica son útiles en la presente invención. Ejemplos de estas son: Cy2™ (506), YO-PRO™-1 (509), YOYO™-1 (509), Calceína (517), FITC (518), FluorX™ (519), Alexa™ (520), Rodamina 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green™ 500 (522), Oregon Green™ 488 (524), RiboGreen™ (525), Rhodamine Green™ (527), Rodamina 123 (529), Magnesium Green™ (531), Calcium Green™ (533), TO-PRO™-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3™ (570), Alexa™ 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange™ (575), Ficoeritrina R&B (575), Rodamina Faloidina (575), Calcium Orange™ (576), Pironina Y (580), Rodamina B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red™ (590), Cy3.5™ (596), ROX (608), Calcium Crimson™ (615), Alexa™ 594 (615), Rojo Texas (615), Rojo Nilo (628), YO-PRO™-3 (631), YOYO™-3 (631), R-ficocianina (642), C-ficocianina (648), TO-PRO™-3 (660), TOTO3 (660), DiD DiI(5) (665), Cy5™ (670), Tiadicarbocianina (671) y Cy5.5 (694). Los números entre paréntesis es una longitud de onda de emisión máxima en nanómetros.

Pares adecuados de indicador-inactivador se divulgan en diversas publicaciones del siguiente modo: Pesce y col., editores, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White y col., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2ª Edición (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6ª Edición, Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996; patentes de EE.UU. N° 3.996.345 y 4.351.760.

Cabe destacar que una molécula inactivadora negra no fluorescente capaz de inactivar una fluorescencia de una amplia gama de longitudes de onda o una longitud de onda específica se puede usar en la presente invención.

En el marcador de FRET adaptado al cebador HDD, el indicador abarca un donante de FRET y el inactivador abarca la otra pareja (aceptor) de FRET. Por ejemplo, se usa un pigmento fluoresceína como indicador y un pigmento rodamina como inactivador.

La presente invención usa dos actividades distintas de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde, incluyendo una actividad polimerasa y una actividad nucleasa de 5' a 3'. La expresión "actividad nucleasa de 5' a 3'" usada en el presente documento significa actividad exonucleasa de 5' a 3' generalmente asociada con ADN polimerasas de modo que los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de un oligonucleótido hibridado a un molde, o actividad endonucleasa de 5' a 3' de modo que se produce escisión de más de un nucleótido desde el extremo 5' de un oligonucleótido hibridado a un molde.

La reacción catalizada por la actividad polimerasa se expresa en el presente documento como la reacción de extensión en 3'. La reacción catalizada por la actividad nucleasa de 5' a 3' se expresa en el presente documento como la reacción de escisión en 5'.

La reacción de escisión en 5' hace referencia a una reacción nucleolítica en el extremo 5' o en una porción terminal en 5' (por ejemplo, más de un nucleótido separado del extremo 5') de un oligonucleótido (por ejemplo, cebadores y sondas) hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana. Esta reacción tiene como resultado la escisión de los cebadores y sondas, dando fragmentos nucleotídicos con varios tamaños.

La reacción de extensión en 3' hace referencia a una reacción de polimerización de ácidos nucleicos en el extremo 3' de los cebadores mediante un ácido nucleico polimerasa dependiente de molde.

5 La expresión usada en el presente documento "liberación de marcadores" abarca la liberación de marcadores per se o la liberación de fragmento(s) nucleotídicos que contienen marcador(es). Cuando el oligonucleótido (p. ej., cebadores y sondas) usado en la presente invención contiene al menos dos marcadores, la expresión "liberación de marcadores" significa la liberación de al menos un marcador o liberación de al menos un fragmento nucleotídico que contiene al menos un marcador.

10 La expresión usada en el presente documento "liberación de al menos un marcador del sistema marcador interactivo" hace referencia a la liberación de al menos un marcador per se entre una pluralidad de marcadores que constituyen el sistema marcador interactivo o la liberación de fragmento(s) nucleotídicos que contienen al menos un marcador.

La presente invención incluye generalmente seis protocolos ilustrativos para detectar secuencias de ácido nucleico diana, pero no se limita a ellos:

El primer protocolo es detectar secuencias de ácido nucleico diana usando solo el cebador HDD.

15 El segundo protocolo es detectar secuencias de ácido nucleico diana usando el cebador HDD junto con una sonda marcada.

El tercer protocolo es detectar secuencias de ácido nucleico diana usando el cebador HDD junto con un cebador en dirección 5' (o un cebador en dirección 3').

20 El cuarto protocolo es detectar secuencias de ácido nucleico diana usando un par de cebadores compuesto por dos cebadores como un cebador directo y un cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD.

El quinto protocolo es detectar secuencias de ácido nucleico diana usando (i) un par de cebadores compuesto por dos cebadores como un cebador directo y un cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD y (ii) una sonda marcada.

25 El sexto protocolo es detectar secuencias de ácido nucleico diana usando (i) un par de cebadores compuesto por dos cebadores como un cebador directo y un cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD y (ii) un cebador en dirección 5' (o un cebador en dirección 3').

Todos los protocolos de detección se describirán con más detalle del siguiente modo:

1. Ensayo de detección de la diana con cebador HDD usando un cebador HDD

30 De acuerdo con el primer protocolo como el proceso más básico de la presente invención, cuando el cebador HDD hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana se extiende, es escindida por la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

El primer protocolo comprende las etapas de:

35 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD, en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores;

40 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con un ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

45 (c) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

La FIG. 1 muestra las etapas esquemáticas básicas del primer protocolo y la FIG. 5 muestra los resultados de la detección de una secuencia de ácido nucleico diana usando un cebador HDD de la presente invención y una ADN polimerasa *Taq* sin la repetición de la desnaturalización, la hibridación, la escisión y la extensión a un intervalo de tiempo predeterminado.

50 Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa de repetir las etapas (a)-(b) o (a)-(c) con desnaturalización entre ciclos repetidos al menos dos veces para amplificar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana. La repetición del ciclo permite la escisión del cebador HDD hibridado con la

secuencia de ácido nucleico diana, lo que contribuye a la amplificación de la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana. Dicha amplificación de la señal se considera una amplificación de la señal en tiempo real.

Preferentemente, el primer protocolo comprende las etapas de:

- 5 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD, en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores;
- 10 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;
- 15 (b') desnaturalizar la resultante de la etapa (b);
- (b'') repetir las etapas (a)-(b') al menos dos veces para amplificar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y
- 20 (c) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (b''), al final de la repetición de la etapa (b'') o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición de la etapa (b''), de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Este procedimiento que comprende la etapa de repetición se ilustra esquemáticamente en la FIG. 2 y la FIG. 6 muestra los resultados de la amplificación de señal en tiempo real usando un cebador HDD y una ADN polimerasa *Taq* con la repetición de la desnaturalización, la hibridación, la escisión y la extensión a diversas concentraciones de dNTP.

De acuerdo con el primer protocolo, la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana se obtiene o amplifica mediante únicamente la reacción de escisión en el cebador HDD.

La desnaturalización del resultante de la etapa (b) es hacer de los dúplex bicatenarios formados en la etapa (b) ácidos nucleicos monocatenarios. Los procedimientos para la desnaturalización incluyen, entre otros, tratamiento con calor, álcali, formamida, urea y glicoxal, procedimientos enzimáticos (p. ej., acción de la helicasa) y proteínas de unión. Por ejemplo, la desnaturalización se puede conseguir calentando a una temperatura que varía de 80 °C a 105 °C. Joseph Sambrook, y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) proporcionan procedimientos generales para realizar este tratamiento.

De acuerdo con una realización preferida, la detección de la señal se realiza de un modo en tiempo real, de un modo de punto final o de un modo con intervalo de tiempo predeterminado. La detección de un modo en tiempo real es detectar la señal para cada ciclo de la repetición. La detección de un modo de punto final es detectar la señal al final de la repetición. La detección de un modo con intervalo de tiempo predeterminado es detectar la señal a cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición.

La presente invención es muy adecuada para la detección multiplexada de las secuencias de ácido nucleico diana.

40 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico y el cebador HDD comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores.

45 Cuando se usan al menos dos cebadores de HDD, se pueden preparar para que contengan marcadores en varias combinaciones dependiendo de los fines de análisis. Por ejemplo, una pluralidad de los cebadores de HDD pueden estar relacionados con todos los marcadores idénticos, todos los marcadores diferentes o marcadores diferentes parciales. Además, al menos dos marcadores parcial o completamente diferentes o iguales pueden estar unidos a un cebador HDD.

50 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada. La utilización de la secuencia de ácido nucleico preamplificada en la presente invención permite un sorprendente incremento de la sensibilidad y especificidad de la detección de la diana. Una cantidad mínima de la secuencia de ácido nucleico diana se preamplifica hasta un nivel adecuado y después se detecta mediante la

presente invención, lo que permite que la sensibilidad de la detección de la diana esté muy incrementada. Es interesante el hecho de que el cebador HDD hibridable a secuencias en dirección 3' de los cebadores usados en la reacción de preamplificación puede servir como cebadores anidados para aumentar la especificidad de la detección de la diana.

5 2. Ensayo de detección de la diana con cebador HDD usando un cebador HDD y la sonda marcada

El segundo protocolo usa una sonda marcada, así como el cebador HDD. La sonda marcada tiene un marcador que genera una señal detectable y la sonda marcada hibrida con un sitio en 3' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD y es escindida en etapas sucesivas.

10 El extremo 3' de la sonda marcada se bloquea para prohibir la extensión de la sonda. El bloqueo se puede conseguir usando bases no complementarias o mediante la adición de un resto químico tal como biotina o un grupo fosfato al hidroxilo e 3' del último nucleótido. El bloqueo también se puede realizar eliminando el 3'-OH o usando un nucleótido que carece de un 3'-OH tal como un didesoxinucleótido.

15 El término usado en el presente documento "sonda" hace referencia a una molécula de ácido nucleico monocatenario que comprende una porción o porciones que son sustancialmente complementarias a una secuencia de ácido nucleico diana.

El segundo protocolo puede producir una intensidad de señal más alta para las secuencias de ácido nucleico diana en comparación con el primer protocolo que solo usa el cebador HDD, ya que la señal se genera a partir de la sonda marcada, así como el cebador HDD.

20 El marcador útil en la sonda marcada se describe como en del cebador HDD. Preferentemente, el marcador es un marcador FRET.

La sonda marcada también se escinde mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador de la sonda marcada. Por tanto, el segundo protocolo da dos señales distintas indicativas de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

25 De acuerdo con el segundo protocolo, cuando el cebador HDD hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana se extiende, se produce la reacción de escisión en 5' sobre el cebador HDD y/o la sonda marcada por la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador del cebador HDD y/o la sonda marcada, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

El segundo protocolo comprende las etapas de:

30 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD y una sonda marcada, en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores;

35 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, en el que la sonda marcada se escinde mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador de la sonda, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

(c) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

45 Preferentemente, el segundo protocolo comprende además la etapa de repetir las etapas (a)-(b) o (a)-(c) con desnaturalización entre ciclos repetidos al menos dos veces para amplificar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Específicamente, el segundo protocolo comprende las etapas de:

50 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD y una sonda marcada, en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores; en el que la sonda marcada hibrida con un sitio en dirección 5' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de

- extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, en el que la sonda marcada se escinde mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador de la sonda, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;
- 5 (b') desnaturalizar la resultante de la etapa (b);
- 10 (b'') repetir las etapas (a)-(b') al menos dos veces para amplificar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y
- (c) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (b''), al final de la repetición de la etapa (b'') o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición de la etapa (b''), de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
- 15 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico y el cebador HDD comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores y la sonda marcada comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de sondas.
- 20 Cuando se usan al menos dos cebadores de HDD y al menos dos sondas, se pueden preparar para que contengan marcadores en varias combinaciones dependiendo de los fines de análisis. Por ejemplo, una pluralidad de los cebadores de HDD y al menos dos sondas pueden unirse a todos los marcadores idénticos, todos los marcadores diferentes o marcadores diferentes parciales. Además, al menos dos marcadores parcial o completamente diferentes o iguales pueden estar unidos a un cebador HDD o una sonda.
- 25 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.
- De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada.
- 30 3. Ensayo de detección de la diana con cebador HDD usando un cebador HDD y en dirección 5' (o cebador en dirección 3')
- De acuerdo con el tercer protocolo, cuando el cebador HDD y un cebador en dirección 5' (o cebador en dirección 3') hibridados con la secuencia de ácido nucleico diana se extienden, se produce la reacción de escisión en 5' sobre el cebador HDD y/o el cebador en dirección 5' (o cebador en dirección 3') mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
- 35 El cebador en dirección 5' hibrida con un sitio en 5' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD. El cebador en dirección 3' hibrida con un sitio en 3' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD.
- Específicamente, el tercer protocolo comprende las etapas de:
- 40 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD y un cebador en dirección 5' o un cebador en dirección 3'; en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores; en el que el cebador en dirección 5' hibrida con un sitio en dirección 5' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD, en el que el cebador en orientación
- 45 3' hibrida con un sitio en dirección 3' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD;
- (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;
- 50 (c) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa de repetir las etapas (a)-(b) o (a)-(c) con desnaturalización entre ciclos repetidos al menos dos veces para amplificar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana. La repetición del ciclo permite la escisión del cebador HDD hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana, lo que contribuye a la amplificación de la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

Específicamente, el tercer protocolo comprende las etapas de:

(a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD y un cebador en dirección 5' o un cebador en dirección 3'; en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores; en el que el cebador en dirección 5' hibrida con un sitio en dirección 5' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD, en el que el cebador en orientación 3' hibrida con un sitio en dirección 3' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;

(b') desnaturalizar la resultante de la etapa (b);

(b'') repetir las etapas (a)-(b') al menos dos veces para amplificar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

(c) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (b''), al final de la repetición de la etapa (b'') o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición de la etapa (b''), de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, el cebador en dirección 5' o el cebador en dirección 3' tiene un marcador que genera una señal detectable. El marcador unido al cebador en dirección 5' o el cebador en dirección 3' se puede liberar en la etapa (b) junto con el unido al cebador HDD y estar también implicado en la señal de la etapa (c). En una realización, el marcador unido al cebador en dirección 5' o al cebador en dirección 3' es diferente del unido al cebador HDD. El marcador útil en el cebador en dirección 5' o al cebador en dirección 3' se describe como el del cebador HDD. Preferentemente, el marcador es un marcador FRET.

Cuando el cebador en dirección 5' o al cebador en dirección 3' tiene un marcador, el tercer protocolo puede producir una intensidad de señal más alta para las secuencias de ácido nucleico diana en comparación con el primer protocolo usando solo el cebador HDD porque la señal se genera a partir del cebador en dirección 5' marcado (o el cebador en dirección 3' marcado), así como el cebador HDD.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico y el cebador HDD comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores y el cebador en dirección 5' (o cebador en dirección 3') comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada.

4. Ensayo de amplificación de la diana en tiempo real usando cebador HDD

De acuerdo con el cuarto protocolo, cuando el par de cebadores compuesto por dos cebadores como cebador directo y cebador inverso en el que al menos un cebador es el cebador HDD, es decir hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana, se extienden, la reacción de escisión en 5' se produce en los dos cebadores mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana (FIG. 3).

Un par de cebadores compuesto por dos cebadores como cebador directo y cebador inverso en los que al menos un

cebador es el cebador HDD permite tanto la amplificación de la diana como la amplificación de la señal cuando el procedimiento se lleva a cabo de forma repetida.

De acuerdo con una realización preferida, el presente procedimiento comprende las etapas de:

- 5 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un par de cebadores compuesto por dos cebadores como cebador directo y cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD capaz de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana, en los que el cebador HDD comprende (i) una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores;
- 10 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' de los dos cebadores mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que los dos cebadores se extienden por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD entre los dos cebadores, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;
- 15 (c) desnaturalizar el resultante de la etapa (b);
- (d) repetir las etapas (a)-(c) al menos dos veces para amplificar tanto la secuencia de ácido nucleico diana como la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y
- 20 (e) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (d), al final de la repetición de la etapa (d) o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición, de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

25 El cuarto protocolo usa un par de cebadores compuesto por dos cebadores como cebador directo y cebador inverso. Al menos uno de los dos cebadores es el cebador HDD.

De acuerdo con una realización preferida, la etapa (a) se realiza usando al menos un cebador adicional que tiene una orientación inversa al cebador HDD. En este caso, los moldes (es decir, la secuencia de ácido nucleico diana) están más disponibles para la hibridación del cebador HDD.

30 De acuerdo con una realización preferida, los dos cebadores tienen todos un marcador a liberar en la etapa (b). Los marcadores unidos a los dos cebadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. El marcador útil en el cebador homólogo del cebador HDD se describe como el del cebador HDD. Preferentemente, el marcador es un marcador FRET.

35 La desnaturalización del resultante de la etapa (b) es hacer de los dúplex bicatenarios formados en la etapa (b) ácidos nucleicos monocatenarios. Los procedimientos para la desnaturalización incluyen, entre otros, tratamiento con calor, álcali, formamida, urea y glicoxal, procedimientos enzimáticos (p. ej., acción de la helicasa) y proteínas de unión. Por ejemplo, la desnaturalización se puede conseguir calentando a una temperatura que varía de 80 °C a 105 °C. Joseph Sambrook, y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) proporcionan procedimientos generales para realizar este tratamiento.

40 La presente invención es muy adecuada para la detección multiplexada de las secuencias de ácido nucleico diana. Según el mejor entender de los inventores, la presente invención es un procedimiento único que permite que se haga realidad una detección en tiempo real multiplexada.

En el cuarto protocolo se pueden preparar varias combinaciones del cebador HDD como se muestra en la FIG. 4A: (A) el cebador HDD como cebador directo; (B) el cebador HDD como cebador inverso y (C) el cebador HDD como cebador directo y como cebador inverso.

45 La FIG. 15 muestra los resultados de las combinaciones de cebadores ilustradas en la FIG. 4A usando el cebador interno combinado con un cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

50 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico, cada uno de los dos cebadores comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada. Cuando el presente procedimiento se realiza usando la secuencia de ácido nucleico preamplificada como material de partida se induce una amplificación anidada para mejorar significativamente la sensibilidad y la especificidad en la detección de la diana.

5 5. Ensayo de amplificación de la diana en tiempo real usando el cebador HDD y la sonda marcada

El quinto protocolo usa una sonda marcada, así como un par de cebadores compuesto por dos cebadores como un cebador directo y un cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD. La sonda marcada tiene un marcador que genera una señal detectable y la sonda marcada hibrida con un sitio en 3' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD y es escindida en etapas sucesivas. Cuando los dos cebadores hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana y se extienden se produce la reacción de escisión en 5' sobre los dos cebadores mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador del cebador HDD entre los dos cebadores y en los que la sonda marcada se modifica en su extremo 3' para impedir la extensión por la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y se hibrida con un sitio entre los dos cebadores y se escinde para liberar un marcador unido a la sonda marcada, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana (FIG. 4B).

De acuerdo con una realización preferida, el presente procedimiento comprende las etapas de:

(a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un par de cebadores compuesto por dos cebadores como cebador directo y cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD capaz de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana y con una sonda marcada adicional, en los que el cebador HDD comprende (i) una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores; en los que la sonda marcada se modifica en su extremo 3' para prevenir la extensión mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde e hibrida con un sitio entre los dos cebadores.

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' de los dos cebadores mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que los dos cebadores se extienden por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, entre los dos cebadores; en el que la sonda marcada se escinde mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador de la sonda, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;

(c) desnaturalizar el resultante de la etapa (b);

(d) repetir las etapas (a)-(c) al menos dos veces para amplificar tanto la secuencia de ácido nucleico diana como la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

(e) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (d), al final de la repetición de la etapa (d) o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición de la etapa (d), de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, la etapa (a) se realiza usando al menos un cebador adicional que tiene una orientación inversa al cebador HDD. En este caso, los moldes (es decir, la secuencia de ácido nucleico diana) están más disponibles para la hibridación del cebador HDD y el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3').

De acuerdo con una realización preferida, los dos cebadores tienen todos un marcador a liberar en la etapa (b). Los marcadores unidos a los dos cebadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. El marcador útil en el cebador homólogo del cebador HDD se describe como el del cebador HDD. Preferentemente, el marcador es un marcador FRET.

En el quinto protocolo se pueden preparar varias combinaciones del par de cebadores y la sonda marcada como se muestra en la FIG. 4B: (A) el cebador HDD como cebador directo; (B) el cebador HDD como cebador inverso y (C) el cebador HDD como cebador directo y como cebador inverso.

La FIG. 16 muestra los resultados de las combinaciones de cebadores ilustradas en la FIG. 4B usando la sonda marcada combinada con el cebador HDD como cebador directo, cebador inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido

nucleico, cada uno de los dos cebadores como el cebador directo y el cebador inverso comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores y la sonda marcada comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de sondas.

5 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada.

10 6. Ensayo de amplificación de la diana en tiempo real usando cebador HDD y cebador en dirección 5' (o cebador en dirección 3')

De acuerdo con el sexto protocolo, cuando (i) el par de cebadores compuesto por dos cebadores como cebador directo y cebador inverso en el que al menos un cebador es el cebador HDD, e (ii) el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3') hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana, se extienden, la reacción de escisión en 5' se produce en los dos cebadores y/o el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3') mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador del cebador HDD entre los dos cebadores, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, el presente procedimiento comprende las etapas de:

20 (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el par de cebadores compuesto por dos cebadores como un cebador directo y un cebador inverso, en el que al menos un cebador es el cebador HDD y el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3'); en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores; en el que el cebador en dirección 5' hibrida con un sitio en dirección 5' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD, en el que el cebador en orientación 3' hibrida con un sitio entre los dos cebadores y tiene la misma orientación que el cebador HDD;

30 (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' de los dos cebadores y el cebador en dirección 5' mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que los dos cebadores y el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3') se extienden por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD entre los dos cebadores, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;

35 (c) desnaturalizar el resultante de la etapa (b);

(d) repetir las etapas (a)-(c) al menos dos veces para amplificar tanto la secuencia de ácido nucleico diana como la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

40 (e) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (d), al final de la repetición de la etapa (d) o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición de la etapa (d), de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

45 De acuerdo con una realización preferida, la etapa (a) se realiza usando al menos un cebador adicional que tiene una orientación inversa al cebador HDD. En este caso, los moldes (es decir, la secuencia de ácido nucleico diana) están más disponibles para la hibridación del cebador HDD y el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3').

De acuerdo con una realización preferida, no solo el cebador HDD sino también otros cebadores tienen un marcador que genera una señal detectable. Los marcadores unidos a los cebadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. El marcador útil en los cebadores se describe como en del cebador HDD. Preferentemente, el marcador es un marcador FRET.

50 En el sexto protocolo se pueden construir varias combinaciones del par de cebadores y el cebador en dirección 5' como se muestra en la FIG. 4C: (A) los cebadores de HDD como un cebador directo y un cebador en dirección 5'; (B) los cebadores de HDD como un cebador directo y un cebador inverso; (C) los cebadores de HDD como un cebador directo, un cebador en dirección 5' y un cebador inverso; (D) el cebador HDD como un cebador directo.

55 La FIG. 17 muestra los resultados de combinaciones de cebadores ilustradas en la FIG. 4C usando el cebador HDD como un cebador directo combinado con un cebador HDD adicional como un cebador en dirección 5', un cebador

inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

En el sexto protocolo se pueden construir varias combinaciones del par de cebadores y un cebador en dirección 3' como se muestra en la FIG. 4D: (A) el cebador HDD como cebador directo; (B) el cebador HDD como cebador inverso; (C) el cebador HDD como cebador directo y como cebador inverso.

- 5 La FIG. 18 muestra los resultados de las combinaciones de cebadores ilustradas en la FIG. 4D usando un cebador interno combinado con el cebador HDD como un cebador directo, un cebador inverso o ambos en la amplificación por PCR a tiempo real para el gen de *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

En la Figura 4D, el cebador en dirección 3' se puede expresar como un cebador interno.

- 10 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico, cada uno de los dos cebadores como el cebador directo y el cebador inverso comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores y el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3') comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores.

- 15 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada.

Realización preferida: Ensayo de PCR en tiempo real usando el cebador HDD

- 20 Los protocolos 4^o-6^o usan un par de cebadores compuesto por dos cebadores como un cebador directo y un cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD capaz de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana. Por tanto, la repetición de la reacción se acompaña de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana. Preferentemente, la amplificación se realiza de acuerdo con la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que se divulga en las patentes de EE.UU. N° 4.683.195, 4.683.202, y 4.800.159.

- 25 De acuerdo con una realización preferida, la presente invención para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada con una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD) comprende las etapas de:

- 30 (a) preparar una mezcla de PCR que contiene la secuencia de ácido nucleico diana, un par de cebadores compuesto por dos cebadores en los que al menos un cebador es el cebador HDD capaz de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana y una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3'; en el que el cebador HDD comprende (i) una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un par de una molécula indicadora fluorescente y una molécula inactivadora colocadas en el cebador HDD para inactivar la fluorescencia de la molécula indicadora; en el que los dos cebadores están separados por un sitio dentro del cebador HDD susceptible a la escisión por nucleasa, de modo que se permite que la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde separe la molécula indicadora fluorescente de la molécula inactivadora escindiendo por el sitio susceptible, de modo que se obtiene la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;

- 40 (b) amplificar la secuencia de ácido nucleico diana usando la mezcla para PCR realizando al menos dos ciclos de hibridación de cebador, extensión y desnaturalización del cebador, en el que los dos cebadores se extienden por la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para amplificar la secuencia de ácido nucleico diana y son escindidos por la actividad nucleasa 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar la molécula indicadora o la molécula inactivadora del cebador HDD entre los dos cebadores; de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

- 50 (c) detectar la señal de fluorescencia indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (d), al final de la repetición de la etapa (b) o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición, de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento se realiza de acuerdo con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el par de cebadores en el que al menos un cebador es el cebador HDD.

- 55 Como se describe en el cuarto protocolo se pueden sugerir varias combinaciones del cebador HDD en las reacciones de PCR en tiempo real: (A) el cebador HDD como cebador directo; (B) el cebador HDD como cebador inverso y (C) el cebador HDD como cebador directo y como cebador inverso.

5 De acuerdo con una realización preferida, la mezcla para PCR comprende un par de cebadores compuesto por dos cebadores en el que al menos un cebador es el cebador HDD, un cebador en dirección 5' (o cebador en dirección 3') y la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene actividad nucleasa 5' a 3'; en el que el cebador en dirección 5' hibrida con un sitio en 5' de un sitio hibridado del cebador HDD y tiene la misma orientación que el cebador HDD.

De acuerdo con una realización preferida, la mezcla para PCR comprende un par de cebadores compuesto por dos cebadores en el que al menos un cebador es el cebador HDD, y una sonda marcada con un marcador que genera una señal detectable; en el que la sonda marcada se modifica en su extremo 3' para prevenir la extensión por la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde e hibrida con un sitio entre los dos cebadores.

10 De acuerdo con una realización preferida, este protocolo puede producir una intensidad de señal más alta para las secuencias de ácido nucleico diana en comparación con el protocolo que solo usa el par de cebadores, ya que la señal se genera a partir de la sonda marcada, así como el cebador HDD.

De acuerdo con una realización preferida, la etapa (a) se realiza usando al menos un cebador adicional que tiene una orientación inversa al cebador HDD. En este caso, los moldes (es decir, la secuencia de ácido nucleico diana) están más disponibles para la hibridación del cebador HDD.

15 De acuerdo con una realización preferida, la detección de la etapa (c) se realiza de un modo en tiempo real, de un modo de punto final o de un modo con intervalo de tiempo predeterminado.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico, cada uno de los dos cebadores como el cebador directo y el cebador inverso comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores.

20 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico, cada uno de los dos cebadores como el cebador directo y el cebador inverso comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores y el cebador en dirección 5' (o el cebador en dirección 3') comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores.

De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de las secuencias de ácido nucleico, cada uno de los dos cebadores como el cebador directo y el cebador inverso comprende al menos dos tipos (más preferentemente, al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de cebadores y la sonda marcada comprende al menos dos tipos (más preferentemente al menos tres tipos, lo más preferentemente al menos cinco tipos) de sondas.

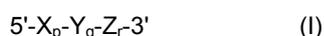
30 De acuerdo con una realización preferida, no solo el cebador HDD sino también otros cebadores tienen un marcador que genera una señal detectable. Los marcadores unidos a los cebadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. El marcador útil en los cebadores se describe como en del cebador HDD. Preferentemente, el marcador es un marcador FRET.

35 Cuando no solo el cebador HDD sino también el otro cebador tengan un marcador, se puede producir la intensidad de señal más alta para las secuencias de ácido nucleico diana en comparación con el protocolo que solo usa el cebador HDD porque la señal se genera a partir de otros cebadores, así como del cebador HDD.

40 De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.

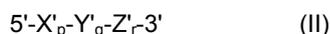
De acuerdo con una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada.

45 De acuerdo con una realización preferida, el cebador HDD usado tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) representada por la siguiente fórmula general I o una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (OEDm) representado por la siguiente fórmula general II:



50 en la que X_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es más alta que la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones; la porción de separación separa la primera porción de cebado en 5' de la segunda porción de cebado en

3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3' de forma que la especificidad de hibridación global del cebador HDD se potencia;



5 en la que X'_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y'_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z'_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X' , Y' y Z' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es inferior a la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones de X'_p , Y'_q and Z'_r ; la porción de separación separa la primera porción de cebado en 5' de la segunda porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3' de forma que la especificidad de hibridación global del cebador HDD se potencia.

Más preferentemente, el cebador HDD tiene la estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) representada por la fórmula general I.

20 El cebador HDD que tiene una estructura de OEDm es particularmente adecuado en el tercer y el sexto protocolo usando el cebador en dirección 5'. El cebador HDD que tiene una estructura de OCD es adecuado en otros protocolos.

25 La estructura de OCD como una versión del cebador de OED (oligonucleótido de especificidad doble) la propuso por primera vez el presente inventor (véase el documento WO 2006/095981; Chun y col., Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, *Nucleic Acid Research*, 35:6e40(2007)). La estructura de OEDm es una versión recién modificada de la estructura de OCD propuesta por primera vez por el presente inventor (véase el documento WO 2006/095981).

30 El OCD abarca un nuevo concepto en el que su hibridación viene determinada doblemente por la porción en 5' de especificidad de T_m alta (o la primera porción de hibridación en 5', la primera porción de cebado e 5') y la porción en 3' de especificidad de T_m baja (o la segunda porción de hibridación en 3', la segunda porción de cebado en 3') separadas por la porción de separación, lo que exhibe una especificidad de hibridación espectacularmente potenciada (véase el documento WO 2006/095981; Kim y col., Direct detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by multiplex PCR using dual-priming oligonucleotide primers, *Journal of Virological Methods*, 149:76 - 84(2008); Kim, y col., Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay, *Journal of Virological Methods*, doi:10.1016/j.jviromet.2008.11.007(2008); Horii y col., Use of dual priming oligonucleotide system to detect multiplex sexually transmitted pathogens in clinical specimens, *Letters in Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1472 - 765X2009.02618x(2009)) Como tal, el OCD tiene, en última instancia, dos segmentos cebadores con distintas propiedades de hibridación: la primera porción de cebado en 5' que inicia una hibridación estable y la segunda porción de cebado en 3' que principalmente determina la especificidad por la diana.

40 La estructura de OEDm es la opuesta a la estructura de OED: La segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5') que determina principalmente la especificidad diana y la primera porción de cebado en 3' (o la primera porción de hibridación en 3') que inicia una hibridación estable.

45 De acuerdo con una realización preferida, la base universal en la porción de separación se selecciona del grupo que consiste en desoxiinosina, inosina, 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, desoxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3-nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desoxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe 5-nitroindol, 2'-F 5-nitroindol, desoxi 4-nitrobencimidazol, 4-nitrobencimidazol, desoxi 4-aminobencimidazol, 4-aminobencimidazol, desoxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobencimidazol, PNA-5-introindol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobencimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobencimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4- nitrobencimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-0-metoxietil inosina, 2'-0-metoxietil nebularina, 2'-0-metoxietil 5-nitroindol, 2'-0-metoxietil 4-nitro-bencimidazol, 2'-0-metoxietil 3-nitropirrol, y combinaciones de los mismos. Más preferentemente, la base universal es desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol o 5-nitroindol, lo más preferentemente desoxiinosina.

55 Preferentemente, la porción de separación comprende nucleótidos contiguos que tienen al menos tres, más preferentemente al menos cuatro, lo más preferentemente al menos cinco bases universales, preferentemente desoxiinosina.

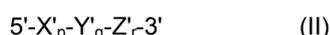
Preferentemente, en la estructura de OCD, la primera porción de cebado en 5' es más larga que la segunda porción de cebado en 3'. La primera porción de cebado en 5' tiene, preferentemente, una longitud de 15 - 60 nucleótidos,

más preferentemente de 15 - 40 nucleótidos, todavía más preferentemente de 15 - 25 nucleótidos. Es preferible que la segunda porción de cebado en 3' tiene una longitud de 3 - 15 nucleótidos, más preferentemente de 5 - 15 nucleótidos, todavía más preferentemente de 6 - 13 nucleótidos. Preferentemente, la porción de separación tiene una longitud de 3 - 10 nucleótidos, más preferentemente de 4 - 8 nucleótidos, lo más preferentemente de 5 - 7 nucleótidos. De acuerdo con una realización preferida, la T_m de la primera porción de cebado en 5' varía de 40 °C a 80 °C, más preferentemente de 45 °C a 65 °C. La T_m de la segunda porción de cebado en 3' varía, preferentemente, de 10 °C a 40 °C. Es preferible que la T_m de la porción de separación varía de 3 °C a 15 °C.

Preferentemente, en la estructura de OEDm de la primera porción de cebado en 3' (o la primera porción de hibridación en 3') es más larga que la segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5'). La primera porción de cebado en 3' tiene, preferentemente, una longitud de 15 - 60 nucleótidos, más preferentemente de 15 - 40 nucleótidos, todavía más preferentemente de 15 - 25 nucleótidos. Es preferible que la segunda porción de cebado en 5' tiene una longitud de 3 - 15 nucleótidos, más preferentemente de 5 - 15 nucleótidos, todavía más preferentemente de 6 - 13 nucleótidos. Preferentemente, la porción de separación tiene una longitud de 3 - 10 nucleótidos, más preferentemente de 4 - 8 nucleótidos, lo más preferentemente de 5 - 7 nucleótidos.

De acuerdo con una realización preferida, la T_m de la primera porción de cebado en 3' varía de 40 °C a 80 °C, más preferentemente de 45 °C a 65 °C. La T_m de la segunda porción de cebado en 5' varía, preferentemente, de 10 °C a 40 °C. Es preferible que la T_m de la porción de separación varía de 3 °C a 15 °C.

De acuerdo con una realización preferida, la sonda marcada tiene una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (OEDm) representada por la siguiente fórmula general II:



en la que X'_p representa una segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5') que tiene una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y'_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z'_r representa una primera porción de cebado en 3' (o una primera porción de hibridación en 3') que tiene una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos; y X' , Y' y Z' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5') es inferior a la de la primera porción de cebado en 3' (o la primera porción de hibridación en 3') y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones de X'_p , Y'_q y Z'_r ; la porción de separación separa la segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5') de la primera porción de cebado en 3' (o la primera porción de hibridación en 3') en términos de acontecimientos de hibridación con la secuencia de ácido nucleico diana, la especificidad de hibridación del oligonucleótido se determina de forma doble mediante la segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5') y la primera porción de cebado en 3' (o la primera porción de hibridación en 3') de forma que se potencia la especificidad de hibridación global de la sonda.

Preferentemente, en la estructura de OEDm para la sonda marcada, la primera porción de cebado en 3' (o la primera porción de hibridación en 3') es más larga que la segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5'). La primera porción de cebado en 3' tiene, preferentemente, una longitud de 15 - 60 nucleótidos, más preferentemente de 15 - 40 nucleótidos, todavía más preferentemente de 15 - 25 nucleótidos. Es preferible que la segunda porción de cebado en 5' tiene una longitud de 3 - 15 nucleótidos, más preferentemente de 5 - 15 nucleótidos, todavía más preferentemente de 6 - 13 nucleótidos. Preferentemente, la porción de separación tiene una longitud de 3 - 10 nucleótidos, más preferentemente de 4 - 8 nucleótidos, lo más preferentemente de 5 - 7 nucleótidos.

De acuerdo con una realización preferida, la T_m de la primera porción de cebado en 3' (o la primera porción de hibridación en 3') varía de 40 °C a 80 °C, más preferentemente de 45 °C a 65 °C. La T_m de la segunda porción de cebado en 5' (o la segunda porción de hibridación en 5') varía, preferentemente, de 10 °C a 40 °C. Es preferible que la T_m de la porción de separación varía de 3 °C a 15 °C.

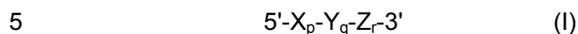
De acuerdo con una realización preferida, el cebador en dirección 5' o el cebador en dirección 3' tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) representada por la siguiente fórmula general I:



en la que X_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es más alta que la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones; la porción de separación separa la primera porción de cebado en 5' de la segunda porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda

porción de cebado en 3' de forma que la especificidad de hibridación global del cebador en dirección 5' se potencia;

De acuerdo con una realización preferida, el cebador (es decir, el cebador homólogo) usado junto con el cebador HDD para la amplificación de la diana tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) representada por la siguiente fórmula general I:



en la que X_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es más alta que la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones; la porción de separación separa la primera porción de cebado en 5' de la segunda porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3' de forma que la especificidad de hibridación global del cebador se potencia;

Las tecnologías convencionales que usan cebadores o sondas para detectar el ácido nucleico diana no pueden carecer de señales falsas a un nivel satisfactorio debido a las limitaciones inherentes a los cebadores y sondas usados. No obstante, el cebado de HDD, la sonda marcada, el cebador en dirección 5', el cebador en dirección 3' y el cebador inverso que tienen la estructura OCD u OEDm con dicho diseño intrigante se hibridan con las secuencias de ácido nucleico diana con una especificidad potenciada espectacularmente, lo que permite detectar las secuencias de ácido nucleico diana sin señales falsas.

Como se usa en el presente documento, el término "convencional" junto con los cebadores y las sondas significa cualquier cebador o sonda que no tienen una estructura de OCD u OEDm. Se describen en el presente documento como cebadores convencionales o sondas convencionales.

Tras la hibridación con la secuencia de ácido nucleico diana, la resultante de la etapa (a) se pone en contacto con la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' en condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

La frase "en condiciones para la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD por la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde" significa condiciones suficientes para inducir una reacción de extensión en el extremo 3' y la reacción de escisión en el extremo 5' o en la porción terminal en 5' del cebador HDD mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3'. Dichas condiciones pueden seguir aquellas para la extensión del cebador mediante ácido nucleico polimerasas convencionales. Por ejemplo, las condiciones se encontrarán en Joseph Sambrook, y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001). Como ejemplo ilustrativo, las condiciones incluyen la incubación de una secuencia de ácido nucleico diana, el cebador HDD, una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, ADN polimerasa *Tag*), dNTP y $MgCl_2$ a una temperatura relativamente alta (por ejemplo, 50 - 75 °C) durante un periodo de tiempo adecuado.

La frase "en condiciones para la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión de los dos cebadores por la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde" significa condiciones suficientes para inducir una reacción de extensión en el extremo 3' y la reacción de escisión en el extremo 5' o en la porción terminal en 5' del par de cebadores (un cebador directo y un cebador inverso) capaces de la amplificación de la diana mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3'. Los detalles de las condiciones se describirán con referencia a la frase indicada anteriormente.

De acuerdo con una realización preferida, la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' es una ADN polimerasa termoestable que se puede obtener de diversas especies bacterianas, incluyendo *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosiphon africanus*. Más preferentemente, la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' es ADN polimerasa *Tag*.

Por último, se detecta la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana. La detección de la señal se puede realizar para cada ciclo de la repetición, al fina de la repetición o a cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición. Preferentemente, la detección de la señal se puede realizar para cada

ciclo de la repetición para mejorar la precisión de la detección.

La presente invención no requiere ninguna secuencia o longitud concreta de las secuencias de ácido nucleico diana a detectar y/o amplificar. La secuencia diana de ARN deberá transcribirse inversamente a ADNc (Joseph Sambrook, y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); y Noonan, K. F. y col., Nucleic Acids Res 16:10366 (1988)). En particular, las secuencias de ácido nucleico diana que se pueden detectar y/o amplificar incluyen cualquier ácido nucleico procariota, eucariota de origen natural (por ejemplo, protozoos y parásitos, hongos, levaduras, plantas superiores, animales superiores e inferiores, incluyendo mamíferos y seres humanos) o viral (por ejemplo, virus herpes, VIH, virus de la gripe, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus de la polio etc.) o viroide.

El cebador HDD hibridado con la secuencia de ácido nucleico diana es escindida por la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' y el marcador unido al cebador HDD se libera para generar una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana. La señal se puede detectar o medir mediante procedimientos convencionales para cada marcador. POr ejemplo, cuando el marcador está con una enzima, la señal se detecta usando un sustrato para la enzima. Cuando se usan partículas de oro como marcador metálico, la señal se detecta mediante un procedimiento de tinción con plata usando nitrato de plata. La señal de fluorescencia se puede detectar o medir mediante procedimientos convencionales, por ejemplo fluorómetros.

La señal detectada se puede obtener directamente del marcador *per se* o indirectamente del de una reacción sucesiva con el marcador. Asimismo, la señal detectada se puede obtener a partir de un marcador liberado o un marcador restante (no incluido en los nucleótidos escindidos) (por ejemplo, el sistema marcador interactivo).

Las ventajas de la presente invención se hacen más prominentes a medida que se detectan simultáneamente al menos dos secuencias de ácido nucleico diana. De acuerdo con la presente invención, una multitud de secuencias de ácido nucleico diana se puede detectar simultáneamente en una reacción.

Adicionalmente, la presente invención es muy útil en la detección de una variación nucleotídica. La expresión "variación nucleotídica" usada en el presente documento hace referencia a un polimorfismo de nucleótido en una secuencia de ADN en una localización concreta entre segmentos contiguos de ADN que, por otro lado, tienen una secuencia similar. Dichos segmentos contiguos de ADN incluyen un gen o cualquier otra porción de un cromosoma. Por ejemplo, la variación nucleotídica detectada en la presente invención incluye delección, inserción y sustitución. Variación nucleotídica de ejemplo incluye numerosas variaciones en un genoma humano (por ejemplo, variaciones en el gen de MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa), variaciones implicadas en la resistencia a fármacos de los patógenos y las variaciones que produce tumorigénesis.

Preferentemente, la variación nucleotídica detectada en la presente invención es una sustitución de una base, más preferentemente un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) y mutación puntual.

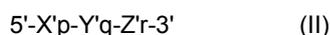
En otro aspecto de la presente invención se proporciona un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD), que comprende:

(a) el cebador HDD que comprende (i) una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores; y

(b) una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3';

en el que cuando el cebador HDD hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana, el cebador HDD se extiende mediante la actividad polimerasa de la una ácido nucleico polimerasa y el cebador HDD es escindido mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa para liberar el marcador o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana,

en el que un kit para detectar una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende una sonda discriminativa diana (sonda TD) que tiene una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (OEDm) representado por la siguiente fórmula general I para permitir discriminar la secuencia de ácido nucleico diana de una secuencia de ácido nucleico no diana:



en la que X'p representa a segunda porción de hibridación en 5' que tiene una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y'q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z'r representa una primera porción de hibridación en 3' que tiene una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos; y X', Y' y Z' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la segunda porción de hibridación en 5' es inferior a la de la primera porción de hibridación en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones de in X'p, Y'q y Z'r; la porción de separación separa la segunda porción de hibridación en 5' de la

- primera porción de hibridación en 3' en términos de acontecimientos de hibridación a la secuencia de ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación de la sonda TD se determina de forma dual mediante la segunda porción de hibridación en 5' y la primera porción de hibridación en 3' de forma que la especificidad global de la hibridación de la sonda TD se potencia; en la que cuando la sonda TD hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana, tanto la segunda porción de hibridación en 5' como la primera porción de hibridación en 3' hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana; en la que cuando la sonda TD hibrida con la secuencia de ácido nucleico no diana, tanto la segunda porción de hibridación en 5' como la porción de separación forman una sola hebra, de modo que la sonda TD permite la discriminación de la secuencia de ácido nucleico diana de la secuencia de ácido nucleico no diana.
- De acuerdo con una realización preferible, el kit además comprende un cebador adicional para la amplificación de la diana junto con el cebador HDD, un cebador en dirección 5', cebador en dirección 3', una sonda marcada o combinaciones de los mismos.
- De acuerdo con una realización preferible, el cebador adicional para la amplificación de la diana, el cebador en dirección 5' y/o el cebador en dirección 3' tiene un marcador.
- El marcador útil en los cebadores o la sonda marcada se describirá como tal en del cebador HDD. Preferentemente, el marcador es un marcador FRET.
- La sonda marcada y los cebadores marcados también se escinden mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene la actividad nucleasa de 5' a 3' para liberar el marcador de ellos, dando dos señales separadas indicativas de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
- Dado que el kit de la presente invención se construye para realizar el procedimiento de detección de la presente invención descrito anteriormente, las descripciones habituales entre ellos se omiten con el fin de evitar una redundancia innecesaria que conduzca a la complejidad de esta memoria descriptiva.
- Los presentes kits pueden incluir opcionalmente los reactivos requeridos para realizar reacciones de PCR para amplificación de la diana (por ejemplo, reacciones de PCR), tales como tampones, cofactores de la ADN polimerasa y desoxirribonucleótidos-5-trifosfatos. Opcionalmente, los kits también pueden incluir varias moléculas de polinucleótidos, transcriptasa inversa, varios tampones y reactivos, y anticuerpos que inhiben la actividad de ADN polimerasa.
- Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para realizar reacciones de control positivo y negativo. El experto en la técnica que tenga el beneficio de la presente divulgación puede determinar fácilmente las cantidades ópticas de reactivos para usar en una reacción dada. Normalmente, los kits están adaptados para contener en envases o compartimentos separados los constituyentes descritos anteriormente.
- A continuación se resumirán las características y ventajas de la presente invención:
- (a) Los procedimientos de PCR en tiempo real convencionales requieren sondas marcadas o una estructura de cebador modificada de forma complicada como estructura en horquilla, que dificultan el diseño, la síntesis o la selección de la secuencia de la sonda y el cebador. No obstante, ya que el cebador HDD de la presente invención se usa no solo para la amplificación de la diana sino también para la amplificación de la señal sin sondas marcadas adicionales o una estructura de cebador modificada de forma complicada, el diseño, la síntesis o la selección de la secuencia del cebador HDD para la PCR en tiempo real es relativamente simple y fácil.
- (b) La optimización de los procedimientos de PCR en tiempo real convencionales es difícil porque es necesario para las reacciones de PCR en tiempo real convencionales que las condiciones de hibridación se optimicen para las sondas, así como para los cebadores. Se supone que los procedimientos de PCR en tiempo real convencionales usando cebadores con colas para formar bucles en horquilla optimizan las condiciones de reacción con formación y deformación de los bucles de horquilla en los cebadores. No obstante, la presente invención podría estar libre completamente de las materias problemáticas e inconvenientes asociados con la optimización de los procedimientos de PCR en tiempo real convencionales.
- (c) Como se aborda en el ejemplo 7, varias combinaciones de (i) los cebadores de HDD como un cebador directo, un cebador inverso o un cebador en dirección 5' o (ii) los cebadores de HDD y las sondas permiten detectar con eficacia las secuencias de ácido nucleico diana.
- (d) Es muy improbable que los procedimientos de PCR en tiempo real convencionales adopten un ensayo multiplexado debido a la dificultad del diseño y optimización del cebador o la sonda. Por el contrario, ya que la presente invención solo usa un cebador marcado sin sondas adicionales o una estructura del cebador modificada de forma complicada en la PCR en tiempo real, es posible exhibir una excelente detección de la diana en tiempo real de un modo multiplexado.
- (e) En comparación con la sonda para PCR en tiempo real convencional, el cebador HDD se extiende durante el proceso y, a su vez, el cebador HDD extendido muestra una fuerza de unión más alta a las secuencias de ácido nucleico diana. El cebador para PCR en tiempo real convencional requiere una estructura modificada de forma

complicada, tal como un bucle en horquilla que molesta a la unión a la secuencia de ácido nucleico diana. Por el contrario, el cebador HDD no requiere dicha modificación, por lo que el cebador HDD tiene una mejor eficiencia de unión a las secuencias de ácido nucleico diana. Esta característica es responsable en parte de la mayor eficiencia de detección de la diana del presente procedimiento.

5 (f) El presente procedimiento puede realizar fácilmente las reacciones de PCR en tiempo real usando cebadores que generalmente se usan para las reacciones de PCR. En resumen, los cebadores para generar amplicones en las reacciones de PCR pueden asegurar una reacción de PCR en tiempo real satisfactoria. A este respecto, el presente procedimiento se considera que es rentable tanto en costes como en tiempo en el desarrollo de un ensayo de PCR en tiempo real.

10 (g) Como se ha tratado anteriormente en el presente documento, el cebador y/o la sonda usados en la presente invención que tienen la estructura de OCD u OEDm da lugar a la mejora de la especificidad de unión, de modo que se eliminan las señales falsas positivas asociadas con la unión a no dianas del cebador y/o la sonda en la reacción de PCR en tiempo real.

15 La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle mediante ejemplos. Sería obvio para los expertos en la técnica que con estos ejemplos se pretende ser más concretamente ilustrativo y el alcance de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas no está limitado a o por los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Evaluación del cebador de THD en la detección de un ácido nucleico diana

20 El cebador HDD de la presente invención se evaluó si el cebador HDD marcado doblemente puede generar una señal suficiente para detectar una secuencia de ácido nucleico diana cuando el cebador HDD hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana con la reacción de la ADN polimerasa *Taq* y la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD se lleva a cabo por una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' para separar la molécula indicadora fluorescente de la molécula de inactivadora situadas en el cebador HDD. El cebador HDD está marcado doblemente con 6-FAM (6-carboxi-fluoresceína) como una molécula indicadora y el Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) como una molécula inactivadora. Las posiciones de los marcadores están indicadas en la secuencia de oligonucleótidos.

25 Para analizar esta evaluación, se utilizó el gen de *Staphylococcus aureus* como un molde diana y por comodidad experimental, el oligonucleótido sintético se usó como molde para gen de *S. aureus*. La señal se midió en un intervalo de tiempo predeterminado sin la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana.

30 El proceso y los resultados para la generación de señal y la detección del gen diana de *Staphylococcus aureus* se describen en el presente documento.

Las secuencias del molde sintético y el cebador HDD de marcaje doble usado en este ejemplo son:

SA-Tem 5'-

gccaataaaactaggaggaaatttaaattgtagaattgaacaaggatttaattcatttagcgactttaaaggtcattggtg

aggtggtggcggtaacaacgccgtaaacccaatgattgaccacggaatgaataatggtgaattatcgctatcaacacag

acggctcaagctttaaacttatctaaagctgaatctaaa-3' (SEC ID N° 1); y

SA-THD 5'-[6-FAM]CATTCCG[BHQ1-dT]GGTCAATCATTGGT-3'(SEC ID N° 2).

35 La reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD de marcaje doble se llevaron a cabo en el volumen final de 20 µl que contienen 2 pmol de molde (SEC ID N° 1), 10 µl de 2X la mezcla maestra que contiene MgCl₂ 10 mM, 2 unidades de la ADN polimerasa *Taq* (Solgent, Korea), 200 µM de cada uno de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 5 pmoles del cebador HDD de marcaje doble (SEC ID N° 2); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 60 segundos a 55 °C o 65 °C. La detección de la señal generada se realizó en cada ciclo por el intervalo de tiempo predeterminado.

40 Como se muestra en la FIG. 5, incluso en la reacción en la que no hay amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, se observó el aumento de la señal fluorescente en *Staphylococcus aureus* en base al tiempo real, mediante el control de la señal fluorescente en el intervalo de tiempo predeterminado. Además, se demostró ninguna diferencia en la señal entre 55 °C (N° 2) y 65 °C (N° 4). No se observó ningún cambio en la señal fluorescente en ausencia de moldes (N° 1 y 3).

Ejemplo 2: Examen del cebador HDD en las condiciones de reacción de PCR en tiempo real para la detección de un ácido nucleico diana

Los inventores también examinaron si el cebador HDD puede generar una señal suficiente para detectar una secuencia de ácido nucleico diana cuando se aplicó la repetición de la desnaturalización, la hibridación, la escisión y la extensión a las diversas concentraciones de dNTP en las condiciones de la reacción de PCR en tiempo real.

Para examinar esta evaluación, el mismo molde (SEC ID N° 1) y el cebador HDD de marcaje doble (SEC ID N° 2) usados en el EJEMPLO 1 se usan para la amplificación de la señal diana en tiempo real.

La amplificación de la señal diana en tiempo real se llevó a cabo a las diversas concentraciones de dNTP (concentración final de 500 µM, 200 µM, 20 µM o 0 µM) en el volumen final de 20 µl que contienen 2 pmol de molde (SEC ID N° 1), 10 µl de 2X la mezcla maestra que contiene MgCl₂ 10 mM, 2 unidades de la ADN polimerasa *Taq* (Solgent, Korea) y 5 pmoles del cebador HDD de marcaje doble (SEC ID N° 2); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 55 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

Como se muestra en la FIG. 6, no se observó amplificación de la señal fluorescente de la secuencia de ácido nucleico diana en las reacciones de control negativo donde no había polimerasa *Taq* (N° 1) o el molde (N° 2). Tales resultados indican que no hubo amplificación de la señal, ya sea por hibridación del molde diana y el cebador HDD o por la escisión del propio cebador HDD monocatenario. Por otro lado, la señal fluorescente de la secuencia de ácido nucleico diana se observó no sólo en ausencia de dNTP (N° 6), sino también a la diferente concentración de dNTP (N° 3, 4 y 5). Con 500 µM de dNTP, el valor Ct fue el más alto y la intensidad de la señal fue la más baja (N° 3), donde 20 µM de dNTP mostraron el valor de Ct más bajo y la intensidad de señal más alta (N° 5).

Por lo tanto, sin la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, la repetición de la desnaturalización, la hibridación, la escisión y la extensión usando el cebador HDD era suficiente para generar la señal fluorescente diana, por lo tanto, permite la detección de la secuencia de ácido nucleico diana por la amplificación de la señal en tiempo real.

Ejemplo 3: Diferencias entre el cebador de THD y la sonda en la amplificación por PCR en tiempo real

Las principales diferencias entre el cebador y la sonda son que la sonda no se incorpora en el producto de amplificación. Para confirmar que el cebador HDD se incorpora en el producto de amplificación de PCR en tiempo real pero la sonda no está bajo las condiciones de la PCR en tiempo real, la PCR en tiempo real se llevó a cabo para detectar genes de *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* utilizando el cebador como THD un cebador directo.

Cuando se utiliza la secuencia de ácido nucleico diana del gen de *S. pneumoniae* como molde, las secuencias del cebador HDD de marcaje doble como un cebador directo, el cebador inverso y la sonda de doble marcaje utilizados en este ejemplo son:

SP-THD 5'-[6-FAM]TCCTTCAAACCTGTGGATT[BHQ1-dT]GGGTGT-3' (SEC ID N° 4)
 Sonda SP 5'-[6-FAM]TCCTTCAAACCTGTGGATT[BHQ1-dT]GGGTGT[Phos-Q]-3'(SEC ID N° 5)
 SP-P2 5'-GGTTTCCGTACAGCCTTGA-3' (SEC ID N° 6)

La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 10 ng de ADN genómico de *S. pneumoniae*, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, *Taq* ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 10 pmoles de cebador de doble marcado THD (SEC ID N° 4) o la sonda de marcaje doble (SEC ID N° 5) Y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 6); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo. Los productos de la amplificación por PCR se separaron en 2% de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Como se muestra en la FIG. 7, el cebador HDD en la PCR a tiempo real hace posible la obtención de los productos de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, así como la amplificación de la señal diana (N° 3 de la FIG. 7A) y los productos de la secuencia de ácido nucleico diana amplificada, *S. pneumoniae*, se confirmaron en gel de agarosa (calle 2 de la Fig. 7B). Por otra parte, no hubo ningún cambio en la señal fluorescente en la PCR a tiempo real utilizando la sonda de marcaje doble (N° 1 de la FIG. 7A) a diferencia del cebador HDD, y tampoco se observaron productos en gel de agarosa (calle 1 de la FIG. 7B).

Cuando se utiliza la secuencia de ácido nucleico diana del gen de *N. meningitidis* como molde, las secuencias del cebador HDD de marcaje doble como un cebador directo, el cebador inverso y la sonda de doble marcaje utilizados en este ejemplo son:

NM-THD2 5'-[6-FAM]TCCACCAATGGCG[BHQ1-dT]ATAGCGGA-3' (SEC ID N° 8)

Sonda NM 5'-[6-FAM]TCCACCAATGGCGTATAGCGGA[BHQ1a-Q]-3' (SEC ID N° 9)

NM-P1 5'-CCAATCCCTATACCTTTACGTC-3' (SEC ID N° 10)

5 La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 10 ng de ADN genómico de *S. pneumoniae*, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, Taq ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 10 pmoles de cebador de doble marcado THD (SEC ID N° 8) o la sonda de marcaje doble (SEC ID N° 9) Y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 10); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo. Los productos de la amplificación por PCR se separaron en 2% de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

15 La amplificación por PCR en tiempo real para el gen de *N. meningitidis* como un ácido nucleico diana mostró los resultados similares como se muestra en la FIG. 7. Los resultados de la PCR en tiempo real utilizando el cebador HDD mostraron la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana, así como la amplificación de la señal diana (N° 3 de la FIG. 8A), y los productos de la PCR del gen de *N. meningitidis* se detectaron en gel de agarosa (calle 2 de la FIG. 8B). No obstante, no hubo ningún cambio en la señal fluorescente en la PCR a tiempo real utilizando la sonda de marcaje doble (N° 1 de la FIG. 8A) y tampoco se observaron productos de la secuencia de ácido nucleico diana mostrada en el gel de agarosa (calle 1 de la FIG. 8B).

Ejemplo 4: Especificidad de la PCR en tiempo real usando el cebador HDD

20 La especificidad de la PCR en tiempo real usando el cebador HDD se analizó mediante la detección de las secuencias de ácidos nucleicos diana del gen de *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. Para este estudio se usó el cebador de de HDD de marcaje doble como un cebador directo en la amplificación de PCR a tiempo real.

A. Especificidad de la PCR a tiempo real para *S. pneumoniae*

Las secuencias del cebador HDD de marcaje doble y del cebador inverso usados en este ejemplo son:

25 SP-THD 5'[6-FAM]TCCTTCAAACCTGTGGATT[BHQ1-dT]GGGTGT-3' (SEC ID N° 4)

SP-P2 5'-GG"TTTCCGTACAGCCTTGA-3' (SEC ID N° 6)

30 La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 1 ng de ADN genómico de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, Taq ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 10 pmoles de cebador de doble marcado THD (SEC ID N° 4) y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 6); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

35 En la PCR a tiempo real utilizando el gen de *S. pneumoniae* como un ácido nucleico diana se produjo amplificación de la señal fluorescente (N° 1 de la FIG. 9), mientras que no se observó amplificación de la señal fluorescente en la PCR a tiempo real con secuencias de ácido nucleico no diana, tales como *N. gonorrhoeae* (n° 2 de la IG. 9) y *N. meningitidis* (N° 3 de la de la FIG. 9) así como el control negativo (N° 4 de la FIG. 9).

B. Especificidad de la PCR a tiempo real para *N. meningitidis*

Las secuencias del cebador HDD de marcaje doble y del cebador inverso usados en este ejemplo son:

40 NM-THD1 5'-[6-FAM]CCATAACC[BHQ1-dT]TGAGCAATCCAIIIICCTGACGTTC-3' (SEC ID N° 7)

NM-P1 5'-CCAATCCCTATACCTTTACGTC-3' (SEC ID N° 10)

45 La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 1 ng de ADN genómico de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, Taq ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 10 pmoles de cebador de doble marcado THD (SEC ID N° 7) Y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 10); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

50 En la PCR a tiempo real utilizando el gen de *N. meningitidis* como un ácido nucleico diana se produjo amplificación de la señal fluorescente (N° 1 de la FIG. 10), mientras que no se observó amplificación de la señal fluorescente en la PCR a tiempo real con secuencias de ácido nucleico no diana, tales como *S. pneumoniae* (n° 2 de la IG. 10) y *N. meningitidis* (N° 3 de la de la FIG. 10) así como el control negativo (N° 4 de la FIG. 10).

Ejemplo 5: Sensibilidad de la PCR en tiempo real usando el cebador HDD

La sensibilidad de la PCR en tiempo real usando el cebador HDD se analizó mediante la detección de las secuencias de ácidos nucleicos diana del gen de *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. Para este estudio se usó el cebador de de HDD de marcaje doble como un cebador directo en la amplificación de PCR a tiempo real.

5 A. Sensibilidad de la PCR a tiempo real para *S. pneumoniae*

Las secuencias del cebador HDD de marcaje doble y del cebador inverso usados en este ejemplo son:

SP-THD 5'-[6-FAM]TCCTTCAAACCTGTGGATT[BHQ1-dT]GGGTGT-3' (SEC ID N° 4)

SP-P2 5'-GGTTTCCGTACAGCCTTGA-3' (SEC ID N° 6)

10 La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene el ADN genómico diluido en serie *N. meningitidis* de *S. pneumoniae* (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg o 0,1 pg), 10 µl de la mezcla de 2X QIAGEN Multiplex Master de 6 mM de MgCl₂, *Taq* DNA polimerasa y dNTP (QIAGEN), 10 pmoles del cebador marcado doblemente (SEC ID N° 4) Y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 6); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

15 Como se muestra en la FIG. 11, cuando PCR en tiempo real se realizó utilizando el ADN genómico de *S. pneumoniae* después de una dilución en serie a partir de 10 ng, se podría detectar la secuencia de ácido nucleico diana hasta 0,1 pg (N° 1-6).

B. Sensibilidad de la PCR a tiempo real para *N. meningitidis*

20 Las secuencias del cebador HDD de marcaje doble y del cebador inverso usados en este ejemplo son:

NM-THD1 5'-[6-FAM]CCATAACC[BHQ1-dT]TGAGCAATCCAIIIICCTGACGTTC-3' (SEC ID N° 7)

NM-P1 5'-CCAATCCCTATACCTTTACGTC-3' (SEC ID N° 10)

25 La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene el ADN genómico diluido en serie *N. meningitidis* de *N. meningitidis* (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg o 0,1 pg), 10 µl de la mezcla de 2X QIAGEN Multiplex Master de 6 mM de MgCl₂, *Taq* DNA polimerasa y dNTP (QIAGEN), 10 pmoles del cebador marcado doblemente (SEC ID N° 7) Y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 10); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

30 Como se muestra en la FIG. 12, cuando PCR en tiempo real se realizó utilizando el ADN genómico de *N. meningitidis* después de una dilución en serie a partir de 10 ng, se podría detectar la secuencia de ácido nucleico diana hasta 0,1 pg (N° 1-6).

Ejemplo 6: PCR anidada en tiempo real usando el cebador HDD

35 La especificidad y la sensibilidad de la PCR a tiempo real anidada usando el cebador HDD en el que se ensayaron adicionalmente mediante la detección de las secuencias de ácidos nucleicos diana del gen de *S. pneumoniae*. Para este estudio se usó el cebador de de HDD de marcaje doble como un cebador directo en la amplificación de PCR a tiempo real.

A. Especificidad por PCR en tiempo real anidada

40 Las secuencias de cebador directo y el cebador inverso para la primera ronda de PCR y la secuencia del cebador HDD de marcaje doble para la PCR en tiempo real anidada usadas en este ejemplo son:

SP-P1 5'-TTGACCACTTCGCTATTTCC-3' (SEC ID N° 3)

SP-THD 5'-[6-FAM]TCCTTCAAACCTGTGGATT/BHQ1-dT/GGGTGT-3' (SEC ID N° 4)

SP-P2 5'-GGTTTCCGTACAGCCTTGA-3' (SEC ID N° 6)

45 La primera ronda de amplificación por PCR se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 10 ng de ADN genómico de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*, 10 µl de 2X QIAGEN, 10 pmoles del cebador directo (SEC ID N° 3) y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 6) de modo que el tubo que contiene la mezcla de reacción se introdujo en el cícador térmico (ABI9700, ABI); la mezcla de reacción de desnaturizó durante 10 min a 95 °C y sometió a 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 90 segundos y 90 segundos (72 °C).

La PCR en tiempo real anidada se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 2 µl de la primera ronda del

producto de la PCR, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, Taq ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 5 pmoles de cebador de doble marcado THD (SEC ID N° 4) y 5 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 6); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 20 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

Como se muestra en la FIG. 13, se observó una secuencia de ácido nucleico señal en el ácido nucleico diana, 10 fg de la concentración de ADN genómico (No. 1-7) cuando PCR en tiempo real se realizó con el ADN genómico de *S. pneumoniae* diluido en serie como molde diana a partir de 10 ng *S. pneumoniae* (n° 1), pero no había ningún ácido nucleico no diana (n° 4).

B. Sensibilidad por PCR en tiempo real anidada

Las secuencias del cebador directo, cebador inverso y cebador e HDD de marcaje doble usados en los ejemplos son:

Se usan las mismas secuencias de cebador directo y el cebador inverso para la primera ronda de PCR y la secuencia del cebador HDD de marcaje doble para la PCR en tiempo real anidada usadas en el ejemplo 6A para la especificidad de la PCR en tiempo real anidada.

La primera ronda de amplificación de PCR La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene el ADN genómico diluido en serie *N. meningitidis* de *S. pneumoniae* (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg o 100 pg), 10 µl de la mezcla de 2X QIAGEN Multiplex Master de 6 mM de MgCl₂, Taq DNA polimerasa y dNTP (QIAGEN), 10 pmoles del cebador directo (SEC ID N° 3) y 10 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 6) de modo que el tubo que contiene la mezcla de reacción se introdujo en el cildador térmico (ABI9700, ABI); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 min a 95 °C y sometió a 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 90 segundos y 90 segundos (72 °C).

La PCR en tiempo real anidada se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 2 µl del producto de la PCR, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, Taq ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 5 pmoles de cebador de doble marcado THD (SEC ID N° 4) y 5 pmol de cebador inverso (SEC ID N° 6); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 20 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

Como se muestra en la FIG. 14, la secuencia de ácido nucleico se detectó hasta 10 fg de la concentración de ADN genómico (No. 1 - 7) cuando PCR en tiempo real se realizó con el ADN genómico de *S. pneumoniae* diluido en serie como molde diana a partir de 10 ng.

Ejemplo 7: PCR en tiempo real usando las diversas combinaciones del cebador HDD

Es un primer informe descubierto por la presente invención que un cebador general sin las modificaciones estructurales tales como un vástago de la horquilla en la baliza molecular, Sunrise o Scorpion se puede utilizar en la PCR en tiempo real con una doble función. una primera función, síntesis de la secuencia complementaria; una segunda función, generación de señales que indican una secuencia de ácido nucleico diana. Por tanto, los inventores aplicaron las varias concentraciones del cebador HDD en las amplificaciones por PCR en tiempo real, que es una de las principales ventajas del cebador HDD.

Para este estudio se usó el gen de *N. gonorrhoeae* como molde del ácido nucleico diana. El cebador HDD tiene una estructura de OCD o una estructura convencional con un marcador doble.

Las secuencias del cebador HDD de marcaje doble y de los cebadores usados en este ejemplo son:

NG-P1 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGCIIIICGAGCAAGAAC-3' (SEC ID N° 11)

45 NG-THD1 5'-[6-FAM]CAATGGATCGG[BHQ1-dT]ATCACTCGCIIIICGAGCAAGAAC-3' (SEC ID N° 12)

NG-P2 5'-ATTGGCGTGTTCGCATATTTAAG-3' (SEC ID N° 13)

NG-THD2 5'-[6-FAM]ATTGGCGTGTTCGCATA[BHQ1-dT]TTAAG-3' (SEC ID N° 14)

Sonda NG- 5'-[6-FAM]ATTGGCGTGTTCGCATA[BHQ1-dT]TTAAG[Phos-Q]-3' (SEC ID N° 15)

NG-P3 5'-TACGCCTGCTACTTTACGCTIIIIIGTAATCAGATG-3' (SEC ID N° 16)

50 NG-THD3 5'-[6-FAM]TACGCCTGCTAC[BHQ1-dT]TTACGCTIIIIIGTAATCAGATG-3' (SEC ID N° 17)

A. Combinaciones del cebador HDD de marcaje doble como un cebador directo, un cebador inverso o ambos

5 La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 1 ng de ADN genómico de *N. gonorrhoeae*, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, Taq ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 10 pmoles de cebador HDD de marcaje doble como cebador directo (SEC ID N° 12), reverse primer (SEQ ID NO: 17), o ambos (SEC ID N° 12 Y 17) y pmoles del cebador como un cebador directo (SEC ID N° 11), o cebador inverso (SEC ID N° 16); el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 40 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

B. Combinaciones del cebador HDD de marcaje doble con una sonda interna de de marcaje doble

10 Las combinaciones del cebador HDD de marcaje doble y la reacción PCR en tiempo real fueron las mismas que las utilizadas en el **Ejemplo 7A**, excepto por el uso de la sonda interna de marcaje doble (5 pmoles, SEC ID N° 15).

C. Combinaciones del cebador HDD de marcaje doble como un cebador directo y un cebador inverso y/o un cebador en dirección 5'

15 La reacción de PCR en tiempo real fue la misma que se usó en el **Ejemplo 7A**, excepto por el uso del cebador HDD de marcaje doble como un cebador directo (5 pmoles, SEC ID N° 14) el uso del cebador HDD en dirección 5' de marcaje doble (10 pmoles, SEC ID N° 12) o el cebador en dirección 5' (10 pmoles, SEC ID N° 11).

D. Combinaciones del cebador HDD de marcaje doble con un cebador interno no marcado

La reacción de PCR en tiempo real fue la misma que se usó en el **Ejemplo 7A**, excepto por el uso del cebador interno de (10 pmoles, SEC ID N° 13).

20 Como se muestra en las FIG. 15 - 18, la amplificación de la señal en tiempo real y la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana demostraron la aplicabilidad de diversas combinaciones de cebadores de HDD en la amplificación por PCR en tiempo real.

Ejemplo 8: Comparación de los procedimientos que utilizan el cebador HDD y la sonda TaqMan en la amplificación por PCR en tiempo real

25 Para investigar el mecanismo de la señalización, se comparó el procedimiento de PCR en tiempo real de la presente invención usando el cebador HDD con el procedimiento de PCR en tiempo real TaqMan usando el gen de *N. gonorrhoeae* como una molde del ácido nucleico diana.

El cebador HDD tiene una estructura de OCD con un marcador doble. Las secuencias del cebador HDD de marcaje doble, la sonda TaqMan y del cebador inverso usados en este ejemplo son:

- 30 NG-P1 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGCIIIIICGAGCAAGAAC-3' (SEC ID N° 11)
 NG-THD 5'-[6-FAM]CAATGGATCGG[BHQ1-dT]ATCACTCGCIIIIICGAGCAAGAAC-3' (SEC ID N° 12)
 NG-P2 5'-ATTGGCGTGTTCGCATATTTAAG-3' (SEC ID N° 13)
 Sonda NG- 5'-[6-FAM]ATTGGCGTGTTCGCATA[BHQ1-dT]TTAAG[Phos-Q]-3' (SEC ID N° 15)
 NG-P3 5'-TACGCCTGCTACTTTACGCTIIIIIGTAATCAGATG-3' (SEC ID N° 16)
 35 NG-THD3 5'-[6-FAM]TACGCCTGCTAC[BHQ1-dT]TTCACGCTIIIIIGTAATCAGATG-3' (SEC ID N° 17)

40 La PCR en tiempo real se realizó en el volumen final de 20 µl que contiene 1 ng de ADN genómico de *N. gonorrhoeae*, 10 µl de 2X QIAGEN Multiplex Master Mix que contiene MgCl₂ 6 mM, Taq ADN polimerasa y dNTP (Qiagen), 10 pmoles de cebador (SEC ID N° 11) o el cebador HDD de marcaje doble (SEC ID N° 12) como un cebador directo, 10 pmol de cebador (SEC ID N° 16) o el cebador HDD de marcaje doble (SEC ID N° 17) como un cebador inverso, 5 pmolES de sonda TaqMan (SEC ID N° 15), o cebador interno (SEC ID N° 13) como sonda interna/cebador; el tubo que contiene la mezcla de reacción se colocó en el termociclador en tiempo real (CFX96, Bio-Rad); la mezcla de reacción se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C y se sometió a 20 ciclos de 30 segundos a 60 °C o 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 90 segundos a 72 °C. La detección de la señal generada se realizó en la etapa de extensión (72 °C) de cada ciclo.

45 Como se muestra en la FIG. 19, se ha demostrado que las diversas combinaciones de cebadores de HDD amplifican la secuencia de ácido nucleico diana. Además, la amplificación de la señal se produce con una gran eficiencia (N°. 2, 3, 5 y 6) en ausencia de la sonda de doble marcador que por lo general se requiere para el procedimiento con la sonda TaqMan (N° 4). es decir, no sólo mostró el valor más bajo de Ct en comparación con la reacción de la sonda TaqMan, sino también una mayor intensidad de la señal fluorescente. Por lo tanto, a diferencia del procedimiento de la sonda TaqMan existente, es posible amplificar la señal diana y la secuencia de ácido nucleico diana con una mayor eficiencia, solamente usando el cebador que está diseñado para amplificar la secuencia de ácido nucleico diana.

Listado de secuencias

<110> SEEGENE, INC.

5 <120> Cebador de hibridación y Detección del la diana HDD

<150> KR10 - 2009 - 0107262

<151> 2009 - 11 - 07

10 <160> 17

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

15 <211> 200

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador SA-Tem

<400> 1

gccaataaaa ctaggaggaa atttaaatgt tagaattiga acaaggattt aatcatttag	60
cgactttaaa ggtcattggt gtaggtggg gcggttaaaa cgccgtaaac cgaatgattg	120
accacggaat gaataatgtt gaatttatcg ctatcaacac agacggtaaa gctttaaact	180
tatctaaagc tgaatctaaa	200

25

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador SA-HDD

ES 2 533 793 T3

<400> 2

cattccgtgg tcaatcattc gggt 24

5 <210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador SP-P1

<400> 3

15 ttgaccactt cgctatttcc 20

<210> 4

<211> 25

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador HDD-SP

25 <400> 4

tccttcaaac tgtggatttg ggtgt 25

<210> 5

30 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Sonda SP

<400> 5

tcctcaaac tgtgattg ggtgt 25

<210> 6

5 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador SP-P2

<400> 6

ggttccgta cagccttga 19

15

<210> 7

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador NM-THD1: n indica desoxiinosina

<400> 7

25

ccataacct gagcaatcca nnnnctga cggtc 35

<210> 8

<211> 22

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador NM-THD2

35

<400> 8

tccaccaatg gcgtatagcg ga 22

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda NM

10 <400> 9

tccaccaatg gcgtatagcg ga 22

<210> 10

15 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador NM-P1

<400> 10

ccaatcccta taccttagc tc 22

25

<210> 11

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador NG-P1; n indica desoxiinosina

<400> 11

35

caatggatcg gtatcactcg cnnnnncgag caagaac 37

<210> 12

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Cebador NG-THD1; n indica desoxiinosina

<400> 12

10

caatggatcg gtatcactcg cnnnnncgag caagaac 37

<210> 13

<211> 24

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador NG-P2

20

<400> 13

attggcgtgt ttcgcatatt taag 24

25

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador NG-THD2

<400> 14

35

attggcgtgt ttcgcatatt taag 24

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Sonda NG

<400> 15

10 attggcgtgt ttcgcatatt taag 24

<210> 16

<211> 37

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador NG-P3; n indica desoxiinosina

20 <400> 16

tacgcctgct actttcacgc tnnnnngtaa tcagatg 37

<210> 17

25 <211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador NG-THD3: n indica desoxiinosina

<400> 17

tacgcctgct actttcacgc tnnnnngtaa tcagatg 37

35

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD), que comprende las etapas de:
- (a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con el cebador HDD, en el que el cebador HDD comprende (i) hibridar una secuencia nucleotídica complementaria con la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores;
- (b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' del cebador HDD mediante el ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que el cebador HDD se extiende por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' del ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y
- (c) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además la etapa de repetir las etapas (a)-(b) o (a)-(c) con desnaturalización entre ciclos repetidos al menos dos veces para amplificar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cebador HDD usado tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) representada por la siguiente fórmula general I o una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (OEDm) representada por la siguiente fórmula general II:
- $$5'-X_p-Y_q-Z_r-3' \quad (I)$$
- en la que X_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es más alta que la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones; la porción de separación separa la primera porción de cebado en 5' de la segunda porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3' de forma que la especificidad de hibridación global del cebador HDD es potenciada;
- $$5'-X'_p-Y'_q-Z'_r-3' \quad (II)$$
- en la que X'_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y'_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z'_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X' , Y' y Z' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es inferior a la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones de X'_p , Y'_q and Z'_r ; la porción de separación separa la segunda porción de cebado en 5' de la primera porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, estando la especificidad de la hibridación del oligonucleótido determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3', de forma que la especificidad de hibridación global del cebador HDD se potencia.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cebador HDD comprende al menos un marcador en su porción terminal en 5'.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cebador HDD comprende al menos un marcador en su extremo 5'.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema marcador interactivo es un par de una molécula indicadora fluorescente y una molécula inactivadora colocada en el cebador HDD para inactivar la fluorescencia de la molécula indicadora y los dos cebadores están separados por un sitio dentro del cebador HDD susceptible a la escisión por nucleasa, de modo que permite que la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde separe la molécula indicadora fluorescente de la molécula inactivadora escindiendo en el sitio susceptible, obteniendo de este modo la señal indicativa de la presencia de la secuencia de

ácido nucleico diana.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la molécula indicadora fluorescente es localizada en la porción terminal en 5' del cebador HDD y la molécula inactivadora es localizada en 3' de la molécula indicadora fluorescente.

5 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la molécula inactivadora es localizada en la porción terminal en 5' del cebador HDD y la molécula indicadora fluorescente es localizada en 3' de la molécula inactivadora.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos de secuencias de ácido nucleico y el cebador HDD comprende al menos dos tipos de cebadores.

10 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico preamplificada.

15 12. Un procedimiento de detección de una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD), que comprende las etapas de:

(a) hibridar la secuencia de ácido nucleico diana con un par de cebadores compuesto por dos cebadores como cebador directo y cebador inverso en los que al menos un cebador es el cebador HDD capaz de amplificar la secuencia de ácido nucleico diana, en los que el cebador HDD comprende (i) una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores;

(b) poner en contacto el resultante de la etapa (a) con una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3' en las condiciones de la reacción de escisión en 5' y la reacción de extensión en 3' de los dos cebadores mediante la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde; en el que los dos cebadores se extienden por acción de la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde y es escindido por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde para liberar el marcador, o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD entre los dos cebadores, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana;

(c) desnaturalizar el resultante de la etapa (b);

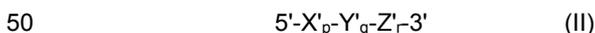
(d) repetir las etapas (a)-(c) al menos dos veces para amplificar tanto la secuencia de ácido nucleico diana como la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana; y

(e) detectar la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana, en el que la detección se realiza para cada ciclo de la repetición de la etapa (d), al final de la repetición de la etapa (d) o en cada uno de los intervalos de tiempo predeterminados durante la repetición, de forma que la señal es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el cebador HDD usado tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) representada por la siguiente fórmula general I o una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (OEDm) representada por la siguiente fórmula general II:

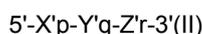


40 en la que X_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es más alta que la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones; la porción de separación separa la primera porción de cebado en 5' de la segunda porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3' de forma que la especificidad de hibridación global del cebador HDD es potenciada;



en la que X'_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y'_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z'_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de

- nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X', Y' y Z' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es inferior a la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones de X'_p, Y'_q and Z'_r; la porción de separación separa la segunda porción de cebado en 5' de la primera porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3' de forma que la especificidad de hibridación global del cebador HDD es potenciada.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el cebador HDD comprende al menos un marcador en su porción terminal en 5'.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el cebador HDD comprende al menos un marcador en su extremo 5'.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el sistema marcador interactivo es un par de una molécula indicadora fluorescente y una molécula inactivadora colocada en el cebador HDD para inactivar la fluorescencia de la molécula indicadora y los dos cebadores están separados por un sitio dentro del cebador HDD susceptible a la escisión por nucleasa, de modo que permite que la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa dependiente de molde separe la molécula indicadora fluorescente de la molécula inactivadora escindiendo en el sitio susceptible, obteniendo de este modo la señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la molécula indicadora fluorescente es localizada en la porción terminal en 5' del cebador HDD y la molécula inactivadora es localizada en 3' de la molécula indicadora fluorescente.
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la molécula inactivadora es localizada en la porción terminal en 5' del cebador HDD y la molécula indicadora fluorescente es localizada en 3' de la molécula inactivadora.
19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la secuencia de ácido nucleico diana comprende al menos dos tipos de secuencias de ácido nucleico y cada uno de los dos cebadores así como el cebador directo y el cebador inverso comprende al menos dos tipos de cebadores.
20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la secuencia de ácido nucleico diana comprende una variación nucleotídica.
21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el procedimiento es realizado de acuerdo con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el par de cebadores en el que al menos un cebador es el cebador HDD.
22. Un kit de detección de una secuencia de ácido nucleico diana de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos usando una reacción de escisión en 5' y una reacción de extensión en 3' de un cebador de hibridación y detección de la diana (cebador HDD), que comprende:
- (a) el cebador HDD que comprende (i) una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y (ii) un marcador o un sistema marcador interactivo que contiene una pluralidad de marcadores; y
- (b) una ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que tiene una actividad nucleasa de 5' a 3', en el que cuando el cebador HDD hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana, el cebador HDD se extiende mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa y el cebador para HDD se escinde mediante actividad de nucleasa 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa para liberar el marcador o al menos un marcador del sistema marcador interactivo del cebador HDD, de modo que se obtiene una señal indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana.
- en el que un kit de detección de una secuencia de ácido nucleico diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende
- una sonda discriminativa diana (sonda TD) que tiene una estructura de oligonucleótido de especificidad doble modificado (OEDm) representado por la siguiente fórmula general I para permitir discriminar la secuencia de ácido nucleico diana de una secuencia de ácido nucleico no diana:

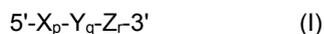


en la que X'_p representa a segunda porción de hibridación en 5' que tiene una secuencia nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y'_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z'_r representa una primera porción de hibridación en 3' que tiene una secuencia

nucleotídica de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos; y X', Y' y Z' son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la segunda porción de hibridación en 5' es inferior a la de la primera porción de hibridación en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones de in X'p, Y'q y Z'r; la porción de separación separa la segunda porción de hibridación en 5' de la primera porción de hibridación en 3' en términos de acontecimientos de hibridación a la secuencia de ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación de la sonda TD se determina de forma dual mediante la segunda porción de hibridación en 5' y la primera porción de hibridación en 3' de forma que la especificidad global de la hibridación de la sonda TD se potencia; en la que cuando la sonda TD hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana, tanto la segunda porción de hibridación en 5' como la primera porción de hibridación en 3' hibridan con la secuencia de ácido nucleico diana; en la que cuando la sonda TD hibrida con la secuencia de ácido nucleico no diana, tanto la segunda porción de hibridación en 5' como la porción de separación forman una sola hebra, de modo que la sonda TD permite la discriminación de la secuencia de ácido nucleico diana de la secuencia de ácido nucleico no diana.

23. El kit de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el kit comprende además al menos un cebador adicional, una sonda marcada o su combinación.

24. El kit de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el cebador HDD tiene una estructura de oligonucleótido de cebado doble (OCD) representado por la siguiente fórmula general I:

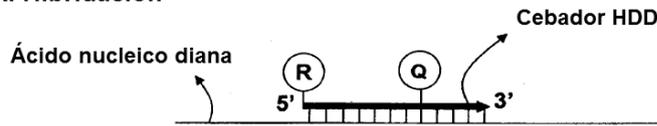


en la que X_p representa una primera porción de cebado en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; Y_q representa una porción de separación que comprende al menos tres bases universales, Z_r representa una segunda porción de cebado en 3' que tiene una secuencia de nucleótidos de hibridación complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana; p, q y r representan el número de nucleótidos, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la primera porción de cebado en 5' es más alta que la de la segunda porción de cebado en 3' y la porción de separación tiene la T_m más baja en las tres porciones; la porción de separación separa la primera porción de cebado en 5' de la segunda porción de cebado en 3' en términos de acontecimientos de hibridación al ácido nucleico diana, de modo que la especificidad de la hibridación del oligonucleótido viene determinada doblemente por la primera porción de cebado en 5' y la segunda porción de cebado en 3', de forma que la especificidad de hibridación global del cebador es potenciada.

Fig. 1A

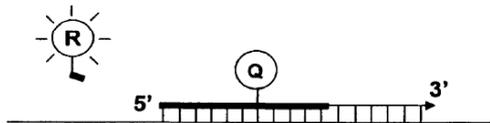
Escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD

A. Hibridación



↓ Ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa de 5' a 3'

B. Generación de señal mediante escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD



Escisión en 5' del cebador HDD mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa y extensión en 3' del cebador HDD mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa. Se obtiene una señal indicativa de la presencia del ácido nucleico diana.

↓ Detección de la señal por intervalo de tiempo predeterminado

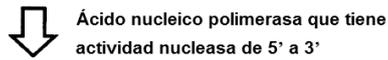
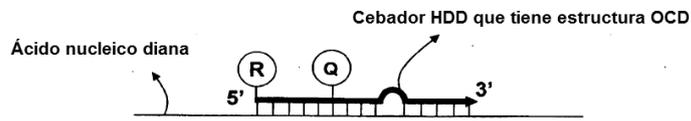
Detección de la señal en tiempo real

Ⓡ : Molécula indicadora Ⓚ : Molécula inactivadora

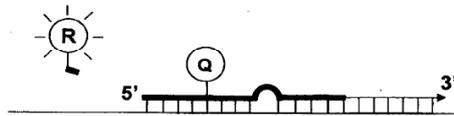
Fig. 1B

Escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD

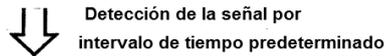
A. Hibridación



B. Generación de señal mediante escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD



Escisión en 5' del cebador HDD mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa y extensión en 3' del cebador HDD mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa. Se obtiene una señal indicativa de la presencia del ácido nucleico diana.



Detección de la señal en tiempo real

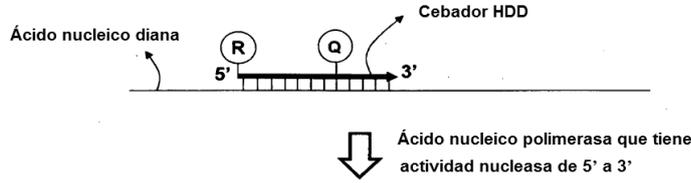
R : Molécula indicadora **Q** : Molécula inactivadora

OCD: Oligonucleótido de cebado doble

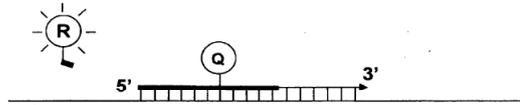
Fig. 2A

Amplificación de la señal en tiempo real

A. Hibridación



B. Generación de señal mediante escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD



Escisión en 5' del cebador HDD mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa y extensión en 3' del cebador HDD mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa. Se obtiene una señal indicativa de la presencia del ácido nucleico diana.

↓ Repetición de la desnaturalización, hibridación, escisión y extensión

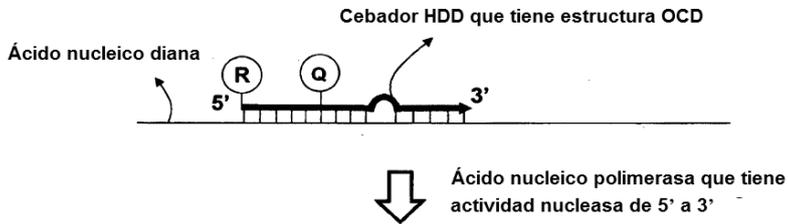
Amplificación de la señal en tiempo real

Ⓡ : Molécula indicadora Ⓚ : Molécula inactivadora

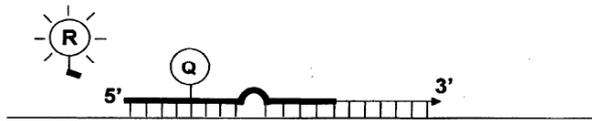
Fig. 2B

Amplificación de la señal en tiempo real

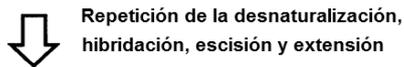
A. Hibridación



B. Generación de señal mediante escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD



Escisión en 5' del cebador HDD mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa y extensión en 3' del cebador HDD mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa. Se obtiene una señal indicativa de la presencia del ácido nucleico diana.



Amplificación de la señal en tiempo real

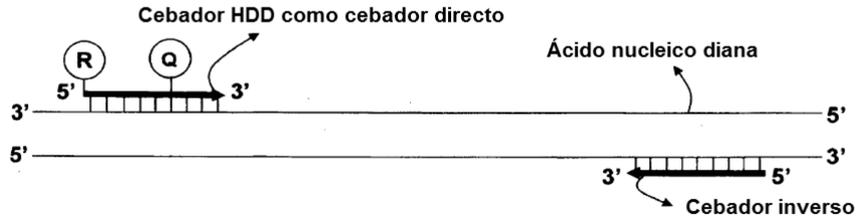
Ⓡ : Molécula indicadora Ⓚ : Molécula inactivadora

OCD: Oligonucleótido de cebado doble

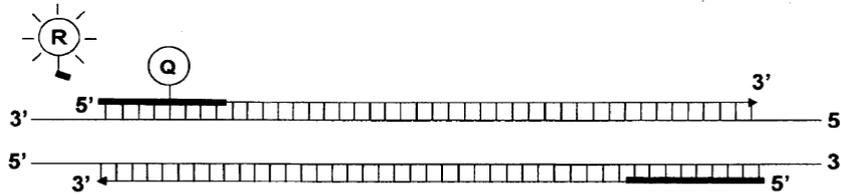
Fig. 3A

PCR en tiempo real usando el cebador HDD

A. Hibridación



B. Generación de señal mediante escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD



Escisión en 5' del cebador HDD mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa y extensión en 3' del cebador HDD mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa. Se obtiene una señal indicativa de la presencia del ácido nucleico diana.



Repetición de la desnaturalización, hibridación, escisión y extensión

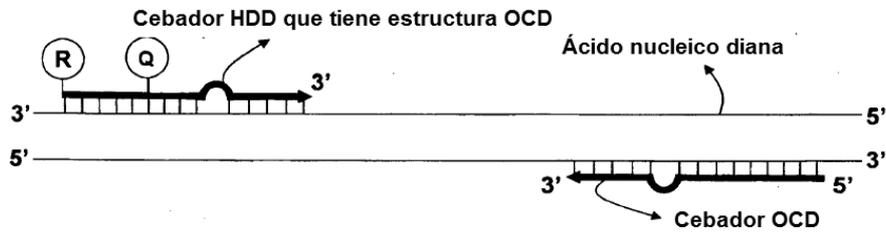
Amplificación en tiempo real de los ácidos nucleicos señal y diana

(R) : Molécula indicadora **(Q)** : Molécula inactivadora

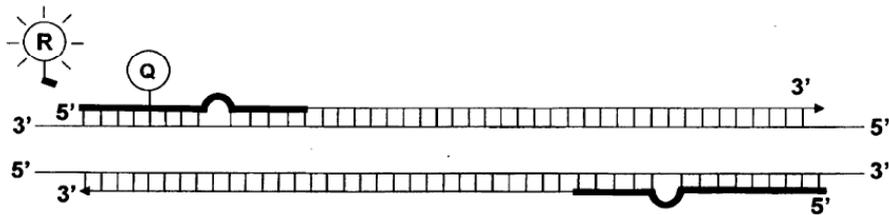
Fig. 3B

PCR en tiempo real usando el cebador HDD

A. Hibridación



B. Generación de señal mediante escisión en 5' y extensión en 3' del cebador HDD



Escisión en 5' del cebador HDD mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa y extensión en 3' del cebador HDD mediante la actividad polimerasa de la ácido nucleico polimerasa. Se obtiene una señal indicativa de la presencia del ácido nucleico diana.



Repetición de la desnaturalización, hibridación, escisión y extensión

Amplificación en tiempo real de los ácidos nucleicos señal y diana

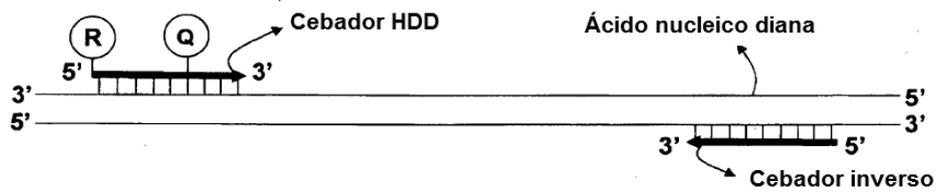
(R) : Molécula indicadora **(Q)** : Molécula inactivadora

OCD: Oligonucleótido de cebado doble

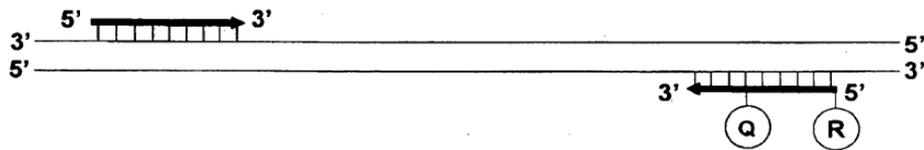
Fig. 4A

PCR en tiempo real usando diferentes combinaciones del cebador HDD

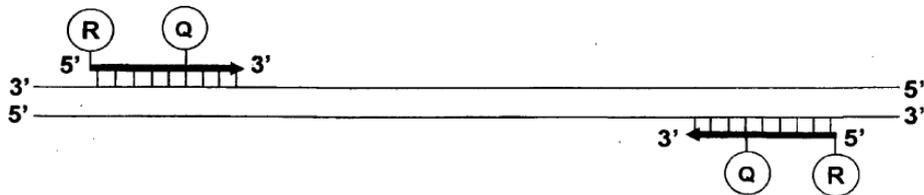
A. Combinación del cebador HDD como cebador directo



B. Combinación del cebador HDD como cebador inverso



C. Combinación de los cebadores HDD como cebadores directos e inversos



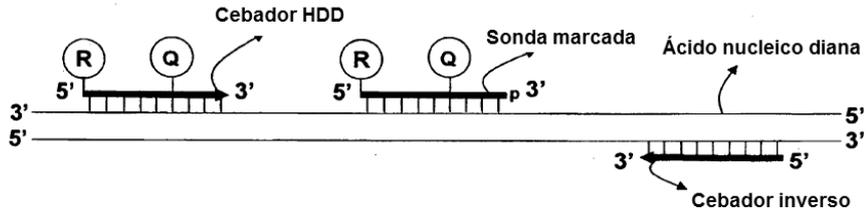
(R) : Molécula indicadora

(Q) : Molécula inactivadora

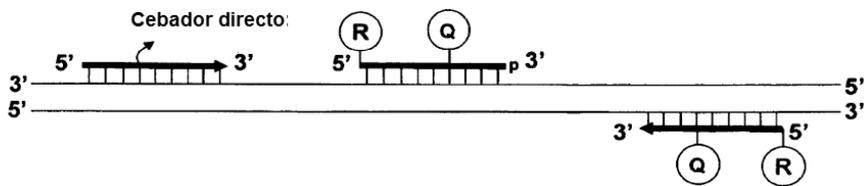
Fig. 4B

PCR en tiempo real usando diferentes combinaciones del cebador HDD

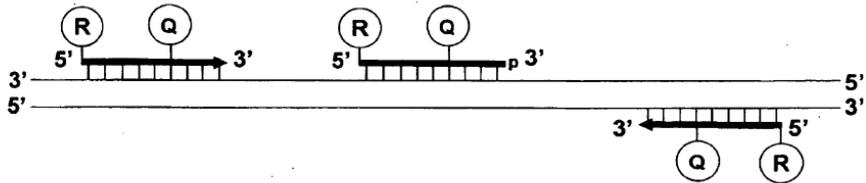
A. Combinación del cebador HDD como cebador directo con una sonda



B. Combinación del cebador HDD como cebador inverso con una sonda



C. Combinación del cebador HDD como cebadores directos/inversos con una sonda



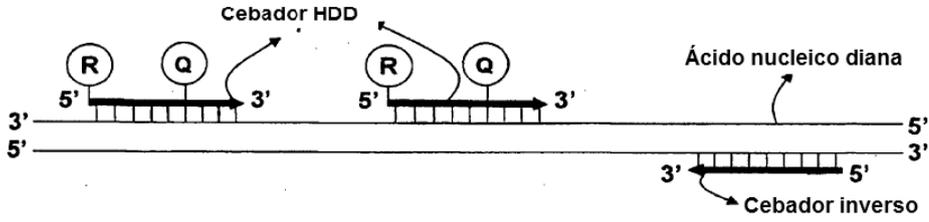
(R) : Molécula indicadora **(Q)** : Molécula inactivadora

P: Fosfato para bloquear la extensión en 3' de la sonda

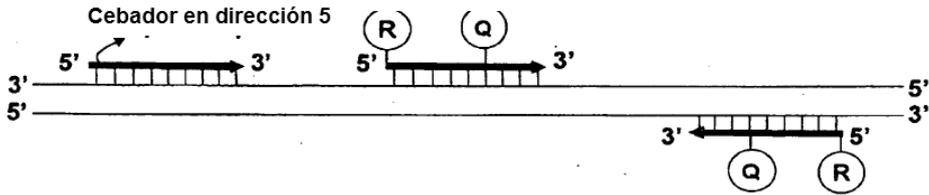
Fig. 4C

PCR en tiempo real usando diferentes combinaciones del cebador HDD

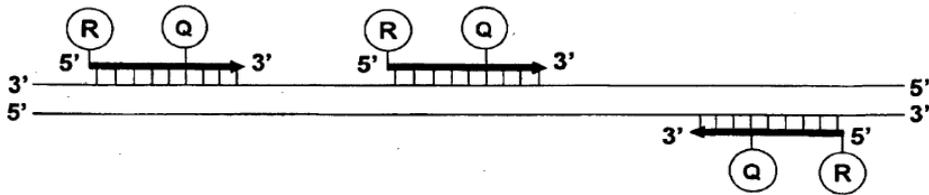
A. Combinación de los cebadores HDD como cebadores directos y en dirección 5'



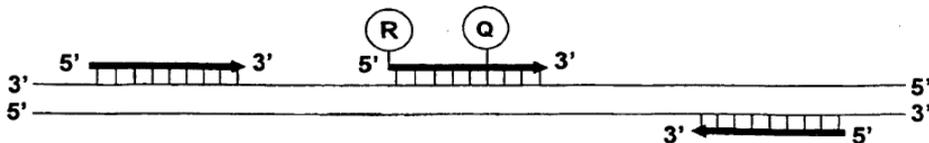
B. Combinación de los cebadores HDD como cebadores directos e inversos



C. Combinación de los cebadores HDD como cebadores directos, en dirección 5' e inversos



D. Combinación del cebador HDD como cebador directo

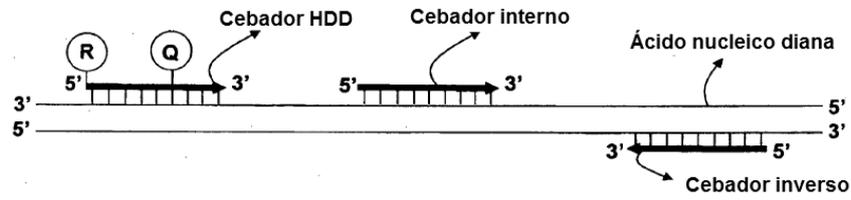


(R) : Molécula indicadora (Q) : Molécula inactivadora

Fig. 4D

PCR en tiempo real usando diferentes combinaciones del cebador HDD

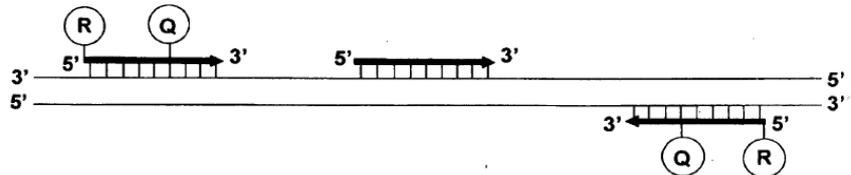
A. Combinación del cebador HDD como cebador directo con un cebador interno



B. Combinación del cebador HDD como cebador inverso con un cebador interno



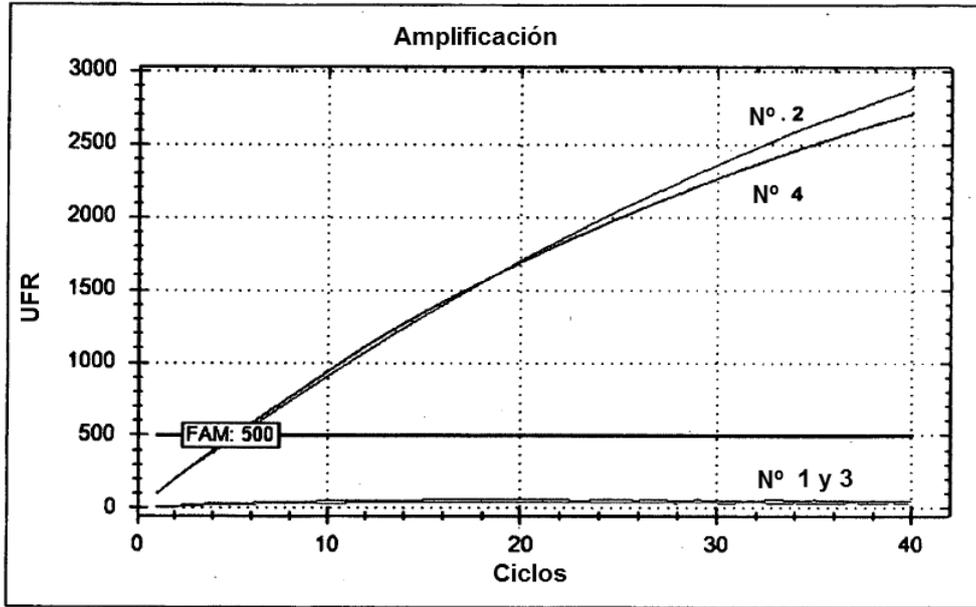
C. Combinación del cebador HDD como cebadores directos/inversos con un cebador interno



R : Molécula indicadora

Q : Molécula inactivadora

Fig. 5

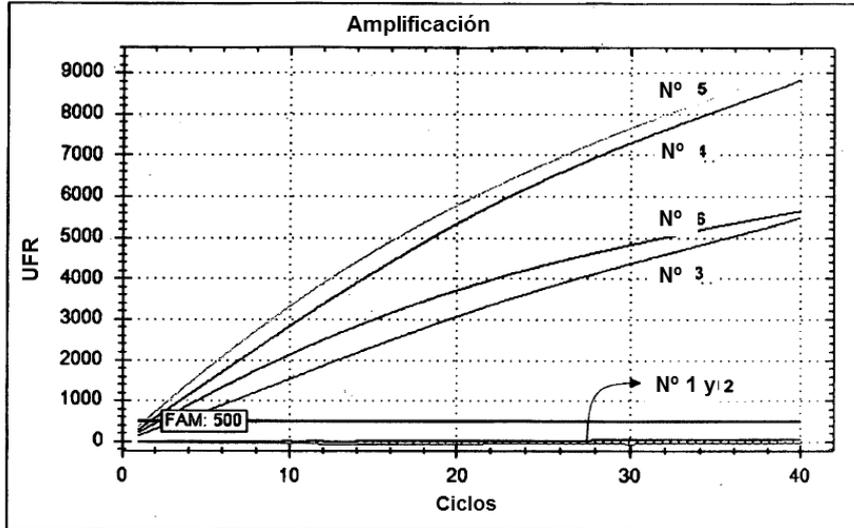


Nº	Molde ¹⁾	Cebador HDD ²⁾	Temperatura	Valor de Ct
1	-	+	55°C	-
2	+	+	55°C	5,32
3	-	+	65°C	-
4	+	+	65°C	5,09

1) El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *S. aureus*.

2) El cebador HDD tiene una estructura convencional con un marcador doble.

Fig. 6

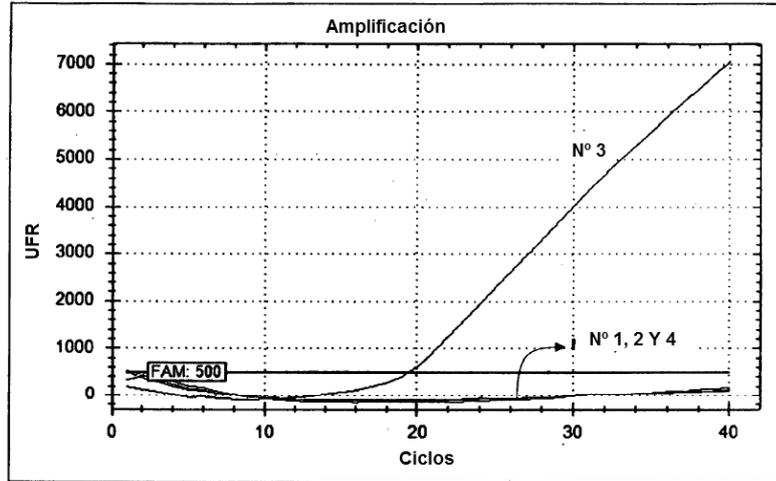


Nº	Enzima	Molde ¹⁾	Cebador HDD ²⁾	Con. de dNTP	Valor de Ct
1	-	+	+	-	-
2	+	-	+	-	-
3	+	+	+	500 µM	3,33
4	+	+	+	200 µM	1,71
5	+	+	+	20 µM	1,38
6	+	+	+	-	2,23

¹⁾ El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *S. aureus*.

²⁾ El cebador HDD tiene una estructura convencional con un marcador doble.

Fig. 7A



Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Sonda ³⁾	Cebador inverso	Valor Ct
1	+	-	+	Cebador ⁴⁾	-
2	-	-	+	Cebador	-
3	+	HDD ²⁾	-	Cebador	19,45
4	-	HDD	-	Cebador	-

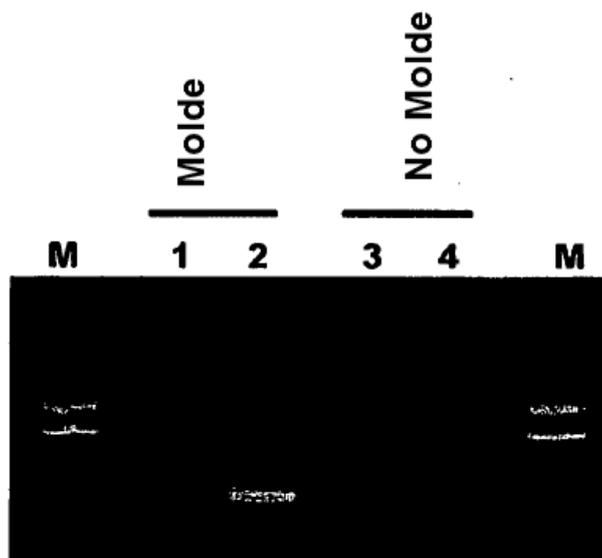
¹⁾ El molde es un oligonucleótido sintético para el gen de *S. aureus*.

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura convencional con un marcador doble.

³⁾ La sonda tiene una estructura convencional con un marcador doble y un fosfato en su extremo 3'.

⁴⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 7B

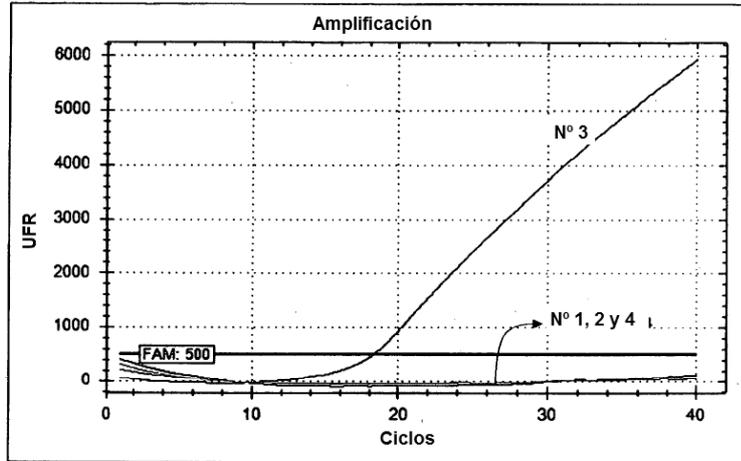


M: Marcador del tamaño del ADN

Calles 1 y 3: sonda

Calles 2 y 4: Cebador HDD

Fig. 8A



Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Sonda ³⁾	Cebador inverso	Valor Ct
1	+	-	+	Primer ⁴⁾	-
2	-	-	+	Primer	-
3	+	THD ²⁾	-	Primer	18,27
4	-	THD	-	Primer	-

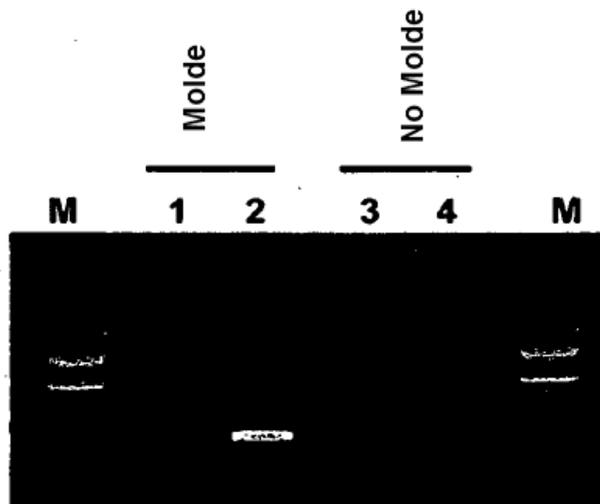
¹⁾ El molde es un oligonucleótido sintético para N. meningitidis

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura convencional con un marcador doble.

³⁾ La sonda tiene una estructura convencional con un marcador doble y un fosfato en su extremo 3'.

⁴⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 8B

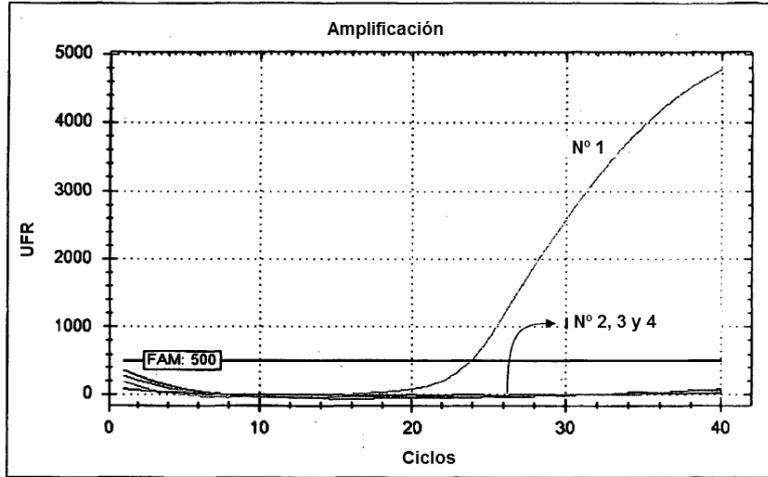


M: Marcador del tamaño del ADN

Calles 1 y 3: sonda

Calles 2 y 4: Cebador HDD

Fig. 9



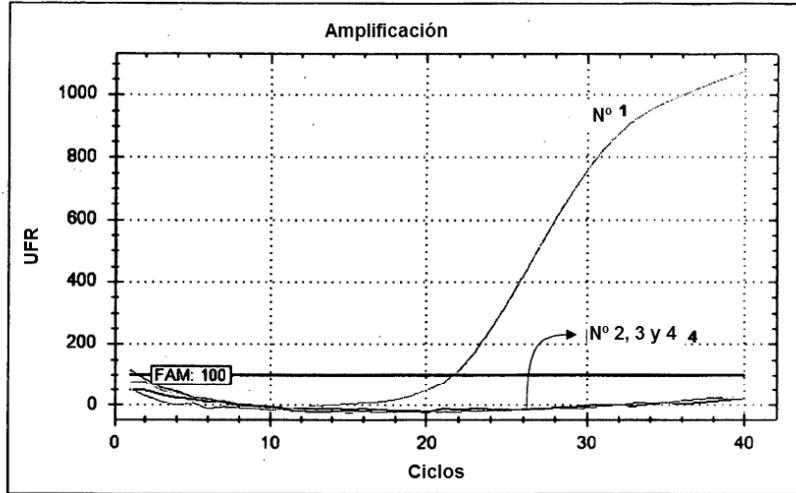
Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador inverso	Valor de Ct
1	SP	HDD ²⁾	Cebador ³⁾	23,91
2	NG	HDD	Cebador	-
3	NM	HDD	Cebador	-
4	-	HDD	Cebador	-

¹⁾ El molde es un ADN genómico para *S. pneumoniae* (SP), *N. gonorrhoeae* (NG) o *N. meningitidis* (NM).

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura convencional con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 10



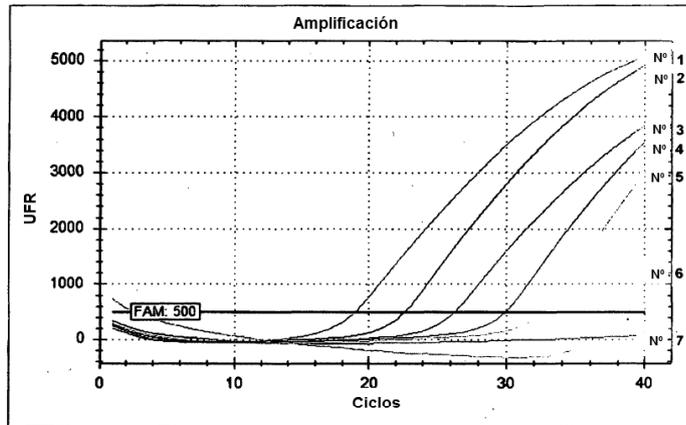
Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador inverso	Valor de Ct
1	NM	HDD ²⁾	Cebador ³⁾	21,60
2	NG	HDD	Cebador	-
3	SP	HDD	Cebador	-
4	-	HDD	Cebador	-

¹⁾ El molde es un ADN genómico para *N. meningitidis* (NM), *N. gonorrhoeae* (NG) o *S. pneumoniae* (SP).

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura convencional con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 11



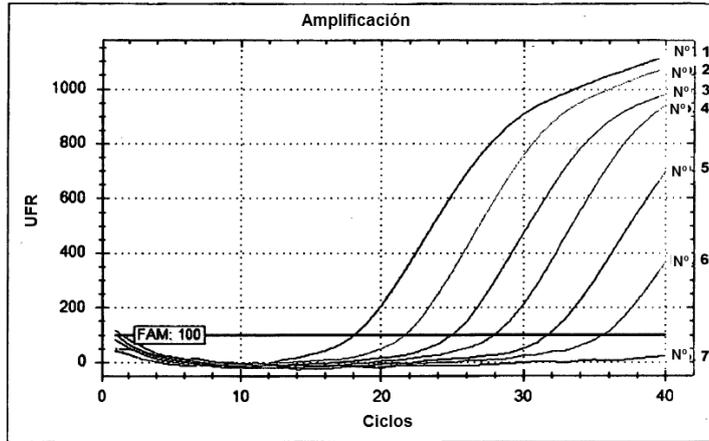
Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador inverso	Valor de Ct
1	10 ng	HDD ²⁾	Cebador ³⁾	18,98
2	1 ng	HDD	Cebador	22,62
3	100 pg	HDD	Cebador	26,27
4	10 pg	HDD	Cebador	29,96
5	1 pg	HDD	Cebador	32,65
6	0.1 pg	HDD	Cebador	37,65
7	-	HDD	Cebador	-

¹⁾ El molde es un ADN genómico de *S. pneumoniae*.

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura convencional con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 12



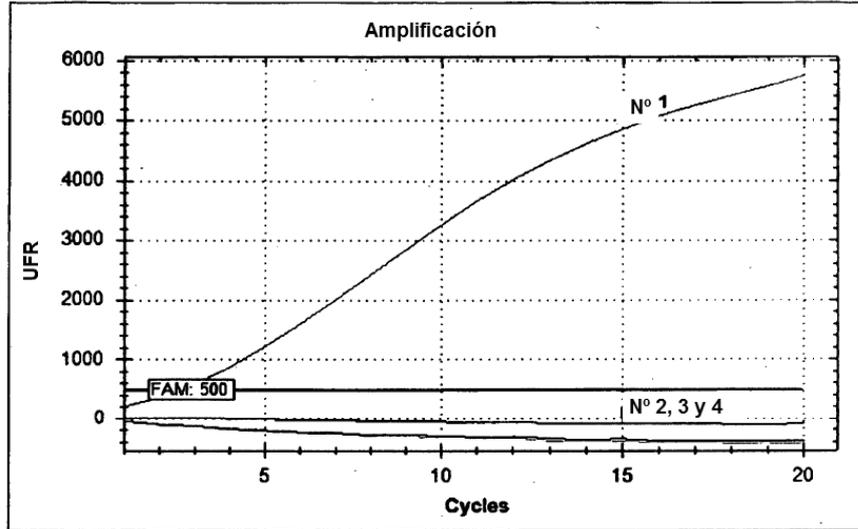
Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador inverso	Valor de Ct
1	10 ng	HDD ²⁾	Cebador ³⁾	18,09
2	1 ng	HDD	Cebador	21,60
3	100 pg	HDD	Cebador	24,93
4	10 pg	HDD	Cebador	27,90
5	1 pg	HDD	Cebador	31,67
6	0,1 pg	HDD	Cebador	35,59
7	-	HDD	Cebador	-

¹⁾ El molde es un ADN genómico de *N. meningitidis*.

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura OCD con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 13



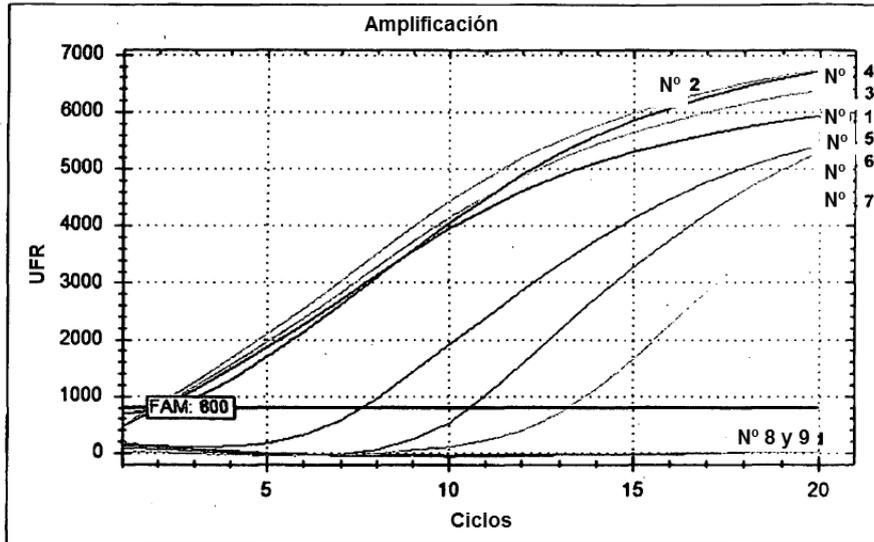
Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador inverso	Valor de Ct ₃
1	SP	HDD ²⁾	Cebador ³⁾	2,57
2	NG	HDD	Cebador	-
3	NM	HDD	Cebador	-
4	-	HDD	Cebador	-

¹⁾ El molde es un ADN genómico para *S. pneumoniae* (SP), *N. gonorrhoeae* (NG) o *N. meningitidis* (NM).

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura convencional con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 14



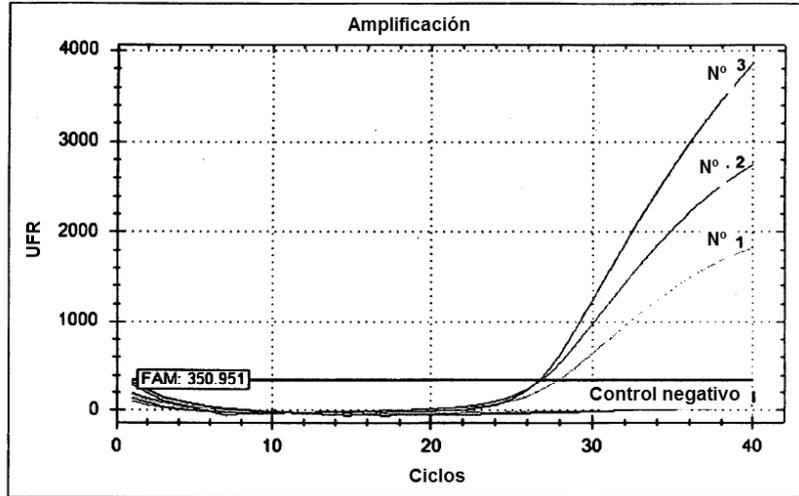
Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador inverso	Valor de Ct
1	10 ng	HDD ²⁾	Cebador ³⁾	2,09
2	1 ng	HDD	Cebador	1,85
3	100 pg	HDD	Cebador	2,01
4	10 pg	HDD	Cebador	2,18
5	1 pg	HDD	Cebador	7,59
6	100 fg	HDD	Cebador	10,55
7	10 fg	HDD	Cebador	13,24
8	1 fg	HDD	Cebador	-
9	-	HDD	Cebador	-

¹⁾ El molde es un ADN genómico de *S. pneumoniae*.

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura convencional con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 15



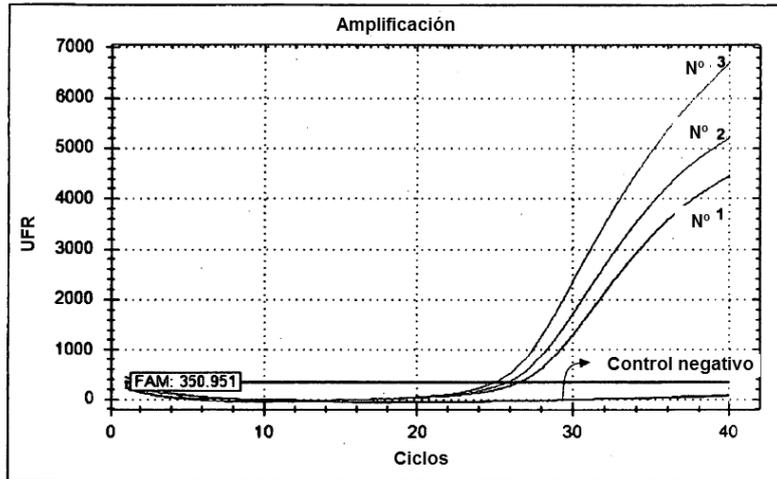
Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador inverso	Valor Ct
1	+	HDD ²⁾	Cebador	27,93
2	+	Cebador ⁻³⁾	HDD	26,90
3	+	HDD	HDD	26,72

¹⁾ El molde es un ADN genómico de *N. gonorrhoeae*.

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura OCD con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura OCD sin un marcador.

Fig. 16



Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Sonda interna ⁴⁾	Cebador inverso	Valor Ct
1	+	HDD ²⁾	+	Cebador	26,63
2	+	Cebador ³⁾	+	HDD	25,88
3	+	HDD	+	HDD	25,10

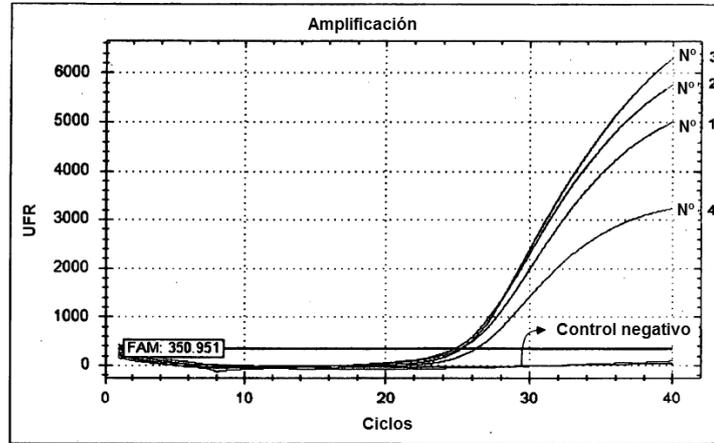
¹⁾ El molde es un ADN genómico de *N. gonorrhoeae*.

²⁾ El cebador HDD representa un cebador HDD que tiene una estructura OCD con un marcador doble.

³⁾ El cebador presenta un cebador que tiene una estructura OCD sin un marcador.

⁴⁾ La sonda interna tiene una estructura convencional con un marcador doble.

Fig. 17



Nº	Molde ¹⁾	Cebador en dirección 5' 2)	Cebador directo ³⁾	Cebador inverso ⁴⁾	Valor Ct
1	+	HDD ⁵⁾	HDD	Cebador	25,16
2	+	Primer⁶⁾	HDD	HDD	24,81
3	+	HDD	HDD	HDD	25,25
4	+	Primer	HDD	Cebador	2,25

¹⁾ El molde es un ADN genómico de *N. gonorrhoeae*.

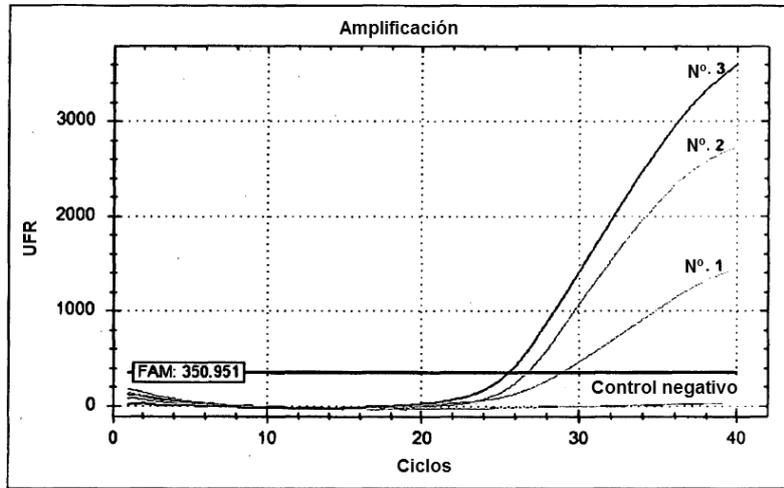
^{2), 4)} Los cebadores en dirección 5' e inversos tienen una estructura de OCD

³⁾ El cebador directo tiene una estructura convencional. -

⁵⁾ HDD representa un cebador HDD que tiene un marcador doble.

⁶⁾ El cebador representa un cebador que tiene una estructura OCD sin un marcador.

Fig. 18



Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo -	Cebador interno ⁴⁾	Cebador inverso	Valor Ct
1	+	HDD ²⁾	+	Cebador	28,89
2	+	Cebador ³⁾	+	HDD	26,75
3	+	HDD	+	HDD	25,55

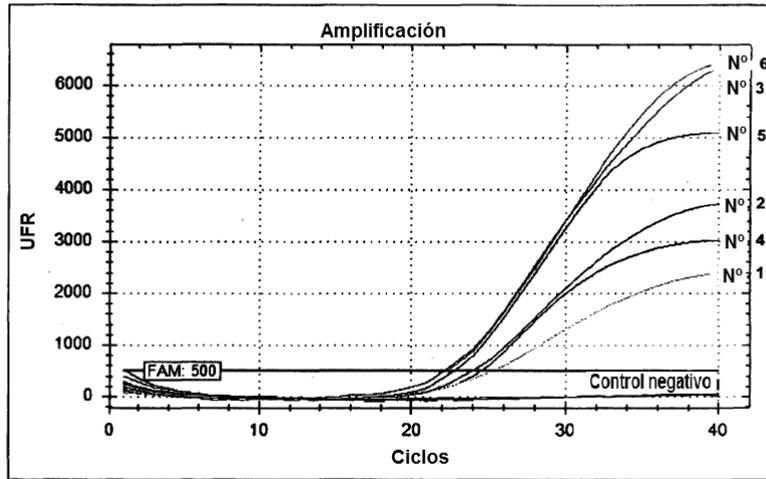
¹⁾ El molde es un ADN genómico de *N. gonorrhoeae*.

²⁾ HD representa un cebador HDD que tiene una estructura OCD con un marcador doble.

³⁾ El cebador representa un cebador que tiene una estructura OCD sin un marcador.

⁴⁾ El cebador interno tiene una estructura convencional sin un marcador.

Fig. 19



Nº	Molde ¹⁾	Cebador directo	Cebador interno ⁴⁾	Sonda interna ⁵⁾	Cebador inverso	Valor Ct
1	+	HDD ²⁾	-	-	Cebador	25,25
2	+	Cebador ³⁾	-	-	HDD	23,92
3	+	HDD	-	-	HDD	22,06
4	+	Cebador	-	+	Cebador	24,49
5	+	Cebador	+	-	HDD	22,73
6	+	HDD	+	-	HDD	22,14

¹⁾ El molde es un ADN genómico de *N. gonorrhoeae*.

²⁾ HD representa un cebador HDD que tiene una estructura OCD con un marcador doble.

³⁾ El cebador representa un cebador que tiene una estructura OCD sin un marcador.

⁴⁾ El cebador interno tiene una estructura convencional sin un marcador.

⁵⁾ La sonda interna tiene una estructura convencional sin un marcador.