

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 052**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2008 E 08788296 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2188394**

54 Título: **Identificación de secuencias de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

13.08.2007 GB 0715739
13.08.2007 GB 0715737

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF STRATHCLYDE (100.0%)
MCCANCE BUILDING, 16 RICHMOND STREET
GLASGOW G1 1XQ, GB

72 Inventor/es:

GRAHAM, DUNCAN;
FAULDS, KAREN;
SMITH, EWAN y
RICKETTS, ALASTAIR

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 547 052 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

Identificación de secuencias de ácidos nucleicos

5 Esta invención se refiere a la identificación de secuencias de ácidos nucleicos. Más particularmente la invención se refiere al uso de una enzima exonucleasa para facilitar la identificación de una secuencia diana por medio de la degradación de un duplo de ácido nucleico formado entre una secuencia de ácido nucleico diana y una secuencia de sonda de ácido nucleico, de tal modo que se genera un cambio de señal discernible tras la degradación de la sonda cuando se une a/se asocia con la diana o el duplo de ácido nucleico, cuyo cambio de señal es detectable por medio de microscopía Raman.

Introducción

10 La industria moderna de diagnóstico molecular está valorada en 20 mil millones de £ y está creciendo a una tasa del 10 % anual. Aunque se basa en una serie de técnicas distintas, este mercado en constante crecimiento está dominado por los enfoques basados en la amplificación (principalmente ensayos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)). El motivo de esto es que el genoma de los organismos y ciertamente el de los seres humanos es particularmente complejo y necesita la simplificación de la región de interés para una enfermedad particular o un ensayo diagnóstico. Además de reducir la complejidad del genoma, un enfoque basado en la amplificación también aumenta la cantidad de material disponible para la detección. Esto es importante cuando se considera la biodisponibilidad y sensibilidad de las técnicas rutinarias tales como la fluorescencia o la quimioluminiscencia.

20 La PCR es una técnica de biología molecular usada para replicar y amplificar regiones específicas (o genes) de una cadena de ADN. Una pequeña cantidad de ADN puede amplificarse exponencialmente, sin usar un organismo vivo tal como una levadura o *E. coli*, para obtener suficiente ADN para que se ensaye adecuadamente. La técnica se usa para una serie de aplicaciones tales como la detección de enfermedades y estados patológicos infecciosos o hereditarios, la clonación de genes, ensayos de paternidad y huella genética en ciencias forenses.

25 El procedimiento de la PCR se lleva a cabo en ciclos. Cada ciclo consiste en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión.

En la etapa de desnaturalización el molde de ADN bicatenario que contiene la región diana o el gen de interés que se amplificará se calienta para romper los enlaces de hidrógeno entre dos hebras. Esto hace que se separen y se vuelvan accesibles a los cebadores (secciones cortas de ADN o ARN que son complementarias al comienzo y al final de la región de ADN que se va a amplificar).

30 En la etapa de hibridación la temperatura disminuye, permitiendo que los cebadores hibriden con secuencias complementarias en el ADN diana, flanqueantes a la región que se va a amplificar. Dado que a menudo de usa un gran exceso de cebadores, las hebras diana se unen a los cebadores en lugar de hacerlo entre ellas mismas.

35 En la etapa de extensión, la ADN polimerasa (una enzima que sintetiza nuevas copias de la región de ADN de interés) copia la cadena de ADN comenzando en cada cebador y extiende las nuevas hebras en la dirección de 5' a 3'. Esto da como resultado dos copias del ADN bicatenario que constituyen el molde para el siguiente ciclo. Por lo tanto, se replica una cantidad doble de ADN en cada nuevo ciclo. Un segundo ciclo produce 4 copias de una secuencia diana de ADN bicatenario. Después del tercer ciclo hay 8 copias de la secuencia diana de ADN bicatenario, dos de las cuales consisten solamente en la región diana. Las otras copias también incluyen las regiones de ADN flanqueantes. Se realizan de aproximadamente de 20 a 35 ciclos.

40 La PCR cuantitativa (QPCR), también mencionada como PCR en tiempo real, es una modificación de la PCR. Esta técnica se usa comúnmente para detectar una secuencia específica de ADN dentro de una muestra. Si la secuencia específica está presente, la QPCR puede medir rápidamente la cantidad de producto de PCR en tiempo real. Esta puede usarse para medir indirectamente la cantidad de material inicial presente. La mayor parte de los procedimientos de QPCR usan una molécula indicadora fluorescente que aumenta a medida que se acumula el producto de PCR con cada ciclo de amplificación.

45 Una de dichas técnicas es el procedimiento de SYBR Green. El colorante SYBR Green puede unir el nuevo ADN bicatenario sintetizado y puede medirse el aumento de la intensidad de fluorescencia. Esto permite determinar posteriormente la concentración inicial de ADN.

50 También se usan comúnmente sondas específicas de secuencia (por ejemplo, Sondas TaqMan o Balizas Moleculares) para la QPCR. Las sondas TaqMan están diseñadas para hibridar con una secuencia específica de ADN, habitualmente una sección del producto de PCR deseado. La sonda contiene un colorante indicador que es fluorescente. La sonda también contiene un desactivador, que absorbe la fluorescencia emitida por el colorante indicador. La proximidad cercana del desactivador con respecto al indicador impide la fluorescencia de este último. Durante la fase de extensión del ciclo de PCR, la actividad de exonucleasa de la ADN polimerasa permite que se "sobreescriba" sobre la sonda rompiéndola en fragmentos separados. Al hacer esto, la molécula desactivadora se separa del colorante indicador y aumenta la fluorescencia.

Las balizas moleculares actúan de un modo similar al de las sondas TaqMan. Las balizas moleculares son sondas con forma de horquillas que también contienen típicamente un par de fluoróforo/desactivador y que están diseñadas para detectar secuencias específicas de ADN. De nuevo, la proximidad cercana del desactivador impide la fluorescencia del fluoróforo. Cuando la sonda hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria, sin embargo, la sonda se endereza, introduciendo suficiente distancia entre el fluoróforo y el desactivador para que se dé la fluorescencia. No obstante, la detección de la fluorescencia está ligada a la sensibilidad y puede ser necesaria una señal fluorescente relativamente grande por encima del fondo con el fin de la detección exitosa con respecto al escaneo.

También se han usado sondas marcadas radiactivamente para detectar el ADN. Su uso fue ventajoso para permitir técnicas muy sensibles pero tenía la desventaja presentar una dificultad en el manejo y la eliminación segura de las sondas marcadas radiactivamente. Además, dichas técnicas no permitían los ensayos continuos (algunas veces mencionados como homogéneos) dado que era necesaria la separación del sustrato sin reaccionar antes de que pudiera hacerse alguna medición cuantitativa. Por lo tanto, dichas técnicas no se usan con la misma frecuencia que las técnicas modernas tales como aquellas que implican balizas moleculares y sondas TaqMan.

S.C. Hillier y col. notifican (Electrochemistry Communications, 6, 1227-1232 (2004)) un ensayo electroquímico de detección génica que utiliza la actividad de la exonucleasa T7 sobre secuencia complementaria de oligonucleótidos diana en la que se describe un procedimiento para detectar una secuencia específica de ADN usando una sonda marcada con ferroceno 5'. La sonda hibrida con la región diana y después la exonucleasa T7, que muestra una actividad exonucleasa de 5' a 3' sobre el ADN bicatenario, escinde el nucleótido terminal del extremo 5' de la sonda liberando el ferroceno. El ferroceno liberado migra a la superficie del electrodo dando como resultado un aumento de la corriente de oxidación del ferroceno en el electrodo. Sin embargo, este ensayo no tiene ningún aspecto homogéneo ya que ninguna de las sondas no incorporadas o sin hibridar se separarían antes de la detección dado de otro modo que estas producirían una señal de fondo.

La Patente de EE.UU. Nº 5.853.990 (Winger y col.) describe la determinación de una sonda de nucleótidos usando una sonda de ARN. Una sonda de ARN hibrida con una secuencia diana de ADN, la sonda de ARN se ha modificado de modo que contenga marcadores similares a los que se usan en el ensayo TaqMan. La enzima RNasaH se usa entonces para degradar selectivamente la cadena de ARN de la quimera de modo que se libera el marcador del desactivador.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el reconocimiento de la capacidad de determinadas exonucleasas para digerir un ácido nucleico bicatenario (es decir, duplo). Dicha capacidad de procesamiento permite que se proporcione un sistema por el cual puede liberarse una molécula de señalización tras la digestión del duplo de ácido nucleico y la molécula de señalización/marcador detectado por medio de espectroscopía Raman y en (R)DRSP particulares.

Visto desde un primer aspecto, por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para su uso en la detección de un ácido nucleico diana que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una sonda de ácido nucleico bicatenario con una muestra de interés en condiciones eficaces para generar un duplo de sonda/ácido nucleico diana mediante la hibridación específica de dicha sonda de ácido nucleico con dicho ácido nucleico diana, si dicho ácido nucleico diana está presente;
- (ii) poner en contacto cualquier duplo de sonda/ácido nucleico diana con una exonucleasa para efectuar la digestión del duplo y liberar una molécula marcadora del duplo; y
- (iii) detectar el marcador por espectroscopía Raman detectando un cambio detectable en el espectro Raman del marcador tras su liberación del duplo, de modo que se detecte el ácido nucleico diana, si está presente.

Preferentemente, la exonucleasa no tiene capacidad de sintetizar oligonucleótidos o de polimerasa; en otras palabras el contacto con la exonucleasa da como resultado únicamente la degradación del oligonucleótido y no la construcción del oligonucleótido.

El ácido nucleico diana se obtiene a partir de una muestra de interés, que puede ser un fluido, líquido, aire, una torunda de una superficie sólida, etc.

En una realización de la invención la sonda de ácido nucleico está marcada con el marcador. En otra realización el marcador es capaz de unirse a un duplo de ácido nucleico. El marcador es tal que puede detectarse por espectroscopía Raman, usando procedimientos tales como las técnicas de Dispersión Raman de Superficie Potenciada (DRSP) o Resonancia de Dispersión Raman de Superficie Potenciada (RDRSP). Los marcadores adecuados se desvelan en la técnica anterior que se menciona más adelante en el presente documento y pueden mencionarse como "marcadores de (R)DRSP" cuya expresión se refiere a un marcador que puede detectarse por DRSP y/o RDRSP.

Una ventaja particular de la presente invención, a diferencia de la técnica anterior, tal como la PCR, es que no es necesario efectuar la amplificación del ácido nucleico diana, debido a que una señal detectable, en particular con (R)DRSP, proporciona la sensibilidad suficiente con cantidades minúsculas del nucleótido diana.

El uso de la (R)DRSP como una modalidad de detección se desvela, por ejemplo, en los documentos WO97/05280, WO99/60157 y WO2005/019812 así como en numerosos artículos de investigación, en particular en aquellos en los que Duncan Graham es el (co)autor (véase por ejemplo SERRS Parte 2, Synthesis and evaluation of dyes for multiple labelling for SERRS (McHugh, C.J., Docherty, F.T., Graham, D., Smith, W.E. Analyst, 2004, 129, 1, 69-72); y Biosensing Using Silver Nanoparticles and Surface Enhanced Resonance Raman Scattering (Graham, D, Faulds, K, Smith, W. E., Chemical Communications, 2006, 42, 4363-4371)).

En los documentos WO97/05280, WO99/60157 y WO2005/019812 se describe el uso de (R)DRSP en procedimientos para detectar o identificar secuencias de ácidos nucleicos particulares. En estas publicaciones la detección se basa en la medición del efecto directo de la unión de una secuencia diana sobre la (R)DRSP. En contraposición, se apreciará que la presente invención permite la detección de una secuencia diana gracias a la liberación detectable de un marcador gracias a la digestión de un duplo de ácido nucleico, cuya liberación es indicativa de que la sonda se ha unido a la secuencia diana.

La combinación de detección Raman o (R)DRSP con la identificación de secuencias de ácidos nucleicos en los cuales se usa una exonucleasa para liberar un marcador detectable por Raman/(R)DRSP a partir de un duplo sonda/diana, hasta donde alcanza el conocimiento de los presentes inventores, no se ha notificado hasta el momento y representa un aspecto adicional de la invención. Vista desde este aspecto la invención proporciona un procedimiento para su uso en la detección de un ácido nucleico diana que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una sonda de ácido nucleico monocatenaria con una muestra de interés en condiciones eficaces para generar un duplo de sonda/ácido nucleico diana mediante la hibridación específica de dicha sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico diana, si dicho ácido nucleico diana está presente;
- (ii) poner en contacto cualquier duplo de sonda/ácido nucleico diana con una exonucleasa para efectuar la digestión del duplo y liberar una molécula marcadora del duplo; y
- (iii) detectar el marcador mediante espectroscopía Raman detectando un cambio detectable en el espectro Raman del marcador tras su liberación del duplo, de modo que se detecte el ácido nucleico diana, si está presente.

Vista desde un aspecto adicional más, la invención proporciona un procedimiento para detectar simultáneamente varios ácidos nucleicos diana distintos en una muestra de interés que comprende efectuar simultáneamente varios procedimientos de acuerdo con la invención para su uso en la detección de un ácido nucleico diana en el que se usa un marcador distinto para detectar cada uno de dichos ácidos nucleicos diana.

También se desvela en el presente documento un kit de partes que comprende:

- (i) una sonda de ácido nucleico;
- (ii) una exonucleasa capaz de digerir un ácido nucleico bicatenario; y
- (iii) un marcador detectable por (R)DRSP.

En determinadas realizaciones, la sonda de ácidos nucleicos del kit es una sonda de ácidos nucleicos monocatenaria que tiene un grupo 5-fosfato; y la exonucleasa es exonucleasa lambda.

La capacidad de detectar a veces pequeñas cantidades de los ácidos nucleicos diana en ausencia de replicación de la diana es una ventaja particular de la presente.

Se desvela además un procedimiento para su uso en la detección de un ácido nucleico diana que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una sonda de ácido nucleico monocatenaria con una muestra de interés en condiciones eficaces para generar un duplo de sonda/ácido nucleico diana mediante la hibridación específica de dicha sonda de ácido nucleico con un ácido nucleico diana, si está presente, y
- (ii) poner en contacto cualquier duplo de sonda/ácido nucleico diana con una exonucleasa para efectuar la digestión del duplo y liberar una molécula marcadora del duplo,

en la que se pone en contacto un exceso de dicha sonda de ácido nucleico con la muestra de interés en la etapa (i) de tal modo que la digestión de un duplo en la etapa (ii) recicla el ácido nucleico diana una o más veces permitiendo de este modo que más moléculas de sonda hibriden específicamente con la diana formando duplos de sonda/diana adicionales que se digieren para liberar moléculas diana adicionales.

También se desvela el uso de un ácido nucleico diana como un molde con una sonda de ácido nucleico monocatenaria que se hibrida específicamente y un duplo de sonda/ácido nucleico diana resultante degradado por una exonucleasa para liberar una molécula marcadora del duplo, en el que dicho ácido nucleico diana se usa como dicho molde varias veces de modo que se liberan varias moléculas marcadoras de varios duplos, y en el que cada uno de dichos varios duplos está comprendido por el mismo ácido nucleico diana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1(a) muestra esquemáticamente una realización de la presente invención que hace uso de la detección por RDRSP. Inicialmente, se toma una muestra que contiene un ADN genómico sin amplificar y se calienta para producir un ADN monocatenario. Después de añadir una sonda que se une específicamente a la secuencia diana de ADN. Esta sonda está diseñada de un modo específico dependiendo de la estrategia de detección a usar: este puede tener un grupo fosfato 5' por ejemplo para permitir que ocurra la acción de la enzima exonucleasa λ . En el caso de la detección por RDRSP la sonda puede, por ejemplo, contener un colorante de hidroxiquinolina 3' que no da una señal de RDRSP mientras que está unido a la sonda. Tras la acción de la enzima y la digestión de la sonda, sin embargo, se libera el colorante en una solución, lo que permite que se obtenga una señal de RDRSP cuando se añade un sustrato adecuado, tal como nanopartículas de plata.

La Figura 2 muestra una realización adicional de la presente invención en la que la sonda de detección es una nanopartícula metálica en la superficie de las cuales están unidas las secuencias diana. Estos detienen la agregación de las nanopartículas debido a la repulsión electrostática. Las secuencias de las sondas pueden modificarse de distintas formas y en particular para facilitar la detección por RDRSP así como la detección visual. El sistema (a) usa sondas unidas a la superficie en el extremo 3' y que se han modificado en el extremo 5' con un grupo fosfato. Tras la hibridación con la secuencia diana y la posterior digestión por una exonucleasa, el ADN se degrada dando como resultado la agregación de las partículas, que puede observarse como un desplazamiento en el plasmón superficial y opcionalmente un cambio de color distintivo. En el sistema (b) los colorantes activos de RDRSP se espaciarán sobre la superficie de las nanopartículas, sin embargo no se observará ninguna señal hasta después de la hibridación con la diana y de que se dé la digestión por la enzima y la agregación resultante. Después de que se dé la agregación se obtendrá una señal de RDRSP. En el sistema (c), la sonda usada es la misma sonda usada en la Figura 1; tras la hibridación y digestión el colorante de RDRSP se liberará y será capaz de unirse a la superficie y producir una señal de RDRSP cuando las nanopartículas hibriden.

La Figura 3 es un diagrama de flujo esquemático de un ensayo que emplea exonucleasa λ para digerir una sonda de oligonucleótidos cuando se unen a un ácido nucleico diana y retirar la sonda sin digerir.

La Figura 4 muestra el aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando el ADN bicatenario en el que una cadena porta un resto fosfato 5' se expone a la exonucleasa λ , y una comparación con el mismo experimento llevado a cabo en ausencia de exonucleasa λ .

La Figura 5 muestra el aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo cuando el ADN bicatenario en el que una cadena porta un resto fosfato 5' se expone a dos cantidades distintas de exonucleasa λ , y una comparación con el mismo experimento llevado a cabo en ausencia de exonucleasa λ .

La Figura 6 muestra aumentos de la fluorescencia tras el procesamiento por λ exonucleasa tras exponer el mismo ADN bicatenario a λ exonucleasa, cuyos resultados se representan en las Figuras 1 y 2 y ADN modificados en los que los sustratos tienen un hueco 5'; un extremo como 5' y una cola 3'; un hueco 5' y una cola 3'; y una comparación con un ADN sin modificar en ausencia de λ exonucleasa.

La Figura 7 muestra un espectro de RDRSP de reacciones de ensayo después de la digestión enzimática y la etapa de lavado posterior en presencia/ausencia de la secuencia complementaria.

La Figura 8 muestra la intensidad de RDRSP de la altura promedio del pico principal a 1650 cm^{-1} de la sonda marcada con TAMRA (SONDA PTB) en presencia/ausencia de la secuencia diana complementaria después de que se digiriera por la enzima λ exonucleasa. Las reacciones de control que se ejecutaron en las mismas condiciones pero que carecían de la enzima también se muestran para la comparación. El valor citado es el promedio de las tres mediciones llevadas a cabo para 3 réplicas separadas para cada tipo de reacción.

La Figura 9 muestra los espectros de RDRSP después de la reacción de digestión, inactivación y la etapa de eliminación de la biotina (línea discontinua) y la misma reacción llevada a cabo en ausencia de la enzima (línea continua).

La Figura 10 muestra una representación esquemática de un ensayo basado en FRET.

La Figura 11 muestra un formato de ensayo usado en estudios de catálisis a baja concentración de diana. La sonda marcada con colorante se muestra como una estrella de 8 puntas, el aglutinante del surco menor como una cruz (X) y la diana como una línea continua. Se digirieron distintas relaciones de sonda marcada con FAM con respecto a la secuencia diana complementaria (1:1; 10:1; 100:1) en presencia de la enzima exonucleasa λ . La concentración de sonda marcada con FAM y H33258 se mantuvo constante a $1\text{ }\mu\text{M}$; se redujo la concentración de secuencia complementaria. La mezcla de reacción se calentó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min seguida de una etapa de inactivación enzimática a $75\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. Cuando el nivel de fluorescencia era inferior al del detector se añadía un exceso de diana para intentar la formación de duplos y por lo tanto se producía una curva de fusión si había cantidades apreciables de la sonda que no se habían digerido.

La Figura 12 muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia a lo largo de 30 min del duplo FRET en presencia (curva inferior)/ausencia (curva superior) de exonucleasa lambda. Una disminución de la intensidad de fluorescencia indica la destrucción del sistema FRET por digestión. Relación de sonda marcada: complementaria (1:1).

5 La Figura 13 muestra la fluorescencia de las curvas de hibridación para las muestras que contiene un exceso inicial de la sonda en comparación con la secuencia diana (100:1). Ambas muestras se enriquecieron con diana adicional. El trazo inferior presenta una muestra a la que se le añadió enzima, sin mostrar un cambio importante en la intensidad de fluorescencia. El trazo superior carecía de enzima y por lo tanto muestra una transición de la fluorescencia aguda a -58 C, que se correlaciona con la Tm del duplo para esta secuencia.

10 La Figura 14 muestra la fluorescencia del control de sonda monocatenaria marcada con FAM en presencia de H33258 y lexo (línea continua inferior); el ADN bicatenario (sonda FAM hibridada) con H33258 (línea continua superior); y el ADN bicatenario con H33258 y lexo (línea discontinua), muestra el progreso de la digestión a los 30 minutos.

15 La Figura 15 muestra las curvas de hibridación para el ADN no digerido (línea continua) y digerido (línea discontinua). La muestra no digerida muestra una Tm = 57 °C.

La Figura 16 muestra el cambio de intensidad después de 30 min de digestión con lexo usando distintos complementos para la sonda FAM. Para cada par, la barra del lado izquierdo representa un cambio en la fluorescencia de las muestras sin la enzima, las muestras del lado derecho con la enzima (mostrando los promedios de tres medidas excepto a partir del 5' solapante, únicamente una medida).

20 La Figura 17 muestra una representación esquemática de un procedimiento en el que se usa una sonda de ácido nucleico bicatenaria que comprende un marcador de (R)DRSP y biotina, la sonda sin reaccionar o en exceso se elimina usando imanes recubiertos de estreptavidina permitiendo la detección únicamente del marcador de (R)DRSP que estaba presente en un duplo sonda/diana antes de la degradación por la exonucleasa.

25 La Figura 18 muestra un gel de agarosa en TBE que muestra la detección de un ácido nucleico diana (ADN de *C. trachomatis*) (líneas 2 a 9) frente a un control negativo (líneas 12 a 19).

La Figura 19 representa los resultados del análisis de (R)DRSP del análisis de ADN de *C. trachomatis* con controles negativos y con una concentración variable de sonda.

La Figura 20 representa el espectro de RDRSP de las muestras que contienen el ADN de *C. trachomatis*, frente a un control negativo.

30 La Figura 21 representa, esquemáticamente, un protocolo de ensayo en el que se pone en contacto un ácido nucleico diana, secuencialmente con una sonda de captura biotinilada unida a esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina y después con una sonda de RDRSP marcada con un colorante activo terminada en un fosfato 5', digiriéndose el duplo resultante por exonucleasa lambda, permitiendo la detección del colorante usando RDRSP.

35 La Figura 22 muestra una respuesta de un ensayo RDRSP representado en la Figura 21 (espectro superior) con un control negativo en el que no se usa sonda marcada con colorante (espectro inferior).

La Figura 23 muestra un espectro RDRSP de un colorante derivado de 8-hidroxiquinolina.

40 La Figura 24 muestra un procedimiento de la invención que implica la liberación de un marcador a partir de un duplo de sonda/ácido nucleico diana formado tras la hibridación de dos sondas de ácido nucleico y un ácido nucleico diana.

La Figura 25 muestra una variación de la realización representada en la Figura 24 en la que se captura un ADN diana por una sonda de captura asegurada sobre una superficie sólida tal como una esfera o una placa.

Descripción detallada de la Invención

45 Los términos "diana", "muestra" o la expresión "muestra de interés" se refieren en el presente documento a cualquier muestra que contenga un ácido nucleico, por ejemplo, muestras que contienen ácidos nucleicos aislados a partir de un individuo (o unos individuos). El "ácido nucleico diana" puede ser cualquier ácido nucleico, incluyendo ADN (de cualquier origen, por ejemplo, genómico, ADNc, sintético, etc.), ARN (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, sintético, etc.) o derivados de estos (tales como la inclusión de bases de nucleótidos raras/no habituales de origen natural y/o bases de nucleótidos sintéticas, conocidas en la técnica). La muestra puede representar a todos o únicamente a una porción de los ácidos nucleicos presentes en una fuente dada. La muestra puede prepararse antes de ensayarla con el fin de hacer que el ácido nucleico diana de la misma esté más disponible para el procedimiento de ensayo. Por ejemplo el ácido nucleico diana puede estar completa o parcialmente purificado y/o pueden producirse y separarse fragmentos. Como alternativa a, o además de, usar el ácido nucleico de la muestra directamente, pueden prepararse y usarse copias (por ejemplo mediante PCR). La expresión "ácido nucleico diana" cubre todas estas posibilidades.

La expresión "ácido nucleico", y los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan en el presente documento para un polímero o un oligómero basado en los nucleótidos que contienen 2-desoxi-D-ribosa o D-ribosa, así como para moléculas de APN o ALN conocidas en la técnica. Por lo tanto, estos términos y expresiones incluyen el ADNbc y el ADNmc así como el ARNbc y el ARNmc. Los términos y expresiones también abarcan la posibilidad de mezclas quiméricas de los anteriores, siendo un ejemplo de dicha mezcla una construcción de oligonucleótidos monocatenarios que comprende tanto ADN como APN o ALN. No se pretende hacer una distinción entre la expresión "ácido nucleico" y los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido"; estos términos y expresión se usan indistintamente.

El ácido nucleico diana no necesariamente es una especie aislada de cualquier secuencia natural o existente sino que puede ser cualquier secuencia de cualquier longitud presente en, o dentro de, la muestra que se desea investigar. Por lo tanto puede ser cualquier secuencia que se encuentre en un genoma, o ácido nucleico subgenómico, cromosoma, vector extracromosómico o gen, o motivo, o secuencia no codificante, o una secuencia de sitio marcado o una marca de secuencia expresada. La secuencia puede proceder de cualquier fuente, por ejemplo, producida de acuerdo con material publicado o aquel que está en una base de datos.

La expresión "hibridación específica" pretende referirse a la secuencia de la sonda de ácido nucleico que es sustancialmente complementaria a la secuencia del ácido nucleico de la diana. Esto se refiere a los oligonucleótidos que, cuando se alinean de tal modo que el extremo 5' de una de las secuencias se empareja con el extremo 3' de la otra, existe al menos un 95 %, típicamente al menos un 97 %, más típicamente al menos un 98 % y más típicamente al menos un 99 % de identidad (es decir, emparejamiento de bases de Watson y Crick) entre las secuencias. Pueden incorporarse (enzimática o sintéticamente) análogos de bases modificadas que no se encuentran comúnmente en los ácidos nucleicos naturales en los ácidos nucleicos. Tal como se conoce en la técnica, la complementariedad de dos hebras de ácido nucleico puede no ser perfecta: algunos duplos estables pueden contener pares de bases que no coinciden correctamente o pares de bases que no coinciden y un experto en la materia de la tecnología de ácidos nucleicos puede determinar su estabilidad hipotéticamente considerando una serie de variables distintas a la longitud del oligonucleótido y la concentración y la identidad de las bases de guanina y citosina del oligonucleótido. A este respecto se entenderá que la rigurosidad de las soluciones usadas en cualquier caso dado puede variar de acuerdo con las necesidades del ejemplo concerniente, y la selección de la rigurosidad adecuada está dentro de las capacidades de la persona experta.

El experto destinatario será consciente del control adecuado de la temperatura y/o concentraciones de sales, por ejemplo, es posible asegurar que únicamente las secuencias de las sondas de un grado deseado de especificidad para una diana particular permanecerán unidas a la diana y las sondas no específicas no hibridarán con la diana. El experto destinatario entiende esto con respecto a la hibridación específica.

Tal como se conoce en la técnica, los parámetros de la concentración de sales y/o la temperatura pueden variar para alcanzar la identidad deseada entre la sonda y el ácido nucleico diana. Una guía con respecto a dichas condiciones que está fácilmente disponible para los expertos en la materia en particular puede encontrarse en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Tercera Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Páginas 7.9 a 7.12 (2001).

La estabilidad de un duplo de ácido nucleico se mide por la temperatura de fusión o disociación, o "Tm". La Tm de un duplo de ácido nucleico particular en condiciones de reacción específicas es la temperatura a la cual la mitad de los pares de bases están presentes en una estructura de duplo y la mitad están presentes en un ADN monocatenario.

Los factores principales que rigen la determinación de la Tm son la longitud de la secuencia y el contenido de G-C. El procedimiento teórico y experimental para determinar la Tm se desvela en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Segunda edición, J Sambrook y col., Cold Spring Harbor, Capítulo II secciones 46 y 55. En esencia, para oligonucleótidos de una longitud menor de 18 nucleótidos, la Tm del híbrido se estima multiplicando el número de restos de A + T en el híbrido por 2 °C y el número de restos de G + C por 4 °C y sumando los dos conjuntamente. Para los nucleótidos entre aproximadamente 14 y 70 nucleótidos de longitud, también es aplicable la siguiente ecuación ideada por Bolton y McCarthy, (P.N.A.S. 48:1390, 1962) para determinar la TM de moléculas de ADN largas:

$$T_m = 81,5 - 16,6(\log[Na^+]) + 0,41 (\% G + C) - (600/N).$$

(en la que N es la longitud de la cadena y [Na⁺] es la fuerza iónica de la solución de hibridación.

Los expertos en la materia conocen otras fórmulas para calcular las Tm.

Tal como se indica anteriormente, la persona experta será consciente de que la Tm exacta dependerá de muchos factores, tales como la temperatura de reacción, la concentración de sales, la presencia de desnaturalizantes tales como la formamida y el grado de complementariedad con respecto a la secuencia con la cual se pretende que hibride el nucleótido.

Con respecto a la hibridación del oligonucleótido, la temperatura óptima de hibridación se lleva a cabo generalmente en condiciones que están de 2 a 10 °C por debajo de la T_m. Idealmente, la temperatura de hibridación se controla de un modo preciso, preferentemente a ± 2 °C, más preferentemente a $\pm 0,5$ °C o mejor, particularmente cuando las longitudes hibridables de los oligonucleótidos de captura son pequeñas y existe una necesidad de discriminar entre dos secuencias que únicamente pueden diferir en un solo nucleótido en uno u otro de los extremos de la secuencia hibridable.

Las condiciones de hibridación elegidas se diseñan para que sean tan cercanas como sea posible a la T_m calculada de los duplos formados entre la sonda y los ácidos nucleicos diana. La concentración de sales en la solución de hibridación usada es particularmente significativa. En NaCl 1 M, los pares de bases de G:C son más estables que los pares de A:T. De un modo similar, los oligonucleótidos bicatenarios con un contenido en G-C más alto tienen una T_m más alta que aquellos de la misma longitud con un contenido en A-T más alto. Si hay ligeras diferencias, es decir, diferencias en un único nucleótido, entre los ácidos nucleicos diana que necesitan distinguirse, es importante el establecimiento de las condiciones óptimas de hibridación, particularmente cuando la longitud hibridable es pequeña (< aproximadamente 30-meros). En los casos en los que debido a una composición distinta de nucleótidos en la muestra de interés además del nucleótido diana, existe un intervalo de T_m amplio. Debido a esto las condiciones pueden manipularse de modo que se disminuya la dependencia de las T_m sobre la composición de nucleótidos usando soluciones de hibridación caotrópicas. Esto puede efectuarse, por ejemplo, mediante la incorporación en la solución de hibridación de una amida terciaria o cuaternaria.

Tal como se usa en el presente documento, la sonda de ácido nucleico o "sonda" comprende una secuencia de ácido nucleico que está diseñada para formar una estructura de duplo con una secuencia sustancialmente complementaria en el ácido nucleico diana. Se entenderá que la sonda de ácido nucleico puede formar por lo tanto un duplo, por ejemplo, con un ácido nucleico diana monocatenario o bicatenario. Siendo este último la estructura de triplete resultante que comprenderá un duplo formado por la hibridación entre una cadena del ácido nucleico diana y la sonda monocatenaria. Los expertos en la materia entenderán que son posibles las arquitecturas de oligonucleótidos de orden superior que contienen duplos, por ejemplo las estructuras de cuarteto.

En determinadas realizaciones, el marcador se une directamente, enlaza o se asocia de otro modo con una o más bases de nucleótidos de la "sonda" de ácido nucleico. Por asociada con se entenderá que abarca realizaciones en las que un nucleótido individual, o una porción del mismo, es detectable una vez que ya no está unido a la sonda de ácido nucleico original de la que forma parte.

Los marcadores adecuados para la detección Raman/(R)DRSP se describen en, por ejemplo, los documentos WO97/05280, WO99/60157 y WO2005/019812. Otros marcadores adecuados incluyen aquellos colorantes desvelados en SERRS Dyes. Parte 2, Synthesis and evaluation of dyes for multiple labelling for SERRS (McHugh, C.J., Docherty, F.T., Graham, D., Smith, W.E. *Analyst*, 2004, 129, 1, 69-72); y Biosensing Using Silver Nanoparticles and Surface Enhanced Resonance Raman Scattering (Graham, D, Faulds, K, Smith, W. E. *Chemical Communications*, 2006, 42, 4363-4371). También es posible que el marcador tenga una frecuencia de resonancia particular, cuya frecuencia pueda cambiar cuando una serie de los marcadores se pongan en proximidad cercana.

Los marcadores fluorescentes se usan comúnmente en diversos sistemas de detección y varios marcadores fluorescentes son conocidos para los expertos en la materia. La presente invención también puede emplear técnicas de FRET y/o de extinción de la señal fluorescente, tal como se describirá con más detalle más adelante en el presente documento.

Por lo tanto el término "marcador" se refiere a cualquier átomo o molécula que pueda usarse para proporcionar una señal detectable preferentemente cuantificable, preferentemente en tiempo real. El marcador detectable puede unirse a o es una porción inherente de la sonda de ácido nucleico o puede llegar a unirse de otro modo al duplo formado entre la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana. Dichos marcadores pueden unirse al surco menor o mayor el duplo o intercalarse de otro modo con el duplo de ácido nucleico. Se entiende, sin embargo, que los marcadores de este tipo no serán capaces de unirse al ácido nucleico diana a menos que se forme un duplo entre la sonda y el ácido nucleico diana. Muchos de dichos marcadores son conocidos e incluyen PicoGreen® (G. Tolun y S. Myers (A real-time DNase assay (ReDA) based on PicoGreen® fluorescence *Nucleic Acids Res.* 2003, 31: e111)).

Tal como se usa en esta solicitud, a "tiempo real" se refiere a la detección de la producción cinética de una señal, que comprende tomar varias lecturas con el fin de caracterizar la señal a lo largo de un periodo de tiempo. Por ejemplo, una medición en tiempo real puede comprender la determinación de la tasa de aumento de producto detectable. Como alternativa, una medición en tiempo real puede comprender la determinación del tiempo necesario antes de que la secuencia diana se amplifique a un nivel detectable.

En algunas realizaciones puede ser necesario retirar la sonda sin hibridación de una reacción, con el fin de permitir la detección únicamente del marcador que ha llegado a incorporarse/asociarse con un duplo de sonda/ácido nucleico diana. Un modo de alcanzar esto es incorporar un resto de captura (también mencionado en el presente documento como un resto capturable) sobre/en la sonda de ácido nucleico (los ejemplos incluyen un resto magnético y/o biotina). Si la sonda de ácido nucleico no se une a la diana, la diana no se digerirá por la exonucleasa y la sonda sin

digerir puede retirarse por medio de un imán, tal como esferas magnéticas, en el caso de un resto magnético o del uso de un material recubierto de estreptavidina, en el caso de la biotina. Sin embargo, si la sonda forma el duplo sonda/diana, el resto de captura se liberará de la sonda tras la digestión del duplo pero el marcador aún podrá detectarse.

5 Así, por ejemplo, mediante un marcaje doble con un marcador detectable por espectroscopía Raman (por ejemplo, (R)DRSP y biotina, por ejemplo en el extremo 3', la sonda sin digerir (por ejemplo porque el ácido nucleico diana no estuviese presente) o puede retirarse el exceso de sonda mediante el uso de esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina, lo que significa que únicamente se detecta una señal cuando está presente el ácido nucleico diana.

10 Esto se muestra esquemáticamente en la Figura 17 (usando la detección por (R)DRSP y la captura con biotina/estreptavidina como ejemplo).

15 Puede entenderse que esta metodología es análoga al uso de sondas Taq-Man. Con las sondas Taq-Man la señal se suprime mediante el uso de un desactivador que, una vez separado del colorante indicador durante la amplificación por PCR, ya no suprime la fluorescencia del colorante indicador y la fluorescencia es detectable. En la presente invención, sin embargo, puede obviarse el uso del desactivador, una vez que la señal que de otro modo surgiría como una consecuencia del exceso o de falta de hibridación de la sonda pueda retirarse mediante el uso de un resto capturable tal como biotina, que se une a la sonda así como un colorante detectable por Raman. Ventajosamente, puede usarse el mínimo de sonda cuando la sensibilidad de la modalidad de detección lo permita (por ejemplo cuando se usa (R)DRSP).

20 En otras realizaciones adicionales de la invención, los procedimientos de la invención pueden hacer uso opcionalmente de más de una sonda de ácido nucleico que actúa en combinación con una sonda para el ácido nucleico diana. Por lo tanto, por ejemplo, si se usan dos sondas, una sirve para capturar el ácido nucleico diana, si está presente en la muestra de interés y la otra para proporcionar (típicamente) un marcador detectable para señalar que la diana si está presente, pueda desplegarse. Por lo tanto una primera sonda de ácido nucleico puede, por ejemplo, biotinilarse en el extremo 3', por lo que proporciona un resto capturable. Este puede ponerse en
25 contacto con una muestra de interés. Si el ácido nucleico está presente, este hibrida con la primera sonda y el duplo resultante se captura usando esferas magnéticas marcadas con estreptavidina. La sonda sin unir y los demás componentes de la muestra de interés pueden lavarse después. Como alternativa, la primera sonda de ácido nucleico puede ponerse en contacto inicialmente con un imán recubierto de estreptavidina (o esferas magnéticas), lavándose la sonda de captura no unida antes de la exposición a la muestra de interés, después de lo cual pueden
30 lavarse los componentes sin hibridar de la muestra de interés. Esta realización alternativa se representa esquemáticamente en la Figura 21.

Después de la captura del ácido nucleico diana, puede introducirse un marcador detectable por Raman al duplo resultante de la hibridación de la primera sonda de ácido nucleico con respecto al ácido nucleico diana. Esto puede lograrse usando un marcador que pueda intercalarse en el duplo tal como se describe en el presente documento.
35 Como alternativa, y típicamente, se introduce el marcador con una segunda sonda de ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico diana ya unido a la primera sonda de ácido nucleico. El duplo resultante que comprende dos hebras de la primera y opcionalmente la segunda sonda de ácido nucleico complementaria a distintas regiones del ácido nucleico diana puede degradarse después por la exonucleasa para liberar el marcador detectable por Raman (por ejemplo, activo para (R)DRSP).

40 En todas las realizaciones de la invención, en las que es posible separar el marcador no unido del ácido nucleico diana, por ejemplo, usando la técnica de captura que se describe en el presente documento, es posible y es a menudo ventajoso no incluir un resto desactivador para el marcador detectable por Raman en la sonda en la que está comprendido el marcador. Esto es debido a que es posible retirar la sonda que contiene marcador no unida (lo que podría producir de otro modo un resultado de falso positivo de fondo, dado que el ácido nucleico diana está
45 indicado por la detección del marcador). Sin embargo, cuando las técnicas de captura que se describen en el presente documento no se usan, o incluso cuando se usan, puede ser ventajoso incluir un desactivador para el marcador en una sonda de ácido nucleico. De este modo cualquier sonda residual sin hibridar que contenga un marcador no contribuye a cualquier señal detectada.

50 La Figura 21 representa, esquemáticamente, un ejemplo de una realización descrita anteriormente en el presente documento en términos generales en la que se emplean una primera y una segunda sonda de ácido nucleico por separado con una serie particular, pero no obligatoria, de etapas de lavado representadas. Se observará que la segunda sonda de ácido nucleico comprende un marcador y un desactivador (siendo el desactivador el círculo más oscuro de la sonda "marcadora") aunque se entenderá a partir de la discusión inmediatamente anterior que la presencia de este desactivador no es un rasgo esencial. "P" representa un resto terminal de fosfato 5' que sirve para
55 producir el ácido nucleico bicatenario resultante como un sustrato para la exonucleasa lambda. Por lo tanto la Figura 21 muestra una sonda de captura corta (biotinilada en 3') unida a esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Se lava la sonda no unida. La secuencia diana se hibrida después con la sonda de captura inmovilizada (primera sonda de ácido nucleico). Se lava el ácido nucleico diana no unido. Después se hibrida una secuencia de oligonucleótido marcada con un colorante (con un grupo fosfato 5') con la secuencia diana capturada. Se produce la acción de la exonucleasa λ sobre secuencia de la sonda hibridada. La enzima degrada la sonda de ADN hibridada a
60

mononucleótidos, liberando el colorante.

Como un ejemplo adicional de una realización de la invención que puede hacer uso de más de un ácido nucleico que actúa en combinación con una sonda para el ácido nucleico diana, pueden usarse dos sondas de ácidos nucleicos en las que una primera sonda comprende una secuencia diseñada como sonda para el ácido nucleico diana. Además de la porción de la primera sonda que es complementaria a al menos una porción del ácido nucleico diana la primera sonda también comprende una secuencia complementaria a una segunda sonda de ácido nucleico. Esta segunda sonda de ácido nucleico puede comprender un marcador activo para (R)DRSP u otro para Raman (que es al menos detectable por (R)DRSP o Raman cuando se escinde de la segunda sonda de ácido nucleico) y opcionalmente un desactivador. Como alternativa, el marcador puede proporcionarse de otro modo, por ejemplo, siendo un marcador que puede intercalarse en un duplo formado por la hibridación entre el ácido nucleico diana y la sonda de ácido nucleico (constituida en esta realización por una primera y una segunda sonda de ácidos nucleicos) tal como se describe en el presente documento. La primera o la segunda sonda, típicamente la segunda sonda, también pueden comprender un grupo fosfato 5' en el que la exonucleasa usada es exonucleasa lambda. La Figura 24 muestra una representación esquemática de esta realización de la invención en la que la modalidad de detección que se indica es la RDRSP; el ácido nucleico diana un ADN; la segunda sonda de ácido nucleico está marcada con un colorante activo para RDRSP (mostrado como una estrella) y que tiene un fosfato 5'; y siendo la exonucleasa usada exonucleasa lambda.

Una ventaja de esta realización de la invención es que permite que la primera sonda funcione como una sonda específica de diana basándose en la porción de su secuencia que está diseñada para hibridar con el ácido nucleico diana. La porción de su descripción de secuencia que hibrida con la segunda sonda puede ser genérica, por lo que se entiende que la secuencia no es específica para el ácido nucleico diana pero sí para la segunda sonda. Por lo tanto no es necesario que la segunda sonda posea ninguna complementariedad de secuencia con respecto al ácido nucleico diana y por lo tanto puede usarse para detectar múltiples ácidos nucleicos diana. Esto es ventajoso debido a que la segunda sonda de ácido nucleico, tal como se indica, es típicamente más compleja estructuralmente, comprendiendo típicamente un marcador y opcionalmente un desactivador y opcionalmente un grupo fosfato 5'. No es necesario que la segunda sonda se personalice basándose en el ácido nucleico diana; la primera sonda, que está basada en parte en una secuencia encontrada en el ácido nucleico diana, puede fabricarse simplemente mediante síntesis de oligonucleótidos.

Este enfoque puede permitir que se use una sonda genérica para el ensayo, es decir, la secuencia de la segunda sonda (y su secuencia complementaria de la primera sonda) pueden usarse para todos los ácidos nucleicos diana y puede optimizarse para producir las mejores condiciones posibles para que funcione la enzima, para que tenga lugar la hibridación y para la configuración óptima del marcador.

La región diana de la primera sonda de ácido nucleico puede cambiarse después para hibridar con la diana. De un modo particularmente ventajoso esta porción de su secuencia también podría contener bases que aumenten la eficacia de hibridación tales como bases de ALN.

Una ventaja adicional de esta realización de la invención es que esta permite la detección directa de los ácidos nucleicos diana que comprenden APN o ALN: dado que no es el ácido nucleico bicatenario (opcionalmente quimérico) mediante la hibridación entre la diana y la primera sonda que se escinde, no es necesario hacer uso de exonucleasas que se eligen basándose en la constitución del ADN diana, o usar sondas de ácidos nucleicos que no se unan únicamente a, por ejemplo, ADN o ARN. La eficacia de hibridación mejorada proporcionada utilizando ALN y APN puede proporcionarse, por lo tanto, por una o ambas de (i) la porción del ácido nucleico diana al que se dirige la región directora de la primera sonda o (ii) que la región directora en sí misma comprenda ALN y APN.

Por lo tanto, es una metodología de detección más genérica que solo para ARN o ADN. La diana podría ser ADNbc que usa un oligonucleótido formador de tripletes (OFT), una proteína que usa un aptámero o un anticuerpo que se une a una diana adecuada. En dichas realizaciones, la detección puede llevarse a cabo del mismo modo que se describe en el presente documento (por ejemplo para un ADN monocatenario con una secuencia de la sonda que comprende una primera y una segunda secuencia de la sonda). Por lo tanto, con el ADN bicatenario como ácido nucleico diana, por ejemplo, la primera sonda de ácido nucleico puede ser un OFT que tiene una única secuencia que forma el triplete, es decir, que se dirige al ADN bicatenario, y que está conjugada con una secuencia de ácido nucleico complementaria a la segunda sonda de ácido nucleico. La hibridación de la segunda sonda de ácido nucleico y la degradación posterior del duplo resultante sirve para detectar la presencia del ADNbc deseado sin ninguna necesidad de fusión.

De un modo análogo, un ácido nucleico puede conjugarse a un anticuerpo, que después puede, por ejemplo, inmovilizarse sobre un soporte sólido. La detección de un suceso de unión (por ejemplo a un antígeno) puede lograrse mediante un procedimiento de la invención en el que un ácido nucleico que sirve como el ácido nucleico diana puede unirse a un anticuerpo adicional (por ejemplo en un ensayo análogo a un ensayo ELISA de tipo sándwich). La presencia del antígeno en el soporte sólido puede determinarse después por la detección del ácido nucleico diana de acuerdo con un procedimiento de esta invención. De este modo, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para detectar cualquiera de los sucesos de unión conjugando un ácido nucleico adecuado como el ácido nucleico diana a la sonda biomolecular en cualquier estudio dado. La unión puede detectarse después

exponiendo el conjugado biomolecular de sonda-ácido nucleico diana a una sonda de ácido nucleico y practicando un procedimiento de la invención.

Una ventaja adicional de esta realización de la invención es la facilidad con la que se permite la multiplexación, simplemente cambiando el marcador de la segunda sonda y la secuencia diana de la primera sonda. La secuencia que se degrada realmente por la exonucleasa puede permanecer constante necesitando únicamente establecer un conjunto de condiciones óptimas para la exonucleasa incluso en una matriz de complejos múltiples en la que pueden detectarse varios ácidos nucleicos diana.

El uso de secuencias genéricas escindibles por la exonucleasa descritas anteriormente en el presente documento también puede usarse en conjunción con la metodología de captura descrita en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, la porción de la primera sonda de ácido nucleico diseñada para hibridar con la segunda sonda de ácido nucleico podría derivarse por ejemplo en el extremo 3' con biotina para permitir el uso de una metodología de captura y de lavado basada en estreptavidina-biotina descrita en el presente documento y en referencia a la Figura 21. De este modo la primera sonda de ácido nucleico sirve como sonda capturable tal como se describe en el presente documento. El uso de dichas metodologías puede mejorar la especificidad (y por lo tanto la fiabilidad) de los procedimientos de esta invención (si se desea).

Un modo alternativo para mejorar la especificidad se representa en la Figura 25. Esta representa el uso de dos sondas de captura que pueden unirse a una superficie sólida, por ejemplo una esfera o una placa o una alternativa ejemplar derivada con biotina para permitir la captura mediante un imán recubierto de estreptavidina. Se representan dos sondas de captura; podrían usarse una o más. Por lo tanto, cuando se deriva la metodología de captura para usarse en los casos donde se hace uso de secuencias escindibles por exonucleasa, la sonda (o las sondas) de captura no necesitan ser la misma sonda que aquella que hibrida con la sonda marcada (tal como se ilustra en la Figura 24).

En una realización de la invención, la sonda de ácido nucleico que contiene un fosfato 5' que hibrida con un ácido nucleico diana se digiere por una exonucleasa tal como la exonucleasa lambda, de modo que se degrada la cadena que contiene el fosfato 5'. Mientras que pueden degradarse ambas hebras por digestión, en algunas realizaciones de la invención es suficiente la para digestión únicamente de la sonda y la liberación del marcador detectable por Raman/(R)DRSP.

La exonucleasa Lambda es una enzima de 24 kD codificada por el bacteriófago *Lambda*. Esta enzima está implicada en la recombinación genética del bacteriófago pero también está disponible comercialmente como una enzima de procesamiento del ADN. Se ha desvelado que la estructura cristalina de la enzima es un homotrímero con una estructura cuaternaria toroidal.

La exonucleasa lambda digiere una cadena bicatenaria (ADNbc) comenzando por el extremo 5' fosforilado. Las dimensiones del canal central de la exonucleasa lambda son tales que esta únicamente puede acomodar ADNbc en un extremo del canal. La enzima es altamente procesiva, pasando la cadena 3' de ADN a través del centro del canal cónico del centro de la enzima. La cadena 5' se digiere, liberando mononucleótidos 5' libres. También se ha mostrado que se digiere el ADN monocatenario con un extremo 5' fosforilado pero es un sustrato pobre en comparación con el ADNbc (véase P.G. Mitsis y J.G. Kwagh, *Nucleic Acids Research*, 27(15), 3057-3063 (1999) y referencias que se citan en el mismo).

En algunas realizaciones de la invención, la exonucleasa es exonucleasa lambda. En otras realizaciones la exonucleasa no es exonucleasa lambda. Otras exonucleasas que son adecuadas para el uso de la presente invención son exonucleasas que son capaces de digerir progresivamente una o ambas hebras de un duplo de ácido nucleico en una dirección 5' o 3' sin importar si el extremo 5' o 3' del ácido nucleico está modificado, tal como por fosforilación. Debe apreciarse sin embargo, que la exonucleasa debe poseer poca o ninguna capacidad de digerir un ácido nucleico monocatenario. Otras exonucleasas adecuadas incluyen polimerasas, tales como la Taq polimerasa, ADN polimerasa I, y la ADN polimerasa T4.

La sonda puede ser de cualquier longitud conveniente. Su longitud real dependerá de la precisión con la que se desee determinar una secuencia diana dada. Típicamente, sin embargo, la sonda tendrá entre aproximadamente 10 y 50 nucleótidos de longitud, for ejemplo de 20 a 30 nucleótidos de longitud. La sonda se modifica de modo que permita el cambio de entorno del marcador para que este se detecte tras la digestión de la sonda por la exonucleasa, por ejemplo, nucleasa lambda. Preferentemente, el marcador es sustancialmente no detectable cuando forma parte de la sonda, bien cuando la sonda está presente como ácido nucleico monocatenario y/o cuando hibrida con la secuencia diana. De este modo el exceso de sonda no hibridada, que se procesa mucho menos preferentemente por las exonucleasa descritas, no será detectable y de este modo el único marcador detectable será aquel presente cuando se encuentra unido al duplo de ácido nucleico sonda y que se ha liberado tras la digestión del duplo de ácido nucleico. De este modo cualquier cambio en el marcador es indicativo de la presencia de la secuencia diana en la muestra de interés.

A diferencia de los enfoques de la técnica anterior, la cadena de la sonda no necesita extenderse necesariamente durante los procedimientos de esta invención. La sensibilidad de detección mediante el uso marcadores detectables

usando procedimientos de espectrometría Raman, en particular (R)DRSP, por ejemplo, es tal que pueden detectarse niveles extremadamente bajos de marcador. En determinadas realizaciones de la invención, un beneficio adicional es que una vez que la sonda inicial se ha digerido, puede unirse una segunda molécula de sonda al ácido nucleico diana y puede digerirse para generar más señal a partir del mismo fragmento de ácido nucleico diana, teniendo en cuenta la elevada velocidad de recambio de determinadas exonucleasas, tales como la exonucleasa lambda. En efecto, la señal se amplifica en estas realizaciones, en contraposición con la diana, por ejemplo, en la PCR. Puede usarse un exceso de secuencia de la sonda, por ejemplo 10 veces o más o 100 veces o más que el molde presente, o que se espera o se estima que esté presente, en la muestra, para asegurar que la cinética de hibridación favorezca la regeneración de la señal rápida. Este enfoque también permite reacciones de multiplexación mediante el uso de sondas con marcadores distintos.

Sin embargo, si se desea, puede efectuarse la amplificación de la diana. Los procedimientos adecuados de amplificación son conocidos para la persona experta e incluyen la amplificación isotérmica y la amplificación en círculo rodante.

En determinadas realizaciones de esta invención, la fluorescencia, por sí misma, como modalidad de detección puede complementar la detección mediante espectroscopía de Raman en la que el marcador detectable por espectroscopía Raman es fluorescente. En estas realizaciones la sonda comprenderá típicamente un fluoróforo y un desactivador al igual que con las balizas moleculares o las sondas TaqMan descritas anteriormente. Cuando está intacto, el desactivador extinguirá cualquier fluorescencia del fluoróforo. Sin embargo, tras la degradación de la sonda de ADN por la exonucleasa, después de la hibridación con el ácido nucleico diana, se liberará el fluoróforo del desactivador permitiendo que se obtenga la fluorescencia. En los casos donde sea problemática, puede mejorarse la fluorescencia de fondo mediante el uso de microscopía confocal. Esta permite un enfoque de detección ultrasensible al nivel de una sola molécula. También es posible usar una configuración de FRET en contraposición al desactivador-diana y también el uso de mediciones del tiempo de vida de la fluorescencia. Puede usarse cualquier fluoróforo conveniente. En una realización puede usarse fluoresceína-dT (emisión a 516 nm). La fluoresceína-dT es una base modificada en la que la fluoresceína (FAM) está unida en la posición 5 del anillo de timina mediante un brazo espaciador en el carbono 6. Puede usarse cualquier desactivador conveniente, por ejemplo Dabcyl (que extingue a 380-530 nm).

En otra realización, la modalidad de detección se basa en la plasmónica, que se basa en la resonancia de plasmones de nanopartículas como un indicador de hibridación y de este modo el cambio en el estado de agregación de las nanopartículas en solución después de la acción de la exonucleasa. De acuerdo con esta realización, las partículas individuales se funcionalizan con la sonda de tal modo que un fosfato terminal (por ejemplo fosfato 5' en el que la exonucleasa λ se usa como la exonucleasa) o la base del nucleótido está distante con respecto a la superficie de la nanopartícula. Cuando la sonda se funcionalice tendrá una frecuencia de resonancia particular. Cuando estas sondas hibridan con la región diana, el fosfato/base terminal actúa como sitio de reconocimiento para la exonucleasa para permitir la digestión de la sonda sobre la superficie de la nanopartícula. Mientras que las nanopartículas recubiertas con la secuencia de la sonda se aíslan y se desagregan en solución, tras la hibridación con la secuencia diana y la posterior degradación de la secuencia de la sonda las nanopartículas ya no se mantendrán separadas y se agregarán dando como resultado un cambio detectable.

En una realización, puede proporcionarse una superficie a la cual se une una sonda de ácido nucleico. La superficie es una que es adecuada para su uso en la detección Raman (R)DRSP y puede ser una superficie metálica rugosa, tal como una superficie de plata. La superficie puede ser, por ejemplo, la superficie de una nanopartícula, placa de microtitulación, superficie de micromatriz o similar. El marcador detectable por Raman (por ejemplo, (R)DRSP) puede disponerse sobre la superficie tras la digestión del duplo de ácido nucleico.

Asimismo, si la superficie es la superficie de una nanopartícula, la sonda evitaría que las partículas se agregasen, pero tras la digestión de la sonda, las partículas podrían agregarse, potenciando de este modo cualquier señal detectable por Raman (por ejemplo, (R)DRSP).

Si se unen cantidades suficientemente pequeñas de sonda a la superficie de la nanopartícula (por ejemplo, una cobertura del 10 - 20 % de la superficie) entonces puede asumirse que el estado de agregación de las nanopartículas cambiará cuando se degraden las sondas y dará lugar a un cambio en la frecuencia de plasmones de las nanopartículas. Esto puede medirse usando, por ejemplo, microscopía de campo oscuro (véase por ejemplo Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colimetric scatter of gold nanoparticle probes (J. J. Storhoff y col., Nature Biotech. 2004, 22(7), 883-887)).

De acuerdo con esta realización un colorante activo para (R)DRSP (un marcador de (R)DRSP) puede unirse directamente a la nanopartícula, pero cuando la sonda aún está intacta, el marcador es invisible ya que no hay agregación. La digestión del duplo sonda/diana permite que ocurra la agregación de las partículas y también activa el efecto RDRSP.

Pueden usarse coloides de oro o de plata como nanopartículas. Estos coloides pueden considerarse como soles, es decir, partículas sólidas dispersas en agua. El tamaño de estas partículas está en la escala nanométrica, por lo tanto el uso del término nanopartículas típicamente es de 1 - 100 nm en particular 10 - 80 nm, tales como 15 - 40 nm). El

medio coloidal se ajusta bien a las reacciones de hibridación de ADN mientras que los oligonucleótidos pueden inmovilizarse sobre la superficie de las nanopartículas de oro o de plata.

5 En realizaciones preferentes, tal como se explica anteriormente en el presente documento, la modalidad de detección se basa en la (R)DRSP. Los detalles relacionados con la DRSP y la RDRSP se exponen, por ejemplo, en los documentos WO97/05280, WO99/60157 y WO2005/019812 y las referencias citadas en los mismos.

10 Tal como se conoce en la técnica, un espectro Raman surge debido que la luz incidente sobre el analito se dispersa debido al movimiento nuclear y a la excitación de los electrones del analito. Cuando el analito cuyo espectro se registra está estrechamente relacionado con una superficie adecuada, tal como una superficie metálica rugosa, esto da lugar a un gran aumento de la sensibilidad de detección, estando el efecto más marcado cuanto más cerca se sitúa el analito con respecto a la superficie "activa" (la posición óptima está en la primera capa molecular alrededor de la superficie, es decir, dentro de aproximadamente 2 nm de la superficie). Esto se denomina DRSP.

15 Puede obtenerse un aumento adicional de la sensibilidad funcionando a una frecuencia de resonancia del analito (en este caso debido a que se une un colorante a la diana de interés). El uso de una fuente de luz coherente, sintonizada al máximo de absorbancia del colorante, da lugar a un aumento de 10^3 - 10^5 veces en la sensibilidad (la excitación del láser también puede ajustarse al máximo de la resonancia de plasmones de superficie, que puede coincidir o no con el máximo del colorante). El efecto de potenciación de superficie y el efecto de resonancia puede combinarse para producir la RDRSP y un intervalo de frecuencias de excitación aún producirá un efecto potenciador combinado.

20 Por lo tanto la técnica de RDRSP proporciona una huella vibratoria del analito cuando se reúnen dos condiciones. Estas son (i) la absorción sobre una superficie metálica adecuada y (ii) la presencia de un cromóforo visible. El uso de un metal adicional significa que la fluorescencia se desactiva eficazmente. Esto significa que una amplia gama de moléculas coloreadas, incluyendo fluoróforos convencionales, producen excelentes señales de (R)DRSP.

25 Generalmente, se prefiere la RDRSP, y de este modo todas las referencias en el presente documento a la (R)DRSP pueden leerse en RDRSP a menos que el contexto indique específicamente lo contrario. Sin embargo se entenderá que la invención también puede practicarse con DRSP y espectroscopía Raman en general. La DRSP es ventajosa, por ejemplo cuando minimiza la fluorescencia de fondo usando una frecuencia de excitación en la región del infrarrojo.

30 Un ejemplo de cómo generar un marcador que sea invisible para la (R)DRSP, pero que luego se vuelva visible después de la acción de una enzima, se describe por ejemplo, en Moore y col. (2004 Nature Biotech., 22, páginas 1133-1138). En este ejemplo se usa una lipasa para hidrolizar un enlace éster que libera un colorante que se vuelve activo para (R)DRSP. Para cumplir con esto, tal como se aplica a la presente invención, puede unirse un colorante de azo hidroxiquinolina al fosfato 3' de la sonda nucleica a través del grupo fenólico del colorante. Esto enmascara la unión del colorante a una superficie metálica y hace que el colorante sea "invisible" para RDRSP. En este enfoque una vez que la sonda ha hibridado con su secuencia específica, la exonucleasa digerirá el oligonucleótido y liberará el colorante de hidroxiquinolina que puede detectarse por RDRSP, gracias a que el colorante es capaz de unirse a una superficie activa de (R)DRSP.

35 Debido a la extrema sensibilidad de la (R)DRSP, puede no ser necesaria la amplificación del molde, en muchos casos, para hacer que este procedimiento funcione. Sin embargo puede efectuarse la amplificación de la diana si se desea. Los procedimientos adecuados de amplificación son conocidos para la persona experta e incluyen la amplificación isotérmica y la amplificación en círculo rodante.

40 De acuerdo con una realización adicional, puede usarse una sonda que tenga un colorante de (R)DRSP modificado en 5' unido a esta. El colorante puede unirse de tal modo que la sonda no se adhiera a la superficie metálica y produzca RDRSP. Después de la formación del duplo sonda/diana y la adición de una exonucleasa, tal como Taq, se produce la degradación y se libera el marcador. Esta sonda se degrada de un modo similar a una sonda TaqMan; sin embargo en lugar de retirar la extinción de la fluorescencia y un aumento en la fluorescencia tras la acción de la enzima, en esta realización de la presente invención la capacidad del colorante para adherirse a la superficie metálica aumenta y de este modo produce un aumento de la señal de RDRSP. Tal como se describe anteriormente en el presente documento, esta realización puede practicarse en conjunción con el uso de un resto capturable tal como la biotina para permitir la eliminación de la sonda no unida o en exceso. Con cualquiera de estas, u otras, realizaciones de la invención, dichas sondas pueden desplegarse en combinación con la amplificación del ácido nucleico presente en la muestra de interés, por ejemplo por PCR.

45 De un modo conveniente, cuando se usan técnicas de amplificación en conjunción con sondas detectables por Raman, las sondas usadas pueden diseñarse para hibridar con una porción distinta de una diana de ácido nucleico a la que se hibrida, por ejemplo, mediante cebadores usados en PCR. De este modo, la acción de la exonucleasa, por ejemplo Taq, sobre los cebadores continúa en la sonda, siempre que hibride, liberando el marcador detectado por Raman.

55 Otro procedimiento para poner en práctica la invención implica el uso de un intercalante activo para (R)DRSP o, preferentemente, un aglutinante del surco menor (ASM) que en caso de unirse a la secuencia de la sonda

aumentaría la especificidad de la hibridación. Cuando la secuencia de la sonda hibrida con la diana, el intercalador o ASM se diseña de tal modo que no se obtiene ninguna (R)DRSP; sin embargo, tras la digestión por la exonucleasa esta se libera en la solución y es capaz de adsorberse sobre una superficie metálica y producir una (R)DRSP.

Oligonucleótidos usados

- 5 Los oligonucleótidos se adquirieron en atdbio (Inglaterra) y MWG (Alemania) y se purificaron por HPLC.

Nombre	Secuencia	Fuente	Conc./ μ M	Modificaciones
RW01A	5'-TTTTCCCAGTCACGACGT-3'	atdbio	41,17	Fosfato 5' Tiol 3'
RW01B	5'-TTTTCCCAGTCACGACGT-3'	atdbio	63,17	Fosfato 5' Tiol 3'
RW02A	5'-TTTTCCCAGTCACGACGT-3'	atdbio	85,73	Fosfato 5' Enlazador amino 3'
RWFAM	5'-TTTTCCCAG*TCACGACGT-3'	atdbio	18,31	Fosfato 5' DabcyI 3' *T Fluoresceína dT
RWCOMP1	5'-ACGTCGTGACTGGGAAAA-3'	atdbio	31,47	-
RWCOMP2	5'-ACGTCGTGACTGGGAAAACC CTGGCGTTACCCAACTTA-3'	MWG	29,60	-
RWCOMP3	5'-TCAC1GGCCGTCGTTTTACA ACGTCGTGACTGGGAAAA	MWG	32,30	-
RWCOMP4	5'-TCACTGGCCGTCGTTTTA CAACGTCGTGACTGGGAA AACCTGGCGTTACCCAA-3'	MWG	14,40	-

Fusión UV de la Sonda Fluorescente y la Cadena Complementaria

Se obtuvo una curva de fusión UV del oligonucleótido marcado con fluoresceína (RWFAM) y la secuencia complementaria (RWCOMP1) usando un espectrofotómetro Cary 300 Bio UV-Vis. Se usó la curva de fusión para encontrar la temperatura de fusión de las dos hebras.

- 10 Se añadieron 54,6 μ l de RWFAM y 31,8 μ l de RWCOMP1 a 1913,6 μ l de PBS 0,3 M en una cubeta de cristal de cuarzo. Esto proporcionó una concentración total para cada oligo de 0,5 μ M en un volumen total de 2 ml.

La fusión UV se llevó a cabo en 4 rampas mantenidas durante 1 minuto después de cada etapa:

- Rampa 1: 25 °C → 90 °C
- Rampa 2: 90 °C → 25 °C
- 15 • Rampa 3: 25 °C → 90 °C
- Rampa 4: 90 °C → 25 °C

Las primeras curvas derivadas de cada rampa se usaron para encontrar la temperatura media de fusión de RWFAM y RWCOMP1.

Experimentos de Introducción de los Sonda Fluorescente

- 20 **Nociones generales**

Estos experimentos implicaron el uso de una sonda de oligonucleótido modificada con un fluoróforo y un desactivador. Se diseñó la sonda para que hibridase con una serie de oligonucleótidos diana complementarios y al hacerlo, se volvió susceptible a la acción de la exonucleasa lambda. Cualquier degradación de la sonda se detectó por un aumento de la fluorescencia.

- 25 **Diluciones de los Oligonucleótidos**

La siguiente tabla enumera las diluciones de las soluciones madre de oligonucleótidos que se usaron en estos experimentos.

Nombre	Factor de Dilución	Concentración Diluida
RWFAM	0 (Madre)	18,31 μ M
	10	1,8 μ M
	100	0,18 μ M
	1000	18 nm
	10000	1,8 nm
RWCOMP1	0 (Madre)	31,47 μ M
	10	3,1 μ M
	100	0,31 μ M
	1000	31 nm
	10000	3,1 nm
RWCOMP2	0 (Madre)	29,6 μ M
	10	2,9 μ M
RWCOMP3	0 (Madre)	32,3 μ M
	10	3,2 μ M
RWCOMP4	0 (Madre)	14,4 μ M
	10	1,4 μ M

Especificaciones de la enzima

- Exonucleasa Lambda adquirida de Epicentre (Cambio)
- 5 • Tampón de Almacenamiento de la Enzima: solución de glicerol al 50 % que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, DTT 1,0 mM, EDTA 0,1 mM y Triton[®]X-100 al 0,1 %.
- A la recepción de la enzima se prepararon alícuotas 25x en porciones de 10 μ l y se almacenaron en un congelador. Cada porción de 10 μ l contenía 100 unidades de la enzima.

Tampón de Reacción de la Exonucleasa Lambda

- 10 • Tampón de Reacción 10X: Glicina-KOH 670 mM (pH 9,4), MgCl₂ 25 mM y Triton[®]X-100 al 0,1 %.
- El tampón de reacción se separó en porciones de 150 μ l.

Instrumentación

- Todas las reacciones se llevaron a cabo en un dispositivo de QPCR Stratagene MX4000.

Preparación de la Muestra

- 15 • Todas las muestras se prepararon en un entorno limpio dentro de una cámara con guantes estériles.
- Las muestras se prepararon en tiras de tubos de 200 μ l esterilizados.
- Las muestras se prepararon en un volumen total de 150 μ l.
- Debido a la micro-escala del volumen de algunos de los componentes de reacción usados, las muestras se centrifugaron brevemente entre cada etapa. Esto aseguró que se mezclaran todos los reactivos y que no se unieran a los lados de los tubos fuera del cuerpo principal de la muestra.
- 20

Procedimiento Experimental

Los experimentos con la sonda fluorescente se llevaron a cabo usando una estación de trabajo de QPCR Stratagene MX4000 e implicaron dos etapas:

1. Las mezclas de reacción sin la enzima se calentaron a 90 °C y se mantuvieron a esta temperatura durante 10 minutos para asegurarse de la separación de las hebras de ADN. Se permitió que las hebras de la sonda y la diana hibridaran enfriando las muestras a 20 °C y manteniéndolas a esta temperatura durante 5 minutos. La temperatura se volvió a llevar a los 37 °C en la preparación para la segunda etapa.
- 5 2. Se añadió la enzima (o agua como control) a las mezclas de reacción. Las muestras se calentaron a 37 °C y se midió la fluorescencia. Se usaron tres programas ligeramente distintos:

Programa	Número de Ciclos	Duración de los Ciclos / minutos	Duración de Total / minutos
A	40	2	80
B	40	1	40
C	60	1	60

Se efectuaron mediciones de la fluorescencia por triplicado al final de cada ciclo.

Experimentos de fluorescencia

- 10 Los datos presentados más adelante se normalizaron restando el valor de fluorescencia inicial a cada punto de datos. Cuando se tomaron las mediciones por duplicado, únicamente se mostró el valor medio.

Experimento 1: Ensayo Inicial

Se llevó a cabo este experimento para confirmar la viabilidad de la técnica. Se describe detalladamente en el presente documento como un ejemplo del procedimiento que se usa también en los Experimentos 2 y 3.

- 15 Se prepararon las siguientes muestras por duplicado en tubos separados de una tira de 8 tubos:

Muestras de Ensayo: ADNbc 0,1 µM + 10 U de enzima λExo			Muestras de control ADNbc 0,1 µM, sin enzima λExo		
Componente	Conc./ µM	Volumen / µl	Componente	Conc./ µM	Volumen / µl
RWFAM	1,8	8,2	RWFAM	1,8	8,2
RWCOMP1	3,1	4,8	RWCOMP1	3,1	4,8
Tampón de reacción 10X	-	15	Tampón de reacción 10X	-	15
Agua estéril	-	121	Agua estéril	-	122

Se prepararon dos muestras de ensayo para producir una concentración 0,1 µM de ADNbc una vez que habían hibridado. Se añadieron RWFAM (8,2 µl, 1,8 µM) y RWCOMP1 (4,8 µl, 3,1 µM) al tampón de reacción 10X (15 µl) en 121 µl de agua estéril.

- 20 Se prepararon muestras de control por duplicado usando los mismos volúmenes y concentraciones de oligonucleótidos y tampón de reacción pero 122 µl de agua estéril.

Se colocaron las muestras en el instrumento de QPCR para la etapa de hibridación del procedimiento. Después de la hibridación, se recogieron las muestras y se añadió 1 µl (10 Unidades) de exonucleasa lambda a las dos muestras de ensayo. Se devolvieron las muestras al instrumento de QPCR y se midió la fluorescencia usando un programa A.

- 25 Los resultados se muestran en la Figura 4 que muestra que se dio un aumento de la fluorescencia únicamente en las muestras a las que se añadió exonucleasa lambda. Esto indica que la enzima fue capaz de degradar la sonda y de liberar el fluoróforo del desactivador. Se obtuvo un nivel constante de fluorescencia después de 50-60 minutos. Las muestras de control permanecieron en el nivel inicial.

Experimento 2

- 30 Este investigó el efecto de doblar la concentración de la exonucleasa lambda.

Se prepararon las siguientes muestras de ensayo y controles por duplicado:

A) ADNbc 0,1 μ M, sin λ Exo			B) ADNbc 0,1 μ M + 10 U de λ Exo		
Componente	Conc. / μ M	Volumen / μ l	Componente	Conc. / μ M	Volumen / μ l
RWFAM	1,8	8,2	RWFAM	1,8	8,2
RWCOMP1	3,1	4,8	RWCOMP1	3,1	4,8
Tampón de reacción 10X	-	15	Tampón de reacción 10X	-	15
Agua estéril	-	122	Agua estéril	-	121
C) ADNbc 0,1 μ M + 10U de enzima λ Exo			D) Agua al 100 %		
Componente	Conc. / μ M	Volumen / μ l	Componente	Conc. / μ M	Volumen / μ l
RWFAM	1,8	8,2	RWFAM	-	-
RWCOMP1	3,1	4,8	RWCOMP1	-	-
Tampón de reacción 10X	-	15	Tampón de reacción 10X	-	-
Agua estéril	-	120	Agua estéril	-	150

Se prepararon las muestras y se hibridaron tal como se describe en el Experimento 1. Después de la hibridación, se recogieron las muestras del instrumento de QPCR.

- 5 se añadió 1 μ l de exonucleasa lambda a las muestras A y B.
se añadieron 2 μ l de exonucleasa lambda a la muestra C.

Se usó la muestra D como control.

Se devolvieron las muestras al instrumento de QPCR y se midió la fluorescencia usando el programa C.

- 10 La gráfica de la Figura 5 muestra de nuevo que no se da ningún cambio en la fluorescencia en las muestras control. Los datos muestran que cuando se dobla el número de unidades de la enzima usadas, se da un aumento más rápido de la fluorescencia y que el nivel máximo de fluorescencia se alcanza en un periodo más corto de tiempo. Los datos muestran que el tiempo que toma degradar la misma concentración de sonda fluorescente es aproximadamente proporcional a la concentración de enzima presente. Para una concentración 0,1 μ M de la sonda fluorescente, parece que el uso del doble de unidades de exonucleasa reduce a la mitad el tiempo necesario para alcanzar el nivel máximo de fluorescencia.
- 15

Experimento 3

Este investigó el efecto de los extremos 5' con huecos y de las colas 3' sobre la capacidad de la exonucleasa lambda para degradar la cadena de la sonda y usar tres hebras diana distintas:

- 20
- RWCOMP2 - proporcionó un hueco de 20 bases 5'
 - RWCOMP3 - proporcionó un extremo romo 5' y una cola de 20 bases 3'.
 - RWCOMP3 - proporcionó tanto un hueco 5' como una cola de 20 bases 3'.

Se prepararon duplicados de las siguientes muestras:

A) Hueco de 20 bases en 5'			B) Extremo romo 5' y cola de 20 bases		
Componente	Conc. / μ M	Volumen / μ l	Componente	Conc. / μ M	Volumen / μ l
RWFAM	1,8	8,2	RWFAM	1,8	8,2
RWCOMP2	3,0	5,0	RWCOMP3	3,2	4,7

(continuación)

A) Hueco de 20 bases en 5'			B) Extremo romo 5' y cola de 20 bases		
Componente	Conc. / μM	Volumen / μl	Componente	Conc. / μM	Volumen / μl
Tampón de reacción 10X	-	15	Tampón de reacción 10X	-	15
Agua estéril	-	120,8	Agua estéril	-	121,1
C) Hueco de 20 bases 5' y cola de 20 bases			D) ADNbc 0,1 μM + 10U de λExo		
Componente	Conc. / μM	Volumen / μl	Componente	Conc. / μM	Volumen / μl
RWFAM	1,8	8,2	RWFAM	1,8	8,2
RWCOMP4	1,4	10,7	RWCOMP1	3,1	4,8
Tampón de reacción 10X	-	15	Tampón de reacción 10X	-	15
Agua estéril	-	115,1	Agua estéril	-	121
E) Control: Agua					
Componente	Conc. / μM	Volumen / μl			
RWFAM	-	-			
RWCOMP_	-	-			
Tampón de reacción 10X	-	-			
Agua estéril	-	150			

Se prepararon las muestras y se hibridaron tal como se llevó a cabo anteriormente. Después de la hibridación, se retiraron las muestras del instrumento de QPCR y se añadió 1 μl (10 Unidades) de exonucleasa lambda a las muestras A, B, C y D.

- 5 Se devolvieron las muestras al instrumento de QPCR y se midió la fluorescencia usando el programa C.

El objetivo de este experimento fue determinar si la exonucleasa lambda era capaz de degradar la sonda fluorescente cuando hibrida con un ADN diana de una longitud de cadena mayor. Esto produciría que el extremo 5' de la sonda tuviera huecos en comparación con la cadena diana y también produciría una sección de cola larga. Esto pretendía reflejar una muestra de ADN real en la que la secuencia diana complementaria sería parte de una cadena de ácido nucleico mucho más larga.

10

Los datos experimentales (mostrados en la Figura 6) muestran que la formación del duplo entre la sonda y la diana no afecta realmente a la actividad total de la enzima mientras que el aumento de fluorescencia total o en cada caso fue similar.

Agentes químicos y reactivos:

- 15 Los agentes químicos se adquirieron bien en Sigma o Aldrich y fueron todos para uso analítico.

La enzima exonucleasa lambda (2500 unidades, 10 unidades μl , Ref. LE032K) y el tampón de reacción de exonucleasa lambda (Glicina-KOH 670 μM , MgCl_2 25 μM , Triton X-100 al 0,1 %, Madre 10x, Ref. tampón-LE) se obtuvieron a partir de Cambio Ltd., R.U. La Exonucleasa Lambda se suministró en una solución de glicerol al 50 % que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, ditioneitol 1,0 mM, EDTA 0,1 mM y Triton®X-100 al 0,1 %.

- 20 Las esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina se adquirieron en New England Biolabs. Los tampones se filtraron a través de un filtro de jeringuilla con un tamaño de poro de 0,2 μm (Whatman) antes de su uso.

Secuencias de oligonucleótidos:

Los oligonucleótidos se adquirieron de ATDbio y MGW.

A2020 / SONDA PTB (18 mero)

- 25 5'- TTT TCC CAG TCA CGA CGT

Modificaciones 5' Fosfato
Mid (10) dT TAMRA
3' Biotina

A2020 / SONDA PFB (18 mero) 5'- TTT TCC CAG TCA CGA CGT

Modificaciones 5' Fosfato
Mid (10) dT FAM
3' Biotina

5 **A0977**/ Secuencia complementaria (18 mero) -para ambas secuencias anteriores
5'- ACG TCG TGA CTG GGA AAA

Ssecuencias CT

A2057 / SONDA CT (22 mero)

5'- GCT AAA CTT GCT TGC CAC TCA T

Modificaciones: 5' Fosfato
Mid (12) dT FAM

10 **A2058** / CTCOMP (22 mero)
5' - ATG AGT GGC AAG CAA GTT TAG C
Primera cadena CT (amplicón de 100mero)

**GGA ATT TCC ACT TGA TAT TAC CGC AGG AAC AGA AGC TGC GAC AGG GAC
TAA GGA TGC CTC TAT TGA CTA CCA TGA GTG GCA AGC AAG TTT AGC CCT
TTC T**

15 *El sitio de unión para la sonda FAM se muestra en negrita.*
Saliente de 7 bases 5'
71 bases 3'

Instrumentación

20 Se obtuvieron los espectros RDRSP usando un sistema de microscopio Raman Renishaw *In-Via* que incorpora un láser iónico de argón que funciona a 514,5 nm y una potencia de 20 mW. Se usó un patrón de silicio para calibrar el instrumento midiendo la intensidad del pico de 520 cm⁻¹.

Se llevaron a cabo las mediciones de fluorescencia en una Q-PCR Stratagene MX400 que usa una lámpara Halógena de Cuarzo como la fuente de luz. Los filtros de paso de banda se ajustaron generalmente a EX. 350 nm, EMM. 516. Se bloquearon los demás canales usando filtros bloqueantes de la luz. También se usó un espectrofotómetro Cary Eclipse para las mediciones generales de fluorescencia.

25 **Ensayo usando exonucleasa lambda**

El siguiente ensayo se basó en el uso de un 18-mero comercialmente disponible marcado con un fosfato 5', una modificación interna de TAMRA dT y una biotina 3' terminal como la sonda degradable (de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 3).

SONDA·PTB·Fosfato·5'·TTT·TCC·CAG·T(X)·CA·CGA·CGT·Biotina·3'

30 en la que X = a modificación de TAMRA adyacente a T

35 Brevemente, las mezclas de reacción (9-10 µl. 1 picomol de SONDA PTB en presencia/ausencia de 1 eq. de ADNbc complementario) se calentaron 90 °C y se enfriaron a 20 °C para promover la hibridación de las secuencias complementarias. Después se añadió la enzima exonucleasa lambda y se incubó la mezcla de reacción a 37 °C durante 30 min para iniciar la digestión. Esta enzima es una exodesoxirribonucleasa altamente procesiva de 5' a 3' que libera mononucleótidos 5' y las hebras de ADN monocatenario (ADNmc) no hidrolizadas complementarias como productos. Debe liberarse un mononucleótido marcado con TAMRA tras la digestión de la SONDA PTB descrita anteriormente.

Después de la digestión, las mezclas de reacción se calentaron a 75 °C durante 15 minutos para inactivar completamente con la enzima y esencialmente se extinguió la reacción antes de enfriar las muestras para que volvieran a temperatura ambiente. Las esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina en tampón de lavado y unión (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7) se usaron para retirar cualquier Sonda PTB no digerida por medio de la interacción fuerte con la modificación de biotina 3' en el oligonucleótido marcado. Esta etapa se introdujo para retirar la sonda marcada con colorante sin digerir que podría dar lugar a señales de fondo. Se usó un imán para arrastrar a las partículas magnéticas a un lado del eppendorf y después el sobrenadante se transfirió a una placa de pocillos de microtitulación limpio. Se añadió un agente aglutinante (20 µl) seguido por un coloide de Ag reducida con citrato (100 µl). Se registraron los espectros de RDRSP inmediatamente después de la adición del coloide de plata en un Microscopio Raman *In Via* usando una línea de láser de excitación a 514 nm.

La exonucleasa lambda es una exodesoxirribonucleasa altamente procesiva de 5' a 3' que libera mononucleótidos 5' y las hebras de ADN monocatenario (ADNmc) no hidrolizadas complementarias como productos. Los mononucleótidos marcados con colorante deben liberarse tras la digestión.

Estrategia de detección por RDRSP:

La mezcla de reacción contiene una combinación compleja de enzima, oligonucleótidos de longitud completa, productos truncados de digestión y un gran número de compuestos.

Las concentraciones aproximadas de las distintas especies de la mezcla de reacción (20 µl, incluyendo la etapa de lavado de biotina) *antes* del análisis de RDRSP se enumeran más adelante:

**Sonda de Oligonucleótidos marcados 0,1 µM (inicialmente, más productos de digestión)
Oligonucleótido diana complementario 0,1 µM**

Glicina.KOH, 33,5 mM
MgCl₂ 1,25 mM
TX-100 (tensioactivo) al 0,01 %
NaCl 0,255 mM
Tris-HCl, 12,5 mM
EDTA 0,505 mM
Glicerol al 2,5 %
DTT 0,05 mM
10 unidades de enzima exonucleasa lambda

La glicina, un aminoácido sencillo, está presente en altas concentraciones y se sabe que interactúa con la superficie del coloide de plata reducida con citrato (Surface-enhanced Raman scattering of biological molecules on metal colloid II: effects of aggregation of gold colloid and comparison of effects of pH of Glycine solutions between gold and silver colloids: X. Dou, Y. M. Jung, Z. Cao y. Ozaki, Appl. Spectrosc., 1999, 53, 1140). El grado de esta interacción con la superficie de plata está afectado por el pH y puede correlacionarse con los valores de pKa de las distintas especies ionizables:

Valores de pKa para el establecimiento de especies en coloides de plata y oro:

Citrato: 3,1, 4,7, 6,4
EDTA: 2,0, 2,7, 6,1, 10,2
Glicina: pK₁ = 2,34 (COOH), pK₂ = 9,6 (NH₃⁺) El punto isoeléctrico es 5,97

La reacción de digestión se llevó a cabo a un pH 9,4 (tamponado) pero la adición de coloide de plata reducida con citrato (pH 6-7) podría bajar el pH total en algún grado. En cualquier caso, esto sugiere que los grupos citrato en el coloide de plata estarían completamente desprotonados en estas condiciones. Además, una gran proporción de la glicina debe estar en el (NH₃⁺, COO⁻) zwitteriónico en el momento del análisis.

Cuando se añadió un tampón de reacción de exonucleasa a las nanopartículas de plata (en la misma relación que el que se usó en el ensayo real pero un volumen distinto) se observó una disminución del potencial -ve Zeta (Tabla 1). Esto sugiere un cambio en la carga de la superficie de las partículas. Sin embargo, las partículas no mostraron ningún cambio evidente en la agregación en esta etapa.

Tabla. 1. pH y valores de potencial Z para los coloides de plata en H₂O y tampón de reacción con exonucleasa (No se usó oro en este estudio pero se incluye para la comparación).

Muestra Coloidal	pH	Potencial Zeta / mV	
		Lote Producido	En tampón de reacción
Plata / citrato reducido	6	- 51,5 ± 2,5	- 31,4 ± 0,9
Plata / citrato reducido	10-11	- 47,2 ± 1,4	-38 ± 2,7
Oro / citrato reducido	5-6	- 41,8 ± 2,4	-

Esto sirve para señalar la importancia del pH y su efecto sobre algunas de las distintas especies en la mezcla de reacción. El pH probablemente determina la afinidad de distintos agentes químicos con respecto a la superficie metálica y esta a su vez afectará cualquiera de los estudios de RDRSP posteriores.

El uso de MgSO₄ para agregar las partículas de RDRSP se probó con éxito para estos fines cuando se usó la sonda de oligonucleótido marcada con TAMRA (Figuras 7 y 8). Es posible obtener la señal de RDRSP del marcador TAMRA liberado aunque también se observan algunas señales de fondo de las muestras control. Sin embargo, en un estudio que usa una serie de reacciones por triplicado fue posible establecer un alto grado de discriminación entre las muestras control y la reacción de ensayo positiva que contenía la secuencia diana.

Resumen de experimentación:

La SONDA PTB (fosfato 5', dT interno (TAMRA), Biotina 3') se mezcló con su secuencia complementaria en el tampón de reacción de la exonucleasa lambda (Glicina-KOH 67 μM, MgCl₂ 2,5, TX-100 al 0,01 %), se calentó hasta 90 °C y después de enfrió a 20 °C a lo largo de un periodo de ~ 15 min (0,1 μM, relación 1:1, escala de reacción 10 μl, 1 picomol de ADNbc). Se añadió exonucleasa lambda (1 μl, 10 unidades) y se llevó a cabo la digestión a 37 °C durante 30 minutos seguida de una etapa de inactivación (75 °C durante 15 minutos). Se transfirió la mezcla de reacción a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incubó con esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina (10 μl, 4 mg / ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. La placa de microtitulación se colocó después sobre un soporte magnético para separar las esferas magnéticas hacia un lado del pocillo y el sobrenadante (20 μl) se transfirió después a un pocillo limpio. Se añadió un agente aglutinante (20 μl, MgSO₄ 1 M) seguido de 100 μl de un coloide de plata reducida con citrato. Se adquirieron los espectros RDRSP inmediatamente después (Raman Renishaw *in Via*, 514,5 nm, objetivo 10x, potencia al 100 %, 10 s, 3 acu.). (Véase Figura 9)

Un ensayo Basado en Fret

Se muestran representaciones esquemáticas de ensayos de este tipo en la Figura 10.

Se llevó a cabo una reacción a una escala de 10 μl usando distintas relaciones de sonda marcada con FAM (fosfato 5' - TTT TCC CAG (AT-FAM) CA CGA CGT - Biotina) con respecto a secuencias diana complementarias (1:1; 10:1, 100:1). La concentración de la sonda marcada con FAM y el colorante H33258 (M. Teng, N. Usman, C.A. Frederick y H.J. Wang, Nucl. Acids Res., 1988, 16 N° 6; D.E. Wemer, Biopolymers, 1999, 52, 197-211; y F.M. Ho & E.A.H Hall, Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20, 5, 1001-1010) fue 1 μM. Se añadió tampón de reacción de la exonucleasa lambda (1 μl, 10 unidades) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 30 min seguida de una etapa de inactivación enzimática a 75 °C durante 15 min. Se añadió una solución que contenía una secuencia diana complementaria (100 μl, 0,1 nM) a cada reacción y se llevaron a cabo las curvas de fusión/hibridación (intervalo de temperatura 15-75 °C, controlando los cambios de la fluorescencia a EX₃₅₀ nm, EMM₅₂₀ nm por cada 1 °C, x3 curvas de hibridación y x3 curvas de fusión). Las muestras de control (sin enzima añadida) mostraron una T_m ~ 58 °C que es coherente con los datos de fusión UV. Ninguna de las muestras digeridas mostró curvas de fusión discernibles, lo que sugiere que se digirió la sonda marcada con FAM en todos los casos.

Se muestran estos resultados en las Figuras 12 y 13.

Ejemplos Adicionales

1. MATERIALES

Las secuencias de ADN se adquirieron en ATDbio. Las secuencias de ADN usadas están enumeradas en la tabla 2.

Tabla 2: Sondas de ADN usadas para el ensayo de exonucleasas

Nombre	Secuencia de Nucleótidos	5' mod.	Mid mod.	3' mod.
A1220/sonda FAM	5' TTT-TCC-CAG-TCA-CGA-CGT 3'	Fosfato	FAM 10 bases	biotina,
A1219/sonda TAMRA	5' TTT-TCC-CAG-TCA-CGA-CGT 3'	Fosfato	TAMRA 10 bases	biotina
A1220/sin sonda FAM	5' TTT-TCC-CAG-TCA-CGA-CGT 3'	Fosfato	-	-
A0977/complementaria perfecta	5' ACG-TCG-TCA-CTG-CGA-AAA 3'	-	-	-
LE1/3' protuberante	5' ACG-TCG-TCA-CTG-CGA-AAA-CCC-TGG-CGT-TAC-CCA-ACT-TA 3'	-	-	-
LE2/5' protuberante	5' TCA-CTG-GCC-GTC-GTT-TTA-CAA-CGT-CGT-CAC-TGC-CGA-AA 3'	-	-	-
LE3/protuberante en ambos lados	5' TCA-CTG-GCC-GTC-GTT-TTA-CAA-CGT-CGT-CAC-TGC-CGA-AAC-CCT-GGC-GTT-ACC-CAA-CTT-A 3'	-	-	-

El colorante Hoechst H33258 se adquirió en Sigma-Aldrich.

5 El reactivo Quant-iT™ PicoGreen® se adquirió en Invitrogen.

La exonucleasa lambda y el tampón de reacción de exonucleasa 10x se adquirieron en Cambio. Cuando se diluyó a 1x, La composición del tampón fue de Glicina-KOH 67 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Triton X-100 al 0,1 %, pH 9,4 a 25 °C

Los agentes químicos misceláneos se adquirieron en Sigma-Aldrich.

El tampón fosfato usado para los experimentos fue fosfato 6 mM con NaCl 0,3 M.

10 2. INSTRUMENTACIÓN

Los estudios de la absorción y la fusión UV se llevaron a cabo en un espectrofotómetro *CARY 300 Bio* UV-visible. Los estudios de emisión se llevaron a cabo con un espectrofotómetro de fluorescencia *Varian CaryEclipse*. En ambos casos se usaron cubetas de plástico ópticamente claro con una longitud de paso de 1 cm y un volumen de 3 ml. Los ensayos enzimáticos se realizaron usando un instrumento de PCR *Stratagene Mx4000*.

15 6. ENSAYO DE EXONUCLEASAS

Se prepararon las muestras en tampón de reacción de la exonucleasa lambda 1x con un volumen final de 150 µl. La concentración de la secuencia, complemento y/o el colorante Hoechst fue 1 µM en todos los casos. En las muestras con la enzima, se añadieron 10 unidades de lexo (concentración de 1 µl de 10 unidades/µl) a la mezcla de reacción. Se ajustó la longitud de onda de excitación a 350 nm (10 nm de paso de banda) y se tomaron las mediciones de emisión a 519 nm para el sistema FRET y 440 nm para la fluorescencia del colorante Hoechst (10 nm de paso de banda). Se colocaron las muestras en una placa fría durante el procedimiento de preparación para evitar la digestión temprana.

20 Se mantuvieron las muestras a 37 °C durante 30 minutos (etapa de digestión) midiendo la fluorescencia cada minuto. Después se desnaturalizó la enzima (etapa de inactivación) a 75 °C durante 15 minutos. Después se

realizaron tres etapas de fusión: la curva de hibridación de 75 a 20 °C, después se calentó de nuevo a 75 °C y una última etapa de enfriamiento a 25 °C. La tasa de calentamiento o enfriamiento fue 1 °C/min midiendo la fluorescencia cada minuto.

- 5 Se usó el mismo ensayo para el sistema PicoGreen-TAMRA usando muestras de una concentración 0,1 µM de sonda TAMRA y la secuencia complementaria y una dilución 1/10000 de PicoGreen. Las muestras fueron de 100 µl de volumen en tampón de reacción lexo. Longitud de onda de excitación 492 nm (10 nm de paso de banda), emisión medida a 515 nm (10 nm de paso de banda).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. ENSAYO DE EXONUCLEASAS

10 4.1. DIGESTIÓN DE LA SONDA FAM

La digestión con la nucleasa lambda se llevó a cabo tal como se describe en la sección experimental. Se usaron dos controles:

- 15 • Control de ADN monocatenario: la muestra contenía sonda FAM 1 µM y H33258 1 µM en tampón de reacción de la exonucleasa en presencia de la enzima. Se asumirá que la fluorescencia de este control es igual al 100 % del ADN digerido.
- Control de ADN bicatenario: la muestra contenía sonda FAM 1 µM, complemento y Hoechst, pero no contenía exonucleasa. Se asumirá que esta es igual al 0 % de digestión.

20 La Figura 14 muestra la fluorescencia de ambos controles y de la muestra digerida dentro de los 30 min de digestión (mostrando los datos de una de las tres réplicas). Para las muestras control no hay ningún cambio apreciable en la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, la emisión de sonda FAM hibridada muestra un decaimiento excelente, iniciándose en el nivel del 100 % del ADN bicatenario y alcanzando los valores del monocatenario. Puede observarse la disminución progresiva de la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo, mostrando la capacidad de este sistema FRET para controlar la digestión enzimática en tiempo real.

25 Las curvas de hibridación realizadas después sobre las muestras (figura 15) proporcionan más pruebas de la digestión. La muestra sin enzima vuelve a hibridar cuando se enfría, mostrando una T_m de aproximadamente 5 °C, lo mismo que se observó en ensayos anteriores para la sonda FAM. La muestra digerida con exonucleasa lambda no muestra ninguna capacidad para volver a hibridar, lo que significa que la digestión realmente ha degradado la sonda FAM completamente.

30 4.2. DIGESTIÓN DE LA SONDA FAM USANDO DISTINTOS COMPLEMENTOS

Se investigó la capacidad de la exonucleasa lambda para digerir ADN cuando este hibrida con secuencias más largas que el complemento perfecto. Para esto, se llevó a cabo la misma reacción enzimática para las siguientes muestras:

- 35 • Control de ADN monocatenario (sonda FAM)
- Complemento perfecto: sonda FAM, complemento perfecto y colorante Hoechst, de 1 µM cada una en tampón de reacción lexo
- 3' solapante: la misma pero usando una secuencia complementaria 12 pares de bases más larga en el extremo 3'.
- 5' solapante: la misma pero con el solapamiento en el extremo 5'
- Solapa en ambos lados: solapamiento de tanto en el extremo 3' como en el 5'

40 Para cada una de las anteriores, se usó un conjunto de reacciones (tres réplicas por cada tipo de muestra) como el control de ADN bicatenario (sin la enzima), y se ensayó una con la exonucleasa lambda tal como se ha descrito anteriormente.

45 Las apariencias de los gráficos de la fluorescencia frente el tiempo son muy similares entre sí para el complemento perfecto (gráficas no mostradas), mostrando en todos los casos una disminución marcada de la intensidad (véase figura 16). Las curvas de fusión realizadas después mostraron que todas las muestras se habían digerido.

Después de estos resultados, puede concluirse que la exonucleasa lambda es capaz de digerir ADN incluso cuando la secuencia complementaria es más larga que la sonda.

Uso de la sonda doblemente marcada para detectar un patógeno humano en una muestra biológica por RDRSP

50 Se llevó a cabo la detección en un solo tubo de un patógeno humano a partir de una muestra biológica por RDRSP para *Chlamydia trachomatis*. Usando una técnica análoga a la de Taq-Man se amplificó una región del gen *ompA* (sec. de GenBank AY535172) por PCR con la digestión concomitante de una sonda doblemente marcada. Los datos de más adelante muestran que es posible distinguir entre muestras positivas para *C. trachomatis* y negativas para *C.*

trachomatis basándose en la intensidad de una señal de RDRSP. En este ejemplo se usó el colorante de rodamina activo para (R)DRSP R6G; sin embargo podría usarse cualquier marcador activo para (R)DRSP (u otro para Raman). El conjunto sonda/cebador que se usó en este ensayo estaba basado en un diagnóstico clínico de PCR usado para la identificación de las infecciones por clamidia. Se proporcionaron las muestras por el programa QCMD (Control de Calidad para Diagnóstico molecular) en la forma de orina liofilizada enriquecida con diversas concentraciones de ADN genómico de *C. trachomatis*. El ADN de *C. trachomatis* se derivó de cultivos de 3 días que crecieron en células de McCoy que se recogieron y se inactivaron por calor.

Materiales y procedimientos

Reconstitución de muestras

10 Se recibieron las muestras como viales estériles sellados con goma que contenían orina liofilizada y ADN genómico de *Chlamydia trachomatis*. Estos se inyectaron con 1,2 ml de agua miliQ estéril y se agitaron a 37 °C durante 1 hora para reconstituir las muestras.

Preparación del molde

15 Se pasó la muestra completa del vial a un tubo de 1,5 ml y se añadió ARNt de levadura (Sigma) a una concentración final de 100 µg.ml⁻¹. Se añadieron dos volúmenes de etanol enfriado en hielo y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M a la muestra. Se mezcló la muestra vigorosamente y se incubó a -20 °C durante 15 minutos. Se centrifugó la muestra al máximo durante 15 minutos en una centrifuga de mesa y se desechó el sobrenadante. Se lavó el sedimento dos veces con etanol al 70 % v/v enfriado en hielo y una vez con etanol enfriado en hielo y se permitió que se secase al aire. Se resuspendió el sedimento en 60 µl de agua miliQ estéril agitando a 37 °C durante 1 hora. Este se usó como un molde en las reacciones de PCR posteriores.

Amplificación

25 Se usó un conjunto de sondas/cebadores (MWG Biotech) basándose en una PCR diagnóstica para detectar el gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* (Comuniación personal, Prof Paul Wallace). Se diseñaron los cebadores para amplificar una región de 100 pb del gen a de la base 501 a la base 601 (basándose en la secuencia de GenBank AY535172), la sonda híbrida con las bases 596 a 535. Las secuencias de los cebadores y las sondas usadas de detallan más adelante de 5' a 3':

Cebador 1. cacttratattaccgcaggaacag
 Cebador 2. gctaaacttgctgccactcat
 Sonda: Biotina-agaggcatccttagtccctgtcgcagc-R6G

30 Se llevó a cabo la PCR usando una polimerasa hotstart NovaTaq (Novagen), 25 pmol de cada cebador, entre 100 pmol y 0,1 pmol de sonda, 2 µl de sonda y MgSO₄ 3 µM. El volumen total de reacciones fue de 50 µl y estos se llevaron a cabo en aceite mineral. Se llevó a cabo la PCR a lo largo de 30 ciclos de amplificación usando los siguientes parámetros:

1 ciclo 94 °C durante 5 min
 30 ciclos 94 °C durante 20, 58 °C durante 20, y 72 °C durante 20 s
 1 ciclo 72 °C durante 2 min.

Procesamiento de la muestra con esferas de estreptavidina

35 Se obtuvieron las esferas paramagnéticas de estreptavidina a 4 mg.ml⁻¹ de New England Biolabs. Las esferas tenían una capacidad de unión de 500 pmol.mg⁻¹ de esferas para los oligonucleótidos biotinilados. Como la cantidad máxima de sonda biotinilada en cualquiera de las reacciones de PCR fue 100 pmol, se necesitaron 0,2 mg (50 µl) de esferas por reacción.

Preparación de esferas de Estreptavidina para su uso.

40 Se resuspendieron las esferas por agitación vorticial suave. Se retiraron las alícuotas necesarias (50 µl multiplicados por el número de reacciones de PCR a ensayar) y se colocaron en un tubo de 1,5 ml estéril. Se colocaron las esferas en una gradilla de separación magnética durante ≥ 2 minutos hasta que se secuestraron todas las esferas. Manteniendo el tubo en la gradilla, se retiró y se desechó el sobrenadante. Se retiró el tubo de la gradilla y las esferas resuspendidas en 2 volúmenes de tampón de U/L 2x, [Tampón de unión y lavado 2x: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA1 mM pH 7,5, NaCl 2 mM]. Se devolvió el tubo a la gradilla de separación y se incubó durante ≥ 2 minutos. Se repitió el procedimiento de lavado dos veces. Se resuspendieron las esferas en U/L 2x de modo que su volumen final fuera el mismo que el volumen inicial.

45

Procesamiento de la Muestra

- 5 Se añadieron 50 μ l de las esferas preparadas a 50 μ l de reacción de PCR y se mezclaron suavemente antes de incubarse durante ≥ 15 minutos a temperatura ambiente con mezclado ocasional. Se colocó el tubo en la gradilla de separación de modo que el imán estuviera por encima de la capa superior del aceite mineral y se incubó a temperatura ambiente durante ≥ 2 minutos o hasta que las esferas habían migrado por encima del aceite mineral. Se mantuvo el tubo en la gradilla mientras que se retiró el sobrenadante a un nuevo tubo. Después se usó el sobrenadante para el análisis de RDRSP posterior.

Detección por RDRSP:Preparación de nanopartículas de plata

- 10 Se preparó una suspensión coloidal de nanopartículas de plata reducida con citrato usando un procedimiento modificado de Lee y Meisel.

Instrumentación.

- 15 Se usó la siguiente instrumentación Raman: un sistema de 100 sondas modelo Renishaw con un láser iónico de argón de 514,5- nm, utilizando un objetivo de 20x para enfocar el haz de luz láser en una cubeta de plástico de 1 cm que contenía la muestra.

Preparación de la Muestra.

Todas las muestras se prepararon para el análisis por RDRSP usando las siguientes cantidades de todos los reactivos: 10 μ l de analito, 10 μ l de espermina, 250 μ l de agua, y 250 μ l de nanopartículas de plata reducida con citrato.

- 20 Electroforesis en gel de Agarosa

- 25 Se visualizó el ADN en geles de agarosa horizontales neutros del 2,5 % (p/v). Se prepararon los geles rutinariamente y se ejecutaron en tampón TBE 1 x (Sigma). Se usaron un marcador de 100 pb (Novagen) y marcadores Hyper V (Bioline) como patrones de tamaño. Se usaron geles grandes de 16.5 x 23 cm (200 ml) para asegurar una buena separación. Se mezclaron las muestras de ADN con 1/10 volúmenes de tampón de carga Bluejuice 10x (Sigma) antes de cargar en el gel. Se tiñeron los geles en una solución de 0,5 μ g.ml⁻¹ de bromuro de etidio disuelta en TBE 1x durante 10-20 minutos.

Resultados y discusión.

- 30 Esta técnica es una adaptación de la técnica de *Taq*-man usando un conjunto de cebadores para amplificar una región específica de *ompA* a partir de *C. trachomatis* con la digestión concomitante de una sonda doblemente marcada.

- 35 En la técnica de *Taq*-man hay dos cebadores y una sonda doblemente marcada que hibrida entre ellas. La sonda porta un desactivador en un extremo y un colorante fluorescente en el otro. Mientras que la sonda está intacta el desactivador está en una proximidad lo suficientemente cercana del marcador para impedir la emisión fluorescente. Durante la amplificación por PCR la actividad nucleasa de la polimerasa de 5' a 3' digiere la sonda extiende los cebadores, separando eficazmente el desactivador del marcador fluorescente a medida que permitía la detección.

En este ejemplo la sonda se marcó con biotina y rodamina. Durante la amplificación se destruyó una cantidad proporcional de la sonda liberando biotina y rodamina. Ambas estaban aún unidas a unos pocos nucleótidos pero ya no se asocian físicamente entre sí. Después de la PCR hay una mezcla de sonda sin reaccionar (intacta) tanto con biotina como con rodamina unida, biotina libre y rodamina libre.

- 40 Las esferas de estreptavidina, en la mayor parte de las interacciones irreversibles entre la estreptavidina y la biotina, capturan fácilmente la sonda intacta y la biotina libre dejando únicamente la rodamina libre en el sobrenadante. Este procedimiento secuestra cualquier sonda sin reaccionar y la elimina del análisis de DRSP posterior de modo que una señal de rodamina indicó un ensayo positivo para *C. trachomatis*.

- 45 Debido a la naturaleza extremadamente sensible de la RDRSP la cantidad de sonda usada puede minimizarse si se desea para reducir cualquier fondo y reducir el coste. Se investigó un intervalo de concentraciones de sondas para observar cual sería la más eficaz, de 100 pmol a 0,1 pmol. Se llevó a cabo el experimento por duplicado en dos conjuntos de PCR positivas y dos conjuntos negativos, (la PCR negativa carecía de ADN de *C. trachomatis*). Se sometió a electroforesis a una alícuota de 10 μ l de cada PCR en un gel de agarosa con TBE al 2,5 % (p/v) para comprobar la presencia de producto, Figura 18. Todas las reacciones positivas se amplificaron bien y ninguna de las reacciones negativas mostró ningún producto.

La Figura 18 muestra un ensayo de amplificación por PCR en un gel de agarosa con TBE al 2,5 % (p/v) mostrando dos réplicas positivas (líneas de 1 a 9) y dos réplicas negativas (líneas de 12 a 19) para el intervalo de dilución de la

sonda a 100 pmol, 10 pmol, 1 pmol y 0,1 pmol). Línea 1 marcadores de 100 pb, 2) 100a, 3) 100b, 4) 10a, 5) 10 b, 6) 1 a, 7) 1 b, 8) 0,1 a, 9) 0,1 b, 10) marcador de 100 pb, 11) marcadores Hyper V, 12) 100a, 13) 100b, 14) 10a, 15) 10b, 16) 1 a, 17) 1 b, 18) 0,1 a, 19) 0,1 b, 20) marcador de 100 pb.

5 Se realizaron las reacciones de PCR de nuevo en 50 µl y se procesaron usando esferas de estreptavidina para separar la sonda intacta y la no digerida. Después se usó el sobrenadante para el análisis de RDRSP.

10 El análisis de RDRSP mostró que las reacciones positivas produjeron una señal de RDRSP fuerte y que aunque también había señales de las muestras negativas de la PCR, estos tiempos fueron mucho menos intensos que los controles positivos. Véase las Fig 19 & 20. La Fig. 19 muestra los espectros del experimento de dilución de la sonda en los que la gráfica muestra las dos series positivas (rojo y verde) y las dos series negativas (azul y negro) de muestras analizadas por RDRSP. La concentración de las sondas aumenta de derecha a izquierda. La Fig 20 muestra la diferencia en los espectros entre las muestras positivas y las negativas usando 100 pmol de sonda por reacción.

Ensayo de Esferas ExoRDRSP

15 Se representa un ensayo denominado exoRDRSP en esferas en la Figura 21. Al comienzo del esquema se representa, más arriba, un ADN diana monocatenario y una sonda de captura corta que está biotinilada en el extremo 3' (representado como el "B" dentro del rectángulo gris claro que se ha unido a una esfera recubierta de estreptavidina mostrada como el círculo grande de color gris. Después de la unión de la sonda de captura biotinilada en 3' a las esferas recubiertas de estreptavidina, se lavó la sonda no unida. En la primera etapa mostrada, el ADN diana hibrida con la sonda de captura inmovilizada. Puede lavarse el ADN diana no unido. Un marcador de un nucleótido con un fosfato 5' comprende un colorante activo de RDRSP (el círculo gris claro mostrado hacia el extremo 5' (en este caso TAMRA) y también, opcionalmente un desactivador del marcador en 3' (en este caso se permite que BHQ2 hibride con el ADN diana capturado). Finalmente el ADN bicatenario resultante que comprende el ADN diana, la sonda de captura y la sonda marcada con colorante se exponen a la acción de la exonucleasa lambda, que degrada la sonda de ADN marcada con colorante a mononucleótidos, liberando el colorante para permitir de este modo la detección por RDRSP.

El ensayo representado en la Figura 21, que utiliza la interacción fuerte entre biotina-estreptavidina, usa una sonda de captura corta, una diana de longitud completa y una diana marcada con colorante. El ensayo de separación de sonda emplea los tres oligonucleótidos sintéticos anteriores, de la siguiente composición:

Sonda de Captura

3' TCT CCG TAG GAA 3' dT está biotinilado

Sonda Marcada con Colorante

3' TCA GGG ACA GCG XCG 3' dT modificado con BHQ2

X está modificando en dT con TAMR

Complemento Diana

5' AGA GGC ATC CTT AGT CCC TGT CGC AGC

Experimentación

- 30 1. La sonda de captura se une a esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina por medio de la modificación con biotina en 3' en tampón de unión y lavado (U/l) 1 x. La sonda no unida se lava con el tampón de U/l mientras que la sonda unida se separa mediante un imán.
- 35 2. La secuencia diana del complemento se hibrida con la sonda de captura unida usando un programa de calentamiento (90 °C durante 10 min, 20 °C durante 5 min). La diana no unida se lava de nuevo usando U/L 1 x, durante +3 lavados.
3. La sonda marcadora con colorante se hibrida después con el duplo de sonda de captura /diana preformado usando las condiciones de calentamiento anteriores. Una vez más, se lava la sonda no unida como se hizo anteriormente.
- 40 4. El complejo sonda separado se expone después a λ exonucleasas y tampón de reacción con exonucleasa. La digestión se lleva a cabo a 37 °C durante 30 min seguida de una etapa de inactivación de 75 °C durante 15 min.
5. Se transfiere el complejo a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añade el coloide de plata, un agente aglutinante y agua en la preparación para la RDRSP.
6. Se lleva a cabo inmediatamente la RDRSP usando un Renishaw inVia Raman a 514,5 nm, potencia al 100 %, objetivo 20x, 10 y 3 acumulaciones.
- 45 7. También son posibles las mediciones por fluorescencia.

Resultados

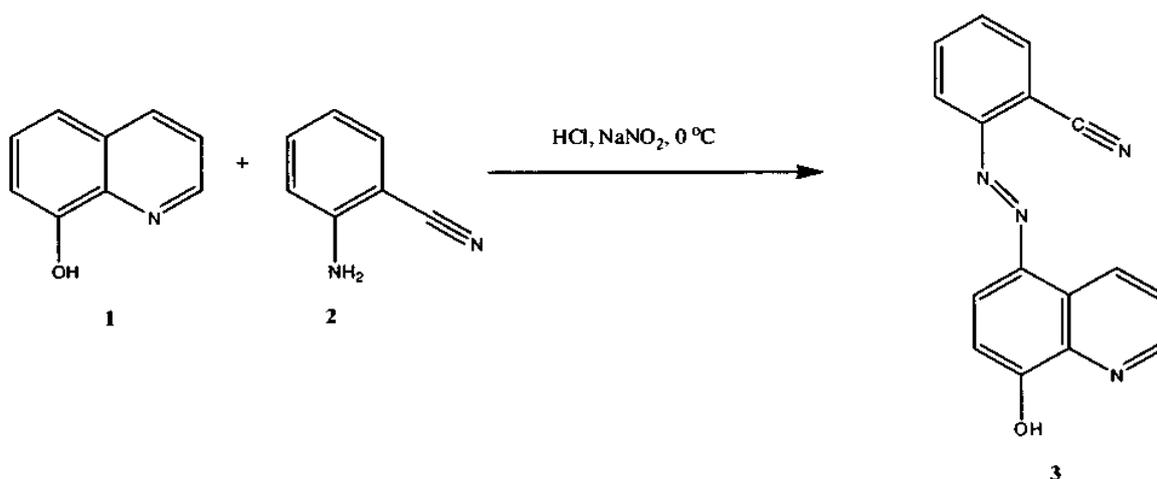
La Figura 22 ilustra la respuesta de RDRSP de una ejecución completa a través del ensayo frente una ejecución a través de la sonda sin el colorante marcado. La silueta de la respuesta de TAMRA es altamente visible. La ausencia de picos en el control es alentadora.

5 Síntesis de una Sonda activa de RDRSP

Se sintetizó una sonda activa para RDRSP que consistía en una secuencia de la sonda que contenía un marcador para RDRSP que era inactivo, es decir que no producía una señal de RDRSP, cuando estaba en la forma de la sonda. Una vez que esta secuencia hibridó con la secuencia diana la sonda permanecía inactiva hasta después de la acción de λ u otra exonucleasa, que liberó el marcador RDRSP haciendo de este modo que se activase para RDRSP.

Las sondas activas de RDRSP pueden fabricarse generando un oligonucleótido con un fosfato 5', a la secuencia de la sonda y después un enlace fosfato 3' en el colorante que se llegará a estar activo para RDRSP después de la escisión enzimática. El enlace fosfato 3' permite la unión directa a colorantes hidroxiquinolona azo que han mostrado que son buenos sustratos para la fosfatasa alcalina yendo de una situación de 'desactivación' a una de 'activación' cuando se usa la detección por RDRSP (F.M. Campbell y col., Analyst, 2008, DOI 10.1039/B8087A). En este enfoque, se añade un colorante hidroxiquinolona azo al extremo 3' usando síntesis inversa de fosforamidito de los oligonucleótidos, es decir síntesis en la dirección de 5' a 3' (la síntesis normal de oligonucleótidos es de 3'-5'). Esto permite la adición de colorantes hidroxiquinolona azo como un fosforamidito durante la síntesis en fase sólida convencional. Cambiando el componente aromático adicional del colorante azo pueden usarse distintos colorantes con distintas secuencias, cada uno de ellos con una señal de RDRSP distinta. Esto permite la multiplexación.

Síntesis de derivado de 8-Hidroxiquinolona



El colorante derivado de 8-hidroxiquinolona (3) se preparó mediante diazotización de *o*-aminobenzonitrilo seguida de acoplamiento con 8-hidroxiquinolona. Para purificar el colorante primero se acetiló de modo que podría separarse de los materiales iniciales mediante una columna de cromatografía de flash y se desacetiló antes de la conversión a fosforamidito. Se confirmó la síntesis del colorante por RNM de ¹H, ¹³C, espec. de masas.

Experimentación:

Se agitó el *O*-Aminobenzonitrilo (1 eq) en HCl (50 %, 10 ml) y se añadió con suavidad durante 10 min. Se enfrió la mezcla a 0 °C en un baño de hielo, al cual se añadió NaNO₂ (1,2 eq) en 2 ml de agua (destilada) por goteo. Se dejó que la reacción se agitara durante 30 min a 0 °C, produciendo una solución de color amarillo claro. Por separado, se disolvió la 8-hidroxiquinolona (1 eq) en MeOH (30 ml) a los cuales se les añadió NaOH (10 %, 100 ml). La solución de 8-hidroxiquinolona se añadió por goteo a la solución de sal de diazonio a lo largo de 15 min y se agitó durante toda la noche.

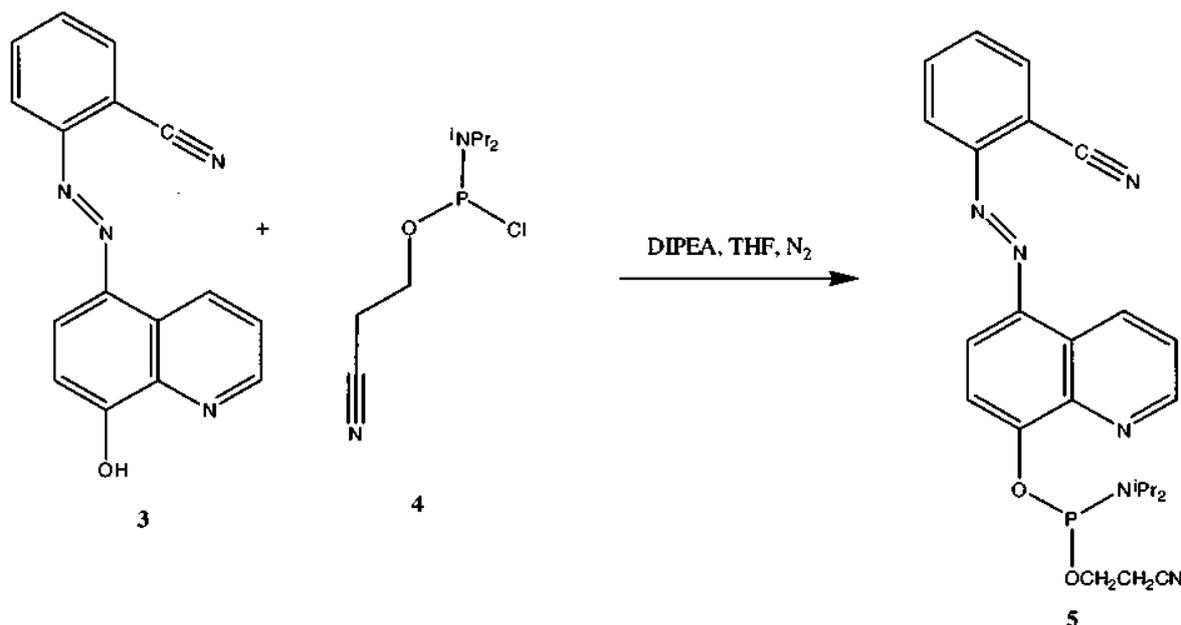
Se neutralizó la reacción mediante la adición de HCl (50 %) y el precipitado resultante se recogió por filtración y se secó durante toda la noche. El precipitado se disolvió en anhídrido acético (100 ml) con una cantidad catalítica de 4-dimetil-aminopiridina. El análisis TLC se mostró una reacción completa. La mezcla se vertió en 1600 ml de hielo/agua y se dejó durante 3 h. El exceso de agua se vertió y se añadió más hielo a la mezcla de aceite/agua produciendo precipitación. Se recogió el precipitado y se secó y se purificó por una columna de cromatografía de flash (sílice; eluyente: DCM - MeOH al 1 %/DCM) produciendo el producto diana desacetilado, 3 con un rendimiento del 38 %. δ_H (400 MHz; DMSO) 3,31 (1H, a, s, OH), 7,29-7,31 (1H, d, J 8,0, ArH), 7,67-7,71 (1H, td, ArH), 7,78-7,81

(1H, q, J 4,0, ArH), 7,87-7,91 (1H, td, ArH), 8,06-8,12 (3H, m, ArH x 3), 9,00 - 9,02 (1H, dd, ArH), 9,36-9,38 (1H, dd, ArH).

Colorante derivado de 8-hidroxiquinolina de RDRSP, 3

5 La actividad del colorante de RDRSP 3 se confirmó mediante el análisis de una solución (0,1 μ M) usando poli-L-lisina al 1 % como agente aglutinante. Fuente de luz láser 514 nm, 1 s de adquisición, potencia al 100 %, 1400 cm^{-1} . El espectro de RDRSP se muestra en la Figura 23.

Modificación del ADN con colorante derivado de 8-Hidroxiquinolina



10 La fosforilación del colorante derivado de 8-hidroxiquinolina, **3**, se llevó a cabo con un reactivo clorofosforilante, **4** para producir fosforamidito, **5**. La síntesis de P^{III} fosforamidito se confirmó por RMN de ^{31}P . El fosforamidito **5** se usó para generar secuencias de sondas marcadas con colorante en 3' usando síntesis de bases inversa, incorporando un fosfato en el extremo 5' por el uso de una columna de fosfato CPG.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> The University of Strathclyde
Graham, Duncan
Faulds, Karen
Smith, Ewen
Ricketts, Alastair

20 <120> IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> P15146PC

25 <160> 27

<170> PatentIn versión 3.3

30 <210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> sonda de oligonucleótido

<400> 1
ttttccagtcacgacgt 18

5
 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> sonda de oligonucleótido

10
 <400> 2
 ttttccagc cacgacgt 18

15
 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> sonda de oligonucleótido

20
 <400> 3
 ttttccagc cacgacgt 18

25
 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótido

35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> Fluoresceína dT

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n e s a , c , g o t

45
 <400> 4
 ttttccagn cacgacgt 18

50
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de oligonucleótido

55
 <400> 5
 acgtcgtgac tgggaaaa 18

60
 <210> 6
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de oligonucleótido

65
 <400> 6
 acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaactta 38

<210> 7

<211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 <400> 7
 tcactggccg tcgtttaca acgctcgtgac tgggaaaa 38
 10 <210> 8
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 <400> 8
 20 tcactggccg tcgtttaca acgctcgtgac tgggaaaacc ctggcggttac ccaa 54
 <210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> dT TAMRA
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o t
 40 <400> 9
 tttcccagn cacgacgt 18
 <210> 10
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> dT FAM
 55 <400> 10
 tttcccagt cacgacgt 18
 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 65

<400> 11
 acgtcgtgac tgggaaaa 18

 5 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido

 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> dT FAM

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

 25 <400> 12
 gctaaacttg cntgccactc at 22

 30 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótido

 40 <400> 13
 atgagtggca agcaagtta gc 22

 45 <210> 14
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido

 55 <400> 14
 ggaatttcca cttgatatta ccgcaggaac agaagctgcg acagggacta aggatgcctc 60
 tattgactac catgagtggc aagcaagttt agccctttct 100

 60 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 65 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido

 70 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> dT FAM

 75 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)

<223> n es a, c, g o t
 <400> 15
 tttcccagn cacgacgt 18
 5
 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> dT TAMRA
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <400> 16
 tttcccagn cacgacgt 18
 25
 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótido
 35
 <400> 17
 tttcccagt cacgacgt 18
 <210> 18
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 45
 <400> 18
 acgtcgtcac tgcgaaaa 18
 <210> 19
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 55
 <400> 19
 acgtcgtcac tgcgaaaacc ctggcggttac ccaactta 38
 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido
 65

<400> 20
 tcactggccg tcgttttaca acgtcgtcac tgccgaaa 38

5
 <210> 21
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido

15
 <400> 21
 tcactggccg tcgttttaca acgtcgtcac tgccgaaacc ctggcggttac ccaactta 58

20
 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> Cebador

30
 <400> 22
 cacttratataccgcagga acag 24

35
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> Cebador

45
 <400> 23
 gctaaacttg ctgccactca t 21

50
 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

55
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido

60
 <400> 24
 agaggcatcc ttagtccctg tcgcagc 27

65
 <210> 25
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> sonda de oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> dT biotilada

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g o t

<400> 25
 nctccgtagg aa 12

 5 <210> 26
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> sonda de oligonucleótido

 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> dT modificada con BHQ2

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g o t

 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> dT TAMRA

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g o t

 35 <400> 26
 ncaggacag cgncg 15

 40 <210> 27
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 27
 agaggcatcc ttagtcctg tgcagc 27

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para su uso en la detección de un ácido nucleico diana que comprende las etapas de:
 - (i) poner en contacto una sonda de ácido nucleico monocatenaria con una muestra de interés en condiciones eficaces para generar un duplo de sonda/ácido nucleico diana mediante la hibridación específica de dicha sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico diana, si dicho ácido nucleico diana está presente;
 - (ii) poner en contacto cualquier duplo de sonda/ácido nucleico diana con una exonucleasa para efectuar la digestión del duplo y la liberación de una molécula marcadora del duplo; y
 - (iii) detectar el marcador mediante espectroscopía Raman detectando un cambio detectable en el espectro Raman del marcador tras su liberación del duplo, para detectar el ácido nucleico diana, si está presente.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha exonucleasa no tiene capacidad de sintetizar oligonucleótidos; y/o en el que dicha sonda de ácido nucleico tiene un grupo fosfato 5' y dicha exonucleasa es exonucleasa lambda.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se pone en contacto un exceso de dicha sonda de ácido nucleico con la muestra de interés en la etapa (i), de tal modo que la digestión de un duplo en la etapa (ii) recicla el ácido nucleico diana una o más veces, permitiendo de este modo que moléculas de sonda adicionales hibriden específicamente con la diana formando duplos de sonda/ácido nucleico diana adicionales que se digieren para liberar moléculas diana adicionales.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de cualquier ácido nucleico diana en dicha muestra de interés se determina con referencia a la magnitud de dicho cambio.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda de ácido nucleico y/o el ácido nucleico diana es ADN.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico diana es un ácido nucleico bicatenario o un ácido nucleico monocatenario.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el marcador únicamente es capaz de detectarse por medio de espectroscopía Raman cuando se libera del duplo de ácido nucleico por medio de la digestión del duplo de sonda/ácido nucleico diana.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho marcador es un colorante activo para (R)DRPS; y/o en el que el marcador es un fluoróforo.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha sonda comprende un fluoróforo y un desactivador que extingue al fluoróforo antes de dicha digestión; y/o en el que dicha detección por espectrometría Raman se complementa por detección basada en plasmónica o fluorescencia.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de la sonda se une a un sustrato activo de (R)DRPS.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda de ácidos nucleicos opcionalmente comprende de aproximadamente 20 a 30 nucleótidos.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el marcador se pone en contacto con dicha sonda de ácido nucleico y dicha muestra de interés en la etapa (i), cuyo marcador puede intercalarse con cualquiera de dichos duplos sonda/ácido nucleico diana si estos se forman.
13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el marcador está unido, enlazado o asociado de otro modo con la sonda de ácido nucleico, por ejemplo en el que la sonda de ácido nucleico está enlazada al marcador.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha puesta en contacto comprende poner en contacto con una primera sonda de ácido nucleico y con una segunda sonda de ácido nucleico, en el que dicha primera sonda de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a una porción de dicho ácido nucleico diana, y un resto capturable, que permite la captura de cualquiera de los duplos resultantes de la hibridación de la primera sonda de ácido nucleico con el ácido nucleico diana, y en el que dicha segunda sonda comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a una porción de dicho ácido nucleico diana distinta a la que es complementaria a dicha primera sonda de ácido nucleico y dicho marcador.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el duplo formado poniendo en contacto dicha muestra de interés con dichas primera y dicha segunda sonda de ácidos nucleicos se aísla de otro material que no forma parte de dicho duplo antes de dicha detección después de dicha puesta en contacto.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha puesta en contacto comprende poner en contacto con una primera sonda de ácido nucleico y con una segunda sonda de ácido nucleico, en el que

dicha primera sonda de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a una porción de dicho ácido nucleico diana, y una secuencia de ácido nucleico complementaria a una porción de dicha segunda sonda de ácido nucleico.

- 5 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dicha puesta en contacto comprende además poner en contacto con un ácido nucleico de captura, siendo dicho ácido nucleico de captura complementario a una porción de dicho ácido nucleico diana al que dicha primera sonda de ácido nucleico no es complementaria y está enlazado a un resto capturable que permite la captura de cualquier complejo de ácido nucleico capturable, pudiéndose formar dicho complejo de ácido nucleico capturable tras dicha puesta en contacto cuando dicho ácido nucleico diana está presente, tal como en el que dicho complejo de ácido nucleico capturable está aislado de otro material que no es parte de dicho duplo antes de dicha detección después de dicha puesta en contacto.
- 10 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que el marcador está unido, enlazado o asociado de otro modo con la segunda sonda de ácido nucleico, por ejemplo en el que la segunda sonda de ácido nucleico es enlazada al marcador; y/o en el que la primera y la segunda sonda de ácidos nucleicos comprende, cada una de ellas, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos.
- 15 19. Un procedimiento para detectar simultáneamente varios ácidos nucleicos diana distintos en una muestra de interés que comprende efectuar simultáneamente varios procedimientos de acuerdo con los procedimientos que se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en los que se usa un marcador distinto para detectar cada uno de dichos ácidos nucleicos diana.

Figura 1

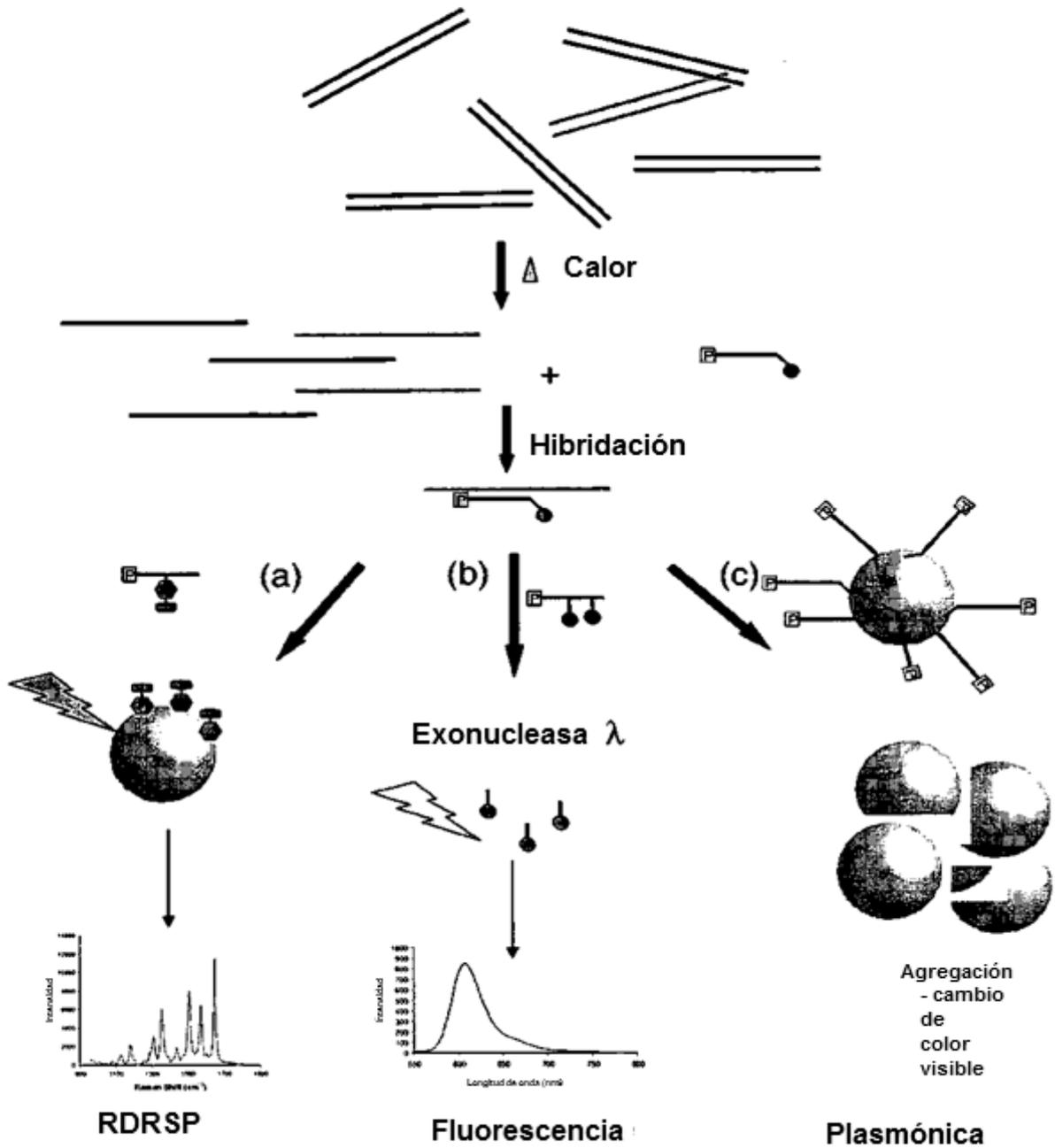
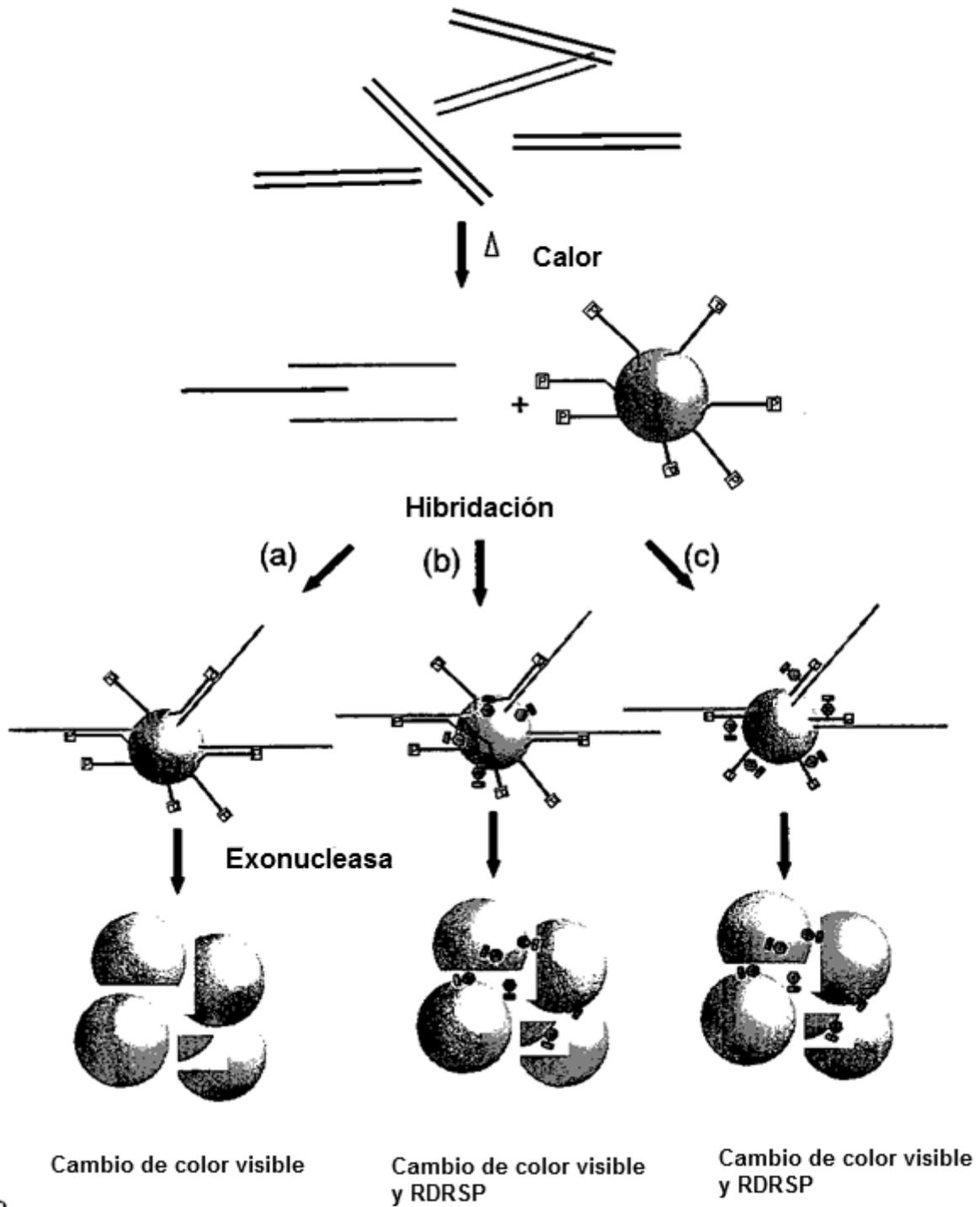


Figura 2



2

Figura 3

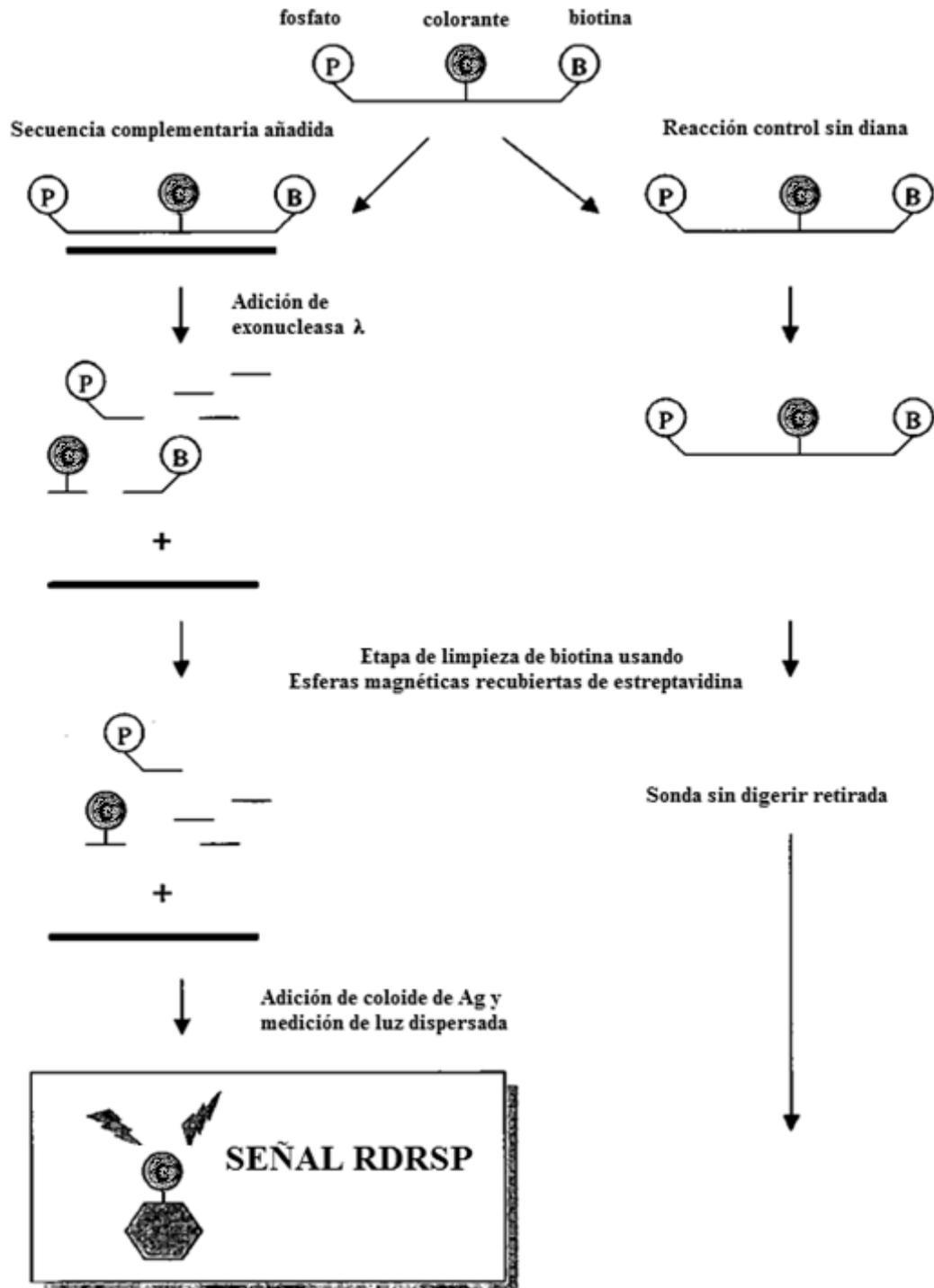


Figura 4

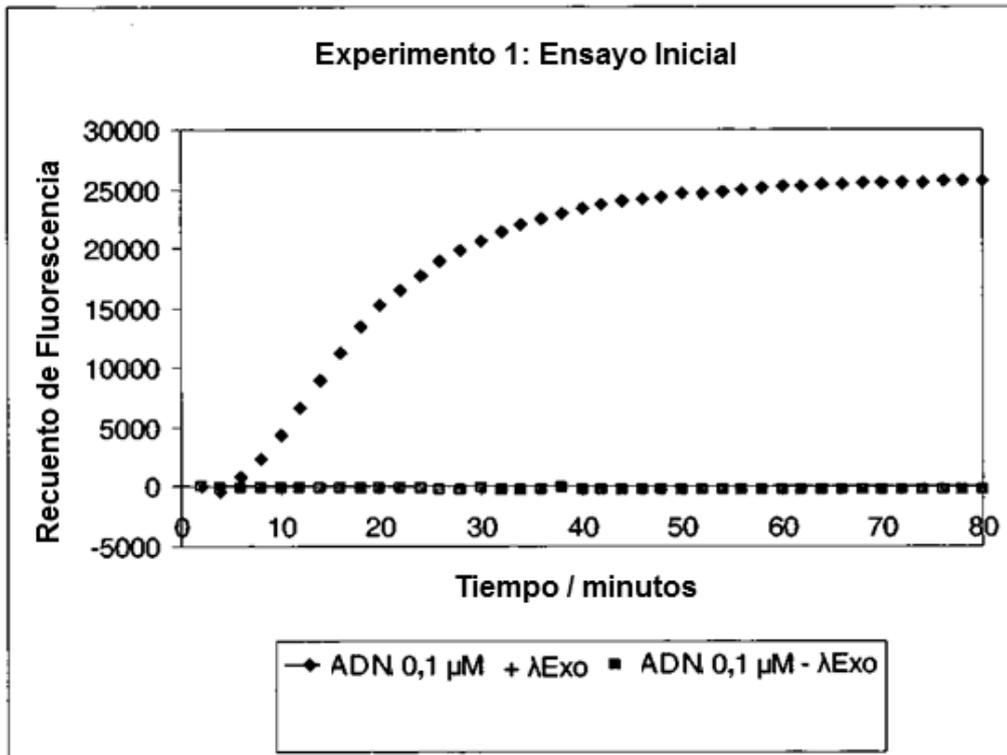


Figura 5

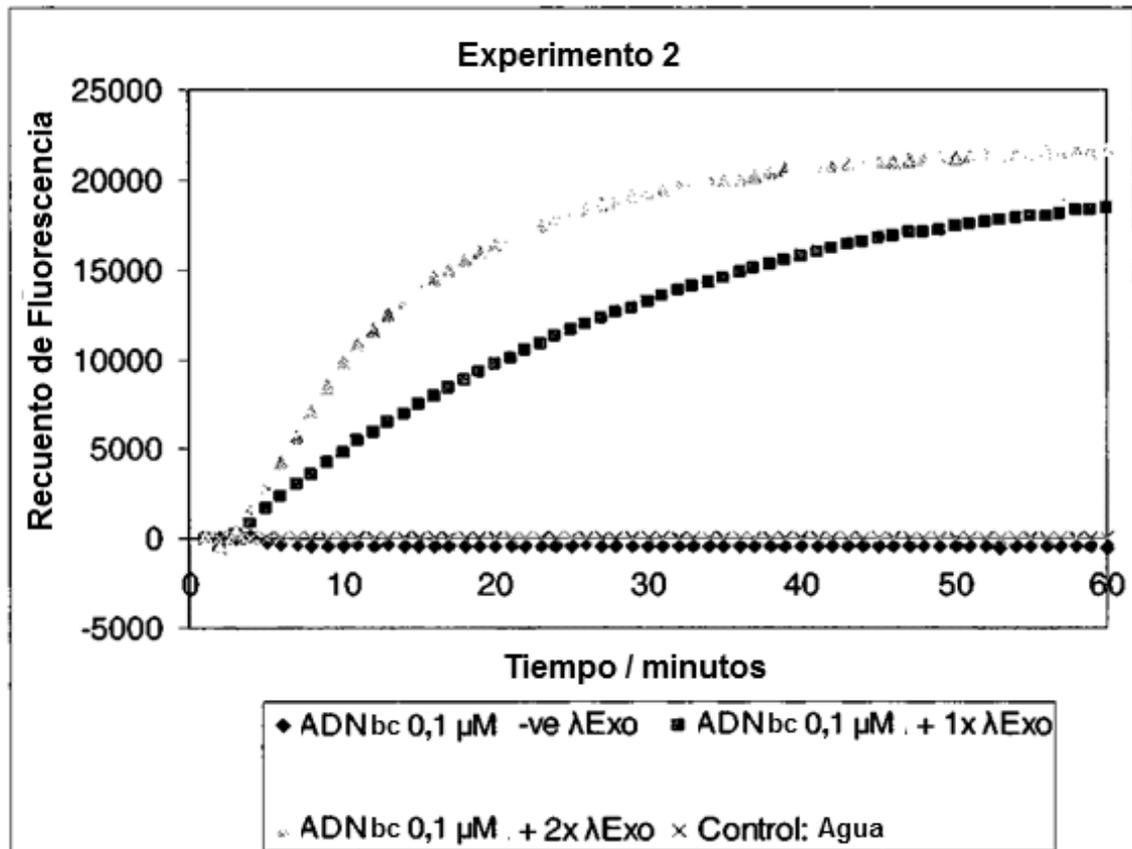


Figura 6

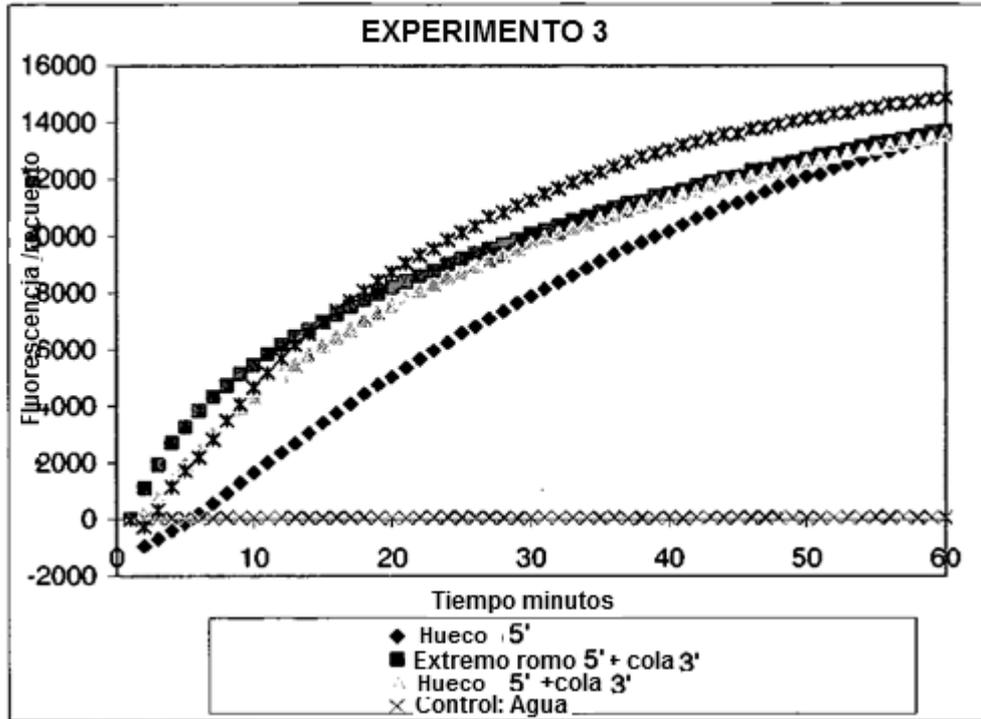


Figura 7

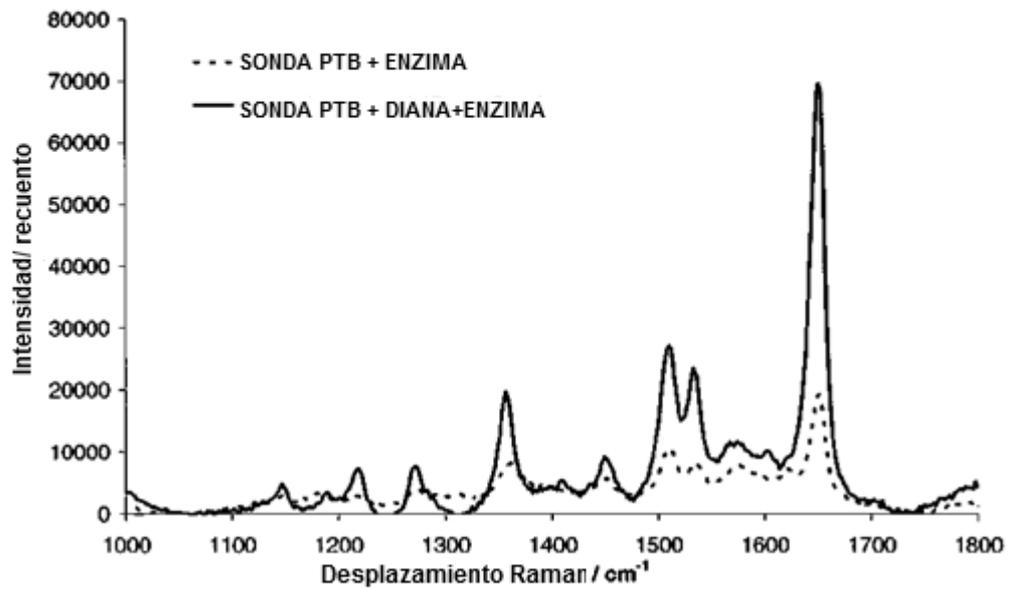


Figura 8

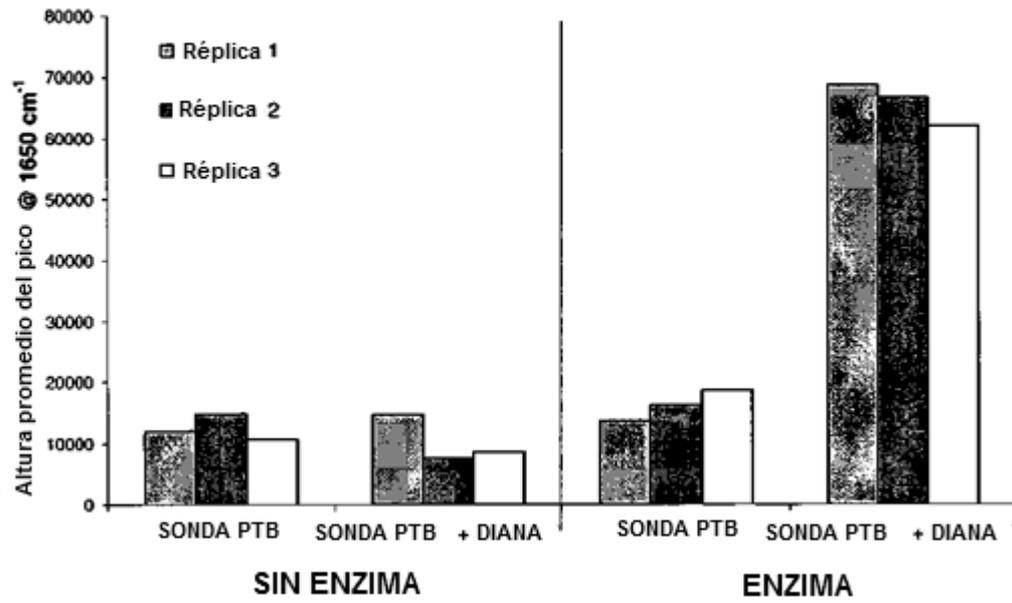
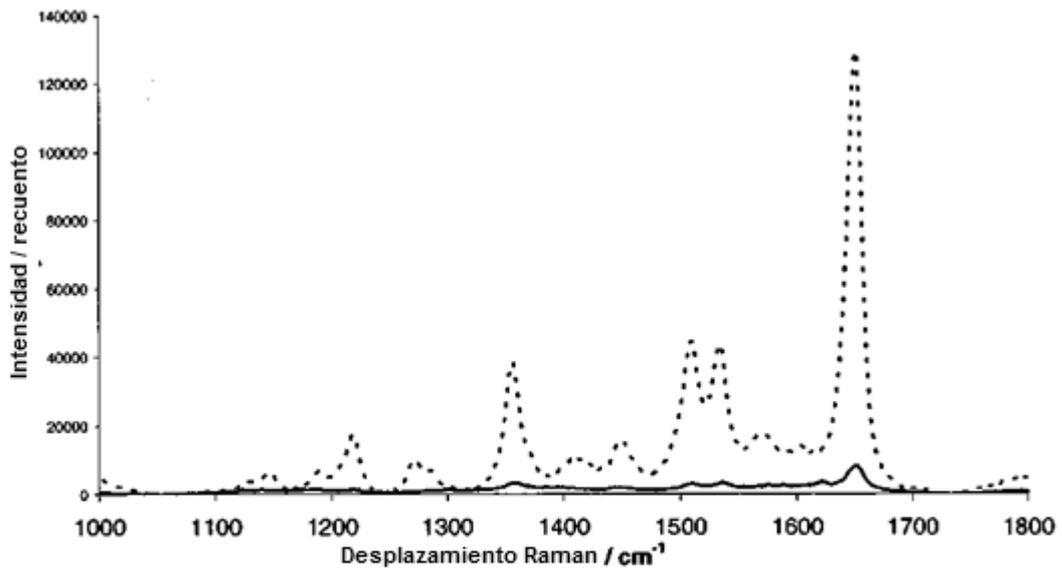


Figura 9



Línea discontinua: sonda + diana+ enzima

Línea continua: sonda + diana (CSE, Control Sin Enzima)

Figura 10

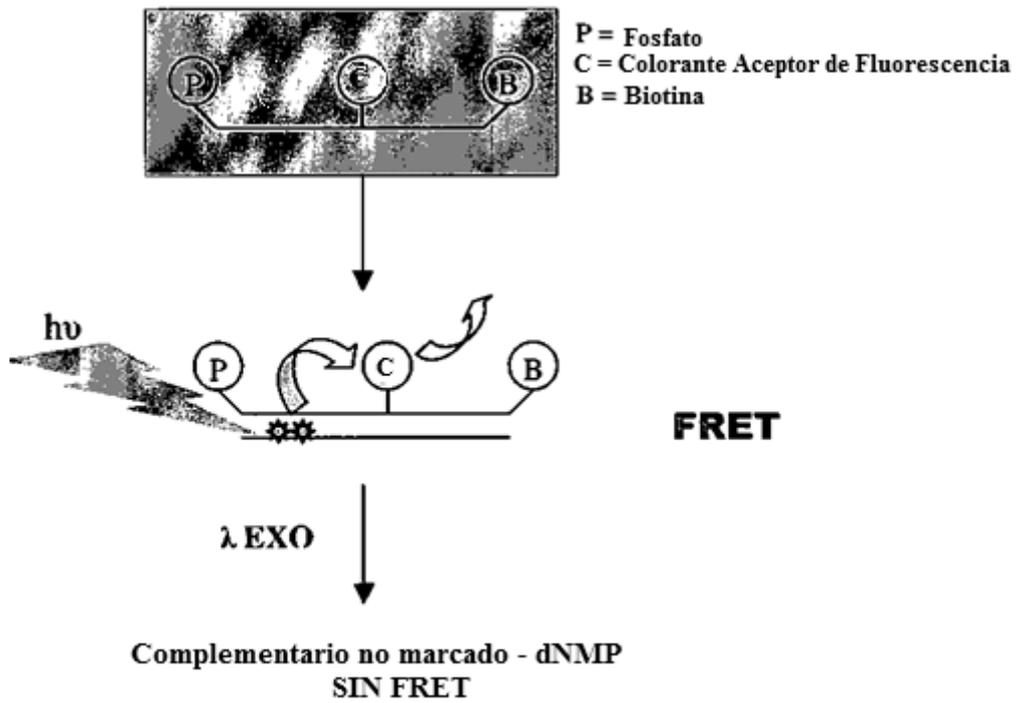


Figura 12

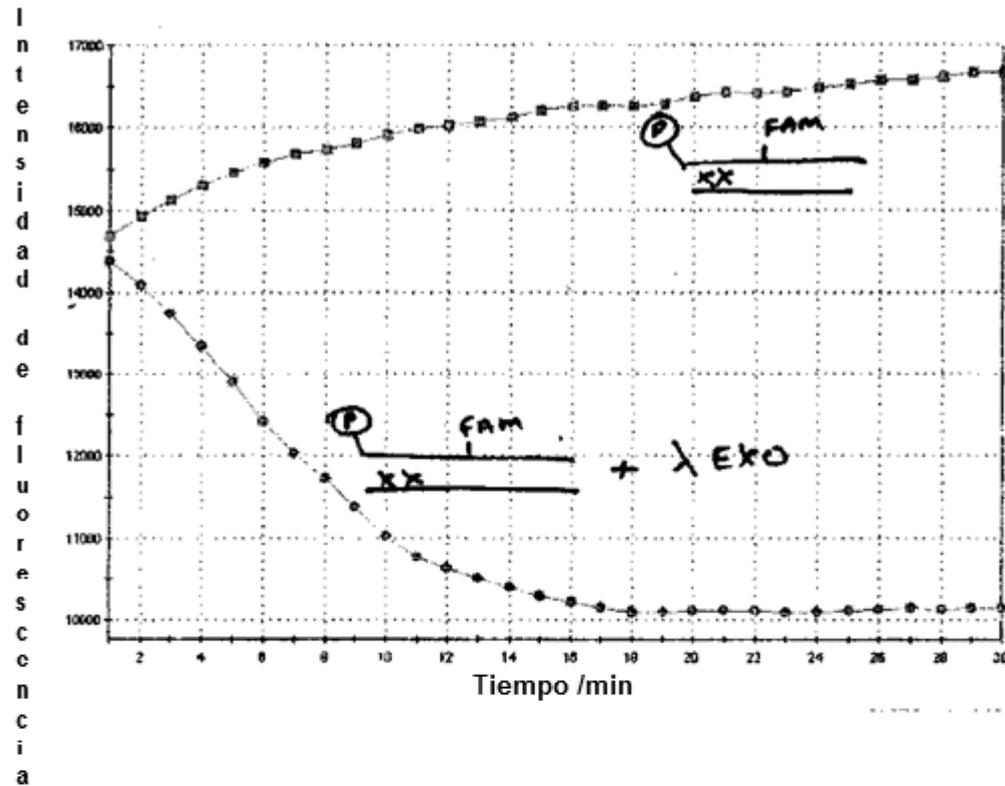


Figura 13

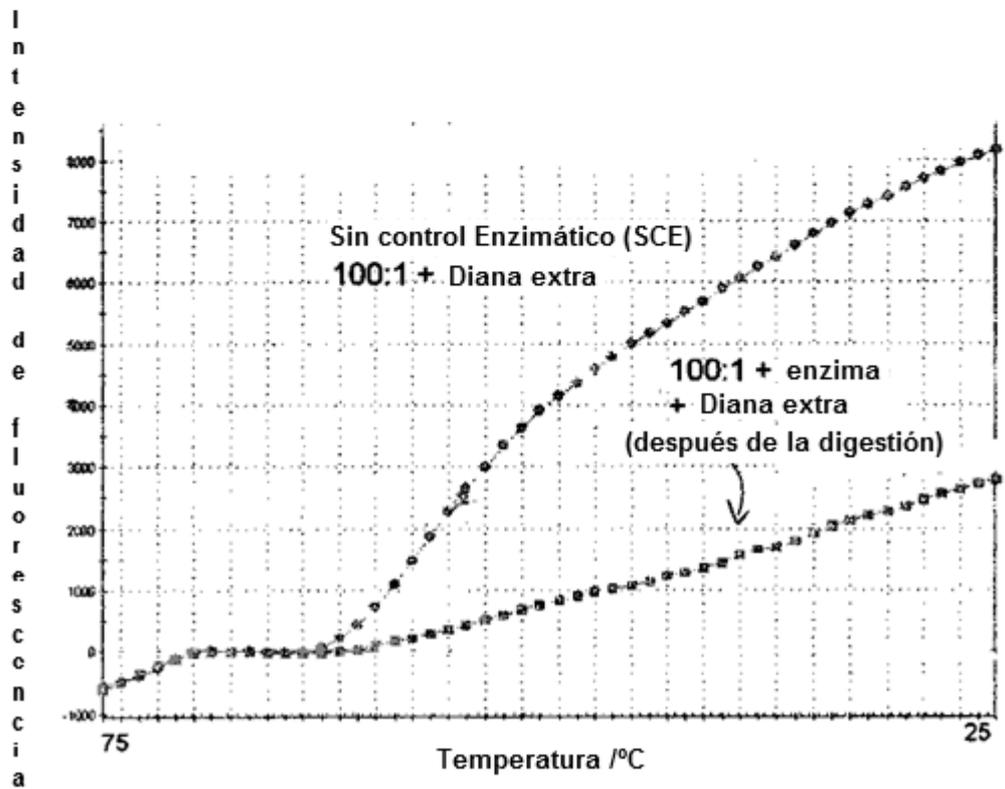


Figura 14

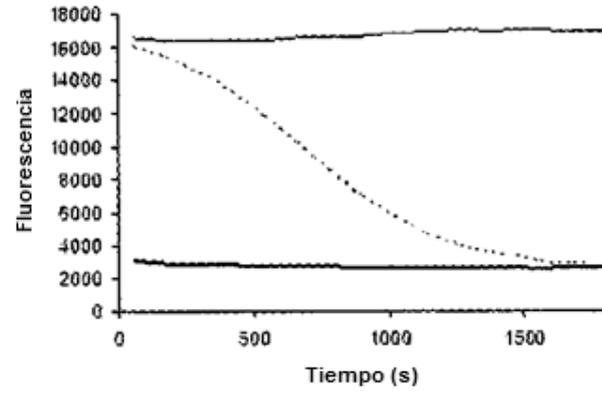


Figura 15

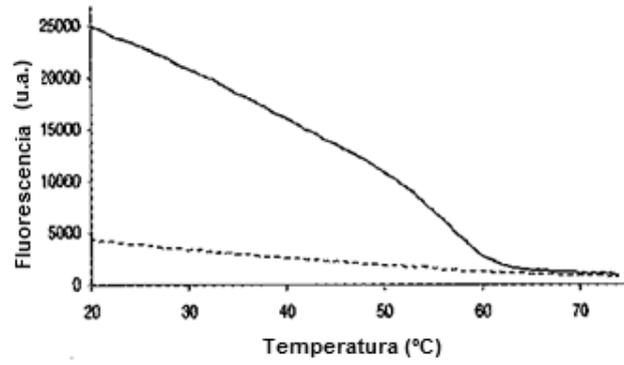


Figura 16

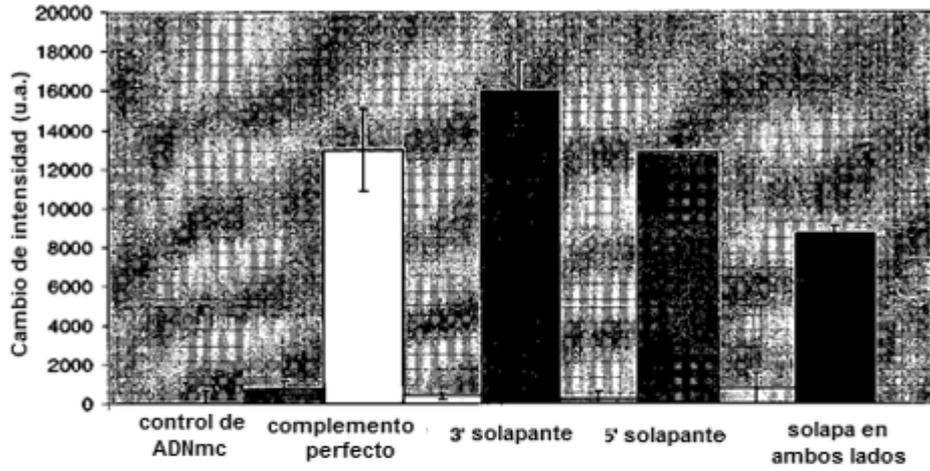
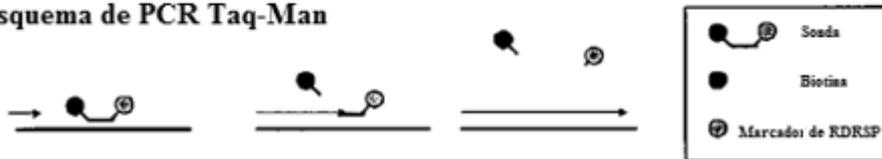


Figura 17

Esquema de PCR Taq-Man



Limpieza post Taq-Man.

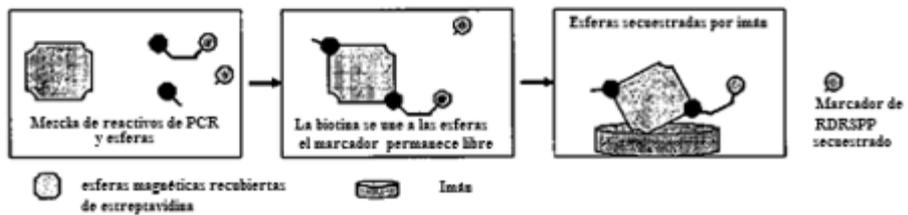


Figura 18



Figura 19

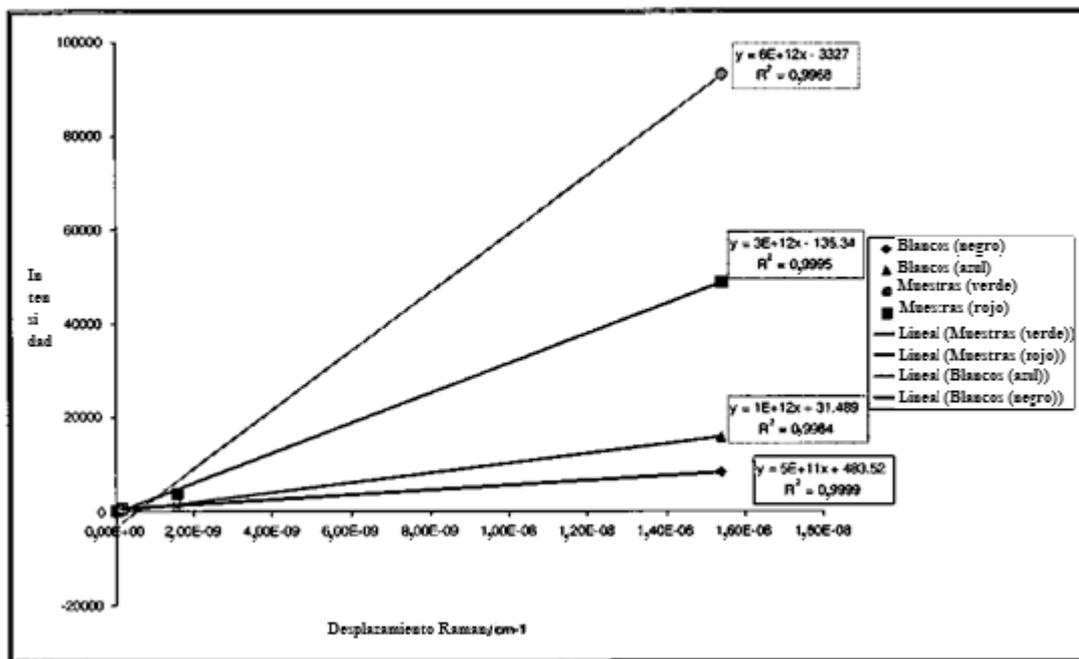


Figura 20

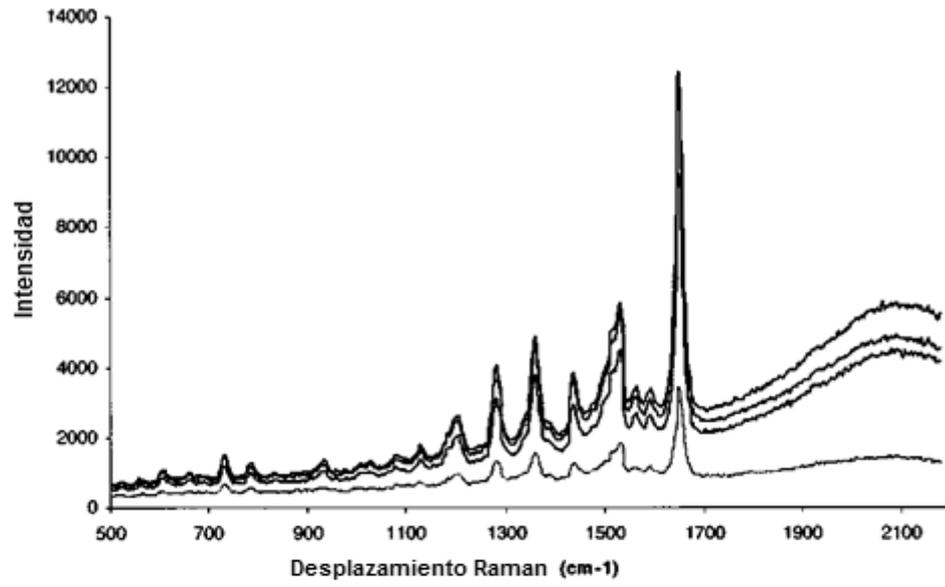


Figura 21

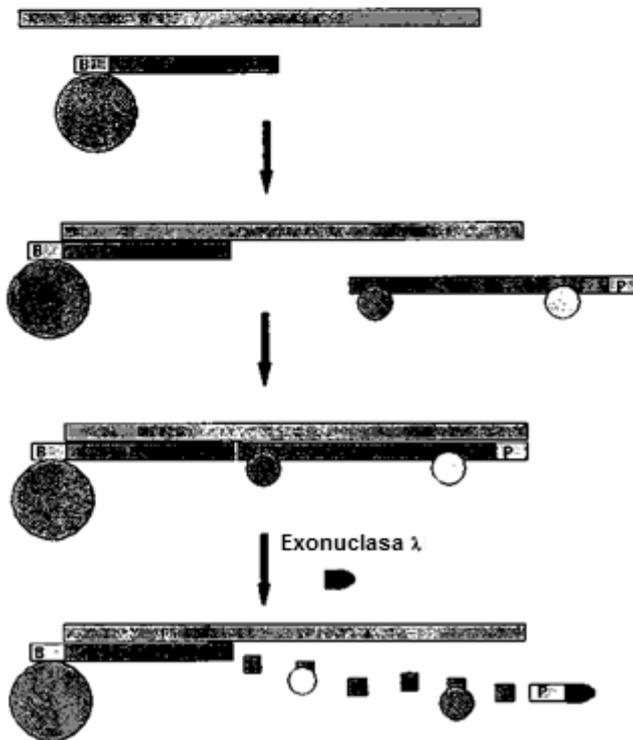


Figura 22

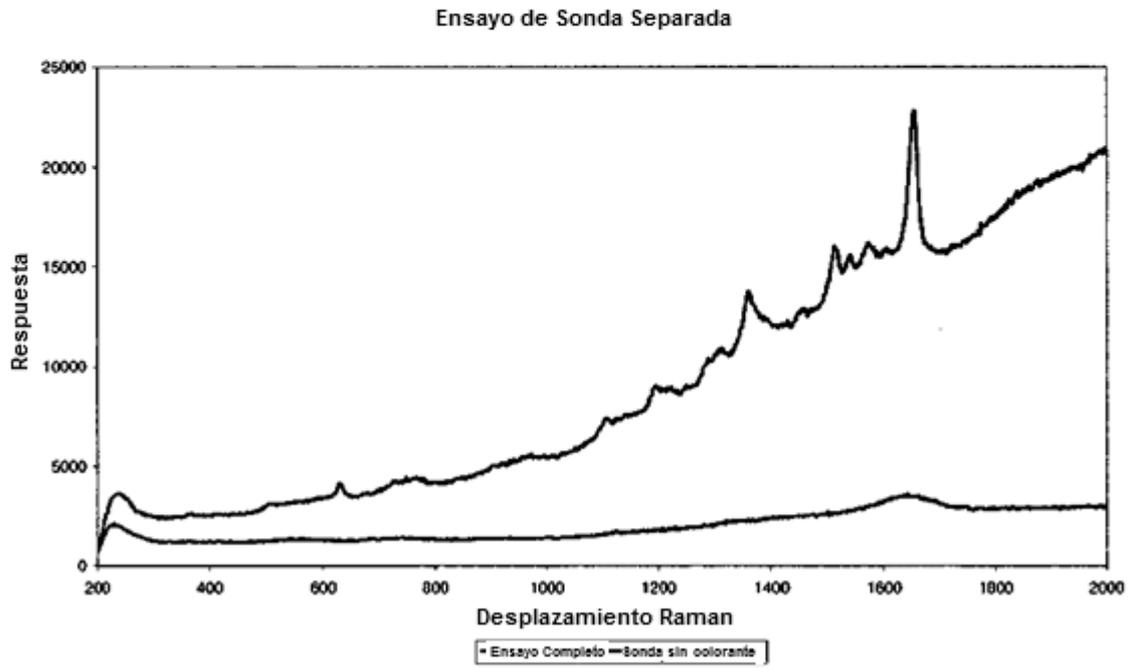


Figura 23

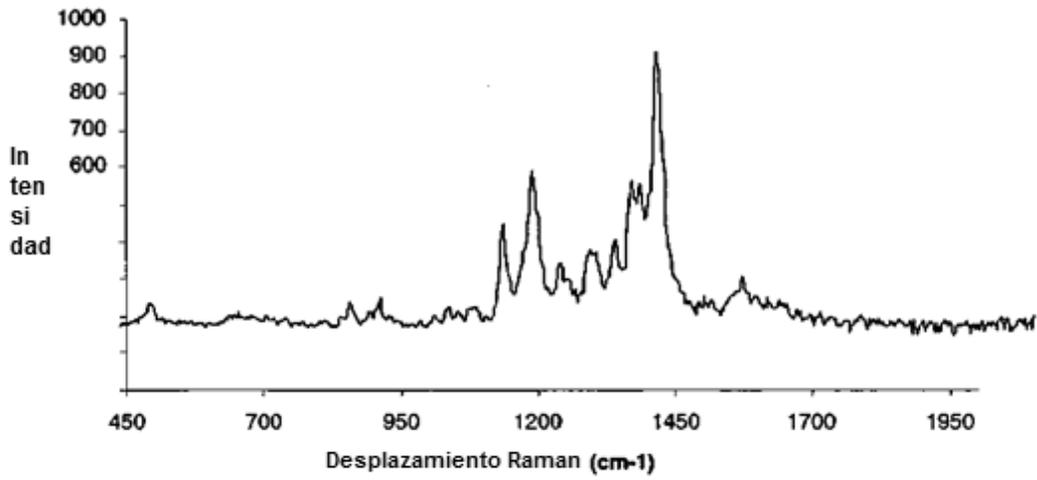


Figura 24

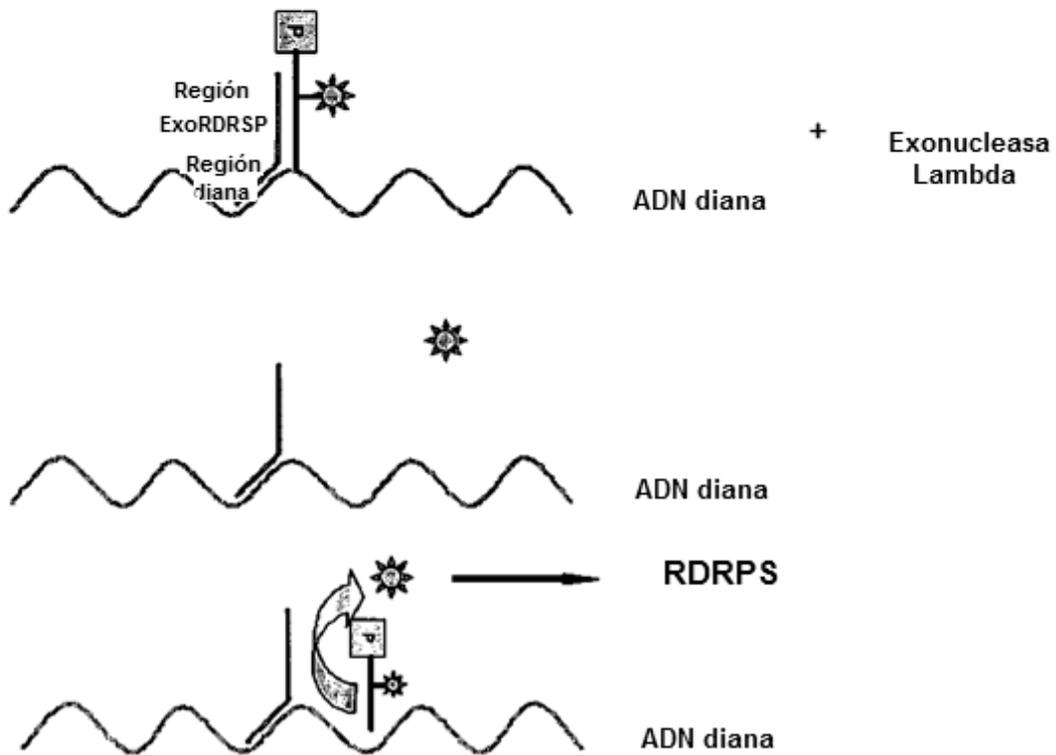


Figura 25

