

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 183**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2001 E 08007108 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1967594**

54 Título: **Detección de ácidos nucleicos por el método de captura híbrida de tipo específico**

30 Prioridad:

15.06.2000 US 594839

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

09.09.2015

73 Titular/es:

**QIAGEN GAITHERSBURG, INC. (100.0%)
1201 CLOPPER ROAD
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**ANTHONY, JAMES;
LORINCZ, ATTILA;
WILLIAMS, INNA;
TROY, JOHN y
TANG, YANGLIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 545 183 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

Detección de ácidos nucleicos por el método de captura híbrida de tipo específico

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de los métodos de detección de ácidos nucleicos en general y más particularmente se refiere a la detección de ácidos nucleicos por el método de captura híbrida de dirección específica.

10

Antecedentes de la invención

La detección de secuencias específicas de ácido nucleico presentes en una muestra biológica es importante para identificar y clasificar microorganismos, diagnosticar enfermedades infecciosas, detectar y caracterizar anomalías genéticas, identificar cambios genéticos asociados con el cáncer, estudiar la susceptibilidad genética a enfermedades, y medir la respuesta a varios tipos de tratamiento. Una técnica común para detectar y cuantificar secuencias específicas de ácido nucleico es la hibridación de ácido nucleico.

15

Hay disponibles varios métodos de hibridación para la detección y estudio de ácidos nucleicos. En un método de hibridación tradicional, los ácidos nucleicos que se van a identificar están o en una solución o fijados en un soporte sólido. Los ácidos nucleicos se detectan utilizando sondas de ácidos nucleicos marcados que son capaces de hibridarse a los ácidos nucleicos. Recientemente, hay nuevos métodos de hibridación que ofrecen mejoras significativas sobre los métodos tradicionales, que siguen careciendo de capacidad para discriminar entre secuencias de ácido nucleico altamente homólogas.

20

25

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de hibridación que no solo sea rápido y sensible sino que también sea altamente específico y capaz de discriminar secuencias de ácido nucleico diana altamente homólogas.

30

El documento US5641630 desvela un método para la detección de una secuencia de ácido nucleico diana seleccionada que implica la hibridación de la secuencia de ácido nucleico diana a una primera sonda de ácido nucleico de cadena única, para lo que la primera secuencia de sonda se une covalentemente a un primer agente complejante. Una segunda sonda de ácido nucleico de cadena sencilla, que tiene una secuencia complementaria a una parte diferente seleccionada de la secuencia diana que la que es complementaria a la primera sonda, se hibrida a la diana y se une un grupo indicador detectable a las segunda secuencia de la sonda.

35

El documento US5681697 desvela un método para detectar analitos de ácido nucleico en una muestra. El método utiliza dos o más moléculas "extensoras de captura" distintas, cada una de las cuales se tienen que unir al analito así como al soporte unido a las sondas de captura. Esto hace posible la unión de una mayor cantidad de marcadores en el complejo analito-sonda.

40

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un nuevo método de detección de ácidos nucleicos, que se denomina en el presente documento como captura híbrida específica de diana ("TSHC"). La TSHC es un método altamente específico y sensible que es capaz de discriminar y detectar secuencias altamente homólogas de ácido nucleico diana.

45

En una realización, el método se refiere a la detección de un ácido nucleico diana en que el ácido nucleico dirigido, que es de cadena sencilla o parcialmente de cadena sencilla, se hibrida simultáneamente, o secuencialmente, a una sonda de secuencia de captura y una sonda de secuencia de señal sin marcar. Estas sondas se hibridan a las regiones no solapadas del ácido nucleico diana y no entre ellas de manera que se forman híbridos de doble cadena. Los híbridos se capturan en una fase sólida y se detectan. En una realización preferida, se forma un híbrido ADN/ARN entre el ácido nucleico diana y la sonda de secuencia de señal. Utilizando este método, se puede conseguir la detección, por ejemplo, uniendo un anticuerpo marcado capaz de reconocer el híbrido ADN/ARN al híbrido de doble cadena, detectando de esta manera el híbrido.

50

55

En otra realización, la sonda de secuencia de señal que se utiliza en el método de detección es una molécula de ácido nucleico que comprende un dúplex ADN/ARN y una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla que es capaz de hibridarse al ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente de cadena sencilla. La detección se puede conseguir, por ejemplo, uniendo un anticuerpo marcado capaz de reconocer la parte dúplex ADN/ARN de la sonda de secuencia de señal, detectando de esta forma el híbrido formado entre el ácido nucleico diana, la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal.

60

En otra realización más, la sonda de secuencia de señal que se utiliza en el método de detección es una molécula que no contiene secuencias que sean capaces de hibridarse al ácido nucleico diana de cadena sencilla o

65

parcialmente de cadena sencilla. Se utilizan sondas puente que comprenden secuencias que son capaces de hibridarse al ácido nucleico diana así como secuencias que son capaces de hibridarse a la sonda de secuencia de señal. En esta realización, la sonda de secuencia de señal comprende una parte dúplex ADN/ARN y una parte de secuencia de ADN de cadena sencilla que contiene secuencias complementarias a las secuencias en la sonda puente. La secuencia puente, que se hibrida con ambos, el ácido nucleico diana y la sonda de secuencia de señal, sirviendo por lo tanto como intermediaria para conectar la sonda de secuencia de señal al ácido nucleico y la sonda de secuencia de captura que está hibridada con el ácido nucleico diana.

En otra realización del método TSHC de la invención, se utilizan sondas bloqueadoras que comprenden oligonucleótidos complementarios a las sondas de captura de secuencia en el método para eliminar el exceso de sondas de captura de secuencia, reduciendo de esta manera la señal de fondo de la detección y aumentando la especificidad del ensayo.

La presente invención también se refiere a nuevas sondas. Estas sondas son secuencias de ácido nucleico que pueden funcionar en varios ensayos de hibridación, incluyendo, por ejemplo, el ensayo TSHC.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra una realización del método de captura híbrida específica de la diana.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra una realización del método de captura híbrida específica de la diana.

La Figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra los posibles mecanismos de acción de una realización que emplea sondas de captura de secuencia fusionadas.

La Figura 4 muestra la sensibilidad y sensibilidad analítica de la detección de HSV-1 por captura híbrida específica de la diana.

La Figura 5 muestra la sensibilidad y sensibilidad analítica de la detección de HSV-2 por captura híbrida específica de la diana.

Las Figuras 6A-6D muestra las distintas realizaciones del método captura-plus híbrida específica de la diana.

La Figura 7 muestra la realización de eliminación de sonda del método de captura híbrida específica de la diana.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para detectar la presencia de ácidos nucleicos en muestras de ensayo. Más específicamente, la invención proporciona un método altamente específico y sensible que es capaz de discriminar y detectar secuencias de ácido nucleico altamente homólogas. Los usos preferidos para la presente invención son bien conocidos por los expertos y se pueden aplicar para la detección y discriminación de varias mutaciones que incluyen, pero no se limitan a inserciones, eliminaciones, inversiones, secuencias repetidas, y múltiples así como polimorfismos de nucleótido único (SNP). Adicionalmente, la presente invención puede ser también específica de grupo para la detección de dianas de ácido nucleico que comparten elementos de secuencia similares.

Se puede utilizar cualquier fuente de ácido nucleico, en forma purificada o no purificada, como muestra de ensayo. Por ejemplo, la muestra de ensayo puede ser un producto alimentario o agrícola o un espécimen clínico humano o veterinario. Normalmente, la muestra de ensayo es un fluido biológico tal como la orina, sangre, plasma, suero, esputo o similar. De manera alternativa la muestra de ensayo puede ser un espécimen de tejido sospechoso de tener un ácido nucleico de interés. El ácido nucleico diana en la muestra de ensayo puede estar presente inicialmente como un molécula separada de forma que la secuencia que se va a detectar constituye el ácido nucleico completo, o puede ser un componente de una molécula más grande. No es necesario que la secuencia de ácido nucleico que se va a detectar esté presente inicialmente en una forma pura. La muestra de ensayo puede comprender una mezcla compleja de ácidos nucleicos, de la que el ácido nucleico diana puede corresponder a un gen de interés contenido en el ADN o ARN genómico humano total o una porción de la secuencia del ácido nucleico de un organismo patógeno cuyo organismo es un componente menor de una muestra clínica.

El ácido nucleico diana en una muestra de ensayo puede ser ADN o ARN, tal como un ARN mensajero, de cualquier fuente, incluyendo bacterias, levaduras, virus, y las células o tejidos de organismos superiores tales como plantas y animales. Los métodos para la extracción y/o purificación de tales ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica. Los ácidos nucleicos diana pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. En el presente método, se prefiere que los ácidos nucleicos diana sean de cadena sencilla o hechos de cadena sencilla por técnicas convencionales de desnaturalización antes de las etapas de hibridación del método. En una realización preferida, se utiliza la técnica de desnaturalización básica para desnaturalizar el ADN diana de doble cadena.

El término "oligonucleótido" como se utiliza el término en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que está comprendida por dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Un oligonucleótido deseado se puede preparar por cualquier método adecuado, tal como purificación a partir de un ácido nucleico de origen natural, por medios de biología molecular, o por síntesis de novo. Ejemplos de nucleótidos son las sondas de ácido

nucleico descritas en el presente documento.

Las sondas de ácido nucleico son secuencias de ácido nucleico detectables que se hibridan con secuencias de ADN o ARN complementarias en una muestra de ensayo. La detección de la sonda indica la presencia de un ácido nucleico particular en la muestra de ensayo. En una realización, el método de captura híbrida específica de la diana emplea dos tipos de sondas de ácido nucleico: sonda de secuencia de captura (CSP) y sonda de secuencia de señal (SSP). Una sonda de secuencia de captura comprende una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con regiones únicas de un ácido nucleico diana y que se captura en una fase sólida. Una sonda de secuencia de señal comprende una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con regiones en un ácido nucleico diana que están adyacentes a las regiones únicas reconocidas por la CSP. Las secuencias de CSP y SSP se seleccionan de forma que no se hibriden con las mismas regiones de un ácido nucleico ni una con otra.

Además, la CSP y la SSP se seleccionan para hibridarse con regiones de la diana con 50.000 bases entre ellas. La distancia entre la secuencia con la que la CSP se hibrida con el ácido nucleico diana y la secuencia con la que se hibrida la SSP es preferentemente entre 1 a 50.000 bases, más preferentemente, la distancia es menor de 3.000 bases. Más preferentemente, la distancia es menor de 1.000 bases.

La CSP que se utiliza en el método de detección puede ser ADN, ARN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), u otros análogos de ácido nucleico. Un "ácido nucleico bloqueado" como se define en el presente documento es una nueva clase de análogos de oligonucleótido que forman dúplex con ADN y ARN complementarios con alta estabilidad térmica y selectividad. La libertad conformacional habitual del anillo de furanosa en los nucleósidos de referencia está restringida en los LNA debido al enlazador metileno que conecta la posición 2'-O a la posición 4'-C. Los PNA son oligonucleótidos en los que la estructura de azúcar-fosfato se reemplaza por una estructura poliamida o "pseudopéptido". En una realización preferida, la CSP es ADN. La CSP tiene una longitud mínima de 6 bases, preferentemente una longitud entre 15 a 100 bases, y más preferentemente una longitud entre 20 a 40 bases. La CSP es sustancialmente complementaria a la secuencia de un ácido nucleico con el que se hibrida. La secuencia de una CSP es preferentemente complementaria en al menos un 75 % con la región de hibridación diana, más preferentemente complementaria en un 100 % de esta secuencia. También se prefiere que la CSP contenga una identidad de secuencia menor a o igual al 75 %, más preferentemente una secuencia de identidad menor del 50 %, con secuencias no deseadas que se crea que estén presentes en una muestra de ensayo. La secuencia en un ácido nucleico diana a la que se une la CSP es preferentemente de una longitud de 6 bases, más preferentemente de una longitud de 20-40 bases. También puede preferirse que las secuencias con las que se hibrida la CSP sean secuencias únicas o secuencias específicas de grupo. Las secuencias específicas de grupo son múltiples secuencias relacionadas que forman grupos separados.

En una realización, la CSP que se utiliza en el método de detección puede contener una o más modificaciones en el ácido nucleico que permite la captura específica de la sonda en una fase sólida. Por ejemplo, la CSP se puede modificar marcándola con al menos un ligando por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, traducción-nick, incorporación química o fotoquímica. Además, la CSP se puede marcar en múltiples posiciones con uno o múltiples tipos de marcadores. Por ejemplo, la CSP puede marcarse con biotina, que se une a estreptavidina, o digoxigenina, que se une a la anti-digoxigenina; o 2,4-dinitrofenol (DNP), que se une al anti-DNP. También se pueden utilizar fluorógenos para modificar las sondas. Ejemplos de fluorógenos incluyen fluoresceína u sus derivados, ficoeritrina, alo-ficocianina, ficocianina, rodamina, Rojo Texas u otros fluorógenos apropiados. Los fluorógenos generalmente se aúnan por modificación química y se unen a un anticuerpo específico del fluorógeno, tal como anti-fluoresceína. Los expertos en la técnica entenderán que la CSP también se puede marcar por incorporación de una base modificada que contenga cualquier grupo químico reconocible por anticuerpos específicos. Otros marcadores y métodos de marcado de secuencias de nucleótido para la captura en una fase sólida recubierta con un sustrato se conocen bien por los expertos en la técnica. Una revisión de los marcadores de ácidos nucleicos se pueden encontrar en el artículo de Landegren, et al., "ADN Diagnostics-Molecular Techniques and Automation", Science, 242:229-237 (1988). En una realización preferida, la CSP se marca con biotina en ambos extremos, 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos. En otra realización, la CSP no se modifica pero es capturada en la matriz sólida gracias a secuencias que están contenidas en la CSP que son capaces de hibridarse con la matriz.

La SSP que se utiliza en el método de detección puede ser ADN o ARN. En una realización particular de la invención, la SSP y el ácido nucleico forman un híbrido ADN/ARN. Por lo tanto, en esta realización, si el ácido nucleico diana es un ADN, entonces la SSP preferida es un ARN. DE manera similar, si el ácido nucleico diana es un ARN, entonces la SSP es un ADN. La SSP generalmente tiene una longitud de al menos 15 bases. Sin embargo, la SSP puede ser hasta o mayor de 1000 bases de larga. Se prefieren las SSP más largas. La SSP puede comprender un único fragmento de ácido nucleico, o múltiples fragmentos de ácido nucleico más pequeños cada uno de los cuales tiene preferentemente entre 15 a 100 bases de longitud.

En otra realización, la SSP que se utiliza en el método de detección comprende un dúplex ADN/ARN y una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla que es capaz de hibridarse al ácido nucleico diana (Fig. 6A). La SSP se puede preparar clonando primero una secuencia de ADN de cadena sencilla complementaria a secuencias en el ácido nucleico diana en un vector ADN de cadena sencilla, luego se hibrida el ARN complementario de la secuencia ADN del vector para generar un dúplex ADN/ARN. Por ejemplo, si se utiliza M13 como vector ADN, se hibrida el

ARN de M13 con la secuencia de ADN M13 en el vector para generar un dúplex ADN/ARN. La SSP resultante contiene una parte dúplex ADN/ARN así como una parte de cadena sencilla capaz de hibridarse con secuencias en el ácido nucleico diana. El ADN de cadena sencilla debería tener la menos 10 bases de largo, y puede ser hasta o mayor de 1000 bases de largo. De manera alternativa, la parte de dúplex ADN/ARN de la SSP se puede formar durante o después de la reacción en la que la parte de cadena sencilla de la SSP se hibrida al ácido nucleico diana. La SSP puede ser lineal, circular, o una combinación de dos o más formas. La parte dúplex ADN/ARN de la SSP proporciona señales amplificadas para la detección de híbridos capturados utilizando anticuerpos anti-ADN/ARN como se describe en el presente documento.

En otra realización más, la SSP que se utiliza en el método de detección es una molécula que no contiene que sean capaces de hibridarse con un ácido nucleico diana. En esta realización, se utilizan sondas puente que comprenden secuencias capaces de hibridarse con el ácido nucleico diana así como secuencias capaces de hibridarse con la SSP. Las sondas puente pueden ser ADN, ARN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), u otros análogos de ácido nucleico. En una realización (Fig. 6B), la SSP comprende una parte dúplex ADN/ARN y una parte de cadena sencilla que contiene secuencias complementarias a las secuencias de la zona puente. La sonda puente, que es capaz de hibridarse tanto con el ácido nucleico diana y la SS, por lo tanto sirve como intermediaria para conectar la SSP al ácido nucleico y la CSP hibridada al ácido nucleico diana. La SSP se puede preparar como se ha descrito anteriormente. En otra realización (Fig. 6C), la SSP que se utiliza en el método de detección comprende múltiples grupos de secuencias repetidas así como una secuencia de ARN de cadena sencilla que es capaz de hibridarse con la sonda puente. Una sonda de oligonucleótido ADN contiene secuencias complementarias a las secuencias repetidas se puede utilizar para hibridarse con la SSP para generar el dúplex ADN/ARN necesario para la amplificación de la señal. En otra realización más (Fig. 6D), la sonda puente contiene una cola poli(A) además de las secuencias que son capaces de hibridarse con el ácido nucleico diana. La SSP que se utiliza en este ejemplo comprende secuencias ADN poli(dT). La sonda puente por lo tanto es capaz de hibridarse con SSP por medio de su cola poli(A). Una sonda ARN que comprende secuencias poli(A) se pueden utilizar para hibridarse con las secuencias ADN poli(dT) restantes en la SSP para formar un dúplex ADN/ARN. Las SSP que comprenden secuencias poli(dT) y la sonda ARN que comprende secuencias poli(A) tienen preferentemente 100 a 5.000 bases de largo.

La SSP que se utiliza en el método de detección de la invención puede ser no modificado o modificado en cuanto a la CSP utilizando métodos descritos anteriormente y/o que se conocen en la técnica. En una realización preferida, la SSP es una sonda sin modificar covalentemente.

Se entiende que se pueden emplear múltiples CSP y/o SSP en el método de detección de la invención.

En otra realización, una sonda de oligonucleótido que comprende secuencias complementarias de dos o más regiones distintas de un ácido nucleico diana que se fusionan juntas y se utiliza como sonda de secuencia de captura en el método de la invención. De manera alternativa, una sonda única se puede designar y producir para que contenga secuencias complementarias de ácidos nucleicos diana únicos o múltiples. Este tipo de sonda se denomina también como una CSP "fusionada". Como se muestra en el Ejemplo 5, la sonda de secuencia de captura fusionada trabaja tan eficazmente como al combinación de dos CSP no fusionadas cuando se utilizan a la misma concentración.

En una realización más de la presente invención, "sondas de eliminación de ácido nucleico" se puede utilizar en TSAR. Con el fin de minimizar el número de matrices de transcripción que es necesario construir, las sondas de eliminación de ácido nucleico, por ejemplo ARN, se diseñan tal que 1) la longitud de la sonda que se utiliza está maximizada; y 2) se evita que las sondas se solapen con la región dirigida por la CSP. Estas sondas de eliminación contienen eliminaciones internas en la matriz del ácido nucleico que se utiliza para generar las sondas. Además, estas sondas de eliminación se hibridan con ácidos nucleicos diana creando "burbujas" de ácido nucleico sin hibridar que es accesible a la hibridación con la CSP. Este método también proporciona un medio muy conveniente para hacer sondas ya que el ácido nucleico para la diana completa se puede clonar en un vector de transcripción y luego se pueden eliminar las secuencias una vez que se han identificado las regiones útiles para la hibridación con CSP. Además, este método permite el uso de sondas del genoma casi de longitud completa que no se solapan (es decir, que no se hibridan con la misma región) con las CSP. Se puede utilizar cualquier kit de mutagénesis disponible comercialmente para diseñar eliminaciones dirigidas en una matriz de transcripción. Normalmente, las eliminaciones de la matriz de ácido nucleico que se utiliza para la síntesis de SSP se llevan a cabo directamente con la matriz clonada en el vector de transcripción. Las eliminaciones en la matriz se hacen de forma que las secuencias que solapan la región hibridada por la CSP se eliminan. Las eliminaciones pueden ser tan pequeñas como la región CSP en sí misma, pero generalmente y preferentemente se eliminan aproximadamente 100 a 300 nucleótidos en los extremos 5' y 3' de la región hibridada por la CSP (véase la Figura 7).

Las sondas de ácido nucleico de la invención se pueden producir por cualquier método adecuado que se conoce en la técnica, que incluye, por ejemplo, por síntesis química, aislamiento de una fuente de origen natural, producción recombinante y PCR asimétrica (McCabe, 1990 In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego, CA., Academic Press, 76-83). Se puede preferir sintetizar químicamente las sondas en uno o más segmentos y posteriormente unir los segmentos. Varios métodos de síntesis química se describen en Narang et al. (1979 Meth.

Enzymol. 68:90), Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:109) y Caruthers et al. (1985 Meth. Enzymol. 154:287). De manera alternativa, los métodos de clonación pueden proporcionar un fragmento de ácido nucleico conveniente que se puede aislar para el uso de un cebador promotor. Una sonda ADN de doble cadena primero da lugar a uno de cadena sencilla utilizando, por ejemplo, métodos de desnaturalización convencionales antes de la hibridación con los ácidos nucleicos diana.

La hibridación se lleva a cabo bajo condiciones de hibridación de referencia bien conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de reacción para la hibridación de una sonda con una secuencia de ácido nucleico varía de sonda a sonda, dependiendo de factores tales como la longitud de la sonda, el número de nucleótidos G y C en la secuencia, y la composición del tampón utilizado en la reacción de hibridación. Las condiciones de hibridación moderadamente rigurosas generalmente se entienden por los expertos en la técnica como condiciones de aproximadamente 25 °C por debajo de la temperatura de fusión de un ADN de cadena doble con bases perfectamente emparejadas. Generalmente se consigue una especificidad más alta empleando condiciones de incubación que tienen temperaturas más altas, en otras palabras condiciones más rigurosas. El capítulo 11 del bien conocido manual de laboratorio de Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1990) describe las condiciones de hibridación para sondas de oligonucleótidos con gran detalle, incluyendo una descripción de los factores implicados en el nivel de rigurosidad necesario para garantizar una hibridación con especificidad. La hibridación se lleva a cabo en una solución acuosa tamponada, para la que se seleccionan condiciones tales como temperatura, concentración de sales, y pH para proporcionar una rigurosidad suficiente tal que las sondas se hibriden específicamente a sus respectivas secuencias de ácido nucleico pero no con cualquier otra secuencia.

En general, la eficacia de la hibridación entre la sonda y la diana mejora bajo condiciones en las que la cantidad de sonda añadida está en exceso molar respecto a la matriz, preferentemente un exceso molar de 2 a 10⁶, más preferentemente un exceso molar de 10³ a 10⁶. La concentración de cada CSP proporcionada para la captura eficaz es al menos de 25 fmoles/ml (25 pM) en la solución de hibridación final, preferentemente entre 25 fmoles a 10⁴ fmoles/ml (10 nM). La concentración de cada SSP es al menos de 15 ng/ml en la solución de hibridación final, preferentemente 150 ng/ml. La Tabla A muestra la conversión de las concentraciones de SSP expresadas en ng/ml a una base molar.

TABLA A

CONVERSIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SSP DE ng/ml A fmoles/ml		
Concentración SSP en ng/ml	Concentración SSP en fmoles/ml (pM)	
	SSP es un ARN 3kb	SSP es un ARN 5kb
15 ng/ml	15,1	9
150 ng/ml	151	90
600 ng/ml	606	364

La hibridación de la CSP y la SSP con el ácido nucleico diana se puede llevar a cabo simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden. En una realización, la hibridación de CSP y la hibridación de SSP con el ácido nucleico diana se llevan a cabo simultáneamente. El híbrido formado se captura entonces en una fase sólida recubierta con un sustrato al que se une el ligando unido a la CSP con especificidad. En otra realización, la hibridación de la SSP al ácido nucleico diana se lleva a cabo tras la hibridación de la CSP con el ácido nucleico diana. En este caso, la CSP se puede inmovilizar en una fase sólida antes o después de la hibridación. En esta realización, tanto la CSP como la diana se pueden unir a la fase sólida durante la reacción de hibridación de la SSP. Más preferentemente, la CSP y SSP se hibridan con el ácido nucleico diana, formando un complejo hibridado, en que dicho complejo es capturado entonces en una fase sólida revestida con un sustrato a cuyo ligando unido a la CSP se une con especificidad.

Con el fin de identificar y detectar secuencias de polinucleótidos específicas con especificidad y sensibilidad añadidas, se pueden diseñar ensayos tal que las condiciones sean óptimas para aumentar la señal de detección y reducir la interferencia de fondo. Los métodos preferidos para conseguir una rigurosidad añadida incluye la etapa de captura TSHC con calor y/o por medio del uso de sondas bloqueadoras. Aunque la eficacia de la captura del complejo hibridado que comprende CSP, SSP y ácido nucleico diana está influenciado por varias condiciones de ensayo, una captura con calor puede ser útil para reducir la falsa reactividad y la detección de mutaciones de al menos un nucleótido. Preferentemente, el método de captura con calor o la unión del complejo hibridado a una fase sólida utiliza un intervalo elevado de temperaturas. Con el fin de inmovilizar las dianas hibridadas con CSP después de la hibridación, la solución de hibridación se coloca en pocillos de una placa de 96 pocillos, por ejemplo, y la placa se agita durante 15 minutos a 2 horas a temperaturas que varían desde 20 °C a 90 °C agitando a 110 rpm. Opcionalmente, puede preferirse la hibridación a temperatura ambiente durante una hora agitando a 1100 rpm. Las

temperaturas por encima de la temperatura ambiente pueden preferirse para para que se produzca un nivel añadido de rigurosidad en la hibridación (e "hibridación promiscua") durante la etapa de captura en la placa. Otro medio para conseguir un alto grado de especificidad y sensibilidad es a través del uso de sondas bloqueadoras.

5 Una realización de la presente invención proporciona un método de captura con calor que utiliza elevadas temperaturas para capturar una SSP hibridada y un ácido nucleico diana que forman un complejo a una CSP inmovilizada en una fase sólida, sea simultánea o secuencialmente, en que la temperatura evita que se produzca la hibridación no específica de la CSP durante la etapa de captura en placa. La temperatura elevada también afecta la especificidad de hibridación de la SSP. La CSP que se utiliza en TSHC puede ser un ácido nucleico o un ácido nucleico modificado, preferentemente ADN, que contiene una modificación que permita la captura en una fase sólida. Un ejemplo de tal modificación es un marcador de biotina y más preferentemente múltiples marcadores de biotina. La CSP contiene un mínimo de 6 pares de bases, preferentemente 16 a 50 pares de bases con una temperatura de fusión (T_m) por encima de los 65 °C. Las CSP pueden comprender secuencias complementarias a secuencias únicas en la molécula diana de ácidos nucleicos presentes en la muestra, aunque esto no es necesario para dirigirse a múltiples especies de ácido nucleico. Por ejemplo, si una familia genética es la diana, la CSP puede comprender preferentemente un elemento de secuencia común con uno o más miembros de la familia genética. Para la mayoría de las aplicaciones, la CSP preferentemente contiene una identidad de secuencia de al menos el 70 % y más preferentemente menor del 50 %, para dianas no deseadas que se sospecha que están presentes en la muestra. El ensayo puede utilizar CSP que se diferencian un solo un único nucleótido y detectan selectivamente dianas que se diferencian en solo un único nucleótido. Ese grado de discriminación se puede facilitar utilizando la etapa de captura en placa con calor. Por ejemplo, es se utiliza una CSP marcada con biotina, la avidina o alguna otra biotina que se unen a proteínas se puede utilizar para revestir la fase sólida para la captura. Otra realización de la presente invención engloba la hibridación y captura simultáneas, en que la hibridación se lleva a cabo directamente en la captura de la fase sólida, por ejemplo en una captura en placa.

25 En otra realización más de la presente invención, el método TSHC se puede utilizar para distinguir y detectar ácidos nucleicos diana con SNP. Este método de detección de captura híbrida de polimorfismo de un único polinucleótido (HC-SNP) puede detectar SNP con alta sensibilidad y especificidad. Un ejemplo que ilustra la gran capacidad de TSHC para distinguir y detectar ácidos nucleicos diana con SNP como se describe en el presente documento, que que la captura marcada de oligonucleótidos (CSP) se utiliza, además de las sondas de secuencia de señal (SSP), y una molécula de ácido nucleico diana. Las CSP se pueden hibridar y capturar ácidos nucleicos diana a una fase sólida o superficie (por ejemplo, una placa de 96 pocillos). Los métodos de marcado son bien conocidos en la técnica y también se puede emplear para facilitar la inmovilización del ácido nucleico.

35 En un ejemplo, la captura de un ácido nucleico diana se consigue por medio de la interacción de alta afinidad entre una biotina en la CSP y una estreptavidina en la superficie sólida. Simultáneamente, se hibrida una sonda de secuencia de señal ARN (SSP) complementaria un diana ADN y no solapada con la región de captura, con el ADN diana. Los híbridos ARN/ADN se reconocen por anticuerpos dirigidos contra los híbridos ARN/ADN marcados con fosfatasa alcalina. En este ejemplo, se añade entonces un sustrato fosforilado quimioluminiscente y posteriormente, el sustrato activado se puede detectar y medir con un luminómetro. Se determinan las relaciones señal ruido utilizando un control negativo conocido. Además, la concentración de la diana se puede determinar utilizando concentraciones conocidas de moléculas diana y calibradores. La especificidad de unión y la captura del híbrido en una fase sólida se modula, regula, o se ajusta por temperaturas mayores que la temperatura ambiente, por adición de sondas bloqueadoras, o por temperaturas mayores que la temperatura ambiente y la adición de sondas bloqueadoras. De manera alternativa, la etapa de captura se puede llevar a cabo a temperatura ambiente y puede utilizar opcionalmente sondas bloqueadoras.

Otra realización de la presente invención proporciona además un método de oligonucleótido bloqueador en que en muchos casos, obvia la necesidad de una etapa de captura con calor. Esto se puede conseguir hibridando oligonucleótidos bloqueadores para la captura de oligonucleótidos a temperatura ambiente. Las sondas de captura pueden necesitar preferentemente la presencia de sondas bloqueadoras, que son complementarias a la sonda de captura. La longitud de las sondas bloqueadoras pueden variar de bloqueadores complementarios a la CSP de longitud completa bloqueadores complementarios muy cortos a solo una pequeña porción de la CSP. Por ejemplo, las sondas bloqueadoras pueden ser más cortas en 4-10 pares de bases que la longitud de la CSP.

55 La presencia de las sondas bloqueadoras reduce el fondo y hace posible un grado más alto de sensibilidad. La etapa de captura con calor y sondas bloqueadoras se puede utilizar o separadas o juntas, en que la especificidad de unión y la captura del híbrido a una fase sólida se modulan, regula, o ajusta por temperaturas mayores que la temperatura ambiente y la adición de sondas bloqueadoras.

60 Los expertos en la técnica entenderán que una fase sólida o matriz incluye, por ejemplo, poliestireno, polietileno, polipropileno, policarbonato o cualquier material plástico sólido en forma de placas, portaobjetos, placas, perlas, partículas, micropartículas, copas, cadenas, chips y tiras. Una fase sólida también incluye perlas de cristal, tubos de ensayo de cristal y otro producto de cristal apropiado. También se puede utilizar una fase sólida funcionalizada tal como un plástico o cristal que se ha modificado de forma que la superficie contiene grupos carboxilo, hidrazida, aldehído, ácido nucleico o derivados de nucleótidos. Se puede utilizar cualquier fase sólida tal como micropartículas, perlas, tiras, tubos de ensayo, portaobjetos, cadenas, chips o placas microtiter de cristal o de plástico.

En una realización preferida, la CSP se marca con biotina, y la fase sólida revestida con estreptavidina o revestida con avidina se emplea para la captura del híbrido.

Más preferentemente, se utilizan placas microtiter revestidas de estreptavidina. Estas placas se pueden revestir pasiva o covalentemente.

5 El híbrido capturado se puede detectar por medios convencionales bien conocidos en la técnica, tal como con un anticuerpo policlonal o monoclonal marcado específico del híbrido, un anticuerpo específico para uno o más ligandos unidos a la SSP, un anticuerpo marcado, o una modificación detectable de la SSP por sí misma.

10 Un método preferido de detección detecta el híbrido capturado utilizando un anticuerpo capaz de unirse al híbrido ARN/ADN (denominado en el presente documento "anticuerpo ARN/ADN"). En la presente realización, el anticuerpo anti-ARN/ADN se marca preferentemente con una enzima, una molécula fluorescente o un conjugado biotina-avidina y no es radioactivo. El marcador se puede detectar directamente o indirectamente por medios convencionales conocidos en la técnica tal como un colorímetro, un luminómetro, o un detector de fluorescencia. Un marcador
15 preferido es, por ejemplo, la fosfatasa alcalina. Otros marcadores conocidos por un experto en la técnica también se puede emplear como un medio de detección del híbrido unido de doble cadena.

La detección del híbrido capturado se consigue uniendo el anticuerpo conjugado al híbrido durante una etapa de incubación. Las superficies se lavan entonces para retirar el exceso de conjugado. Estas técnicas se conocen en la
20 técnica. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo lavados manuales utilizando un Eppendorf™ Repeat Pipettor con un Combitip™ de 50 ml (Eppendorf, Hamburg, Germany), una jeringa de repetición Coming (Corning, Corning, NY), una bomba sencilla regulada por un variostato, o por flujo gravitatorio a partir de un depósito con un tubo insertado. También se pueden utilizar los sistemas de lavado de tubos disponibles comercialmente disponibles en Source Scientific Systems (Garden Grove, CA).

25 El conjugado unido se detecta posteriormente por un método utilizado convencionalmente en la técnica, por ejemplo, colorimetría o quimioluminiscencia como se describe en Coutlee, et al, J. Clin. Microbiol. 27:1002-1007 (1989). Preferentemente, el conjugado de fosfatasa alcalina se detecta por quimioluminiscencia añadiendo un sustrato que se puede activar por la fosfatasa alcalina. Los sustratos quimioluminiscentes que se activan por la fosfatasa alcalina se conocen bien en la técnica.
30

En otra realización, el método de captura híbrida específica de la diana de la invención emplea sondas bloqueadoras además de la CSP y SSP. Una sonda bloqueadora comprende secuencias que son complementarias a las
35 secuencias de la CSP. La secuencia de una sonda bloqueadora es complementaria preferente en al menos un 75 % a la secuencia de CSP, más preferentemente complementaria en un 100 % a la CSP. La adición de las sondas bloqueadoras a la mezcla de reacción de hibridación evita que las CSP no hibridadas se hibriden por reacción cruzada con secuencias de ácido nucleico presentes en la diana y por lo tanto aumenta la especificidad de la detección.

40 La sonda bloqueadora es generalmente al menos de 5 bases de longitud, preferentemente de 12 bases de longitud. La concentración de la sonda bloqueadora en la reacción de hibridación está preferentemente en exceso respecto a la de CSP y SSP. Preferentemente, la sonda bloqueadora está presente en un exceso molar de 2 veces, aunque, puede estar presente en un exceso molar de hasta 10.000 veces. Las sondas bloqueadoras pueden ser ADN, ARN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) u otros análogos de ácido nucleico.
45

En una realización, se utilizan sondas bloqueadoras complementarias de la CSP de longitud completa o casi de longitud completa. Tras la reacción en la que se forma el híbrido entre CSP, SSP y el ácido nucleico diana, se puede
añadir a la reacción una o más sondas bloqueadoras y se continúa con la reacción durante el tiempo que se desee. Los productos de la hibridación se detectan como se ha descrito anteriormente.
50

En otra realización, se utilizan sondas bloqueadoras complementarias de solo una parte de la CSP y más cortas que la CSP. Estas sondas bloqueadoras tienen una temperatura de fusión menor que la de la CSP. Preferentemente, la temperatura de fusión de la sonda bloqueadora es 10 grados menor que la de la CSP. En este caso, la sonda
55 bloqueadora se añade preferentemente a los ácidos nucleicos diana simultáneamente con la CSP y la SSP. Como la sonda bloqueadora tiene una temperatura de fusión menor que la de CSP, la temperatura inicial para la hibridación se elige de manera que la sonda bloqueadora no interfiera con la hibridación de la CSP con sus secuencias diana. Sin embargo, cuando la temperatura de las mezclas de hibridación se ajusta por debajo de la temperatura que se utiliza para la hibridación de la diana, la sonda bloqueadora se hibrida a la CSP y bloquea eficazmente la CSP de la hibridación de reacción cruzada con secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, cuando los productos de hibridación se incuban a temperatura ambiente en placas microtiter revestidas de estreptavidina durante la captura híbrida, se
60 pueden añadir las sondas bloqueadoras.

Los siguientes ejemplos ilustran el uso del presente método de amplificación y kit y ensayo de detección. Estos ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no se pretende que limiten el alcance de la invención de ninguna
65 manera.

Ejemplo 1

Protocolo del ensayo de captura híbrida específica de diana

5 Se diluyeron partículas víricas del virus del herpes simple 1 (HSV-1) y del virus del herpes simple 2 (HSV-2) de concentración conocida (Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD) o muestras clínicas utilizando o Medio control negativo (Digene Corp., Gaithersburg, MD) o especímenes cervicales negativos (Digene). Se hicieron varias diluciones y se hicieron alícuotas en tubos de microcentrífuga individuales. Se añadió la mitad de volumen del reactivo de desnaturalización 5100-0431 (Digene). Las muestras de ensayo se incubaron a 65 °C durante 45 minutos para la desnaturalización de los ácidos nucleicos de las muestras.

Después de la desnaturalización, se añadió a la muestra una solución de hibridación que contenía SSP (600 ng/ml cada una), CSP (2,5 pmoles/ml cada una), y sondas bloqueadoras (250 pmoles/ml cada una) a las muestras y se incubaron durante una hora a 74 °C. Se añadieron entonces a la mezcla de hibridación las sondas bloqueadoras en una solución que contenía un volumen de 4x Diluyente de sondas (Digene), un volumen de reactivo de desnaturalización, y dos volúmenes de medio de control negativo y se incubó a 74 °C durante 15 minutos.

En una segunda serie de experimentos, después de la desnaturalización de los ácidos nucleicos, se añadió a las muestras una mezcla de hibridación que contenía SSP (600 ng/ml cada una), CSP (2,5 pmoles/ml cada una), y sondas bloqueadoras (250 pmoles/ml cada una) y se incubaron durante una hora a 74 °C.

Los tubos que contenían las mezclas de reacción se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se tomaron alícuotas de cada tubo y se transfirieron a pocillos individuales de una placa de captura con estreptavidina de 96 pocillos (Digene). Las placas se agitaron a 1100 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se decantaron entonces y las placas se lavaron dos veces con el tampón de lavado de captura híbrida 2 (Digene) y se invirtieron brevemente para retirar el tampón de lavado residual. Se añadió entonces el reactivo de detección 1 anti-ARN/ADN fosfatasa alcalina (DR-1; Digene) a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente de 20 °C a 25 °C). Los pocillos se sometieron entonces a múltiples etapas de lavado que incluían: 1) tres lavados con tampón de lavado Sharp (Digene) a temperatura ambiente; 2) incubación de la placa con el tampón de lavado Sharp durante 10 minutos a 60 °C sobre un bloque de calor; 3) dos lavados con el tampón de lavado Sharp a temperatura ambiente; y 4) un lavado con el tampón de lavado SNM (Digene) a temperatura ambiente. Después de la retirada del líquido residual, se añadió el sustrato luminiscente 5100-0350 (Digene) a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos individuales se leyeron entonces en un luminómetro de placas para obtener la unidad de luz relativa (RLU) de la señal.

Las soluciones que contenían el medio de control negativo o los especímenes cervicales negativos HSV, se utilizaron como controles negativos para las muestras de ensayo. Se calculó la relación señal respecto a ruido (S/N) como la relación de la media de RLU que se obtiene de una muestra de ensayo respecto a la media de RLU del control negativo. La relación señal respecto a ruido se utilizó como la base para determinar la eficacia de la captura y la detección de ácidos nucleicos diana. Un valor de S/N de dos o mayor se asignaba arbitrariamente a una señal positiva mientras que un valor de S/N menor de 2 se consideraba negativo. Se calculó el coeficiente de variación (CV) que es una determinación de la variabilidad del experimento en un grupo de muestra tomando la desviación estándar de los replicados, dividiéndolos por la media y multiplicando ese valor por 100 para dar un valor porcentual.

Las sondas de captura de secuencia y las sondas bloqueadoras que se utilizan en los experimentos descritos en los Ejemplos 2-13 se sintetizaron utilizando el método descrito por Cook et al. (1988 Nucl. Acid. Res., 16: 4077-95). A menos de que se señale otra cosa, las sondas de captura de secuencias que se utilizan en el presente documento se marcaron con biotinas en sus extremos 3' y 5'.

Las sondas de secuencia de señal que se utilizan en los experimentos descritos en los ejemplo 2-13 son sondas ARN, pero la presente invención no se limita a SSP que comprenden ARN. Estas sondas se prepararon utilizando los métodos descritos por Yisraeli et al. (1989, Methods in Enzymol., 180: 42-50).

Ejemplo 2

Las siguientes tablas describen las distintas sondas utilizadas en los experimentos descritos en los Ejemplos 3-13.

TABLA 1

CLONES HSV-1 DE LOS QUE SE DERIVAN LAS SONDAS HSV-1				
Nombre del clon	Vector huésped	Sitio(s) de clonación	Tamaño de la inserción (pb)	Localización de la secuencia en HSV-1
RH3	Dgx3	Hind III, Eco RI	5720	39850-45570

R10	Blue Script SK+	Eco RI	4072	64134-68206
RH5B	Blue Script SK+	Eco RV, Eco RI	4987	105108-110095
H19	Blue Script SK+	Hind III	4890	133467-138349

TABLA 2

CLONES HSV-2 DE LOS QUE SE DERIVAN LAS SONDAS HSV-2				
Nombre del clon	Vector huésped	Sitio(s) de clonación	Tamaño de la inserción (pb)	Localización de la secuencia en HSV-2
E4A	Blue Script SK+	Bam HI	3683	23230-26914
E4B	Blue Script SK+	Bam HI Eco RI	5600	26914-32267
18	Blue Script SK+	Hind III	2844	41624-44474
E18	Dgx3	Hind III, Eco RI	3715	44474-48189
4L	Blue Script KS+	Bam HI, Eco RI	4313	86199-90512

TABLA 3

SONDAS DE CAPTURA DE SECUENCIAS PARA HSV-1			
Sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Localización en HSV-1
TS-1	(TTATTATTA)CGTTCATGTCTGGCAAACAGCT CGTCTTATTATTA) [SEC ID N° 1]	24	105040-105063
TS-2	(TTATTATTAJCGTCCTGGATGGCGATACGGC (TTATTATTA) [SEC ID N° 2]	21	110316-110336
VH-3	CGTCCTGGATGGCGATACGGC [SEC ID N° 3]	21	110316-110336
NC-1	CGTTCATGTCTGGCAAACAGCRCGT [SEC ID N° 4]	24	105040-105063
VH-4 (fusión de VH3, NC-1)	CGTTCATGTCTGGCAAACAGCTCGT- CGTCCTGGATGGCGATACGGC [SEC ID N° 5]	45	105040-105063; 110316- 110336
HZ-1	GATGGGGTTATITTCCTAAGATGGGGC GGGTCC [SEC ID N° 6]	34	133061-133094
VH-2	TACCCCGATCATCAGTTATCCTTAAGGT [SEC ID N° 7]	28	138367-138394
FD-1	AAACCGTTCATGACCCGA [SEC ID N° 8]	19	39281-39299
RA-2	ATCGCGTGTTCAGAGACAGGC [SEC ID N° 9]	22	39156-39177
NC-2	CAACGCCCAAATAATA [SEC ID N° 10]	17	46337-46353
FD-2	GTCCCGAaCCGATCTAGCG (nótese que la letra minúscula es una base mutada) [SEC ID N° 11]	20	45483-45502
RA-4	CGAACATAAACCATTCAT [SEC ID N° 12]	22	46361-46382
ON-3	CACGCCCGTGGTTCTGGAATTCGAC [SEC ID N° 13]	25	64105-64129
HZ-2	(TTTATTA)GATGGGGTTATTTTTCTAAGATGGGG CGGGTCC [SEC ID N° 14]	34	133061-133094
ZD-1	GGTTATTITTCCTAAG [SEC ID N° 15]	16	133064-133079
ZD-2	(ATTATT)GGTTATTTTTCTAAG(ATTATT) [SEC ID N° 16]	16	133064-133079

F6R	ACGACGCCCTTGACTCCGATTCGTCATCGGATGA CTCCCT [SEC ID N° 17]	40	87111-87150
BRH19	ATGCGCCAGTGTATCAATCAGCTGTTTCGGGT [SEC ID N° 18]	32	133223-133254
F15R	CAAAACGTCTCTGGAGACGGGTGAGTGTGGCGAG GACG [SEC ID N° 19]	38	141311-141348
VH-1	GTCCCCGACCCGATCTAGCG [SEC ID N° 20]	20	45483 - 45502
ON-4	GCAGACTGCGCCAGGAACGAGTA [SEC ID N° 21]	23	68404 - 68426
PZ-1	GTGCCACGCCCGTGGTTCTGGAATTCGACAGCG A [SEC ID N° 22]	35	64105 - 64139
PZ-2	GCAGACTGCGCCAGGAACGAGTAGTTGGAGTACT G [SEC ID N° 23]	35	68404 - 68438
FG-2	AAGAGGTCCATTGGGTGGGGTTGATACGGGAAAG AC [SEC ID N° 24]	36	105069 - 105104
FG-3	CGTAATGCGGCGGTGCAGACTCCCTG [SEC ID N° 25]	27	110620 - 110646
FG-4	CCAACTACCCGATCATCAGTTATCCTT AAGGTCTCTTG [SEC ID N° 26]	39	138362 - 138400
Hsv1- LF15R (SH-3)	(AAAAAAAAA)CAAAACGTCTCTGGAGACGGGTGA GTGTGGCGAGGACG [SEC ID N° 27]	38	141311-141348
Hsv1- F15-2B (GZ-1)	CAAAACGTCTCTGGAGACGGGTGAGTGTGGCGAG GACG [SEC ID N° 28]	38	141311-141348
Hsv1- F15-3B (GZ-2)	CAAAACGTCC-bio-U-GGAGACGGGTGAG TG-bio-U-CGGCGAGGACG [SEC ID N° 29]	38	141311-141348
* Las secuencias entre paréntesis son secuencias de "cola" que no se dirigen al HSV.			

TABLA 4

SONDAS BLOQUEADORAS PARA HSV-1			
Sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Sonda de captura a la que se hibrida
EA-1	AGGAAAAATAACCCCATC [SEC ID N° 30]	18	HZ-1
EA-2	GACCCGCCCATCTT [SEC ID N° 31]	15	HZ-1
ZD-3	GGACCCGCCCATCTTAGGAAAAATAAC CCCATC [SEC ID N° 32]	34	HZ-1
NG-7	AAAAATAACCCA [SEC ID N° 33]	13	HZ-1
NG-8	CGCCCATCTT [SEC ID N° 34]	11	HZ-1
NG-4	CCATCTTAGGAAAA [SEC ID N° 35]	15	HZ-1
GP-1	ATAACTGATGATCGG [SEC ID N° 36]	15	VH-Z
EA-3	CCACCCAATGGACCTC [SEC ID N° 37]	16	FG-2
EA-4	GTCTTTCCCGTATCAACC [SEC ID N° 38]	18	FG-2
EB-7	CGCCGCATTACG [SEC ID N° 39]	12	FG-3
EB-8	AGGGGAGTCTGC [SEC ID N° 40]	12	FG-3
GP-3	CTGTTTGCCGACA [SEC ID N° 41]	13	VH-4

GP-4	TATCGCCATCCAG [SEC ID N° 42]	13	VH-4
EB-9	ATGATCGGGTAGT [SEC ID N° 43]	14	FG-4
EB-10	AGAGACCTTAAGGATA [SEC ID N° 44]	16	FG-4
NG-1	ATTCCAGAACCACGG [SEC ID N° 45]	15	ON-3
NG-2	TTCCAGAACCACG [SEC ID N° 46]	13	ON-3
NG-3	TCCAGAACCAC [SEC ID N° 47]	11	ON-4
GP-5	GTTCTGGCGCAG [SEC ID N° 48]	13	ON-4
GP-6	TTCCTGGCGCAG [SEC ID N° 49]	12	ON-4

TABLA 5

SONDAS DE CAPTURA DE SECUENCIAS PARA HSV-2			
Sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Localización en HSV-2
NF-1	GCCCGCGCCGCCAGCACTACTTTTC [SEC ID N° 50]	24	41610-41587
FG-1	AAACGTTGGGAGGTGTGTGCGTCATCCTG GAGCTA [SEC ID N° 51]	35	48200-48234
LE-3	GACCAAAACCGAGTGAGGTTCTGTGT [SEC ID N° 52]	26	48732-48757
NF-2	AAACGTTGGGAGGTGTGTGCGTCA [SEC ID N° 53]	24	48200-48223
RA-3	TGRCRCGTCACGAAGTCACTCATG [SEC ID N° 54]	23	22756-22734
ON-2	CATTACTGCCCGCACCCGGACC [SEC ID N° 55]	21	23862-23842
LE-1	GCCGTGGTGTTCCTGAACACCAGG [SEC ID N° 56]	24	27666-27643
LE-4	AGTCAGGGTTGCCCGACTTCGTAC [SEC ID N° 57]	25	22891-22867
NF-3	CAGGCGTCCTCGGTCTCGGGCGGGGC [SEC ID N° 58]	26	32847-32822
NF-4	CCCACGTCACCGGGGGCCCC [SEC ID N° 59]	20	26743-26724
LE-2	GCCGTGCGGTGCGACGCCAAGGC [SEC ID N° 60]	25	33130-33106
SG-3	CCGACGCGTGGGTATCTAGGGGTGCG [SEC ID N° 61]	26	90559 - 90534
SG-4	CGGACGGCGAGCGGAAAGTCAACGT [SEC ID N° 62]	26	86194 - 86169

TABLA 6

SONDAS BLOQUEADORAS PARA HSV-2			
Nombre de sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Sonda de captura a la que se hibrida
HX-4	GGCGCGGGC [SEC ID N° 63]	9	NF-1
HX-5	GAAAGTAGTGCTGGC [SEC ID N° 64]	15	NF-1
GP-7	TGCTGGCGGCG [SEC ID N° 65]	11	NF-1
AZ-3	ACACCTCCCAACG [SEC ID N° 66]	13	FG-1
AZ-4	CTCCAGGATGACG [SEC ID N° 67]	13	FG-1
GR-1	TCGGTTTTGGTC [SEC ID N° 68]	12	LE-3
GR-2	ACACAGAACCTCA [SEC ID N° 69]	13	LE-3
GP-8	CACACACTCCCA [SEC ID N° 70]	13	NF-2
BR-10	CGACCCCTAGATA [SEC ID N° 71]	14	SG-3

BR-11	CCACGCGTCGG [SEC ID Nº 72]	11	SG-3
HX-6	ACGTTGACTTTCCGC [SEC ID Nº 73]	15	SG-4
BR-15	CGCCGTCCCG [SEC ID Nº 74]	10	SG-4

TABLA 7

SONDAS DE CAPTURA DE SECUENCIA PARA HPV			
Sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Tipo de HPV y localización de secuencia
ZL-1	GTACAGATGGTACCGGGTTGTAGAAGTATCTG [SEC ID Nº 75]	33	HPV16 5360-5392
ZL-4	CTGCAACAAGACATACATCGACCGGTCCACC [SEC ID Nº 76]	31	HPV16 495-525
DP-1	GAAGTAGGTGAGGCTGCATGTGAAGTGGTAG [SEC ID Nº 77]	31	HPV16 5285-5315
DP-4	CAGCTCTGTGCATAACTGTGGTAACTTTCTGGG [SEC ID Nº 78]	33	HPV16 128-160
SH-1	GAGGTCTTCTCCAACATGCTATGCAACGTCCTG [SEC ID Nº 79]	33	HPV31 505-537
SH-4	GTGTAGGTGCATGCTCTATAGGTACATCAGGCC [SEC ID Nº 80]	33	HPV31 5387-5419
VS-1	CAATGCCGAGCTTAGTTCATGCAATTTCCGAGG [SEC ID Nº 81]	33	HPV31 132-164
VS-4	GAAGTAGTAGTTGCAGACGCCCTAAAGGTTGC [SEC ID Nº 82]	33	HPV31 5175-5207
AH-1	GAACGCGATGGTACAGGCACTGCAGGGTCC [SEC ID Nº 83]	30	HPV18 5308-5337
AH-2	GAACGCGATGGTACAGGCACTGCA [SEC ID Nº 84]	24	HPV18 5314-5337
AL-1	ACGCCCACCCAATGGAATGTACCC [SEC ID Nº 85]	24	HPV18 4451-4474
PA-4	TCTGCGTCGTTGGAGTCGTTCTGTCGTGCTC [SEC ID Nº 86]	32	HPV18 535-566
18-1AB	(TTATTATTA)CTACATACATTGCCX3CCATGTTCCG CCA[SEC ID Nº 87]	36	HPV18 1369-1395
18-2AB	(TTATTATTA)JTGTTGCCCTCTGTGCCCCCGTTGT CTATAGCCTCCGT [SEC ID Nº 88]	46	HPV18 1406-1442
18-3AB	(TTATTATTA)GGAGCAGTGCCCAAAGATTAAGTTGC [SEC ID Nº 89]	38	HPV18 7524-7552
18-4AB	(TTATTATTA)CACGGTGTGGAATACGGTGAGG GGGTG [SEC ID Nº 90]	37	HPV18 3485-3512
18-5AB	(TTATTATTA)ACGCCCACCCAATGGAATGTACCC [SEC ID Nº 91]	33	HPV18 4451-4474
18-6AB	(TTATTATTA)ATAGTATTGGTGTGTTTCTCAC AT [SEC ID Nº 92]	35	HPV18 81-106
18-7AB	(TTATTATTA)GTTGGAGTCGTTCTGTCGTG [SEC ID Nº 93]	30	HPV18 538-558

18-8AB	(TTATTATTA)CGGAATTTTCATTTTGGGGCTCT [SEC ID N° 94]	31	HPV18 634-655
PE-1	GCTCGAAGGTCGTCTGCTGAGCITTCTACTACT [SEC ID N° 95]	33	HPV18 811-843
PZ-2	GCGCCATCCTGTAATGCACTTTTCCACAAAGC [SEC ID N° 96]	32	HPV45 77-108
PZ-5	TAGTGCTAGGTGTAGTGGACGCAGGAGGTGG [SEC ID N° 97]	31	HPV45 5295-5325
CS-1	GGTCACAACATGTATTACACTGCCCTCGGTAC [SEC ID N° 98]	32	HPV45 500-531
CS-4	CCTACGTCTGCGAAGTCTTGCCGTGCC [SEC ID N° 99]	31	HPV45 533-563
PF-1	CTGCATTGTCACTACTATCCCCACCACTACTTTG [SEC ID N° 100]	34	HPV45 1406-1439
PF-4	CCACAAGGCACATTCATACATACACGCACGCA [SEC ID N° 101]	32	HPV45 7243-7274
PA-1	GTTCTAAGGTCCTCTGCCGAGCTCTCTACTGTA [SEC ID N° 102]	33	HPV45 811-843
45-5AB	(TTATTATTA)TGCGGTTTTGGGGTTCGACGTGGA 1 GGC[SEC ID N° :103]	36	HPV45 3444-3470
45-6AB	(TTATTATTA)AGACCTGCCCCCTAAGGGTACATA GCC[SEC ID N° 104]	36	HPV45 4443-4469
45-8AB	(TTATTATTA)CAGCATTGCAGCCTTTTTGTTACT TGCTTGAATAGCTCC [SEC ID N° 105]	49	HPV45 1477-1516
45-9AB	(TTATTATTA)ATCCTGTAATGCACTTTTCCACAA A [SEC ID N° 106]	34	HPV45 79-103
45-10AB	(TTATTATTA)GCCTGGTCACAACATGTATTAC [SEC ID N° 107]	31	HPV45 514-535
45-11AB	(TTATTATTA)CAGGATCTAATTCATTCTGAGGTT [SEC ID N° 108]	33	HPV45 633-656
ON-1	TGCGGTTTTGGGGTTCGACGTGGAGGC [SEC ID N° 109]	27	HPV45 3444-3470

* Las secuencias entre paréntesis son secuencias de “cola” que no se dirigen al HSV.

TABLA 8

SONDAS BLOQUEADORAS PARA HPV

5

Sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Sonda de captura a la que se hibrida
PV-FD-1	GCXTCCACGTCGAC [SEC ID N° 110]	14	ON-1/45-5AB
PV-FD-2	CCCCAAAACCG [SEC ID N° 111]	11	ON-1/45-5AB
PV-FD-3	GGTACATTCCATTGGG [SEC ID N° 112]	16	18-5AB/AL-1
PV-FD-4	TGGGCGTTAATAATAA [SEC ID N° 113]	16	18-5AB
AH-3	ACCATCGCGTTC [SEC ID N° 114]	12	AH-2
AH-4	GGACCCTGCAGTGC [SEC ID N° 115]	14	AH-1
AH-5	CTGTACCATCGCGTT 3'[SEC ID N° 116]	15	AH-1
AH-6	TGCAGTGCCTGT [SEC ID N° 117]	12	AH-2

PZ-1	CCACCTCCTGCGT [SEC ID Nº 118]	13	PZ-5
PZ-3	ATTACAGGATGGCGC [SEC ID Nº 119]	15	PZ-2
PZ-4	GCTTTGTGGAAAAGTG [SEC ID Nº 120]	16	PZ-2
PZ-6	CCACTACACCTAGCACTA [SEC ID Nº 121]	18	PZ-5
ZL-2	CAGATACTTCTACAACC [SEC ID Nº 122]	17	ZL-1
ZL-3	CCGGTACCATCTGTAC [SEC ID Nº 123]	16	ZL-1
ZL-5	GGTGGACCGGTCG [SEC ID Nº 124]	13	ZL-4
ZL-6	ATGTATGTCTTGTTCAG [SEC ID Nº: 125]	18	ZL-4
DP-2	CTACCACTTCACATGC [SEC ID Nº 126]	16	DP-1
DP-3	AGCCTCACCTACTTC [SEC ID Nº 127]	15	DP-1
DP-5	CCCAGAAAGTTACCAC [SEC ID Nº 128]	16	DP-4
DP-6	AGTTATGCACAGAGCT [SEC ID Nº 129]	16	DP-4
SH-2	CAGGACGTTGCATAGC [SEC ID Nº 130]	16	SH-1
SH-3	ATGTTGGAGAAGACCTC [SEC ID Nº 131]	17	SH-1
SH-5	GGCCTGATGTACCTATA [SEC ID Nº 132]	17	SH-4
SH-6	GAGCATGCACCTACAC [SEC ID Nº 133]	16	SH-4
VS-2	CTCGGAAATTGCATG [SEC ID Nº 134]	15	VS-1
VS-3	AACTAAGCTCGGCATT [SEC ID Nº 135]	16	VS-1
VS-5	GCAACCTTTAGGGG [SEC ID Nº 136]	14	VS-4
VS-6	CGTCTGCAACTACTACTTC [SEC ID Nº 137]	19	VS-4
CS-2	GTACCGAGGGCACT [SEC ID Nº 138]	14	CS-1
CS-3	GTAATACATGTTGTGACC [SEC ID Nº 139]	18	CS-1
CS-5	GGCACGGCAAGAAA [SEC ID Nº 140]	14	CS-4
CS-6	GACTTCGCAGACGTAGG [SEC ID Nº 141]	17	CS-4
PF-2	CAAAGTAGTGGTGGG [SEC ID Nº 142]	15	PF-1
PF-3	GATAGTAGTGACAATGCAG [SEC ID Nº 143]	19	PF-1
PF-5	TGCGTGCGTGTATGTA [SEC ID Nº 144]	16	PF-4
PF-6	TGAATGTGCCTTGTGG [SEC ID Nº 145]	16	PF-4
PE-2	AGTAGTAGAAAGCTCAGC [SEC ID Nº 146]	18	PE-1
PE-3	AGACGACCTTCGAGC [SEC ID Nº 147]	15	PE-1
PA-2	TACAGTAGAGAGCTCGG [SEC ID Nº 148]	17	PA-1
PA-3	CAGAGGACCTTAGAAC [SEC ID Nº 149]	16	PA-1
PA-5	GAGCAGCAGGAACG [SEC ID Nº 150]	16	PA-4
PA-6	ACTCCAACGACGCAGA [SEC ID Nº 151]	16	PA-4

Ejemplo 3

Efecto de la extensión de marcado con biotina sobre la eficacia de la captura

5

Los ensayos se llevaron a cabo para determinar el número óptimo de marcadores por sonda de secuencia de captura para la detección TSHC. Se empleó el método TSHC general que se describe en el Ejemplo 1. Se ensayó la eficacia de la sonda de secuencia de captura F15R marcada con una, dos, o tres biotinas, que se miden por la relación señal respecto a ruido (S/N). La sonda de secuencia de señal era H19. Como se muestra en la Tabla 8, eran suficientes dos biotinas por sonda de secuencia de captura para una eficacia óptima de captura. Se observaba un aumento mayor de un 50 % en S/N utilizando una sonda de secuencia de captura con dos marcadores de biotina en comparación con la sonda de secuencia de captura marcada con una única biotina. La adición de un tercer marcador de biotina a la sonda de secuencia de captura da como resultado una disminución del S/N respecto a la sonda de secuencia de captura marcada con dos biotinas.

15

TABLA 9

EFECTO DE LA EXTENSIÓN DE MARCADO CON BIOTINA SOBRE LA EFICACIA DE LA CAPTURA				
Nº de Biotinas	HSV-1/pocillo	RLU	CV	S/N
Una	0	54	3 %	1,0

Una	4,5x10 ³	236	2 %	4,4
Una	4,5x10 ⁴	1861	3 %	34,5
Una	4,5x10 ⁵	15633	7 %	289,5
Dos	0	46	3 %	1,0
Dos	4,5x10 ³	296	10 %	6,4
Dos	4,5x10 ⁴	2558	1 %	55,6
Dos	4,5x10 ⁵	23369	4 %	508,0
Tres	0	44	22 %	1,0
Tres	4,5x10 ³	243	6 %	5,5
Tres	4,5x10 ⁴	1820	2 %	51,4
Tres	4,5x10 ⁵	18581	8 %	422,3

Ejemplo 4

Efecto de la distancia entre los sitios diana de la CSP y la SSP sobre la eficacia de la captura

5 Se evaluó el efecto de la distancia entre los sitios de hibridación de la sonda de secuencia de captura (CSP) y la sonda de secuencia de señal (SSP) sobre un ácido nucleico diana HSV-1 sobre la eficacia de captura. Se ensayaron las CSP que se hibridan a secuencias del ácido nucleico HSV-1 que se localizan a 0,2 kb, 3 kb, 18 kb, 36 kb, y 46 kb del sitio de hibridación de la SSP. Se empleó el método general TSHC descrito en el Ejemplo 1. Las eficacias fueron del 100 %, 50 %, 30 %, 19 % y 7 % , respectivamente (Tabla 10). Se observó una disminución regular con respecto a las eficacias de captura según aumentaba la distancia de 0,2 kb a 46 kb.

TABLA 10

EFEECTO DE LA DISTANCIA ENTRE LOS SITIOS DIANA SOBRE LA EFICACIA DE CAPTURA			
CSP	SSP	Distancia entre los sitios diana	Eficacia de captura relativa
BRH19	H19	0,2 Kb	100 %
F15R	H19	3 Kb	50 %
F6R	RH5B	18 Kb	30 %
F15R	RH5B	36 Kb	19 %
F6R	H19	46 Kb	7 %

Ejemplo 5

Efecto de la sonda de secuencia de captura fusionada sobre la detección TSHC de HSV-1

15 La capacidad de unión de las placas de estreptavidina se determinó que era aproximadamente 2 pmoles de CPS biotinilada doblemente por pocillo. Aunque las CSP estaban doblemente marcadas con biotina, se prefiere un máximo de 8 CSP (2 CSP por cada SSP) con el fin de que no se exceda la capacidad de unión de los pocillos. Cualquier aumento en la sonda de secuencia de captura marcada con biotina por encima de la capacidad establecida daba como resultado una disminución de la señal, el llamado "efecto gancho". Con el fin de evitar este "efecto gancho" y seguir permitiendo el uso de combinaciones SSP-CSP mayores de cuatro, se ensayó el efecto de síntesis de oligonucleótidos que contenían las secuencias de dos CSP fusionadas juntas (sitios 5' y 3'). Las sondas de secuencia de captura fusionadas pueden funcionar independientemente para dirigir la hibridación con sitios diana únicos. En otra realización, las sondas fusionadas se pueden unir a dos sitios diana favoreciendo la segunda hibridación, aunque es esencial una reacción unimolecular con cinéticas de orden cero una vez que la sonda se ha hibridado al primer sitio. La hibridación se puede determinar por uno o ambos mecanismos. Los experimentos previos mostraban que dos CSP, VH3 y NC-1, cuando se utilizan juntas, dan aproximadamente dos veces el S/N que las CSP individuales. Las sondas de secuencia de captura sin fusionar VH-3 y NC-1 se utilizaron a 2,5 pmoles/ml cada una para una concentración total de 5 pmoles/ml, la sonda VH-4 de fusión (fusión de VH-3 y NC-1) se utilizó a 2,5 pmoles/ml. Como se muestra en la Tabla 11, la sonda fusionada era tan eficaz como la combinación de las dos sondas sin fusionar. Por lo tanto, la detección TSHC que utiliza sondas de secuencia de captura

fusionadas permite que al menos se doble el número de secuencias de ácido nucleico dirigidas por la sonda de secuencia de señal sin que se exceda la capacidad de unión de la placa con biotina. El experimento también carece de reactividad cruzada de HSV-2 a 10^7 genomas como se muestra por la S/N menor de 2,0.

5

TABLA 11

COMPARACIÓN DE SONDAS DE SECUENCIA DE CAPTURA FUSIONADAS FRENTE A SONDAS DE SECUENCIA DE CAPTURA NO FUSIONADAS EN LA DETECCIÓN THSC DE HSV-1					
SSP	CSP	Partículas víricas/ml	RLU	CV	S/N
RH5B	VH-3, NC-1	0	94	14 %	1,0
RH5B	VH-3, NC-1	10^4 HSV-1	164	5 %	1,7
RH5B	VH-3, NC-1	10^5 HSV-1	1003	4 %	10,7
RH5B	VH-3, NC-1	10^7 HSV-2	125	6 %	1,3
RH5B	VH-4 (fusionada)	0	97	10 %	1,0
RH5B	VH-4 (fusionada)	10^4 HSV-1	181	3 %	1,9
RH5B	VH-4 (fusionada)	10^5 HSV-1	1070	2 %	11,0
RH5B	VH-4 (fusionada)	10^7 HSV-2	140	5 %	1,4

Ejemplo 6

Eficacia de varias CSP y SSP en la detección TSHC de HSV-1

10

Se evaluó la eficacia de las sondas de secuencia de captura (CSP) para cada una de las cuatro sondas de secuencia de señal (SSP) específicas del HSV-1, H19, RH5B, RH3 y R10, en la detección del HSV-1 por TSHC. Los criterios que se utilizaron para diseñar las sondas de captura eran: 1) el sitio de hibridación CSP está a 1 kb 5' o 3' del sitio de hibridación de la SSP en la secuencia de ácido nucleico del HSV-1, preferentemente a 0,5 kb; y 2) las CSP contienen secuencias que son únicas para el HSV-1, sin tramos de homología de secuencia con HSV-2 mayores de 10 bases. Las CSP se diseñaron para dirigirse a regiones 5' y 3' adyacentes al sitio de hibridación de SSP. El software Omega (Oxford Molecular Group, Campbell, CA) fue el instrumental en la identificación de tales sitios. La temperatura de fusión (T_m) de las CSP se diseñó para estar entre 70 °C a 85 °C, para conformarse a la temperatura de 70 °C a 75 °C de hibridación utilizada en el ensayo de Captura Híbrida II (HCII) para el HSV (Digene). Se empleó el método TSHC general descrito en el Ejemplo 1. Se ensayaron once CSP (que se unían a 6 sitios diferentes) para H19, seis CSP (que se unían a tres sitios únicos) para RH5B, seis CSP (que se unen a seis sitios únicos) para RH3, y dos CSP para R10. Como se muestra en la Tabla 12, se encontraron sondas de secuencia de captura para las sondas de secuencia de señal H19, RH5B y R10.

25

TABLA 12

CSP Y SSP PARA LA DETECCIÓN TSHC DE HSV-1								
SSP	CSP	Cap %	SSP	CSP	Cap %	SSP	CSP	Cap %
R10	ON-3	100 %	RH5B	TS-1	50 %	H19	HZ-1	50 %
R10	ON-3	80 %	RH5B	NC-1	75 %	H19	HZ-2	20 %
			RH5B	VH-4	130 %	H19	ZD-1	40 %
			RH5B	TS-2	25 %	H19	ZD-2	20 %
			RH5B	VH-3	50 %	H19	BRH19	70 %
						H19	VH-2	70 %
						H19	F15R	25 %

Ejemplo 7

Eficacia de captura de varias CSP y SSP en la detección TSHC de HSV-2

30

Se evaluó la eficacia de captura de las sondas de secuencia de captura (CSP) para cada una de las cuatro sondas de secuencia de señal específicas de HSV-2 (SSP), E4A, E4B, Ei8, y i8, en la detección de HSV-2 por TSHC. Las sondas de secuencia de captura (CSP) se diseñaron basándose en los mismos criterios que para las CSP HSV-1

excepto por el requerimiento de que sean específicas de HSV-2. Se ensayaron cuatro CSP para E4A, tres CSP para E4A, tres CSP para E4B, y dos CSP para cada una de Ei8 e i8. Se empleó el método general descrito en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Tabla 13, se encontraron sondas de secuencia de captura eficaces para i8 y Ei8.

5

TABLA 13

CSP y SSP PARA DETECCIÓN TSHC DE HSV-2					
SSP	CSP	Cap %	SSP	CSP	Cap %
i8	NF-1	100 %	Ei8	NF-2	50 %
			Ei8	LE-3	45 %

Ejemplo 8

Efecto de las sondas bloqueadoras en la detección de HSV-1 y HSV-2

10

En un intento para reducir la reactividad cruzada de TSHC a la vez que se permite que tenga lugar la etapa de captura a temperatura ambiente, se desarrollaron los métodos que utilizan sondas bloqueadoras. Las sondas bloqueadoras comprenden secuencias que son complementarias a las sondas de secuencia de captura (CSP) que se utilizan para la detección. Estos experimentos se diseñaron para evitar la hibridación no específica de las CSP con ácidos nucleicos no diana presentes en la muestra bajo condiciones de baja rigurosidad, una situación que se encuentra a menudo durante la etapa de captura a temperatura ambiente.

15

En un método, se utilizaron sondas bloqueadoras que son complementarias a las sondas de secuencia de captura de longitud completa o casi de longitud completa. Se añadieron las secuencias bloqueadoras a la mezcla de reacción con un exceso de 10 veces con respecto a la CSP después de producirse la hibridación de la CSP y la SSP con la molécula de ADN diana. Como las sondas bloqueadoras tienen una temperatura de fusión similar a las CSP, se hibridaron las CSP con los ácidos nucleicos diana en primera lugar para evitar la hibridación de las sondas bloqueadoras a las CSP antes de que se produzca la hibridación de las CSP con los ácidos nucleicos diana. Como se muestra en la Tabla 14, la adición de las sondas bloqueadoras daba como resultado una reducción drástica de la reactividad cruzada aunque estas sondas no tuvieran efecto en la sensibilidad de la detección de HSV-1. La S/N para la detección de la reactividad cruzada de HSV-2 (10^7 partículas víricas/ml) disminuía de 5,0 a 8,0 cuando se utilizaban las sondas bloqueadoras.

20

25

30

En otro método, se utilizaron sondas bloqueadoras que eran complementarias solo de una parte de CSP y que son más cortas que las CSP. Las sondas bloqueadoras se diseñaron para tener temperaturas de fusión por encima de la temperatura ambiente pero al menos $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ menos de la temperatura de hibridación de las CSP con los ácidos nucleicos diana. Como estas sondas bloqueantes se hibridan con las CSP a una temperatura inferior a la temperatura de hibridación con los ácidos nucleicos diana, las sondas bloqueantes se pueden añadir a la reacción al mismo tiempo que las CSP y SSP sin que afecte la eficacia de hibridación de la CSP con el ácido nucleico diana. Estas sondas bloqueadoras más cortas funcionan durante la etapa de captura a temperatura ambiente hibridándose con las CSP a temperaturas más bajas que las que se encuentran durante la etapa de captura a temperatura ambiente. Como se muestra en la Tabla 15, la adición de sondas bloqueadoras o bien únicas o emparejadas en un exceso de 100 veces con respecto a las CSP daba como resultado una drástica reducción de la reactividad cruzada pero no tenía efecto sobre la sensibilidad de la detección de HSV-1. La S/N de la detección de reacción cruzada de HSV-2 (10^7 partículas víricas/ml) sin las sondas bloqueadoras era de 10,6, pero se reducía a menos de, o igual a 1,5 con la adición de las sondas bloqueadoras.

35

40

45

Por lo tanto, ambos métodos de utilización de sondas bloqueadoras proporcionan una reducción sustancial en la reactividad cruzada. El segundo método que utiliza sondas bloqueadoras con temperatura de fusión más baja puede preferirse debido a que la adición de sondas bloqueadoras al mismo tiempo que la sonda de secuencia de captura elimina la necesidad de una etapa extra para el método de detección.

TABLA 14

EFFECTO DE LAS SONIDAS BLOQUEADORAS AÑADIDAS TRAS LA HIBRIDACIÓN DE LA SONIDA DE CAPTURA EN TSHC						
SSP	CSP	100x Sonda bloqueadora	Partículas víricas/ml	RLU	CV	S/N
H19	HZ-1	Ninguna	0	66	7 %	1,0
H19	HZ-1	Ninguna	10^5 HSV-1	246	5 %	3,7
H19	HZ-1	Ninguna	10^6 HSV-1	1998	2 %	30,3
H19	HZ-1	Ninguna	10^7 HSV-2	327	2 %	5,0

H19	HZ-1	ZD-3	0	60	3 %	1,0
H19	HZ-1	ZD-3	10 ⁵ HSV-1	267	4 %	4,5
H19	HZ-1	ZD-3	10 ⁶ HSV-1	2316	6 %	38,6
H19	HZ-1	ZD-3	10 ⁷ HSV-2	49	2 %	0,8

TABLA 15

EFFECTO DE LAS SONDAS BLOQUEADORAS AÑADIDAS SIMULTANEAMENTE CON LAS SONDAS DE CAPTURA EN LA DETECCIÓN TSHC DE HSV-1						
SSP	CSP	10x Sonda bloqueadora	Partículas víricas/ml	RLU	CV	S/N
H19	HZ-1	ninguna	0	38	15 %	1,0
H19	HZ-1	ninguna	10 ⁴ HSV-1	71	2 %	1,9
H19	HZ-1	ninguna	10 ⁵ HBV-1	389	12 %	10,2
H19	HZ-1	ninguna	10 ⁷ HSV-2	401	18 %	10,6
H19	HZ-1	NG-4	0	39	8 %	1,0
H19	HZ-1	NG-4	10 ⁴ HSV-1	82	5 %	2,1
H19	HZ-1	NG-4	10 ⁵ HSV-1	411	18 %	10,5
H19	HZ-1	NG-4	10 ⁷ HSV-2	57	15 %	1,5
H19	HZ-1	EA-1, EA-2	0	37	0 %	1,0
H19	HZ-1	EA-1, EA-2	10 ⁴ HSV-1	75	8 %	2,0
H19	HZ-1	EA-1, EA-2	10 ⁵ HSV-1	419	8 %	11,3
H19	HZ-1	EA-1, EA-2	10 ⁷ HSV-2	49	5 %	1,3
H19	HZ-1	NG-7, NG-8	0	42	10 %	1,0
H19	HZ-1	NG-7, NG-8	10 ⁴ HSV-1	76	3 %	1,8
H19	HZ-1	NG-7, NG-8	10 ⁵ HSV-1	471	5 %	11,2
H19	HZ-1	NG-7, NG-8	10 ⁷ HSV-2	47	9 %	1,1

5 Ejemplo 9

La detección THSC reduce el fondo del vector

10 El ensayo TSHC elimina el problema de contaminación del vector que se asocia a menudo con el ensayo de detección Captura Híbrida II (HC II) (Digene). Como las sondas ARN de secuencia de señal que se utilizan en HC II se generan a partir de matrices de vector linealizadas, cualquier plásmido ADN no linealizado da como resultado la producción de sondas ARN adicionales de secuencias específicas para las secuencias del vector. En el ensayo HC II, los híbridos ARN/ADN que se forman como resultado de estas transcripciones por medio de lectura son capturadas en las placas revestidas de anticuerpo y generan una señal. Por el contrario en el método TSHC, solo se detectan los híbridos ARN/ADN que también se hibriden a las sondas de secuencia de captura. En consecuencia, cualquier detección de secuencias relacionadas con el vector se elimina. Los plásmidos SK+, pBR322, DgZ, y 1066 de los que se sabía que eran detectables en el ensayo HC II de HSV (Digene) se ensayaron en el ensayo TSHC utilizando dos sondas ARN de secuencia de señal (H19 y RH5b) y dos sondas de secuencia de captura (VH-2 y VH-4). Se utilizaron entonces grupos idénticos de sondas ARN en el método HC II y el método TSHC para la detección de HSV-1. Se empleó el método general TSHC descrito en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Tabla 16, aunque la relación señal respecto a ruido en el HC II de referencia variaba entre 14 a 48, la relación señal respecto a ruido del método TSHC era menor de 2 para todos los plásmidos que se ensayaron.

TABLA 16

FONDO DE VECTOR EN DETECCIÓN TSHC VS. HCII						
Método	SSP	CSP	Dianas/ml	RLU	CV	S/N
TSHC	H19 + RH5B	VH-2 + VH-4	0	94	6 %	1,0
TSHC	H19 + RH5B	VH-2 + VH-4	4ngpBSSK+	137	7 %	1,5
TSHC	H19 + RH5B	VH-2 + VH-4	2 ng pBR322	99	6 %	1,1
TSHC	H19 + RH5B	VH-2 + VH-4	4 ng DgX	135	7 %	1,4
TSHC	H19 + RH5B	VH-2 + VH-4	4 ng 1066	107	7 %	1,1
HC II	H19 + RH5B	Ninguna	0	94	9 %	1,0
HC II	H19 + RH5B	Ninguna	4 ng pBS SK+	4498	3 %	48,1
HC II	H19 + RH5B	Ninguna	2 ng pBR322	1281	8 %	13,7
HC II	H19 + RH5B	Ninguna	4 ng DgX	2003	5 %	21,4
HC II	H19 + RH5B	Ninguna	4 ng 1066	1536	2 %	16,4

Ejemplo 10

5 Sensibilidad y especificidad de la detección de HSV-1 y HSV-2 por TSHC

La sensibilidad y discriminación de tipos para la detección TSHC de HSV-1 y HSV-2 se evaluaron utilizando el TSHC descrito en el Ejemplo 1. En el ensayo TSHC HSV-1, se utilizaron las sondas de secuencia de señal H19 y RH5B, las sondas de secuencia de captura HZ-1, VH-2 y VH-4, y las sondas bloqueadoras NG-7, NG-8, GP-3, GP-4, y GP-1. En el ensayo TSHC HSV-2, se utilizaron las sondas de secuencia de señal i8 y Ei8, las sondas de secuencia de captura NF-1 y NF-2, y las sondas bloqueadoras HX-4, HX-5 y GP-8. Se diluyeron las partículas víricas HSV-1 y HSV-2 a varias concentraciones utilizando la Solución de Control Negativo. Como se muestra en las Figuras 4 y 5, mientras que se detectaban 10^4 copias de HSV-1 o HSV-2 (450 copias/pocillo) en los ensayos respectivos, no había prácticamente detección de la reacción cruzada tipo HSV a concentraciones de hasta 10^8 copias/ml inclusive (4.500.000 copias/pocillo). Por lo tanto, los ensayos TSHC HSV-1 y HSV-2 pueden distinguir los dos tipos con un intervalo de discriminación mayor de 10.000 alimentaciones mientras que mantiene una sensibilidad excelente (450 VP/ml).

El ensayo TSHC HSV-1 muestra un intervalo lineal de detección que varía desde al menos 2×10^3 a 5×10^3 VP/ml (Tabla 17). La especificidad del ensayo es excelente y no se detectó reactividad cruzada (la S/N es menor o igual a 2) en las muestras que contenían HSV-2 a una concentración tan alta como 2×10^7 a 5×10^7 partículas víricas/ml. De manera similar, el ensayo TSHC HSV-2 que contenía HSV-2 también muestra una especificidad excelente, en el que no se detectó reactividad cruzada en muestras que contenían una concentración de HSV-1 tan alta como 5×10^7 partículas víricas /ml (Tabla 18). Se obtuvieron resultados similares de la detección TSHC de HSV-2 utilizando diluciones en serie de virus HSV-2 y HSV-1 (Tabla 19).

TABLA 17

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA DEL ENSAYO TSHC DEL HSV1		
Dianas	RLU	S/N
Control negativo	47	1,0
HSV2 @ 5×10^7 VP/ml	57	1,2
HSV2 @ 2×10^7 VP/ml	43	0,9
HSV1 @ 5×10^3 VP/ml	201	4,3
HSV1 @ 2×10^3 VP/ml	107	2,3

TABLA 18

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA DEL ENSAYO TSHC DEL HSV2		
Dianas	RLU	S/N
Control negativo	40	1,0
HSV1 @ 5×10^7 VP/ml	78	2,0

HSV1 @ 2x10 ⁷ VP/ml	55	1,4
HSV2 @ 5x10 ³ VP/ml	218	5,5
HSV2 @ 2x10 ³ VP/ml	106	2,7

TABLA 19

DETECCIÓN CON SONDAS HSV-2 UTILIZANDO HSV-1 Y HSV-2 DE DILUCIONES DIFERENTES		
Dianas	RLU	S/N
Control negativo	43	1,0
HSV1 @ 5x10 ⁷ VP/ml	112	2,6
HSV1 @ 2x10 ⁷ VP/ml	57	1,3
HSV1 @ 1x10 ⁷ VP/ml	38	0,9
HSV1 @ 1x10 ⁶ VP/ml	38	0,9
HSV1 @ 1x10 ⁵ VP/ml	33	0,8
HSV1 @ 1x10 ⁴ VP/ml	52	1,2
HSV1 @ 1x10 ³ VP/ml	43	1,0
HSV1 @ 1x10 ² VP/ml	39	0,9
HSV2 @ 1x10 ⁷ VP/ml	257173	5980,8
HSV2 @ 1x10 ⁶ VP/ml	28544	663,8
HSV2 @ 1x10 ⁵ VP/ml	3200	74,4
HSV2 @ 1x10 ⁴ VP/ml	266	6,2
HSV2 @ 5x10 ³ VP/ml	181	4,2
HSV2 @ 1x10 ³ VP/ml	62	1,4
HSV2 @ 1x10 ² VP/ml	44	1,0

Ejemplo 11

5

Ensayo de especímenes clínicos

Se ensayó un panel de especímenes clínicos de 64 miembros para HSV-1 y HSV-2 utilizando ambos métodos, TSHC y HC II. El panel incluía 15 muestras que contenían cantidades conocidas de HSV-1 o HSV-2, y 49 muestras que se sabía que eran negativas a HSV-1 y HSV2 por ensayo PCR. En consecuencia, se “esperaba” que las 15 muestras positivas darían positivas en ambos ensayos, TSHC y HC II. Se empleó el ensayo general TSHC descrito en el Ejemplo 1. Los resultados de la utilización del método HC II y el método TSHC se muestran en las Tablas 20 y 21, respectivamente. DE las 49 muestras “que se esperaba” que dieran un resultado negativo, 5 muestras dieron positivas y 44 muestras dieron positivas utilizando el método HC II. En comparación, las 49 muestras dieron negativas utilizando el método TSHC. Por lo tanto, el método TSHC es superior en especificidad al método HC II en la detección de HSV-1 y HSV-2

10

15

TABLA 20

RESULTADOS OBSERVADOS VERSUS ESPERADOS PARA DETECCIÓN HCII DE HSV1 Y HSV2		
Resultado HCII	Resultados Esperados	
	Positivo	Negativo
Positivo	15	5
Negativo	0	44
Total	15	49

20

TABLA 21

RESULTADOS OBSERVADOS VERSUS ESPERADOS PARA DETECCIÓN TSHC DE HSV1 Y HSV2		
TSHC Resultado	Resultados Esperados	
	Positivo	Negativo
Positivo	14	0
Negativo	1	49
Total	15	49

Ejemplo 12**5 Efecto de la combinación de sondas en la detección TSHC de HSV**

Se evaluó el efecto de combinar grupos de sonda de secuencia de señal específica de HSV-1 y sonda de secuencia de captura sobre la detección de HSV-1. La detección de HSV-1 y HSV-2 se llevó a cabo por separado con dos grupos de combinaciones de sonda ARN de secuencia de señal/sonda de secuencia de captura biotinilada (Grupo nº 1: H19 más HZ-1; y Grupo nº 2: RH5b más la TS-1 y TS-2). Se llevó a cabo el TSHC también con ambos grupos de sonda ARN de secuencia de señal/sonda de secuencia de captura biotinilada combinados para evaluar el efecto de la combinación de los dos grupos de sondas sobre la sensibilidad y la reactividad cruzada. Se empleó el método general TSHC descrito en el Ejemplo 1. Los resultados que se muestran en la Tabla 22 demuestran claramente un efecto aditivo de la combinación de los dos grupos de sondas para la detección de HSV-1 sin aumento aparente de la reactividad cruzada con HSV-2.

TABLA 22

SE MEJORA LA SENSIBILIDAD COMBINANDO CSP Y SSP ESPECÍFICOS DE HSV-1					
Sondas de secuencia de captura	Sondas de secuencia de señal	VP/ml	RLU	CV	S/N
HZ-1	H19	0	60	3 %	1,0
HZ-1	H19	10 ⁵ HSV-1	267	4 %	4,5
HZ-1	H19	10 ⁶ HSV-1	2316	6 %	38,9
HZ-1	H19	10 ⁷ H SV2	49	2 %	0,8
TS-1, TS-2	RH5B	0	78	6 %	1,0
TS-1, TS-2	RH5B	10 ⁵ HSV-1	291	6 %	3,8
TS-1, TS-2	RH5B	10 ⁶ HSV-1	2368	11 %	30,6
TS-1, TS-2	RH5B	10 ⁷ H SV2	75	11 %	1,0
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	0	70	12 %	1,0
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 ⁵ HSV-1	457	10 %	6,5
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 ⁶ HSV-1	4263	1 %	60,9
HZ-1, TS-1, TS-2	H19, RH5B	10 ⁷ H SV2	67	6 %	1,0

Ejemplo 13

20

Detección TSHC de HPV18 y HPV45

Se compararon la sensibilidad y especificidad de la detección TSHC y HC II del Papilomavirus humano (HPV18) y el Papilomavirus humano 45 (HPV45). Los estudios previos habían establecido que el HPV45 era el tipo de HPV con mayor reactividad cruzada para el HPV18, y a la inversa, el HPV18 era el tipo de HPV con mayor reactividad cruzada para el HPV45. En este estudio se evaluó la capacidad de los dos métodos para detectar HPV18 y HPV45 utilizando plásmidos ADN de HPV18 y HPV45.

25

Se diseñaron sondas de secuencia de captura (CSP) para cada uno de los tipos de papilomavirus humano HPV16, HPV18, HPV31, y HPV45. Los criterios que se utilizaron para el diseño de las sondas de captura fueron: 1) los sitios de hibridación de CSP no se solapaban con los sitios de SSP; 2) las CSP contienen secuencias únicas para un tipo de HPV sin tramos de homología de secuencia con otros tipos de HPV mayores de 12 bases; y 3) las CSP tienen la longitud suficiente para que sean capaces de hibridarse a 70 °C.

30

35

Las sondas bloqueadoras para cada CSP se diseñaron tal que se pudieran añadir simultáneamente con la CSP durante la hibridación al ácido nucleico diana. Las sondas bloqueadoras tienen una temperatura de fusión de al menos 37 °C pero no mayores de 60 °C, como se calculaba con el programa Oligo 5.0 (National Biosciences, Inc., Plymouth, MN). SE utilizaron dos sondas bloqueadoras por cada oligonucleótido de captura para maximizar el efecto bloqueante durante la etapa de captura en placa a temperatura ambiente. También se deseaba que las sondas bloqueadoras para cada CSP tienen temperaturas de fusión similares.

Las CSP para cada uno de los tipos de HPV se ensayaron en cuanto a la eficacia de captura relativa y la reactividad cruzada con otra HPV con otros tipos de HPV. Las CSP que proporcionaba la mejor combinación de sensibilidad y baja reactividad cruzada se utilizaron para la detección de HPV utilizando TSHC.

En la detección TSHC y HC II de HPV18, el ADN HPV18 se utilizó a una concentración de 10 pg/ml. El HPV45, que se utilizó para el ensayo de reactividad cruzada, se usó a 4 ng/ml. Se empleó el método general TSHC descrito en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Tabla 23, se obtuvo una relación señal respecto a ruido de 16,9 para la detección TSHC del HPV18 en comparación con una relación de 7,6 que se obtuvo con la detección HC II de HVC18. Por otra parte, la reactividad cruzada con HPV45 estaba significativamente reducida utilizando el método TSHC (S/N de 1,3 para TSHC en comparación con la S/N de 393,3 para HC II). Los resultados muestran claramente que en comparación con el método HC II, el método TSHC para la detección de HPV18 era superior tanto en sensibilidad como en especificidad. Los resultados que se obtienen en los experimentos que comparan la detección TSHC y HC II de HPV45 demuestran que el método TSHC para la detección de HPV45 es superior tanto en sensibilidad como en especificidad (Tabla 24).

TABLA 23

DETECCIÓN TSHC DE HPV 18				
Método	Diana	SSP	CSP	S/N
TSHC	0	18L1	18-7L	1,0
	HPV18 (10 pg/ml)	18L1	18-7L	16,9
	HPV45 (4 ng/ml)	18L1	18-7L	1,3
HC II	0	18L1	ninguna	1,0
	HPV18 (10 pg/ml)	18L1	ninguna	7,6
	HPV45 (4 ng/ml)	18L1	ninguna	393,3

TABLA 24

DETECCIÓN TSHC DE HPV45				
Método	Diana	SSP	CSP	S/N
TSHC	0	45L1	ON-1	1,0
	HPV45(10 pg/ml)	45L1	ON-1	8,4
	HPV18(4 ng/ml)	45L1	ON-1	1,6
HCII	0	45L1	ninguna	1,0
	HPV45(10 pg/ml)	45L1	ninguna	8,2
	HPV18(4 ng/ml)	45L1	ninguna	494,0

Ejemplo 14

Protocolo de ensayo plus de captura híbrida específica de la diana

Se utilizó el virus de la hepatitis B (HBV) como sistema de modelo para el desarrollo del ensayo plus de captura híbrida específica de la diana (TSHC-plus) para la detección de ácidos nucleicos diana.

La hibridación en el método TSHC-plus (Fig. 6A-6D) puede llevarse a cabo en una etapa. En el método de una etapa, las CSP, SSP que contienen el dúplex ADN/ARN pre-hibridados, las sondas puente (Fig. 6B-6D), y las sondas bloqueadoras se añaden simultáneamente a los ácidos nucleicos diana. Si la hibridación se lleva a cabo en dos etapas, las CSP, SSP sin dúplex ADN/ARN pre-hibridados, sondas puente y sondas bloqueadoras se hibridan primero al ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de las sondas complementarias a la secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla de la SSP se añaden entonces a la reacción para formar los dúplex ADN/ARN. Se detectan entonces los híbridos utilizando un anticuerpo anti-ADN/ARN como se describe en el Ejemplo 1.

Se llevaron a cabo los experimentos para detectar el HBV utilizando TSHC-plus (Ejemplos 15-18). Se utilizó el método que se muestra en la Figura 6A. Se diluyó el plásmido ADN de virus de la hepatitis B humano (HBV adw2) de concentración conocida (Digene Corp.) utilizando el Diluyente de Muestras negativo a HBV (Digene). Se hicieron varias diluciones y se colocaron alícuotas en tubos individuales. Se utilizó el Diluyente de Muestras negativo como control negativo. Se añadió la mitad de volumen de Reactivo de Desnaturalización 5100-0431 (Digene) a las muestras de ensayo. Las muestras de ensayo se incubaron a 65 °C durante 45 minutos para desnaturalizar los ácidos nucleicos en las muestras.

Después de la desnaturalización de la muestra HBV, se añadió a las muestras una solución de hibridación que contenía sondas de secuencia de captura (CSP), sondas bloqueadoras, sonda de secuencia de señal que comprendía un dúplex M13ADN/M13ARN, y una sonda puente de una secuencia de ADN de cadena sencilla o de cadena parcialmente sencilla capaz de hibridarse tanto con una SSP como con secuencias de HBV, y se incubó a 65 °C durante 1-2 horas. De manera alternativa, las muestras desnaturalizadas se incubaron durante 1 hora con una solución de hibridación que contenía sondas de secuencia de captura (CSP), sondas bloqueadoras y plásmido M13 ADN que contenían secuencias complementarias de HBV durante 1 hora. Después de la incubación, se añadió M13 ARN a la reacción y se continuó la incubación durante una hora adicional a 65 °C.

Los tubos que contenían las mezclas de reacción se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se tomaron alícuotas de cada tubo y se transfirieron a pocillos individuales de una placa con estreptavidina de 96 pocillos (Digene). Las placas se agitaron a 1100 rpm durante una hora a temperatura ambiente. La solución se decantó entonces y se lavaron las placas cuatro veces con tampón de lavado SNM (Digene). Se añadió a cada pocillo el anticuerpo DR-1 anti-ARN/ADN fosfatasa alcalina (Digene) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El DR-1 (Digene) se decantó entonces y las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado SNM (Digene). Después de retirar el tampón de lavado residual, se añadió el sustrato luminiscente (CDP-Star, Tropix Inc.) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos individuales se leyeron en un luminómetro de placas para obtener las unidades de luz relativa (RLU) de las señales.

Ejemplo 15

Las siguientes tablas describen las distintas sondas que se ensayaron en los experimentos descritos en los Ejemplos 16-18.

TABLA 25

SONDAS DE SECUENCIA DE CAPTURA PARA HBV				
Sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	Localización en el HBV	Cadena
HBV C1	GCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCAT (SEC ID N° 152)	28	374-401	Sentido
HBV C2	ACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGCGCCTT (SEC ID N° 153)	27	1861-1877	Sentido
HBV C3	ATGATAAAAACGCCGCAGACACATCCAGCG ATA (SEC ID N° 154)	32	370-401	Anti-sentido

TABLA 26

CLONES HBV/M13 A PARTIR DE LOS CUALES SE PREPARAN SSP				
Nombre del clon	Vector	Sito de clonación	Tamaño de la inserción (pb)	Localización en HBV
SA1	M13 mp 18	Eco RI, Hind III	35	194-228
SA2	M13 mp 18	Eco RI, Hind III	34	249-282
SA1a	M13 mp 19	Eco RI, Hind III	35	194-228
SA2a	M13 mp 19	Eco RI, Hind III	34	249-282
SA4	M13 mp 19	Eco RI, Hind III	87	1521-1607

TABLA 27

SONDAS BLOQUEADORAS HBV

Sonda	Secuencia	Tamaño (pb)	CSP con las que se hibridan
B1	ATGATAAAACGCCG (SEC ID N° 155)	14	HBVC1
B2	CAGACACATCCAGC (SEC ID N° 156)	14	HBVC1
B3	AAGGCACAGCTTG (SEC ID N° 157)	13	HBVC2
B4	GAGGCTTGAACAGT (SEC ID N° 158)	14	HBVC2
B5	TATCGCTGGATGTGTC (SEC ID N° 159)	16	HBVC3
B6	TCGGCGTTTTATCATG (SEC ID N° 160)	16	HBVC3

5

Ejemplo 16**Efecto de las sondas bloqueadoras sobre la detección TSHC-PLUS de HBV**

10 Durante la etapa de captura a temperatura ambiente, el exceso de SSP (dúplex M13ARN/HBV-M13 ADN) que no se hibrida específicamente a la CSP se inmoviliza en la placa lo que da como resultado señales de fondo altas. En un intento para reducir la señal de fondo, se emplearon sondas bloqueadoras en la detección TSHC-Plus de HBV. Las sondas bloqueadoras se diseñaron para que sean mucho más cortas que las CSP de forma que solo sean capaces de hibridarse con las sondas de captura a temperaturas bastante menores de las temperaturas de hibridación utilizadas en el ensayo.

15

Se utilizaron grupos de sondas bloqueadoras que consistían en dos oligonucleótidos separados que eran complementarias a las CSP. Las sondas bloqueadoras se añadieron a la mezcla de hibridación en un exceso de 10 veces con respecto a las CSP. Como las sondas bloqueadoras eran mucho más cortas que las CSP, no se hibridan con las CSP a la temperatura de hibridación con la diana y por lo tanto no interfieren con la hibridación de las CSP a los ácidos nucleicos diana. Después de la hibridación de la CSP a los ácidos nucleicos diana, las muestras se sometieron a la etapa de captura a temperatura ambiente durante la cual las sondas bloqueadoras se hibridan con las CSP en exceso, previniendo de esta manera que se hibriden con las SSP. Como se muestra en la Tabla 28, el uso de las sondas bloqueadoras en la reacción de hibridación reduce mucho las señales de fondo del ensayo.

25

TABLA 28

EFECTO DE LAS SONDAS BLOQUEADORAS SOBRE LA DETECCIÓN DE HBV		
Sonda de captura	Sonda bloqueadora	Señal de fondo (RLU)
HBV C1	no	17892
HBV C1	B1, B2	424
HBV C2	no	9244
HBV C2	B3, B4	398

Ejemplo 17**Efecto de la longitud de SSP sobre la detección TSHC-PLUS de HBV**

Se estudió el efecto de la longitud de la secuencia de ADN insertada en el vector M13 para generar la SSP sobre la detección TSHC-Plus de HBV. Se utilizó un control positivo que contenía 20 pg/ml de plásmido ADN HBV. Como se muestra en la Tabla 29, el uso de una secuencia complementaria de HBV más larga en la SSP (87 pares de bases) daba como resultado un aumento sustancial de la señal de detección. El efecto es poco probable que se deba a la condición de temperatura de hibridación sub-óptima ya que la Tm de las sondas más cortas es 15 grados por encima de la temperatura de hibridación. Como el dúplex M13 ARN/ADN que se forma en la SSP puede actuar bloqueando parcialmente la secuencia de ADN complementaria de la sonda para la hibridación con las secuencias de HBV en los ácidos nucleicos diana, las secuencias complementarias más largas de la SSP pueden superar este bloqueo.

40

TABLA 29

EFECTO DE LA LONGITUD DE LA SECUENCIA COMPLEMENTARIA DE LA SSP SOBRE LA DETECCIÓN TSHC-PLUS DE HBV				
SSP	Tamaño de la secuencia ADN de SSP dirigida a HBV (pb)	Tm de la secuencia ADN de SSP dirigida a HBV	Temperatura de hibridación	Señal (RLU)
SA1	35	83 °C	65 °C	1741
SA2	34	80 °C	65 °C	1857
SA4	87	108 °C	65 °C	7978

Ejemplo 18**5 Detección TSHC-Plus y HC II de HBV**

Se comparó la sensibilidad relativa de la detección TSHC-Plus y HC II (Captura Híbrida II, Digene) de HBV. Se ensayaron en los experimentos referencias positivas de HBV de tres concentraciones distintas. Como se muestra en la Tabla 30, las señales que se obtenían utilizando el método de detección TSHC-Plus eran aproximadamente dos veces mayores que las que se obtenían utilizando el método de detección HC II.

TABLA 30

DETECCIÓN TSHC-PLUS Y HC II DE HBV*				
Método	Control	Concentración de HBV diana		
		10 pg/ml	20 pg/ml	100 pg/ml
HC II	48	2355	4225	21438
TSHC Plus	285	4856	7978	37689

* Señal medida como unidad lumínica relativa (RLU)

Ejemplo 19

15

Preparación de muestras para la detección por captura híbrida específica de la diana de SNP

20

Una realización del método TSHC para detectar SNP proporciona el método de Captura Híbrida-SNP (HC-SNP) que se demuestra en el presente documento utilizando p53 ADN como molécula diana y polimorfismos discriminantes o SNP en el codón 72 de la región codificante p53 (Kawajiri, et al. Carcinogenesis. 14:1085-1089, 1993). Los dos polimorfismos p53 en el codón 72 de la cadena anti-sentido, eran gCg, que codifican Arginina (Arg), y el codón 72 p53, en la cadena anti-sentido, gGg, que codifica Prolina (Pro). Los dos polimorfismos se denominan p53Arg y p53Pro. Este es un SNP en que se utilizó el método HC-SNP para la detección específica del nucleótido. Se entiende que el método HC-SNP no se limita a estos tipos específicos de sondas, marcadores de sonda, y dianas, pero también engloba el ámbito completo de variaciones descritos para el método TSHC.

25

30

Las muestras que comprenden o ampliaciones PCR o ADN genómico se utilizaron como dianas para la detección de polimorfismo en la realización HC-SNP. El uso de ADN genómico puede ser particularmente beneficioso para aplicaciones diagnósticas. Para la preparación de ampliaciones PCR, se utilizaron dos cebadores, por ejemplo, el cebador superior - 5'-AAGACCCAGGTCCAGATGAAG-3' (SEC ID N° 161) y el Cebador Inferior - 5'-AGAATGCAAGAAGCCCAGAC-3' (SEC ID N° 162) (descrito por Klaes et al., L Mol. Med. 77:299-302, 1999). Estos cebadores se escogieron específicamente para la amplificación de una región de exón 4 de p53 (182 pares de bases), utilizando un programa que comprendía: a) 95 °C durante 4 minutos; b) 94 °C durante 40 segundos; c) 62 °C durante 40 segundos; d) 72 °C durante 40 segundos; e) 72 °C durante 6 minutos; y f) 4 °C para el almacenamiento hasta o antes de usarlo, en que las etapas b-d se repiten durante 25 a 45 ciclos dependiendo de la calidad de la matriz ADN. Las ampliaciones PCR se diluyeron 1:1000 o 1:100 en TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA), pH 7,4, antes del ensayo. Ejemplos no limitantes de muestras de ADN genómico para la preparación de ADN genómico incluyen, pero no se limitan a, fluidos humanos, células, tejidos, y tejidos de archivo en bloques de parafina. El aislamiento de ADN genómico se llevó a cabo utilizando los kits apropiados (Qiagen). Aproximadamente, se necesitaban 10-20 µg de ADN genómico aislado por par de ensayos de detección de polimorfismo directos evitando la etapa de amplificación de diana.

40

Se ensayó cada diana ADN con oligos de captura específicos de p53-Arg y p53-Pro por separado. Se calcularon las relaciones señal respecto a ruido (S/N), y se utilizaron las relaciones S/N específica de p53-Arg sobre la S/N

específica de p53-Pro para identificar el genotipo de la muestra. Un ejemplo de los resultados del ensayo SNP para determinar los homocigotos (Arg/Arg o Pro/Pro) frente a heterocigotos (Arg/Pro) se muestran en la Tabla 31. Los resultados de estos ensayos se confirmaron por el análisis Wave (Transgenomic; Santa Clara, CA) y el análisis de secuencia de ADN.

5

Ejemplo 20

Método de captura híbrida específica de la diana para detectar SNP

10 Se preparó el ADN del plásmido (p53-Arg y p53-Pro) a partir de cultivos bacterianos utilizando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen, Inc.; Valencia, CA). Se preparó el ADN genómico (HeLa, SiHa, y Jurkat) a partir de las líneas celulares utilizando el Kit DNeasy Tissue (Qiagen, Inc.). El ADN del plásmido y el ADN de la muestra clínica se amplificaron utilizando el método PCR descrito anteriormente (45 ciclos). Antes de utilizarlo, el ADN amplificado por PCR se diluyó 1:1000 en TE, pH 7,4, y las muestras de ADN del plásmido se diluyeron a 100 pg/ml en TE, pH 7,4.

15 Se utilizaron cinco microlitros de ADN amplificado por PCR o del plásmido por ensayo. Se utilizaron por ensayo cincuenta microlitros de muestras del ADN genómico extraído que contenían 5 µg, 7 µg, y 10 µg de ADN genómico de HeLa, Jurkat, y SiHa, respectivamente. Cada muestra se ensayó dos veces independientemente para cada ensayo. El primer ensayo se llevó a cabo utilizando la CSP p53-Arg y SSP p53. El segundo ensayo se llevó a cabo utilizando la CSP p53-Pro y SSP p53.

20

Una mezcla de agua y el ADN diana con un volumen final de 50 µl por pocillo, se añadió a la placa de hibridación. Se añadió Reactivo de Desnaturalización 5100-0431 (Digene) (25 µl) por pocillo. La placa se cubrió con un sellador de placas y se agitó durante 10-30 segundos a 1100 rpm en un agitador de placas. Las reacciones se desnaturalizaron a 65 °C durante 25 minutos en el calefactor de placas I (Robbins Dcientific Corp.; Sunnyvale, CA).

25 Durante la etapa de desnaturalización, se prepararon las mezclas de sondas. La mezcla de sondas específicas de p53-Arg consistía en 15 pmoles/ml de de CSP específica de Arg de 16 bases de longitud, 600 ng/ml de SSP p53, y 4x de Diluyente de Sondas (Digene). La mezcla de sondas específicas de p53-Pro consistía en 15 pmoles/ml de CSP específica de Pro de 16 bases de longitud, 600 ng/ml de SSP p53 y 4x de Diluyente de Sondas (Digene). Se añadió cada muestra de sondas (25 µl cada una) a la muestra desnaturalizada. La placa se cubrió con un sellador de placas y se agitó durante 10-30 segundos a 1100 rpm utilizando un agitador de placas. Se permitió que las muestras se hibridaran a 65 °C durante 1 hora en el calefactor de placas. Las muestras hibridadas se incubaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos (para disminuir la temperatura de la placa). Las reacciones de hibridación se transfirieron a una placa con estreptavidina de 96 pocillos (SA), y se cubrió con un sellador de placas. Los híbridos se capturaron en la placa SA a 45 °C durante 45 minutos con agitación a 900 rpm. Se llevó a cabo la

30 inmovilización de las dianas hibridadas con CSP en la solución de hibridación que se colocó en los pocillos de una placa de 96 pocillos, por ejemplo, y la placa se agitó durante 15 minutos a 2 horas a temperaturas que variaban de 20 °C a 90 °C, preferentemente a temperatura ambiente durante 1 hora agitando a 1100 rpm. Puede que se prefieran temperaturas por encima de la temperatura ambiente para añadir niveles de rigurosidad para que se produzca la hibridación (e "hibridación promiscua") en la etapa de la captura en placa. Se decantó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de DR-1 (Digene) por pocillo para la detección de los híbridos ARN/ADN capturados. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitación. El sobrenadante se desechó y se lavó la placa dos veces con Tampón de Lavado Sharp a temperatura ambiente. Los pocillos se rellenaron entonces con tampón de lavado Sharp y se incubó la placa a 60 °C durante 10 minutos. La placa se lavó entonces dos veces con tampón de lavado Sharp a temperatura ambiente, y una vez con tampón de lavado de captura híbrida 2 a temperatura ambiente.

35 Se secó el tampón de lavado residual de la placa (utilizando toallitas de papel). Se añadió un sustrato fosforilado quimioluminiscente, DR-2 (100 µl/pocillo) y se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 15 minutos sin agitación. El sustrato activado se midió y analizó utilizando un luminómetro fluorescente (Véase la Tabla 31).

50

TABLA 31

DATOS DEL GENOTIPO A PARTIR DE HC-SNP				
DIANA ADN P53	S/N utilizando oligos de captura específicos de Arg	S/N utilizando oligos de captura específicos de Pro	Relación Arg/Pro	Genotipo
ADN P53-Arg, 100 pg/ml	98,9	4,5	21,91	Arg homocigoto
ADN P53-Pro, 100 pg/ml	10,2	68,0	0,15	Pro homocigoto
ADN P53-Arg/Pro, 100 pg/ml	56,4	54,1	1,04	Arg/Pro heterocigoto

PCR P53-Arg	1350,1	7,9	170,90	Arg homocigoto
PCR P53-Pro	88,0	1093,8	0,08	Pro homocigoto
PCR P53-Arg/Pro	874,3	506,5	1,73	Arg/Pro heterocigoto
ADN HeLa, 5 mg por pocillo	10,8	7,0	1,54	Arg/Pro heterocigoto
ADN SiHa, 10 mg por pocillo	3,8	15,5	0,25	Pro homocigoto
ADN Jurkat, 7 mg por pocillo	23,2	1,6	14,5	Arg homocigoto
Muestra Clínica PCR 1	162,6	106,2	1,53	Arg/Pro heterocigoto
Muestra Clínica PCR 2	51,9	652,5	0,08	Pro homocigoto
Muestra Clínica PCR 3	345,3	2,3	150,13	Arg homocigoto

1. Un método de detección de un ácido nucleico diana que comprende:

- 5 a) hibridar un ácido nucleico de cadena sencilla o parcialmente sencilla con una sonda de secuencia de captura y una sonda de secuencia de señal para formar híbridos de doble cadena entre dichas sondas y el ácido nucleico diana, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal son capaces de hibridarse con regiones no solapadas del ácido nucleico diana y de no hibridarse entre ellas;
- 10 b) añadir una sonda bloqueadora a la reacción de hibridación, en que dicha sonda bloqueadora se hibrida con el exceso no hibridado de sondas de secuencia de captura;
- c) unir el híbrido a una fase sólida para formar un híbrido unido;
- d) detectar el híbrido unido.

2. Un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende:

- 15 a) hibridar un ácido nucleico de cadena sencilla o parcialmente sencilla con una sonda de secuencia de captura inmovilizada y una sonda de secuencia de señal para formar híbridos de doble cadena entre dichas sondas y el ácido nucleico diana, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan a regiones no solapadas del ácido nucleico y no entre ellas;
- 20 b) añadir una sonda bloqueadora a la reacción de hibridación, en que dicha sonda bloqueadora se hibrida con el exceso no hibridado de sondas de secuencia de captura;
- c) detectar el híbrido unido.

3. El método del punto 1 o 2, en que la sonda de secuencia de señal es de cadena sencilla.

25 4. El método del punto 1 o 2, en que la sonda de secuencia de captura se modifica con al menos un ligando.

5. El método del punto 4, en que el ligando es biotina.

30 6. El método del punto 5, en que la sonda de secuencia de captura es lineal y tiene extremos 5' y 3', en que ambos extremos 5' y 3' están biotinilados.

7. El método del punto 1 o 2, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan a regiones del ácido nucleico, en que las regiones están separadas por menos de 3 kilobases.

35 8. El método del punto 1 o 2, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan con regiones del ácido nucleico diana, en que las regiones están separadas menos de 500 kilobases.

9. El método del punto 1 o 2, en que la sonda de secuencia de captura es una fusión de dos o más secuencias complementarias de distintas regiones del ácido nucleico diana o a diferentes moléculas diana.

40

10. El método del punto 1 o 2, en que el híbrido de doble cadena que se forma es un híbrido ADN/ARN.
11. El método del punto 1 o 2, que comprende además la etapa de formación de un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla antes de la etapa de hibridación.
- 5 12. El método del punto 1 o 2, en que la hibridación de la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal al ácido nucleico diana se realiza secuencialmente.
- 10 13. El método del punto 1, en que la etapa a) y la etapa b) se realizan simultáneamente.
14. El método del punto 1, en que la etapa a) y la etapa c) se realizan simultáneamente.
15. El método del punto 1, en que las etapas a), b), y c) se realizan simultáneamente.
- 15 16. El método del punto 2, en que la etapa a) y la etapa b) se realizan simultáneamente.
17. El método del punto 1 o 2, en que la sonda bloqueadora tiene una temperatura de fusión más baja que la de la sonda de secuencia de captura.
- 20 18. El método del punto 1, en que el híbrido se captura en una fase sólida.
19. El método del punto 17, en que la fase sólida está revestida de estreptavidina.
20. El método del punto 17, en que la fase sólida es una microplaca.
- 25 21. El método del punto 1, en que la etapa c) se lleva a cabo a temperatura ambiente.
22. El método del punto 1 o 2, en que el híbrido unido se detecta utilizando un anticuerpo que reconoce el híbrido.
- 30 23. El método del punto 22, en que el híbrido es un híbrido ADN/ARN.
24. El método del punto 22, en que el anticuerpo que reconoce un híbrido ADN/ARN está marcado con fosfatasa alcalina.
- 35 25. Un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende:
- 40 a) hibridar un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla con una sonda de secuencia de captura y una sonda de secuencia de señal que se hibridan con regiones no solapadas en el ácido nucleico diana y no entre ellas, en que dicha hibridación forma un híbrido ARN/ADN entre dicha sonda de secuencia de señal y el ácido nucleico diana; y
- b) detectar el híbrido ARN/ADN por la unión de un anticuerpo que reconoce el híbrido ARN/ADN con dicho híbrido, en que dicho anticuerpo está marcado detectablemente.
- 45 26. El método del punto 25, que comprende además la unión del híbrido formado en una etapa a) a una fase sólida para formar un híbrido unido.
27. El método del punto 25, en que la sonda de secuencia de señal es de cadena sencilla.
- 50 28. El método del punto 25, en que la sonda de secuencia de captura está modificada al menos con un ligando.
29. El método del punto 28, en que la sonda de secuencia de captura está biotinilada.
- 55 30. El método del punto 29, en que la sonda de secuencia de captura es lineal y tiene extremos 5' y 3', en que ambos extremos 5' y 3' están biotinilados.
31. El método del punto 25, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan con regiones del ácido nucleico diana, en que las regiones están separadas menos de 3 kilobases.
- 60 32. El método del punto 25, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan con regiones del ácido nucleico diana, en que las regiones están separadas menos de 500 bases.
33. El método del punto 25, que comprende además la etapa de formación de un ácido nucleico de cadena sencilla antes de la etapa de hibridación.
- 65

34. El método del punto 25, en que las hibridaciones de la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal con el ácido nucleico diana se realiza secuencialmente.
- 5 35. El método del punto 25, en que el híbrido que se forma en la etapa a) se une con una fase sólida formando un híbrido unido.
36. El método del punto 35, en que el híbrido unido se forma a temperatura ambiente.
- 10 37. El método del punto 35, en que la fase sólida está revestida de estreptavidina.
38. El método del punto 35, en que la fase sólida es una microplaca.
39. El método del punto 25, en que el anticuerpo está marcado con fosfatasa alcalina.
- 15 40. El método del punto 25, que comprende además la adición de una sonda bloqueadora en la etapa de hibridación, en que dicha sonda bloqueadora se hibrida con el exceso no hibridado de sonda de secuencia de captura.
- 20 41. El método del punto 40, en que las sondas bloqueadoras se añaden a la reacción de hibridación después de la hibridación de las sondas de secuencia de captura al ácido nucleico diana.
42. El método del punto 40, en que la sonda bloqueadora tiene una temperatura de fusión menor que la de la sonda de secuencia de captura.
- 25 43. Un método de detección de un ácido nucleico diana que comprende:
- 30 a) hibridar un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla con una sonda de secuencia de captura y una sonda de secuencia de señal, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan en regiones que no se solapan con el ácido nucleico diana y no entre ellas, en que la sonda de secuencia de señal comprende una región híbrida ADN/ARN, en que dicha hibridación forma un complejo; y
- b) detectar dicho complejo.
- 35 44. El método del punto 43 en que la sonda de secuencia de señal comprende al menos 40 pares de bases de longitud.
45. El método del punto 43 en que la sonda de secuencia de captura comprende al menos 6 pares de bases de longitud.
- 40 46. El método del punto 45 en que la sonda de secuencia de captura está inmovilizada en una fase sólida.
47. El método del punto 43 en que dicho complejo se detecta por la unión de un anticuerpo que reconoce la región híbrida ADN/ARN de dicha región, en que el anticuerpo está marcado detectablemente.
- 45 48. El método del punto 43 en que la secuencia de captura se modifica con al menos un ligando.
49. El método del punto 48 en que el ligando es biotina.
- 50 50. El método del punto 49, en que la sonda de secuencia de captura es lineal y tiene extremos 5' y 3', en que ambos extremos 5' y 3' están biotinilados.
- 55 51. El método del punto 43, que comprende además la adición de una sonda bloqueadora tras la etapa de hibridación, en que dicha sonda bloqueadora se hibrida con el exceso no hibridado de sonda de secuencia de captura.
52. El método del punto 51, en que las sondas bloqueadoras comprenden un longitud de 4-10 pares de bases menos que la longitud de la sonda de secuencia de captura.
- 60 53. Una sonda de ácido nucleico que consiste en una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en la SEC ID N° 1 hasta la SEC ID N° 160.
- 65 54. El método de acuerdo con el punto 1, en que la sonda de secuencia de señal comprende una primera región que tiene una estructura de dúplex ADN/ARN y una segunda región que tiene una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla.

55. El método de acuerdo con el punto 54, en que el dúplex ADN/ARN es un dúplex M13 ADN - M13 ARN.
56. Un método de detección de un ácido nucleico que comprende:
- 5 a) hibridar un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla con una sonda de secuencia de captura, una sonda puente y una sonda de secuencia de señal para formar híbridos de doble cadena, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda puente se hibridan a regiones no solapadas con el ácido nucleico diana y no entre ellas, y la sonda de secuencia de señal se hibrida con la sonda puente y no con el ácido nucleico diana y la sonda de secuencia de captura;
- 10 b) añadir una sonda bloqueadora a la reacción de hibridación, en que dicha sonda bloqueadora se hibrida con el exceso no hibridado de sondas de secuencia de captura;
- c) unir el híbrido a una fase sólida para formar un híbrido unido; y
- d) detectar el híbrido unido.
- 15 57. El método de acuerdo con el punto 56, en que la sonda de secuencia de señal comprende una primera región que tiene una estructura dúplex ADN/ARN y una segunda región que tiene un ácido nucleico de cadena sencilla.
- 20 58. El método de acuerdo con el punto 57, en que el dúplex ADN/ARN es un dúplex M13 ADN - M13 ARN.
59. El método de acuerdo con el punto 57, en que el dúplex ADN/ARN es un híbrido formado entre secuencias repetidas en la señal de secuencia y una molécula de ácido nucleico que tiene secuencias complementarias de las secuencias repetidas.
- 25 60. El método de acuerdo con el punto 56, en que la sonda puente comprende además un cola poli(A).
61. El método de acuerdo con el punto 60, en que la sonda de secuencia de señal comprende una secuencia ADN poli(dT) de cadena sencilla que se hibrida con la cola poli(A) de la sonda puente, y un dúplex ADN/ARN formado entre las secuencias poli(dT) en la sonda de secuencia de señal y una molécula de ácido nucleico que tiene secuencias poli(A).
- 30 62. Un método de detección de un ácido nucleico que comprende:
- 35 a) hibridar un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla con una sonda de secuencia de captura y una sonda de secuencia de señal para formar híbridos de doble cadena entre dichas sondas y el ácido nucleico diana;
- b) unir el híbrido a una fase sólida formando un híbrido unido; y
- c) detectar el híbrido unido,
- 40 en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan a regiones no solapadas del ácido nucleico diana y no entre ellas.
63. El método del punto 62, en que la hibridación de la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal con el ácido nucleico diana se lleva a cabo secuencialmente.
- 45 64. El método del punto 62, en que la etapa a) y la etapa b) se llevan a cabo simultáneamente.
65. El método del punto 62, que comprende además la adición de una sonda bloqueadora, en que dicha sonda bloqueadora se hibrida con el exceso no hibridado de sondas de secuencia de captura.
- 50 66. El método del punto 65, en que la adición de la sonda bloqueadora y la etapa de hibridación se llevan a cabo simultáneamente.
67. El método del punto 65, en que la adición de la sonda bloqueadora y la etapa de unión se llevan a cabo simultáneamente.
- 55 68. El método del punto 62, en que la sonda de secuencia de señal es de cadena sencilla.
69. El método del punto 62, en que la sonda de secuencia de captura está modificada con al menos un ligando.
- 60 70. El método del punto 62, en que el ligando es biotina.
71. El método del punto 70, en que la sonda de secuencia de captura es lineal y tiene extremos 5' y 3', en que ambos extremos 5' y 3' están biotinilados.
- 65

72. El método del punto 62, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan a regiones del ácido nucleico diana, en que las regiones están separadas menos de 3 kilobases.
- 5 73. El método del punto 62, en que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibrida a regiones del ácido nucleico diana, en que las regiones están separadas menos de 500 bases.
74. El método del punto 62, en que la sonda de secuencia de captura es una fusión de dos o más secuencias complementarias de regiones diferentes del ácido nucleico diana o de diferentes moléculas diana.
- 10 75. El método del punto 62, en que el híbrido de doble cadena que se forma es un híbrido ADN/ARN.
76. El método del punto 62, que comprende además la etapa de formación de un ADN de cadena sencilla antes de la etapa de hibridación.
- 15 77. El método del punto 62, en que la hibridación de la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal con el ácido nucleico se lleva a cabo secuencialmente.
78. El método del punto 62, en que la etapa a) y la etapa b) se llevan a cabo simultáneamente.
- 20 79. El método del punto 63, en que la sonda bloqueadora tiene una temperatura de fusión más baja que la de la sonda de secuencia de captura.
80. El método del punto 63, en que la fase sólida está revestida con estreptavidina.
- 25 81. El método del punto 73, en que la fase sólida es una microplaca.
82. El método del punto 62, en que la etapa b) se lleva a cabo aproximadamente a 20 °C a 90 °C.
- 30 83. El método del punto 82, en que la sonda de secuencia de captura comprende al menos 6 bases de longitud.
84. El método del punto 62, en que la etapa b) se lleva a cabo a temperatura ambiente.
85. El método del punto 62, en que el híbrido unido se detecta utilizando un anticuerpo que reconoce el híbrido.
- 35 86. El método del punto 85, en que el híbrido es un híbrido ADN/ARN.
87. El método del punto 85, en que el anticuerpo que reconoce un híbrido ADN/ARN está marcado con fosfatasa alcalina.
- 40 88. El método de acuerdo con el punto 62, en que la sonda de secuencia de señal comprende una región de sonda de secuencia de captura y es complementaria al ácido nucleico diana.
89. El método de acuerdo con el punto 62, en que el ácido nucleico diana es un polimorfismo de nucleótido simple.
- 45 90. El método de acuerdo con el punto 89, en que la especificidad de unión del híbrido con una fase sólida está modulada por temperaturas mayores que la temperatura ambiente.
- 50 91. El método de acuerdo con el punto 89, en que la especificidad de unión del híbrido a una fase sólida está modulada por la adición de sondas bloqueadoras.
92. El método de acuerdo con el punto 89, en que la especificidad de unión del híbrido a la fase sólida está modulada por temperaturas mayores que la temperatura ambiente y la adición de sondas bloqueadoras.

55 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Digene Corporation

60 <120> DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR EL MÉTODO DE CAPTURA HÍBRIDA DE TIPO ESPECÍFICO

<130> 21-87T1

<140> EP 08 007 108.7

65 <141>10-04- 2008

<150> US 09/594 839
 <151>15-06- 2000

 <160> 162
 5
 <170> PatentIn Ver. 2.1

 <210> 1
 <211> 42
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> TS-1
 15
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

 <400> 1
 20 ttattattac gttcatgtcg gcaaacagct cgttattat ta 42

 <210> 2
 <211> 39
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> TS-2

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 30

 <400> 2
 35 ttattattac gtctggatg gcgatacggc ttattatta 39

 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH-3

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 45

 <400> 3
 cgtcctggat ggcgatacgg c 21
 50
 <210> 4'
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> NC-1
 55

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 60

 <400> 4
 cgttcatgtc ggcaaacagc tcgt 24

 <210> 5
 <211> 45
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH-4
 5
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 5
 10 cgttcatgtc ggcaaacagc tcgtcgtcct ggatggcgat acggc 45
 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HZ-1
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 6
 25 gatgggggta ttttcctaa gatggggcgg gtcc 34
 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH-2
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 7
 taccocgatc atcagttatc ctaaggt 28
 40 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> FD-1
 <220>
 50 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 8
 aaaccgttc atgaccgga 19
 <210> 9
 55 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> RA-2
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 65 <400> 9
 atcgcgtgtt ccagagacag gc 22

<210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> NC-2
 <220>
 10 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 10
 caacgccc aa aataata 17
 15 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> FD-2
 <220>
 25 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 11
 gtccccgaac cgatctagcg 20
 30 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> RA-4
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 40 <400> 12
 cgaaccataa accattcccc at 22
 45 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> ON-3
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 55 <400> 13
 cacgcccgtg gttctggaat tcgac 25
 60 <210> 14
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> HZ-2
 65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

ES 2 545 183 T3

<400> 14
 ttattagat ggggttatt ttctaagat ggggcgggtc c 41

5 <210> 15
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ZD-1

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

15 <400> 15
 ggttatnttt cctaag 16

20 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> ZD-2

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

30 <400> 16
 attattggtt atntttccta agattatt 28

35 <210> 17
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> F6R

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 17
 acgacgcctt tgactccgat tcgcatcgg atgactccct 40

50 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> BRH19

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 18
 atgcgccagt gatatcaatca gctgttcgg gt 32

60 <210> 19
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> F15R

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 19
5 caaaacgtcc tggagacggg tgagtgctcg cgaggacg 38

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH-1

15 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 20
20 gtccccgacc cgatctagcg 20

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> ON-4

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 21
gcagactgcg ccaggaacga gta 23

35 <210> 22
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> PZ-1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 22
gtgccacgc cctggttct ggaattgac agcga 35

<210> 23
<211> 35
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> PZ-2

55 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 23
60 gcagactgcg ccaggaacga gtagtggag tactg 35

<210> 24
<211> 36
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> FG-2

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 24
aagaggtcca ttgggtgggg tgatacggg aaagac 36

10 <210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> FG-3

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 25
cgtaatgctgg cgtgacagac tcccctg 27

25 <210> 26
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> FG-4

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

35 <400> 26
ccaactacc ccatcatcag ttatcctaa ggtctctg 39

40 <210> 27
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Hsv1-LF15R

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

50 <400> 27
aaaaaaaaac aaaacgtct ggagacggg gagtgcggc gaggacg 47

55 <210> 28
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Hsv1-f15-2B

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 28
caaaacgtcc tggagacggg tgagtgcgg cgaggacg 38

65 <210> 29

ES 2 545 183 T3

<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Hsv1-F15-3B

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

10 <400> 29
caaaaactcc ggagacgggt gagtgccgagc aggacg 36

<210> 30
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> EA-1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

20 <400> 30
aggaaaaata accccatc 18

<210> 31
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> EA-2

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

30 <400> 31
gaccgcgcc atctt 15

<210> 32
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> ZD-3

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

40 <400> 32
ggaccgccc catcttagga aaaataacct catc 34

45 <210> 33
<211> 13

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> NG-7

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

55 <210> 33
<211> 13

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> NG-7

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

65 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

ES 2 545 183 T3

	<400> 33 aaaaataacc cca	13
5	<210> 34 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> NG-8	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
15	<400> 34 cgccccatct t	11
20	<210> 35 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> NG-4	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
30	<400> 35 ccatcttagg aaaaa	15
35	<210> 36 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> GP-1	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
45	<400> 36 ataactgatg atcgg	15
50	<210> 37 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> EA-3	
55	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
60	<400> 37 ccaccaatg gacctc	16
65	<210> 38 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> EA-4	

ES 2 545 183 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
5	<400> 38 gtctttcccg tatcaacc	18	
	<210> 39 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial		10
	<220> <223> EB-7		
15	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
20	<400> 39 cgccgcatta cg	12	
	<210> 40 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial		25
	<220> <223> EB-8		
30	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 40 aggggagtct gc	12	
35	<210> 41 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> GP-3		
45	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 41 ctgttgccg aca	13	
50	<210> 42 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> GP-4		
60	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 42 tatcgccatc cag	13	
65	<210> 43 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

ES 2 545 183 T3

<220>
 <223> EB-9

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 43
 atgatcgggg tagt 14

10 <210> 44
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> EB-10

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 44
 agagacctta aggata 16

25 <210> 45
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> NG-1

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

35 <400> 45
 attccagaac cacgg 15

40 <210> 46
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> NG-2

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

50 <400> 46
 ttccagaacc acg 13

55 <210> 47
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> NG-3

60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 47 tccagaacca c 11
 <210> 48

65 <211> 13

ES 2 545 183 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> GP-5

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

10 <400> 48
gttcctggcg cag 13

<210> 49
<211> 12
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> GP-6

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

25 <400> 49
ttcctggcgc ag 12

<210> 50
<211> 24
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NF-1

35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

40 <400> 50
gcccgcgccg ccagcactac ttc 24

<210> 51
<211> 35
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FG-1

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 51
aaacgttggg aggtgtgtgc gtcacctgg agcta 35

55 <210> 52
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> LE-3

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

65

<400> 52
 gccaaaaccg agtgaggttc tgtgt 25

5 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> NF-2

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

15 <400> 53
 aaacgttggg aggtgtgtgc gtca 24

20 <210> 54
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> RA-3

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

30 <400> 54
 tgctcgtcac gaagtcactc atg 23

35 <210> 55
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ON-2

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 55
 cattactgcc cgcaccggac c 21

50 <210> 56
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LE-1

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 56
 gccgtgtgt tcttgaacac cagg 24

60 <210> 57
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> LE-4

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

5 <400> 57
agtcagggtt gcccgacttc gtcac 25

10 <210> 58
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> NF-3

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

25 <400> 58.
caggcgtcct cgtctcggg cggggc 26

30 <210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> LE-2

40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 59
cccacgtcac cgggggcccc 20

50 <210> 60
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> LE-2

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

65 <400> 60
gccggtcgcg tgcgacgcc aaggc 25

70 <210> 61
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

75 <220>
<223> SG-3

80 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

85 <400> 61
ccgacgcgtg ggtatctagg gggtcg 26

90 <210> 62
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> SG-4

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 62
cgggacggcg agcggaaaagt caacgt 26

10 <210> 63
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> HX-4

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 63
ggcgcgggc 9

25 <210> 64
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> HX-5

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

35 <400> 64
gaaagtagtg ctggc 15

40 <210> 65
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> GP-7

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

50 <400> 65
tgctggcggc g 11

55 <210> 66
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> AZ-3

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 66
acacctcca acg 13

65 <210> 67

ES 2 545 183 T3

<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> AZ-4

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 67
ctccaggatg acg 13

15 <210> 68
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> GR-1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

25 <400> 68
tcggttttg tc 12

30 <210> 69
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> GR-2

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

40 <400> 69
acacagaacc tca 13

45 <210> 70
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> GP-8

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 70
cacacacctc cca 13

55 <210> 71
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> BR-10

65 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 71
 cgacccccta gata 14

5 <210> 72
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> BR-11

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

15 <400> 72
 ccacgcgctcg g 11

20 <210> 73
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> HX-6

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

30 <400> 73
 acgttgactt tccgc 15

35 <210> 74
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> BR-15

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 74
 cgccgtcccg 10

50 <210> 75
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ZL-1

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 75
 gtacagatgg taccggggtt gtagaagtat ctg 33

60 <210> 76
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> ZL-4

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 76
5 ctgcaacaag acatacatcg accggtccac c 31

<210> 77
<211> 31
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> DP-1

15 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 77
20 gaagtagtg aggctgcatg tgaagtgga g 31

<210> 78
<211> 33
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> DP-4

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 78
35 cagctctgtg cataactgtg gtaacttct ggg 33

<210> 79
<211> 33
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> SH-1

45 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 79
50 gaggtcttct ccaacatgct atgcaacgtc ctg 33

<210> 80
<211> 33
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> SH-4

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 80
65 gtgtaggtgc atgctctata ggtacatcag gcc 33

<210> 81
<211> 33
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> VS-1

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 81
caatgccgag cttagtcat gcaattccg agg 33

10 <210> 82
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> VS-4

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 82
gaagtagtag ttgcagacgc ccctaaaggt tgc 33

25 <210> 83
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> AH-1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

35 <400> 83
gaacgcgatg gtacaggcac tgcagggtcc 30

40 <210> 84
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> AG-2

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

50 <400> 84
gaacgcgatg gtacaggcac tgca 24

<210> 85
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> AL-1

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 85
acgcccaccc aatggaatgt accc 24

65

ES 2 545 183 T3

<210> 86
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> PA-4

<220>
10 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 86
tctgcgctgt tggagtcgtt cctgctgtgc tc 32

15 <210> 87
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> 18-1AB

<220>
25 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 87
ttattattac tacatacatt gccgcatgt tcgcca 36

30 <210> 88
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> 18-2AB

<220>
40 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 88
ttattattat gttgccctct gtgccccgt tgtctatagc ctccgt 46

45 <210> 89
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> 18-3AB

<220>
55 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 89
ttattattag gagcagtgcc caaaagatta aagtttgc 38

60 <210> 90
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> 18-4AB

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

ES 2 545 183 T3

<400> 90
 ttattattac acggtgctgg aatacgggtga gggggtg 37

5 <210> 91
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 18-5AB

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

15 <400> 91
 ttattattaa cgcccaccca atggaatgta ccc 33

20 <210> 92
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> 18-6AB

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

30 <400> 92
 ttattattaa tagtattggtg gtgtgtttct cacat 35

35 <210> 93
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 18-7AB

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 93
 ttattattag ttggagtcgt tcctgtcgtg 30

50 <210> 94
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 18-8AB

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 94
 ttattattac ggaattcat ttggggctc t 31

60 <210> 95
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> PE-1

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

5 <400> 95
gctcgaaggt cgctgctga gcttttact act 33

<210> 96
<211> 32
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> PZ-2

15 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 96
20 gcgccatcct gtaatgcact ttccacaaa gc 32

<210> 97
<211> 31
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> PZ-5

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 97
tagtgctagg tgtagtgac gcaggagtg g 31

35 <210> 98.
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CS-1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 98
ggcacaaca tgtattacac tgccctcgg ac 32

<210> 99
<211> 31
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CS-4

55 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

60 <400> 99
cctacgtctg cgaagtcttt cttgccgtgc c 31

<210> 100
<211> 34
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> PF-1

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 100
ctgcattgtc actactatcc ccaccactac ttg 34

10 <210> 101
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> PF-4

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 101
ccacaaggca cattcatata tacacgcacg ca 32

25 <210> 102
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> PA-1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

35 <400> 102
gttctaaggt cctctgccga gctcttact gta 33

40 <210> 103
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> 45-5AB

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

50 <400> 103
ttattattat gcggtttgg gggctgcacgt ggaggc 36

55 <210> 104
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 45-6AB

60 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 104
ttattattaa gacctgcccc ctaagggtac atagcc 36

65 <210> 105

ES 2 545 183 T3

<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> 45-8AB

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

10 <400> 105
ttattattac agcattgcag ccttttggtt acttgctgt aatagctcc 49

<210> 106
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> 45-9AB

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

25 <400> 106
ttattattaa tcctgtaatg cactttcca caaa 34

<210> 107
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> 45-10AB

35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 107
ttattattag cctggtcaca acatgtatta c 31

40 <210> 108
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> 45-11AB

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 108
ttattattac aggatctaatac tcattctgag gtt 33

55 <210> 109
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> ON-1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

65

<400> 109
 tgcggttttg ggggtcgacg tggaggc 27

5 <210> 110
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> PV-FD-1

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

15 <400> 110
 gcctccacgt cgac 14

20 <210> 111
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> PV-FD-2

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

30 <400> 111
 ccccaaaacc g 11

35 <210> 112
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PV-FD-3

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

45 <400> 112
 ggtacattcc attggg 16

50 <210> 113
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PV-FD-4

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 113
 tggcgtaa taataa 16

60 <210> 114
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> AH-3

ES 2 545 183 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
5	<400> 114 accatcgcgt tc	12	
	<210> 115 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial		10
	<220> <223> AH-4		
15	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
20	<400> 115 ggaccctgca gtgc 1	4	
	<210> 116 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial		25
	<220> <223> AH-5		
30	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
35	<400> 116 ctgtaccatc gcggt	15	
	<210> 117 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial		40
	<220> <223> AH-6		
45	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 117 tgcagtgct gt	12	
50	<210> 118 <211> 13 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> PZ-1		
60	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 118 ccacctctg cgt	13	
65	<210> 119 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> PZ-3

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 119
attacaggat ggcgc 15

10 <210> 120
<211> 16

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> PZ-4

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 120
gctttctgga aaagtg 16

25 <210> 121
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> PZ-6

35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 121
ccactacacc tagcacta 18

40 <210> 122
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> ZL-2

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 122
cagatacttc tacaacc 17

55 <210> 123
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> ZL-3

65 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 123
ccggtacat ctgtac 16

<210> 124
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> ZL-5
 <220>
 10 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 124
 ggtggaccgg tcg 13
 15 <210> 125
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> ZL-6
 <220>
 25 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 125
 atgtatgtct tgttgacg 18
 30 <210> 126
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> DP-2
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 40 <400> 126
 ctaccacttc acatgc 16
 45 <210> 127
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> DP-3
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 55 <400> 127
 agcctcacct acttc 15
 60 <210> 128
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> DP-5
 65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

	<400> 128 cccagaaagt taccac	16
5	<210> 129 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> DP-6	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
15	<400> 129 agttatgcac agagct	16
20	<210> 130 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> SH-2	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
30	<400> 130 caggacgttg catagc	16
35	<210> 131 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> SH-3	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
45	<400> 131 atgttgaga agacctc	17
50	<210> 132 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> SH-5	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
60	<400> 132 ggcctgatgt acctata	17
65	<210> 133 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> "SH-6	

ES 2 545 183 T3

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

5 <400> 133
 gagcatgcac ctacac 16

10 <210> 134
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> VS-2

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

20 <400> 134
 ctcggaaatt gcatg 15

25 <210> 135
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> VS-3

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

35 <400> 135
 aactaagctc ggcatt 16

40 <210> 136
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> VS-5

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

50 <400> 136
 gcaaccttta gggg 14

50 <210> 137
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> VS-6

60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

60 <400> 137
 cgtctgcaac tactacttc 19

65 <210> 138
 <211> 14
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CS-2
 5
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 138
 10
 taccgaggg cagt 14
 <210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CS-3
 20
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 139
 25
 gtaatacatg ttgtgacc 18
 <210> 140
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> CS-5
 35
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 140
 40
 ggcacggcaa gaaa 14
 <210> 141
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> CS-6
 50
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: sonda de ácido nucléico
 <400> 141
 gactcgcag acgtagg 17
 55
 <210> 142
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> PF-2
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 65

ES 2 545 183 T3

	<400> 142 caaagtagtg gtggg	15
5	<210> 143 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> PF-3	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
15	<400> 143 gatagtagtg acaatgcag	19
20	<210> 144 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> PF-5	
	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
30	<400> 144 tgcgtgcgtg tatgta	16
35	<210> 145 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
45	<400> 145 tgaatgtgcc ttgtgg	16
50	<210> 146 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> PE-2	
55	<220> <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico	
60	<400> 146 agtagtagaa agctcagc	18
65	<210> 147 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> PE-3	

ES 2 545 183 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
5	<400> 147		
	agacgacctt cgagc	15	
	<210> 148		
	<211> 17		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> PA-2		
15	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 148		
20	tacagtagag agctcgg	17	
	<210> 149		
	<211> 16		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> PA-3		
	<220>		
30	<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 149		
	cagaggacct tagaac	16	
35	<210> 150		
	<211> 16		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> PA-5		
	<220>		
45	<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 150		
	gagcagcaca ggaacg	16	
50	<210> 151		
	<211> 16		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> PA-6		
	<220>		
60	<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico		
	<400> 151		
	actccaacga cgcaga	16	
	<210> 152		
65	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 545 183 T3

<220>
<223> HBV C1

5 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 152
gctggatggtg tctgcggcgt tttatcat 28

10 <210> 153
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> HBV C2

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 153
actgttcaag cctccaagct ggcgctt 27

25 <210> 154
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> HBV C3

35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

<400> 154
atgataaaaac gccgcagaca catccagcga ta 32

40 <210> 155
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> B1

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

50 <400> 155
atgataaaaac gccg 14

55 <210> 156
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> B2

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico

65 <400> 156
cagacacatc cagc 14

<210> 157
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> B3
 <220>
 10 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 157
 aaggcacagc ttg 13
 15 <210> 158
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> B4
 <220>
 25 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 <400> 158
 gaggcttgaa cagt 14
 30 <210> 159
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> B5
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 40 <400> 159
 tatcgctgga tgtgtc 16
 45 <210> 160
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> B6
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial:sonda de ácido nucléico
 55 <400> 160
 tcggcgtttt atcatg 16
 <210> 161
 <211> 21
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: SYNTHETIC PRIMER
 65 <300>
 <301> KLEAS et al.,

<303> Molecular Medicine
<304> 77
<306> 299-302
<307> 1999
5
<400> 161
aagaccagg tccagatgaa g 21
10
<210> 162
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: SYNTHETIC PRIMER
20
<300>
<301> KLEAS et al.,
<303> Molecular Medicine
<304> 77
<306> 299-302
<307> 1999
25
<400> 162
agaatgcaag aagccagac 20

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de un ácido nucleico diana que comprende:
 - 5 a) hibridar un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla con una sonda de secuencia de captura y una sonda de secuencia de señal para formar híbridos de doble cadena entre dichas sondas y el ácido nucleico diana, en donde la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal son capaces de hibridarse con regiones no solapadas del ácido nucleico diana y no se hibridan entre ellas.
 - 10 b) añadir una sonda bloqueadora a la reacción de hibridación, en donde dicha sonda bloqueadora se hibrida a un exceso no hibridado de sondas de secuencia de captura.
 - c) unir el híbrido a una fase sólida para formar un híbrido unido; y
 - d) detectar el híbrido unido.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda de secuencia de captura está inmovilizada.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sonda de secuencia de señal es de cadena sencilla.
4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan con regiones del ácido nucleico diana, en donde las regiones están separadas menos de 3

20 kilobases.
5. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal se hibridan con regiones del ácido nucleico diana, en donde las regiones están separadas menos de 500

25 bases.
6. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sonda de secuencia de captura es una fusión de dos o más secuencias complementarias de diferentes regiones el ácido nucleico diana o de diferentes moléculas diana.
7. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el híbrido de doble cadena que se forma es un híbrido

30 ADN/ARN.
8. El método de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además la etapa de formación de un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla antes de la etapa de hibridación.
- 35 9. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la hibridación de la sonda de secuencia de captura y la sonda de secuencia de señal al ácido nucleico diana se llevan a cabo secuencialmente.
10. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa a) y la etapa b) y/o la etapa c) se llevan a cabo

40 simultáneamente.
11. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la sonda bloqueadora tiene una temperatura de fusión más baja que la de la sonda de secuencia de captura.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la fase sólida está revestida con estreptavidina.
- 45 13. El método de la reivindicación 11, en el que la fase sólida es una microplaca.
14. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa c) se lleva a cabo a temperatura ambiente.
- 50 15. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el híbrido unido se detecta utilizando un anticuerpo que reconoce el híbrido.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el híbrido es un híbrido ADN/ARN.
- 55 17. El método de la reivindicación 15, en el que el anticuerpo que reconoce el híbrido ADN/ARN está marcado con fosfatasa alcalina.
18. El método de la reivindicación 1 en el que la sonda de secuencia de señal comprende una región híbrida

60 ADN/ARN, en donde dicha hibridación forma un complejo.
19. El método de la reivindicación 18 en el que la sonda de secuencia de señal comprende una longitud de al menos

60 40 pares de bases.
20. El método de la reivindicación 18 en el que la sonda de secuencia de captura comprende una longitud de al

65 menos 6 pares de bases.

21. El método de la reivindicación 20 en el que la sonda de secuencia de captura está inmovilizada en una fase sólida.
- 5 22. El método de la reivindicación 18 en el que dicho complejo se detecta por la unión de un anticuerpo que reconoce la región híbrida ADN/ARN a dicha región, en donde el anticuerpo está marcado de manera detectable.
23. El método de la reivindicación 18, en el que las sondas bloqueadoras comprenden una longitud de 4-10 pares de bases menor que la longitud de la sonda de secuencia de captura.
- 10 24. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sonda de secuencia de señal comprende una primera región que tiene una estructura de dúplex ADN/ARN y una segunda región que tiene una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla.
- 15 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el dúplex ADN/ARN es un dúplex M13 ADN - M13 ARN.
26. Un método de detección de un ácido nucleico diana, que comprende:
- 20 a) hibridar un ácido nucleico diana de cadena sencilla o parcialmente sencilla a una sonda puente, una sonda de secuencia de captura y una sonda de secuencia de señal, en donde el ácido nucleico diana y la sonda puente cuando se hibridan forman híbridos de doble cadena, y en donde la sonda de secuencia de captura y la sonda puente se hibridan a regiones no solapadas del ácido nucleico diana y no entre ellas, y la sonda de secuencia de señal se hibrida a la sonda puente y no al ácido nucleico diana ni la sonda de secuencia de captura;
- 25 b) añadir una sonda bloqueadora a la reacción de hibridación, en donde dicha sonda bloqueadora se hibrida al exceso no unido de sondas de secuencia de captura;
- c) unir el híbrido a una fase sólida para formar un híbrido unido; y
- d) detectar el híbrido unido.
27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la sonda de secuencia de señal comprende una primera región que tiene una estructura de dúplex ADN/ARN y una segunda región que tiene un ácido nucleico de cadena sencilla.
- 30 28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el dúplex ADN/ARN es un dúplex M 13 ADN - M13 ARN.
- 35 29. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el dúplex ADN/ARN es un híbrido formado entre secuencias repetidas en la sonda de señal y una molécula de ácido nucleico que tiene secuencias complementarias de las secuencias repetidas.
- 40 30. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la sonda puente comprende una cola poli(A).
- 45 31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en el que la sonda de secuencia de señal comprende una secuencia de ADN poli(dT) de cadena sencilla que se hibrida a la cola poli(A) de la sonda puente, y un dúplex ADN/ARN que se forma entre las secuencias poli(dT) de la sonda de secuencia de señal y la molécula de ácido nucleico que tiene secuencias poli(A).
- 50 32. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es un polimorfismo de nucleótido simple.
33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en el que la especificidad de unión del híbrido a una fase sólida está modulada por temperaturas superiores a la temperatura ambiente.
34. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en el que la especificidad de unión del híbrido a una fase sólida está modulada por la adición de sondas bloqueadoras.
- 55 35. El método de acuerdo con la reivindicación 32, en el que la especificidad de unión del híbrido a una fase sólida está modulada por temperaturas superiores a la temperatura ambiente y la adición de sondas bloqueadoras.

Captura Híbrida Específica de la Diana

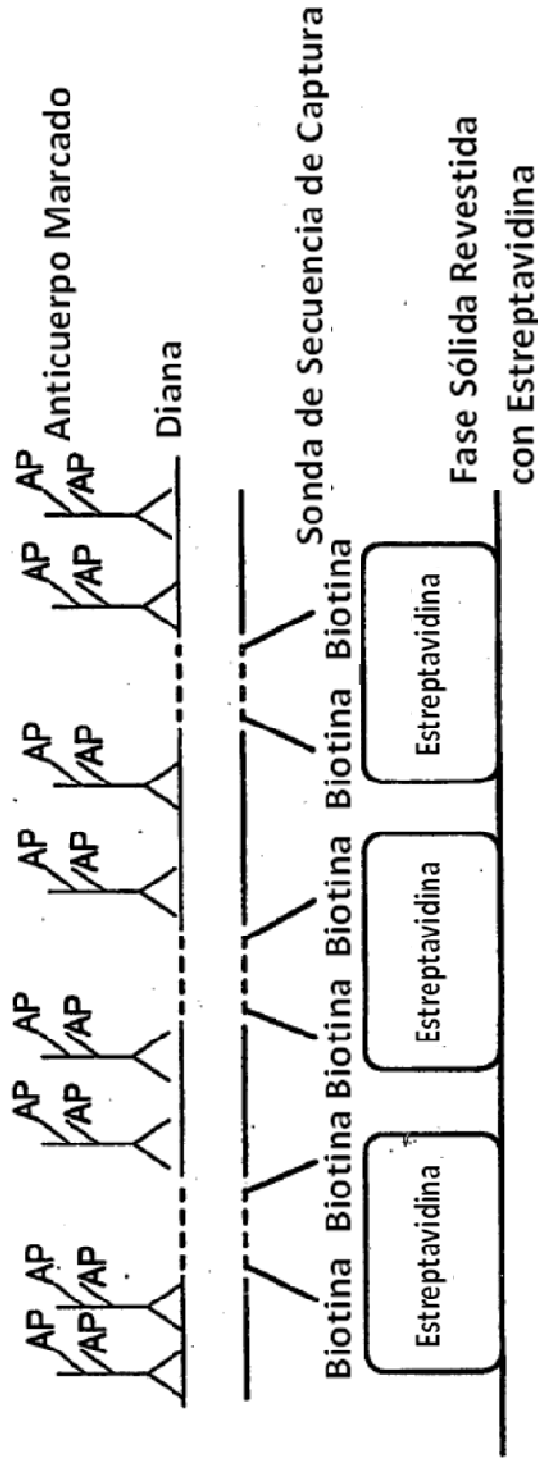


FIG. 1

**Captura Híbrida Específica de la Diana
Utilizando Sonda Bloqueadora
(Versión de hibridación simultánea)**

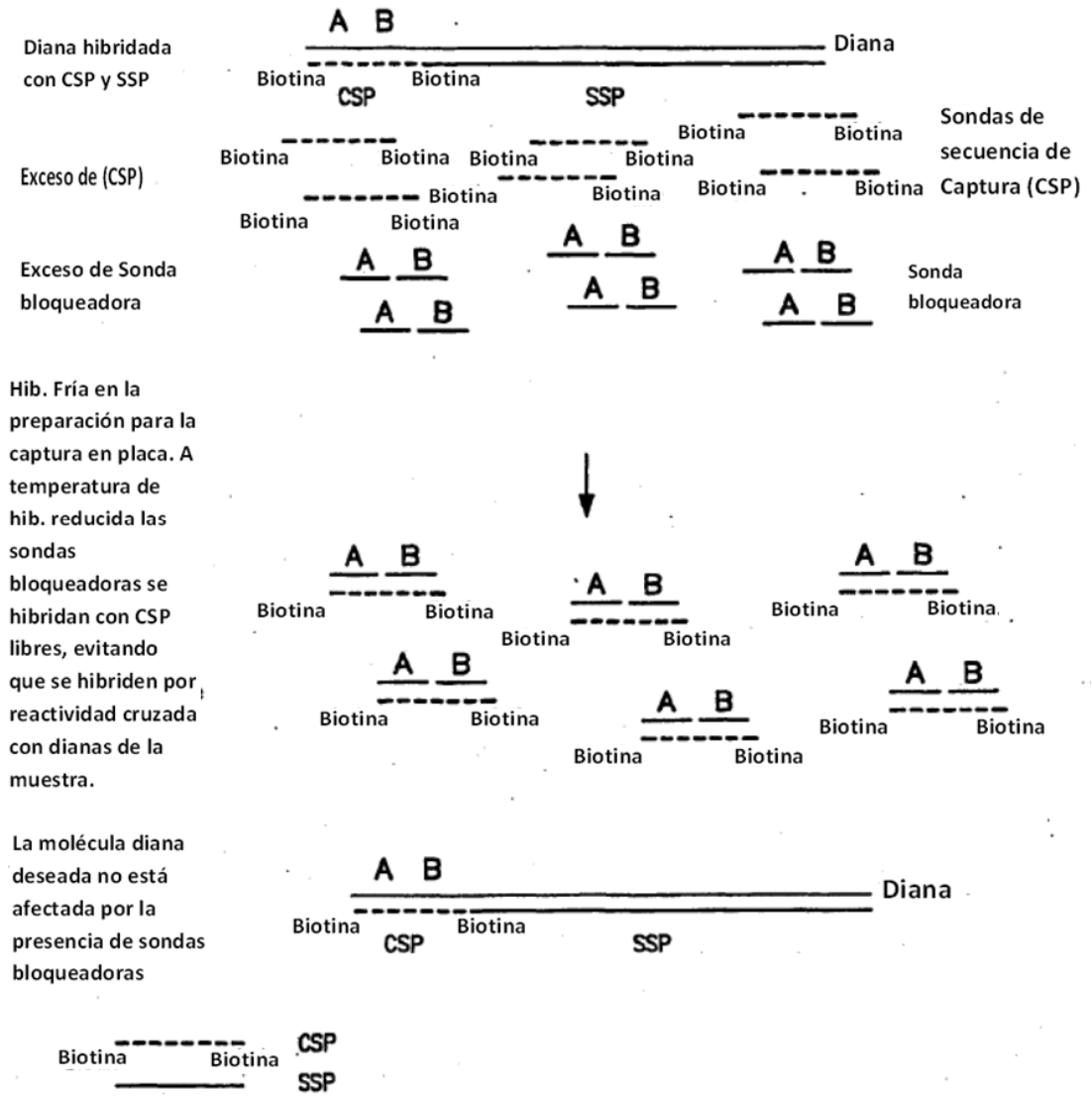


FIG. 2

TSHC con Sondas de secuencia de Captura (CSP) "Fusionadas"

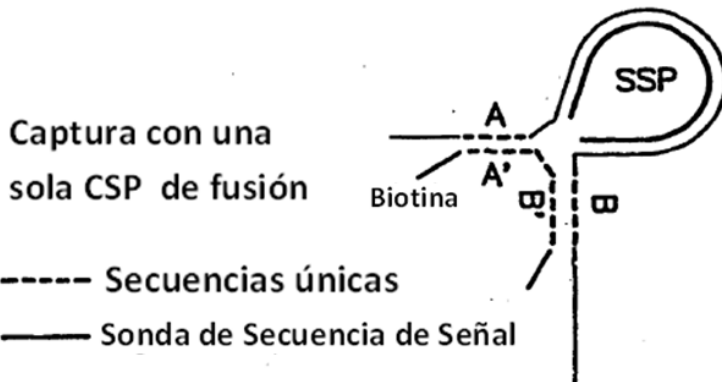
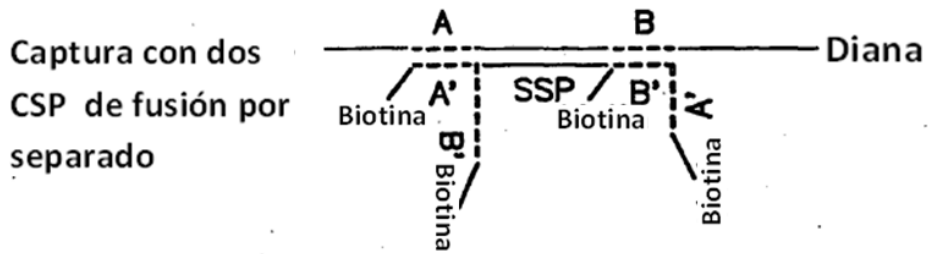
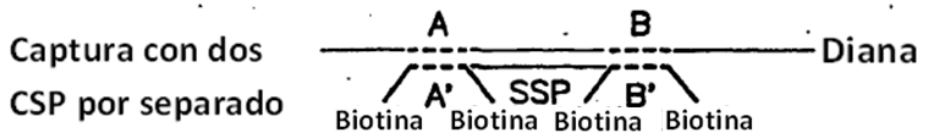


FIG. 3

Sensibilidad analítica y reactividad cruzada de
TSHC de HSV-1

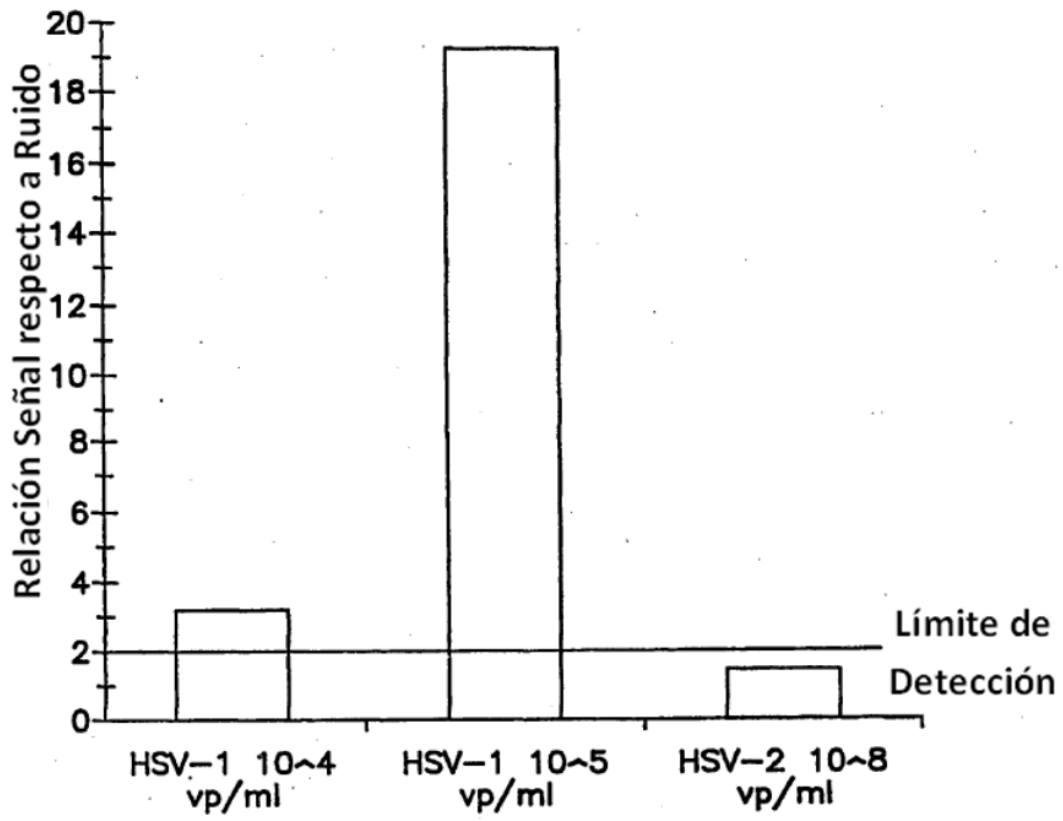


FIG. 4

Sensibilidad y reactividad cruzada de
TSHC de HSV-2

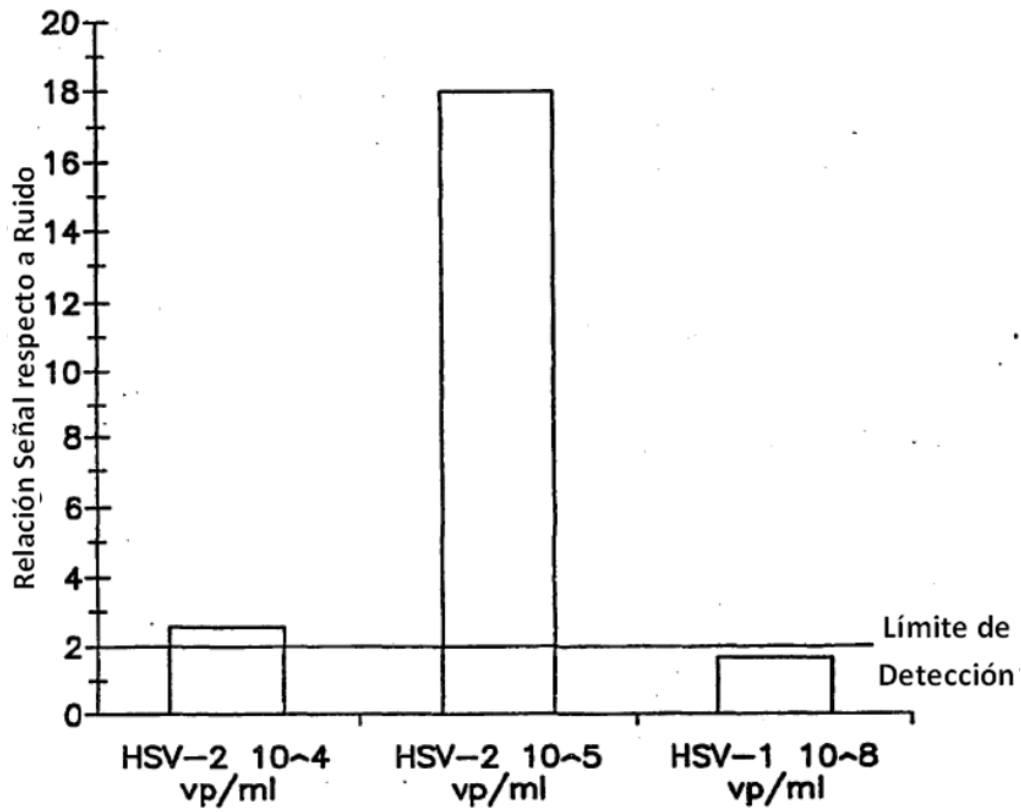


FIG. 5

TSHC-Plus Versión 1

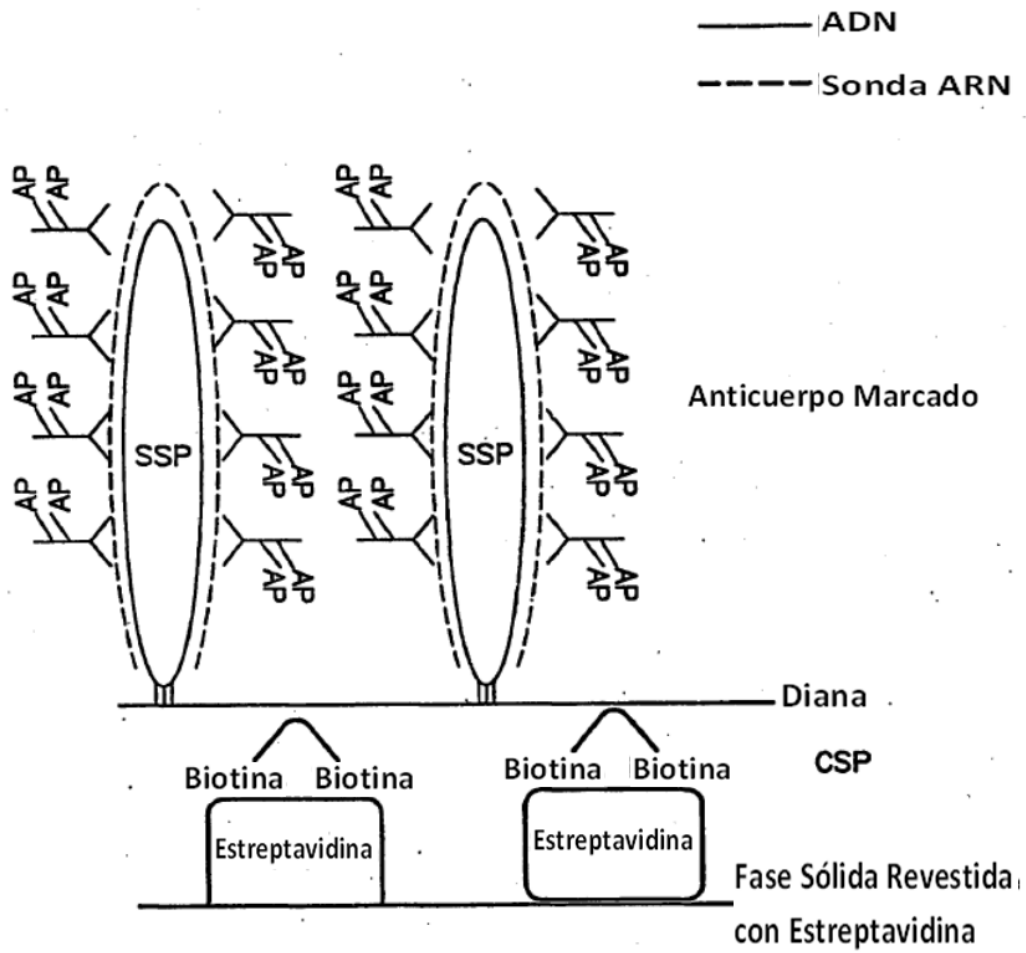


FIG. 6A

TSHC - Plus Versión 3

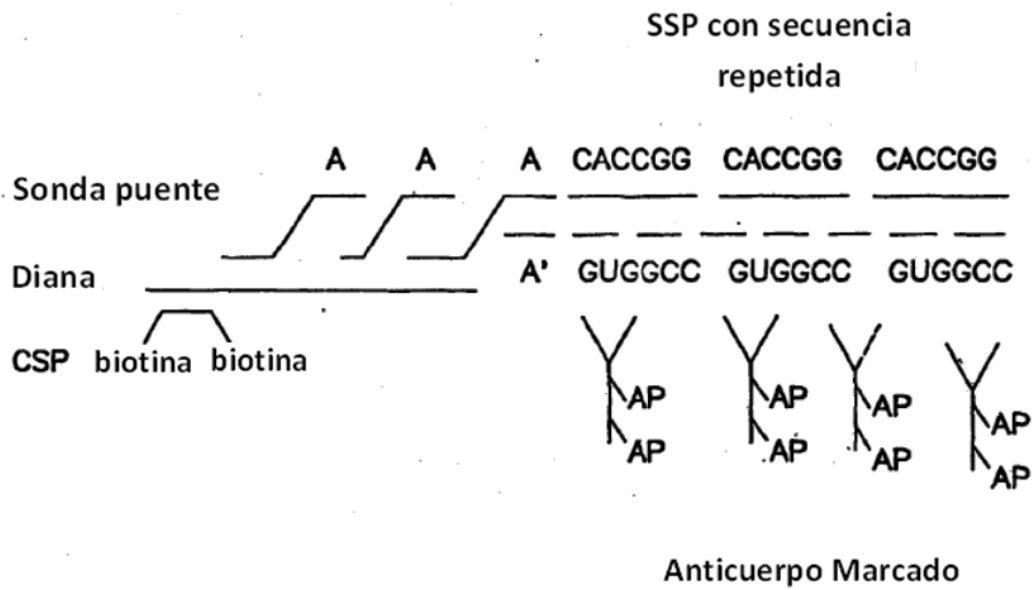


FIG. 6C

TSHC - Plus Versión 4

--- Poli(dT)

----- Poli(A)

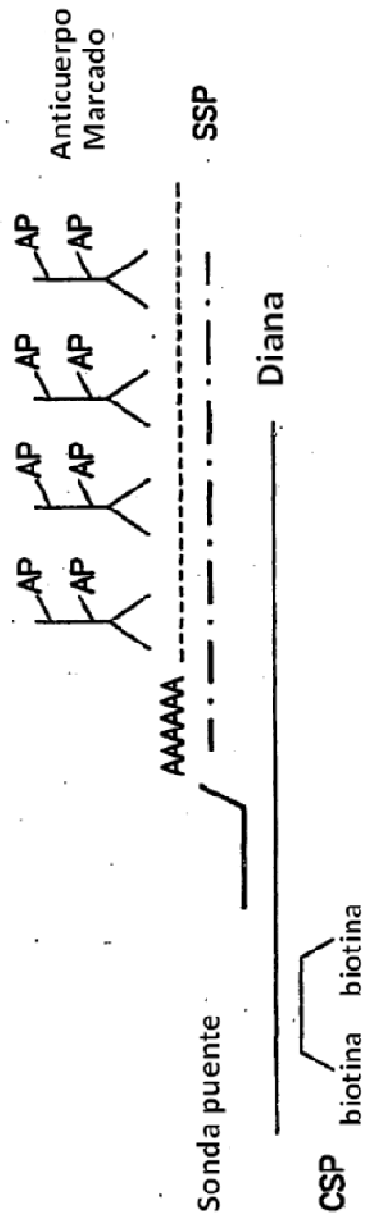


FIG. 6D

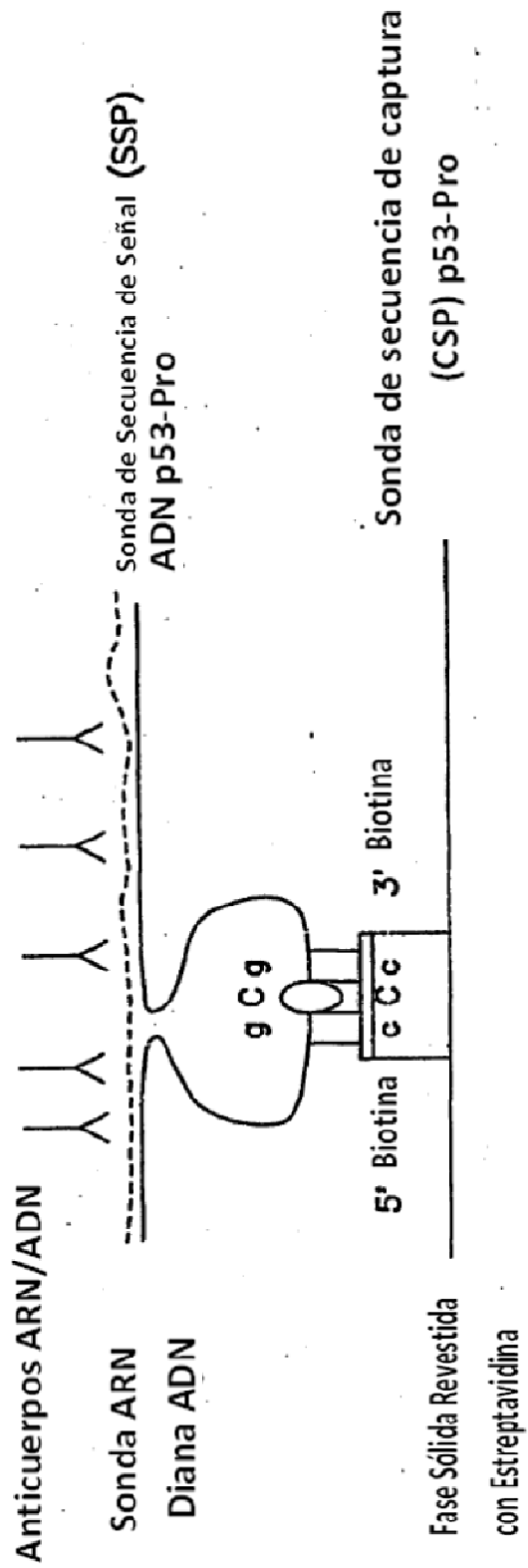


FIG. 7