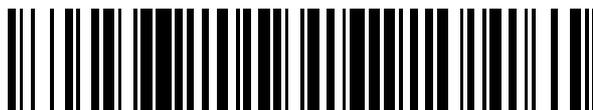


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 158**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/66 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2005 E 05767491 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 1776467**

54 Título: **Método para determinar la cantidad de modelo de ácido nucleico presente en una muestra**

30 Prioridad:

29.07.2004 GB 0416944

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

22.01.2016

73 Titular/es:

**LUMORA LIMITED (100.0%)
Bartholomews Walk
Ely CB7 4EA, GB**

72 Inventor/es:

**TISI, LAURENCE CARLO;
MURRAY, JAMES AUGUSTUS HENRY;
GANDELMAN, OLGA y
ARMSTRONG, VICTORIA LOUISE CHURCH**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 557 158 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

Método para determinar la cantidad de modelo de ácido nucleico presente en una muestra.

5 La invención se relaciona con un método para determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en una muestra, comprendiendo los pasos de: i) traer a asociación con la muestra todos los componentes necesarios para la amplificación de ácido nucleico y todos los componentes necesarios para un ensayo de bioluminescencia para la amplificación de ácido nucleico y consecuentemente: ii) llevando a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico; iii) vigilando la intensidad de salida de luz del ensayo de bioluminescencia; y iv) determinando la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.

Antecedentes

15 La amplificación de ácido nucleico puede usarse para determinar si un ácido nucleico de modelo particular está presente en una muestra. Si un producto de amplificación se produce, esto indica que el ácido nucleico de modelo estaba presente en la muestra. Conversamente, la ausencia de algún producto de amplificación indica la ausencia de ácido nucleico de modelo en la muestra. Tales técnicas son de gran importancia en aplicaciones diagnósticas, por ejemplo, para determinar si un patógeno está presente en una muestra.

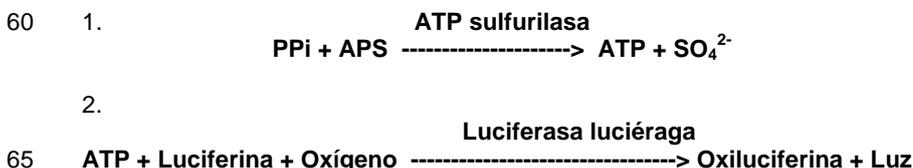
20 Los ácidos nucleicos pueden amplificarse por una variedad de termociclaje y técnicas isotérmicas. Técnicas termocíclicas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizan el ciclaje de temperatura para impulsar ciclos repetidos de síntesis de ADN, llevando a que grandes cantidades de ADN nuevo se sinteticen en proporción a la cantidad original de ADN de modelo. Recientemente, un número de técnicas isotérmicas también han sido desarrolladas que no dependen del termociclaje para impulsar la reacción de amplificación. Las técnicas isotérmicas, que utilizan las polimerasas de ADN con actividad de desplazamiento de hebra han sido desarrolladas para reacciones amplificatorias que no implican un paso de síntesis de ARN. Similarmente, para reacciones amplificatorias que sí implican un paso de síntesis de ARN, existen técnicas isotérmicas que han sido desarrolladas que emplean transcriptasa reversa, DNasa H y polimerasa de ARN dependiente de ADN.

25 Los productos de reacciones de amplificación de ácido nucleico tradicionalmente han sido analizados con el uso de electroforesis de gel (de una base de agarosa o acrilamida), usando un colorante fluorescente (como el bromuro de etidio), tintando para detectar la presencia de ADN. Este método puede ser usado para indicar el número, la cantidad y el tamaño de productos amplificados. Sin embargo, la preparación, la operación y el análisis de las reacciones de amplificación usando electroforesis de gel requiere de una intervención manual extensiva y reactivos peligrosos y requiere mucho tiempo (normalmente una hora en total). Es más, múltiples ciclos de PCR (típicamente 30) se requieren para producir el producto detectible. Más recientemente, han sido desarrollados métodos que incrementan la sensibilidad sobre el electroforesis de gel, los cuales se apoyan en técnicas basadas en la fluorescencia o en un ensayo de turbidez para vigilar los productos de reacciones de amplificación de ácido nucleico en tiempo real.

35 Una característica de polimerasas de ADN y ARN es el hecho de que liberan el compuesto pirofosfato (PPi) cada vez que incorporan una nueva base en la molécula creciente de ADN/ARN. De esta manera, el PPi se produce como un subproducto en una cantidad estequiométrica a la vez que nucleótidos se añaden a una cadena nucleotídica creciente por la polimerasa. De allí sigue que la concentración de PPi es proporcional a la cantidad de síntesis de ácido nucleico que ha ocurrido y, por tanto, a la acumulación de amplificación. Para un polímero de longitud n, la reacción será la siguiente:



55 Un ensayo sensible para PPi se conoce como un Ensayo de Detección de pirofosfato inorgánico enzimático luminométrico (ELIDA) (ver Nyren, P. y Lundin, A., Anal. Biochem. 151: (2) 504-509 (1985)). Este ensayo tiene dos pasos: (1) conversión del pirofosfato (PPi) a ATP por la enzima sulfúrilasa ATP y (2) utilización del ATP para producir luz en la presencia de luciferina y oxígeno, catalizados por luciferasa:



El uso de ensayos de tipo ELIDA es ventajoso en la medida que las lecturas de bioluminescencia pueden obtenerse rápidamente de volúmenes pequeños de muestras y las lecturas pueden hacerse empleando aparatos de vigilancia baratos y simples, tales como cinta fotográfica o cámaras con dispositivos de acomplamiento de carga (CCD) .

5 La patente de EE.UU 5.534.424, EE.UU 5.498.523, WO 98/28440, WO 98/13523 y WO 02/20836 describe el uso de métodos basados en el uso de ELIDA para secuenciar regiones cortas de ADN. El ensayo de ELIDA se usó para seguir la incorporación de nucleótidos únicos en una molécula de ADN por una polimerasa durante una sola ronda de polimerización durante la pirosecuenciación. La pirosecuenciación es una técnica iterativa, en la que solo unos de los cuatro trifosfatos deoxinucleótidos ("dNTPs") está presente en cada uno de los ensayos iterativos para permitir
10 que cada trifosfato deoxinucleótido ("dNTP") se pone a prueba en cada posición de la secuencia. De este modo, todos los componentes necesarios para el síntesis de ADN nunca están presentes simultáneamente.

El uso de un ensayo de tipo ELIDA de punto final, llamado "H3PIM" para vigilar una reacción en cadena de termociclaje de polimerasa también ha sido descrito arriba (ver WO 92/16654 y Tarbary et al., J. Immunological Methods, 156 (1992) 55-60). Alícuotas de una mezcla de reacción se tomaron en intervalos de tiempo predeterminados a lo largo del proceso de reacción y/o al final del proceso de amplificación. Por tanto, un ensayo de larga duración está descrito, implicando la adición múltiple de reactivos.

20 WO 02/064830 describe el uso de un ensayo ELIDA para llevar a cabo un ensayo de punto final para vigilar una reacción de termociclaje PCR. En WO 02/064830, el ensayo ELIDA puede llevarse a cabo en solo un paso, mientras que en WO 92/16654, adiciones múltiples y un paso de incubación se requieren para vigilar el termociclaje de PCR como un ensayo de punto final.

Hay una serie de problemas asociados con los ensayos de punto final descritos arriba. En primer lugar, requieren que los componentes del ensayo de bioluminescencia se añaden a la mezcla reactiva, siguiendo la reacción de amplificación. La apertura del tubo podría llevar a la contaminación de la muestra y, es más, a la contaminación del laboratorio. Si la muestra en sí se contamina, esto podría dar lugar a que se generen falsos positivos o falsos negativos. Es más, si el laboratorio se contamina con el ácido nucleico amplificado de modelo, esto incrementa la probabilidad de que muestras futuras se contaminen y que se obtengan resultados falsos positivo y negativos (por ejemplo, ver Victor, T. et al., "Laboratory experience and guidelines for avoiding false-positive polymerase chain-reaction results", Eur. J. Clin. Chem. & Clin. Biochem., 31 (8): 531-535 (1993)). De allí que la posibilidad de contaminación representa una desventaja severa en el uso del análisis de punto final de este tipo en los métodos diagnósticos.

35 Un problema más que genera el uso del análisis de punto final, como se describe arriba, es que dATP también actúa como un sustrato de luciferasa. Por tanto, cuando el dATP se usa como un sustrato para la polimerasa, la interferencia espectral resulta del dATP en lugar de reaccionar el ATP con la luciferasa. WO 02/064830 describe como, cuando un dATP se usa como el sustrato en la reacción de amplificación, la señal de luz del ELIDA se deteriora rápidamente. Este deterioro sería un obstáculo serio a la utilidad de un ensayo de punto final, ya que la lectura de luz medida sería no sólo una función de la concentración de PPI, sino también del tiempo. De allí que si los ensayos de puntos finales no se llevan a cabo dentro de un período estricto, no serán cuantitativos.

45 Una alternativa a los ensayos de puntos finales, los cuales son capaces de vigilar el síntesis del ácido nucleico durante una reacción de amplificación en "tiempo real", es decir, mientras que el síntesis de ácido nucleico se progresa. Ensayos de tiempo real que ya existen incluyen las técnicas basadas en la fluorescencia y ensayos de turbidez.

Las técnicas basadas en la fluorescencia funcionan vigilando el cambio de fluorescencia que se asocia con la acumulación de un producto de aplicación de alguna manera. Por ejemplo, los métodos para vigilar la amplificación de ADN durante PCR usando los colorantes de unión a ADN bicatenarios (específicamente sondas de hibridización que contengan fluoróforos donantes y aceptantes) se describen en EE.UU 5.994.056, WO 97/44486, WO 99/42611 y EE.UU 6.174.670. Estas técnicas basadas en la fluorescencia en tiempo real lo hacen posible seguir el PCR sin el muestro de líquidos, evitando la necesidad de que un tubo de reacción se abra y disminuyendo los riesgos de contaminación.

55 Sin embargo, las técnicas basadas en la fluorescencia tiene desventajas importantes. En particular, el coste de reactivos fluorescentes, particularmente aprestos etiquetados fluorescentemente, es alto y la preparación de muestras puede resultar difícil. Es más, la aplicación de sistemas basados en la fluorescencia puede resultar dificultada debido a la capacidad limitada de equipos y el coste alto. Normalmente, un termociclo-fluorímetro de ordenadores integrados es necesario se requiere, ya que los métodos frecuentemente siguen el PCR en tiempo real en lugar de emplearse para análisis de puntos finales. Como resultado, la accesibilidad (coste) y portabilidad de tales sistemas están comprometidas. Ya que la detección se lleva a cabo dentro del instrumento PCR, tales métodos sólo están disponibles para laboratorios debidamente equipados.

65 Los ensayos de turbidez implican la vigilancia de la presencia o ausencia de un precipitado de magnesio-pirofosfato en la mezcla reactiva de amplificación como un método de determinar si el PPI se ha producido. Esto se ha descrito

como un método de determinar si una reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle ha tenido lugar (ver Mori, Y. et al., "Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation", *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 289, 150-154 (2001)). Sin embargo, este método no es muy sensible y requiere de una concentraciones de PPI de unos 0,6mM antes de observarse turbidez significativa. Es más, el método de turbidez también requiere el uso de absorbancia como medio de medición, complicando el equipo necesario para llevar a cabo el ensayo.

Los métodos de cuantificación bioluminométricos de productos PCR están descritos en WO 01/42496 y Nygren et al., ("Quantification of HIV-1 using multiple quantitative polymerase chain reaction standards and bioluminometric detection", *Analytical Biochem.*, 288, 28-38 (2001)). Los productos obtenidos como resultado de amplificación de PCR fueron inmobilizados y cuantificados por medio de polimerización de extensión, en la que una ronda de polimerizaciones se llevó a cabo a temperatura ambiente. El PPI liberado debido a la incorporación de nucleótidos fue detectado por un sistema de tipo ELIDA, conllevando sulfirilasa y adenosina 5-fosfosulfato (APS), empleando un luminómetro y un grabador potenciométrico para medir la señal un minuto después de que la reacción se inició.

Resumen de la invención

La materia divulgada en la solicitud pendiente PCT/GB2004/000127 está expresamente excluida del ámbito de la presente solicitud.

La invención proporciona un método para determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra, comprendiendo los pasos siguientes:

i) Asociando con la muestra todos los componentes necesarios para la amplificación de ácido nucleico y todos los componentes necesarios para un ensayo bioluminescente para la amplificación de ácido nucleico, incluyendo:

- a) Una plimerasa de ácido nucleico,
- b) Los sustratos para la polimerasa de ácido nucleico,
- c) Al menos dos iniciadores,
- d) Una luciferasa termoestable,
- e) Luciferina,
- f) Una enzima que convierte PPI a ATP, en la que la enzima no es sulfirilasa ATP, y
- g) Cualquier otro sustrato requerido o cofactores de la enzima de la partef),

y consecuentemente:

ii) Llevando a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico del ácido nucleico de modelo, en la que copias generadas luego se copian posteriormente;

iii) Vigilando la intensidad de la salida de luz del ensayo de bioluminescencia, y

iv) determinando la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.

Se entiende que el sustrato o cofacto de la parte g) no es PPI.

El PPI se produce como consecuencia de la polimerización de ácido nucleico durante la reacción de amplificación. Un método de la invención implica el acoplamiento de esta producción de PPI a la salida de luz del ensayo de bioluminescencia. Preferiblemente, el PPI se convierte primero al ATP. El ATP luego es detectado por un ensayo de bioluminescencia catalizado or una luciferasa que utiliza el ATP como sustrato para la producción de luz en la presencia de luciferina y oxígeno. De este modo, la luciferasa se utiliza para llevar a cabo cambios en la concentración del ATP. Preferiblemente, esto se consigue mediante el uso de una enzima o enzimas que convierten el PPI al ATP. Vigilando la intensidad de la salida de luz del ensayo de bioluminescencia, es posible determinar cuánto PPI está presente en la mezcla de reacción y, de este modo, determinar la cantidad de acido nucleico de modelo está presente en la muestra. De este modo, el método ensaya el síntesis enzimático *in vitro* del ácido nucleico y hace que sea posible cuantificar la medida en que el ácido nucleico ha sido amplificado como resultado de una polimerización nueva durante la reaccion de amplificación.

Algunos ejemplos de enzimas que convierten el PPI al ATP y que son apropiados para el uso en la presente invención incluyen dicinato piruvato ortofosfato ("PPDK") (Eisaki, N. et al., "Pyruvate phosphate dikinase from a thermophilic actinomyces *Microbispora rosea* Subsp. *Aerata*: purficiacion, characterisation and molecular cloning of the gene", *Biochimica et Biophysica Acta*, (1999) 1431: 363-73 y ver GB2317892, el cual describe un PPDK termoestable), adenililtransferasa nicotinamida-mononucleótida ("NMNAT") (Sakubara, H. et al., "A nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase with unique adenylyl group donor specificity from a hyperthermophilic achaeon, *Pyrococcus horikoshii* OT-3", *J Mol Catalisis B: Enzymatic* 23 (2003) 273-279 - el cual describe el aislamiento de un NMNAT extremadamente termoestable), difosfatasa ATP (Heppel LA y Hilmore RJ, "Mechanism of enzymatic hydrolysis of adenosinetriphosphate", *J. Biol Chem.* (1953) 202:217-226) y fosforibosiltransferasa ATP (Voll MJ et al.,

"Purification and composition studies of phosphoribosyladenosine triphosphate: pyrophosphate phosphoryltransferase. The first enzyme of histidine biosynthesis", J. Biol. Chem. (1967) 242:1760-1767). Estas enzimas catalizan las siguientes reacciones:

5 Dicanasa de piruvato ortofosfato:



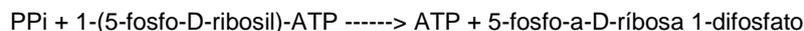
10 Adenililtransferasa nicotinamida-mononucleótido:



15 Difosfatasa ATP:



20 Fosforibosiltransferasa ATP:



25 Las enzimas mencionadas arriba son puramente ilustrativas y cualquier otra enzima o combinación de enzimas que convierta PPI a ATP y que sea compatible con un método acorde con la invención puede usarse. Sin embargo, el uso de sulfurilasa ATP como la enzima que convierte PPI a ATP, como se describe en la solicitud pendiente PCT/GB2004/000127, está específicamente excluido del ámbito de la presente invención. Es más, el uso exclusivo de la propia luciferasa como enzima que convierta PPI a ATP está específicamente excluido del ámbito de la presente invención.

30 Donde la enzima que convierte PPI a ATP sea dicanasa de piruvato ortofosfato, los sustratos son fosfoenolpiruvato y AMP. Donde la enzima que convierta el PPI a ATO sea adenililtransferasa de mononucleótido-nicotinamida, el cofactor es NAD⁺, Donde la enzima que convierta el PPI a ATP es difosfatasa ATO, el sustrato es AMP. Donde la enzima que convierta el PPI a ATO es fosforibosiltransferasa ATP, el sustrato es 1-(5-fosfo-D-ribosil)-ATP.

35 La reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) puede asemejarse a una reacción de polimerasa de ácido nucleico "procesiva", en la medida en que más de un ciclo de adición de nucleótidos se lleva a cabo sin más adiciones o manipulaciones de los componentes de amortiguamiento. De allí que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) es una técnica in vitro para producir muchas copias de una secuencia específica de ácidos nucleicos, en la que las copias generadas se copian posteriormente, llevando a una amplificación del número de copias de una secuencia específica de ácidos nucleicos que se está copiando.

40 La presencia de luciferasa y otros componentes del ensayo de bioluminiscencia durante la reacción de amplificación del paso ii) simplifica bastante el análisis de la muestra, ya que obvia la necesidad de manipulación posterior de la mezcla de reacción, una vez que la reacción de amplificación ha comenzado. Por ejemplo, no es necesario tomar alícuotas de la muestra para determinar cuánto PPI ha sido producido. En su lugar, el ensayo de bioluminiscencia se lleva a cabo directamente en la mezcla de reacción, empleada para la reacción de amplificación enzimática del ácido nucleico en la presencia de todos los componentes necesarios para la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, es decir, sobre la mezcla de reacción que se ha formado en el paso i). Ni es necesario añadir los componentes del ensayo de bioluminiscencia a la mezcla de reacción durante o después de la reacción de amplificación.

45 Los componentes del ensayo de bioluminiscencia (también conocido como "ensayo pirofosfato" o "ensayo PPI" y la reacción de amplificación tiene que ser capaz de soportar las condiciones de la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii). Por ejemplo, una enzima termoestable que convierte el PPI a ATP y/o la luciferasa termoestable y/o la polimerasa termoestable de ácido nucleico. El término "termoestable" usado aquí en relación a la enzima, se refiere a una enzima que es estable dentro del rango de temperatura en que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo a lo largo de un período de tiempo en que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo.

50 Los componentes del paso i) se estabilizan preferiblemente por liofilización o por la presencia de factores estabilizantes. De este modo, los estabilizantes también se relacionan preferiblemente con la muestra del paso i). Por ejemplo, uno o más de BSA, trehalosa, polivinilpirrolidona y ditiotreitol (DTT) pueden ser relacionados con la muestra i). Preferiblemente, todos estos estabilizadores serán relacionados con la muestra del paso i).

La temperatura y el tiempo requeridos para reacciones de amplificación de ácido nucleico son considerablemente diferentes de los que se requieren para las reacciones de polimerización de ácido nucleico. Las reacciones de amplificación de ácido nucleico requieren de una temperatura alta o de una duración larga (p.ej. 15 minutos a 24 horas) o de los dos. En contraste, las reacciones de polimerización de ácido nucleico pueden llevarse a cabo rápidamente en temperaturas bajas (p.ej. 37°C). se sabe que las luciferasas son inestables. Por ejemplo, la luciferasa de luciérnagas silvestres se inactiva rápidamente a 37°C. También se sabe que las luciferasas se inhiben fácilmente, por ejemplo, por oxiluciferina, el producto de su propia reacción leve. Sin embargo, frecuentemente ha sido descubierto que las luciferasas puedan mantenerse estables durante la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii). Es más, ha sido demostrado que las luciferasas pueden mantenerse estables durante toda la reacción de amplificación de ácidos nucleicos del paso ii). Esto es sorprendente, debido a la larga duración que se requiere para algunas reacciones de amplificación de ácido nucleico.

La luciferasa termoestable que es relacionada con la muestra en paso i) es una enzima luciferasa que es estable dentro del rango de temperatura en que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo.. La luciferasa particular utilizada dependerá de las condiciones en que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo. El término "luciferasa", como se utiliza aquí se refiere a una enzima que cataliza una reacción bioluminescente. Las luciferasas que son apropiadas para el uso en los métodos de la invención incluyen tanto las luciferasas silvestres y mutantes o luciferasas variantes, siempre que éstos estén estables dentro del rango de temperatura en que la reacción de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo. Preferiblemente, la luciferasa tendrá una vida media de al menos 10 minutos a 37°C. Preferiblemente, la luciferasa tendrá una vida media de al menos 10 minutos a 40°C. Más preferiblemente, la luciferasa tendrá una vida media de al menos 50°C. Aún más preferiblemente, la luciferasa tendrá una vida media de al menos 60°C. Ejemplos de luciferasas termoestables que son apropiadas para su uso en un método de la presente invención son la luciferasa termoestable Ultra-Glow de Promega, la cual tiene una vida media de al menos diez minutos a 60°C, y también la luciferasa descrita en Tisi, L. et al (Tsis, L. A. et al., (2002) "Development of a thermostable firefly luciferase", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 457, 115-123), la cual tiene una vida media de al menos 10 minutos a 40°C.

La reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) puede o puede no implicar un paso de síntesis de RNA. En métodos en que la reacción de amplificación del paso ii) no implican un paso de síntesis de RNA, los sustratos para la polimerasa incluyen cada uno de los cuatro dNTPs: dATP, dTTP, dCTP y dGTP. Uno o más de los dNTPs puede ser reemplazado con un análogo apropiado del mismo. La luciferasa usada es una luciferasa que utiliza el ATP como un sustrato para la producción de luz. Ejemplos de luciferasa que usan ATP como un sustrato para la producción de luz son la luciferasa silvestre (de *Photinus pyralis*) y mutantes de la misma. Preferiblemente, la luciferasa que usa ATP como un sustrato para la producción de luz es la luciferasa termoestable Ultra-Glow de Promega. La luciferasa se usa para seguir cambios en la concentración del ATP y, por tanto, una enzima que convierte el PPI a ATO está presente en la mezcla reactiva.

Cualquier sustrato o cofactor de la enzima que convierte el PPI a ATP que se requiere para producir el ATO del PPI se añade a la mezcla reactiva del paso i) cuando la enzima que convierte el PPI a ATO está presente.

Para reacciones de amplificación que implican un paso de síntesis de RNA, los sustratos para la polimerasa incluyen cada uno de dNTPs (dATO, dTTO, dCTP y dGTP) y cada uno de los cuatro trifosfatos nucleótidos ("NTPs") (ATP, UTP, CTP y GTP). Uno o más de los dNTPs y/o NTPs puede ser sustituido por un análogo apropiado. Por tanto, cuando la reacción de amplificación implica un paso de síntesis de RNA, el ATO endógeno está presente en la mezcla reactiva como uno de los sustratos de la polimerasa, a no ser que un análogo de ATO se usa, que pueda ser usado por la polimerasa de RNA, pero no reacciona con la luciferasa. Cantidades significativas de ATO endógeno en la mezcla reactiva comprometerían seriamente el uso del método de la invención en que la luciferasa que se relaciona con la muestra en el paso i) tiene que mantenerse sensible a cambios pequeños en la concentración de ATP. Para superar este problema, un análogo de ATP apropiado que es un sustrato para la polimerasa de RNA, pero no para la luciferasa (o al menos es un sustrato poco adecuado para luciferasa) se relaciona preferentemente con la muestra en el paso i), en lugar del ATP en sí.

Una ventaja más de un método de la invención es la facilidad con la que la entrada de luz en el paso iii) puede ser detectada. Preferiblemente, la intensidad de la salida de luz en el paso iii) es vigilada visualmente. Métodos apropiados para vigilar la intensidad de la salida de luz incluyen el uso de cinta fotográfica, una cámara o fotomultiplicador con dispositivo de acompañamiento de carga (CCD) (p.ej. W.R. Leo, *Technique for Nuclear and Particle Physics Experiments*, Springer, 1994). Alternativamente, la intensidad de la salida de luz puede vigilarse usando la detección ocular. Preferiblemente, el paso iii) implica la vigilancia de la intensidad de la salida de luz del ensayo de bioluminescencia usando una cámara CCD. La salida de luz puede ser amplificada para la visualización cuando sea necesario. De allí que la habilidad para detectar la salida de luz usando sólo la cinta fotográfica, una cámara o un fotomultiplicador tiene la ventaja respecto a técnicas que emplean el análisis de fluorescencia o un análisis basado en el gel en la medida en que no se requiere dispositivos o ópticas complejos. Es más la intensidad de la salida de luz puede ser vigilada sin la necesidad de irradiar la muestra (como se requiere en técnicas que implican la fluorescencia o absorbancia), sin la necesidad de una interfaz electroquímica con la muestra (p.ej. en los métodos basados en los semi-conductores: Wilding, P. et al., (1994) "Pcr in a silicon microstructure", *Química clínica*, 40(9): 1815-1818) o sin la necesidad de irradiación indirecta (p.ej. como en métodos de Resonancia de

Superficies de Plasmón: Bianchi, N. et al., (1997) "Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction", *Virología Clínica y Diagnóstica*, 8(3): 199-208.

5 Es más, una o más de una (por ejemplo, miles) de las muestras, pueden ser vigiladas simultáneamente, por ejemplo por una sola cámara CCD. Por tanto, un método de la invención puede usar equipos sencillos y baratos, con la posibilidad de portabilidad y miniturización y fácil integración en sistemas de alto rendimiento.

10 Paso i) de un método de la invención también incluye preferiblemente la aportación de una amortiguación en relación con la muestra. Las amortiguaciones que son apropiadas para el uso con un método de la invención incluyen las amortiguaciones que permiten que la reacción de amplificación proceda y que también permitan que el ensayo de bioluminiscencia procedan. Preferiblemente, la amortiguación comprende un fuente de iones de magnesio. Éstos son preferiblemente en la forma de $MgCl_2$ o $MgSO_4$. Por ejemplo, una amortiguación apropiada puede contener tris-acetato, cloruro de potasio, sulfato de amonio, sulfuro de magnesio y tritón X-100 a pH 8,8 a 15 25°C.

Ventajosamente, al menos los pasos ii) y iii) de un método, según la invención se llevan a cabo en un recipiente cerrado. Esto es de gran utilidad, ya que la capacidad de llevar a cabo tanto la reacción de amplificación y el ensayo de bioluminiscencia en un recipiente cerrado reduce o incluso previene la posibilidad de que una muestra se contamine. Es más, reduce o incluso previene la posibilidad de que el laboratorio se contamine. Esto es particularmente importante en el caso de que incluso una copia de un ácido nucleico de modelo se escapara en el laboratorio, ya que esto podría contaminar otras muestras y dar resultados falsos positivos. Por tanto, la capacidad de prevenir la contaminación es de una especial importancia, cuando un método de la invención se use en una aplicación diagnóstica.

20 Para prevenir tal contaminación, tras el paso iv), al recipiente se le aplica un tratamiento apropiado para destruir el ácido nucleico contenida en él, en particular para destruir el ácido nucleico de modelo. El recipiente en sí también se destruirá preferiblemente tras el paso iv) o tras la destrucción del ácido nucleico contenido en él. Esto minimiza la posibilidad de que el laboratorio y/o otras muestras se contaminen.

30 Preferiblemente, en paso iii) del método de la invención, la intensidad de la salida de luz se vigila durante la reacción de amplificación del ácido nucleico. Esto sólo es posible como resultado de que los componentes del ensayo de bioluminiscencia sigan presentes a lo largo de la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii). Preferiblemente, la intensidad de la salida de luz se vigila a lo largo de la reacción de amplificación del ácido nucleico, es decir, desde el comienzo hasta el final de la reacción de amplificación del ácido nucleico. Alternativamente, la intensidad de la salida de luz puede ser vigilada durante al menos una parte de la reacción de amplificación del ácido nucleico. Alternativamente y/o adicionalmente, la intensidad de la salida de luz puede vigilarse después de que la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii) haya finalizado y/o antes de la reacción de amplificación del paso ii), empezando, por ejemplo, para tomar una lectura de control. La capacidad de vigilar la intensidad de la salida de luz durante la reacción de amplificación del paso ii) simplifica el manejo del recipiente de reacción y también permite una determinación rápida de la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.

45 dATP también actúa como un sustrato para luciferasa. Una ventaja más de vigilar la intensidad de la salida de luz durante la reacción de amplificación es que cualquier señal de fondo que se produzca al reaccionarse el dATP con la luciferasa no interfiere con el método de la invención. Esto sólo se convierte en un problema con un análisis de puntos finales.

50 Aunque el uso del método de la presente invención reduce inherentemente los problemas causados por el dATP, la invención abarca métodos que permiten que la luz que se produzca al reaccionarse la luciferasa con el ATP producido por la enzima que convierte PPI a ATP se distinga de la luz producida al reaccionarse la luciferasa con nucleótidos que están presentes como un sustrato de la enzima polimerasa. Estos métodos reducirán la señal de fondo, incrementando la sensibilidad de detección de la luz producida del ATP producido por la enzima que convierta el PPI en ATP. Estos métodos comprenden las alternativas de:

55 (a) métodos ópticos para distinguir la longitud de onda de luz producida del ATP, de la luz producida por la acción de enzimas en los nucleótidos presentes en el amortiguador de reacción de amplificación;

60 b) usando los nucleótidos en la reacción de amplificación que no sean sustratos efectivos para las enzima que convierten el PPI a ATP.

c) Usando las variantes de enzima con la utilización reducida de dATP como un sustrato.

65 Por ejemplo, la detección de luz específica a longitud de ondas puede emplearse para diferenciar entre la luz producida del ATP (y por tanto derivado de pirofosfato) y la luz del dATP. La luciferasa silvestre reacciona con el ATP para dar una luz amarilla y verde, mientras que reacciona con el dATP para dar una luz roja. Como resultado,

donde una muestra contenga tanto el ATP como el dATP, la medida en que la luz producida en la presencia de la luciferasa es del ATO puede averiguarse empleando filtros apropiados o midiendo la emisión de luz en longitudes de onda n que el dATP contribuye poco a la señal grabada en comparación con el ATP. Por tanto, la luz derivada del dATO contribuye poco a la señal grabada comparada con el ATP. De allí que la luz derivada del dATP, reaccionándose directamente con la luciferasa, puede ser suficientemente minimizada como para incrementar la sensibilidad de la detención del ATP producido por la enzima que convierte el PPI al ATP, incluso a una concentración baja de PPI.

Es más, el dATP puede ser reemplazado por d-a-SATP. El d-a-SATP es un sustrato aproximadamente cien veces peor para la luciferasa que el dATP, tal que hay poca producción de luz de la reacción directa del d-a-SATP con la luciferasa. No obstante, el d-a-SATP es un sustrato apropiado para las reacciones de amplificación que implican el síntesis de ADN. Es conocido que el d-a-SATP puede incorporarse en una cadena de ADN por las polimerasas de ADN. Se ha demostrado que el ADN que ha incorporado el d-a-SATP (que ahora contiene átomos de sulfuro) puede actuar como un modelo para el síntesis futuro del ADN; esto es un requisito para la amplificación. Las reacciones de amplificación que usan el d-a-SATP son eficientes y, al ser el d-a-SATP un sustrato para la luciferasa que el dATP, la interferencia se reduce en gran medida. Por tanto, al usarse el d-a-SATP en un método acorde con la invención, la muestra resultante sólo emitirá luz significativa si el pirofosfato ha sido generado, p.ej. si el ácido nucleico de modelo ha sido amplificado. Será evidente a una persona adepata en esta temática que los nucleótidos diferentes al d-a-SATP, los cuales son sustratos para la polimerasa usada en la reacción de amplificación, pero cuya reacción con la luciferasa demuestra una actividad específica más baja que con el dATP, también podría utilizarse en este contexto.

Las luciferasas mutantes (tales como las luciferasas mutantes o variantes, de luciérnagas o escarabajos) con una diferencia mayor en el color de la bioluminiscencia usando dATP en comparación con el ATP o una afinidad diferente por el dATP o ATP puede usarse, por ejemplo. Las luciferasas mutantes, en las que la diferencia entre la longitud de onda de luminescencia máxima con el dATP y el ATP es mayor a la de la enzima silvestre, pueden emplearse para mejorar la discriminación entre la luz producida del ATP, a diferencia del dATP. Es más, los mutantes en los que el dATP es un sustrato peor para la emisión de luz relativa al ARO pueden emplearse del mismo modo. Con esta realización, cualquier luciferasa mutante puede usarse que discrimine mejor con respecto a la reacción con el ATP por encima de otros nucleótidos, como se mide por actividad y/o longitud de onda de la luz producida. Los métodos para obtener o identificar tales luciferasas están conocidos (p.ej. WO 96/22376 y WO 99/14336).

Preferiblemente, el paso iii) de un método de la invención incluye la producción de un conjunto de datos de la intensidad de la salida de luz como función del tiempo. El conjunto de datos se emplea para determinar la cantidad de un ácido nucleico de modelo presente en la muestra. Preferiblemente, el conjunto de datos se analiza mediante un programa informático y/o se representa en la forma de un gráfico o una lista de cifras. Por ejemplo, el conjunto de datos puede representarse con una curva de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo o una curva del cambio de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo (es decir, el derivativo primero).

La intensidad de la salida de luz puede vigilarse en uno o más momentos predeterminados (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, o más). Estos momentos predeterminados son preferiblemente en momentos predeterminados tras el momento en que todas las condiciones necesarias para que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) tenga lugar estén presentes. En este momento ($t = 0$ minutos). Tales condiciones son que la mezcla reactiva ha sido formada, como se describe en el paso i) y que la mezcla reactiva está en una temperatura apropiada para que la amplificación pueda proceder, dicha temperatura siendo también una temperatura en que los componentes de la reacción de amplificación y el ensayo de bioluminiscencia estén estables. Por ejemplo, la intensidad de la salida de luz puede vigilarse en intervalos predeterminados durante al menos una parte de la reacción de amplificación. Preferiblemente, la intensidad de la salida de luz se vigila en intervalos de tiempo predeterminados durante toda la reacción de amplificación. Por ejemplo, estos intervalos podrían ser cada 30 segundos, cada minuto, cada minuto y 30 segundos, etc. Alternativamente, los intervalos entre los momentos predeterminados puede variar. Preferiblemente, una, dos o más lecturas de luz se toman cada minuto. Cuantas más lecturas de luz se toman por minuto, cuanto mayor será la seguridad en los resultados y, por tanto, es preferible tomar cuántas más lecturas al minuto sea posible. Preferiblemente, la salida de luz se vigila primero en el momento = 0 minutos. En algunas realizaciones, la intensidad de la salida de luz puede también vigilarse después de que la reacción de amplificación haya terminado.

Cuanto mayor sea la sensibilidad del sistema de detección de luz utilizado, cuantos más puntos de tiempo al minuto son posibles, ya que, cuando se use una cámara más sensible, cada dato viene de la integración de una emisión de luz a lo largo de un período más corto de tiempo que con una cámara CCD menos sensible. De allí que es ventajoso utilizar la cámara más sensible posible.

Ventajosamente, en paso iii) del método de esta invención, la intensidad de la salida de luz se vigila continuamente. Por "continuamente", se quiere decir la capacidad completa del sistema de detección empleado. Preferiblemente, la salida de luz se vigila continuamente durante al menos una parte de la reacción de amplificación del paso ii). Más preferiblemente, la salida de luz se vigila continuamente durante toda la reacción de amplificación del paso ii). El

paso iii) también engloba la vigilancia alternativa o adicional de la intensidad de la salida de luz continuamente después de que la reacción de amplificación del paso ii) se termine.

5 Un método acorde con la invención puede emplearse para determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en una muestra de un modo cuantitativo y/o de un modo cualitativo.

10 El uso de un modo cuantitativo incluye el uso de un método de la invención para determinar la cantidad de modelo presente en una muestra antes de que la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii) ocurra. También incluye el uso de un método de la invención para determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en una muestra como resultado de la reacción del paso ii), la cual puede calcularse antes o después de la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii), es decir, la cuantificación de cuánto producto de amplificación de ácido nucleico ("amplicon") ha sido producido. Esto lo hace posible cuantificar la extensión de la reacción de amplificación del ácido nucleico. Cuando se use de un modo cuantitativo, el término "determinar" incluye tanto una determinación exacta de la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra y una estimación de la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra.

20 Sorprendentemente, se ha demostrado que, para determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en una muestra de un modo cuantitativo, el momento del cambio de la intensidad de la salida de luz es un factor proporcional en la adición de intensidad *per se* de la salida de luz producida. Por ejemplo, para un conjunto concreto de condiciones de reacción (p.ej. un ácido nucleico de modelo particular, una concentración de componentes particular para la reacción de amplificación y el ensayo de bioluminescencia y una(s) temperatura(s) particular(es) para la reacción de amplificación), si una concentración más alta de ácido nucleico de modelo está presente en una muestra al comienzo de la reacción de amplificación del ácido nucleico, los cambios de intensidad de la salida de luz ocurrirán después de un período de tiempo más corto tras el comienzo de la reacción de amplificación en comparación con una reacción en la que la concentración más baja de ácido nucleico de modelo está presente en la muestra. De allí que, para un conjunto determinado de condiciones de reacción, es posible determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo que está presente en la muestra mediante la vigilancia del cambio de intensidad de la salida de luz como una función del tiempo. Preferiblemente, una serie de reacciones de control se llevan a cabo, utilizando concentraciones diferentes conocidas de un ácido de modelo particular bajo un conjunto particular de condiciones reactivas y los resultados obtenidos de la muestra que se analiza por un método de la invención se comparan con los resultados obtenidos de esta serie de reacciones de control. Un control también puede llevarse a cabo en el que la cantidad de ácido nucleico de modelo que ha sido producido durante la reacción de amplificación en momentos predeterminados se comprueba con el uso de electroforesis de gel u otro método apropiado cuantitativo. Esto permitirá que la cantidad de ácido nucleico de modelo en la muestra de control en un momento predefinido pueda calcularse y correlarse con los puntos respectivos en un conjunto de datos.

40 Cuando se use de un modo cualitativo, un método de la invención puede usarse para comprobarse si una reacción de amplificación de ácido nucleico produce o no produce un producto de amplificación y con ello determine si cualquier ácido nucleico de modelo está presente en la muestra. En muchas aplicaciones en las que las condiciones de amplificación ya son suficientemente optimizadas (p.ej. la detección rápida del ácido nucleico (preferiblemente ADN) asociado con patógenos), la única información que se requiere para establecer que la secuencia de ADN de referencia estaba presente en la muestra en la concurrencia de la reacción de amplificación. Cuando el ácido nucleico de modelo está presente en la muestra, esto resultará en que el amplicón se produzca como resultado de la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii). Consecuentemente, esto resultará en un cambio en la forma de la intensidad de la salida de luz como función del tiempo en comparación a la reacción de control en la que ninguna amplificación ha tenido lugar. Cuando ningún ácido nucleico de modelo esté presente en la muestra, ninguna reacción de amplificación tendrá lugar en el paso ii) y, por tanto, ningún amplicón será producido como resultado. Consecuentemente, la forma del cambio de intensidad de la salida de luz como función del tiempo será similar (si no igual) que el control en que ninguna amplificación haya tenido lugar. Una persona experimentada será capaz de determinar si un patrón de cambio en intensidad de la salida de luz como función del tiempo difiere significativamente del patrón dado por un control. De allí que la expresión "llevar a cabo la reacción de amplificación del ácido nucleico", como se usa en el paso ii) incluye tanto el "llevar a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico" como el "crear las condiciones apropiadas para que la reacción de amplificación ocurra", ya que en las realizaciones en las que no hay ácido nucleico de modelo presente en la muestra, ninguna reacción de amplificación de ácido nucleico ocurrirá. Preferiblemente, la presencia o ausencia del cambio esperado de luz se vigila en un período de tiempo predeterminado tras el comienzo de la reacción.

60 Ha sido demostrado que el propio PPI puede producir efectos directos en la luciferasa en concentraciones altas. Al llevarse a cabo una serie de experimentos de control, usando concentraciones de un particular ácido nucleico de modelo principiante bajo una serie de condiciones de reacción, la persona experimentada será capaz de determinar del conjunto de datos el momento en que el propio PPI tiene un efecto directo apreciable y discernible en la luciferasa. Estos resultados de control pueden luego usarse para extrapolar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.

65 Por ejemplo, ha sido demostrado que el propio PPI puede inhibir la luciferasa en concentraciones altas. El momento en que la intensidad de la luz empieza a disminuirse rápidamente corresponde con el momento en que la luciferasa

se ha inhibido por una concentración particular de PPI. Esto puede corresponder al momento en que la intensidad de la salida de luz está en un punto máximo, es decir, el punto que marca la transición entre la salida de luz que se incrementa y la salida de luz que se disminuye. Alternativamente, puede representar el punto en que la tasa de disminución en intensidad de la salida de luz incrementa significativamente, p.ej. de una disminución paulatina a una disminución rápida. Al llevarse a cabo una serie de experimentos de control, usando diferentes concentraciones de ácido nucleico de modelo, el momento en que la intensidad de la salida de luz empieza a disminuirse rápidamente para cada particular concentración de ácido nucleico de modelo principiante bajo un particular conjunto de condiciones de reacción puede ser determinado.. Estos resultados de control luego pueden usarse para extrapolar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.

Alternativamente, el PPI puede causar un incremento en la emisión de luz de la luciferasa inhibida por una sustancia diferente al PPI.

Por tanto, si el PPI estimula o no el ensayo de bioluminescencia catalizado por la luciferasa depende de una serie de factores, incluyendo la clase precisa de luciferasa que se usa, la temperatura de la reacción, la concentración de PPI y la presencia de otros compuestos que pueden afectar la actividad de la luciferasa. Al llevarse a cabo un número de experimentos de control, usando las diferentes concentraciones de un particular ácido nucleico de modelo bajo un conjunto particular de condiciones reactivas, la persona experimentada será capaz de determinar del conjunto de datos el momento en que el propio PPI tiene un efecto directo en la luciferasa y el carácter de este efecto. Estos resultados de control pueden luego usarse para extrapolar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.

El conjunto de datos de intensidad de la salida de luz como una función del tiempo puede interpretarse de un número de diferentes maneras para determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra. Puntos particulares en el conjunto de datos representan puntos en el tiempo en que concentraciones específicas del PPI están presentes. Éstos pueden corresponder a la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra. Por ejemplo, uno o más de los siguientes puntos en el conjunto de datos se vigilan preferentemente: i) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la intensidad de la salida de luz empieza a aumentar; ii) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la tasa de cambio de incremento de intensidad de la salida de luz incrementa o disminuye; iii) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la tasa de cambio de intensidad de la salida de luz cambia de un incremento a una disminución (esto es preferentemente el punto de intensidad máxima de la salida de luz o intensidad de "pico" de la salida de luz) o de una disminución a un incremento; iv) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la tasa de cambio de una disminución de intensidad de la salida de luz incrementa o disminuye, y/o v) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la intensidad de la salida de luz alcanza o cruza un nivel determinado.

Para la determinación de la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra de un modo cuantitativo, los puntos en el conjunto de datos que se vigilan son preferentemente aquellos puntos en que la tasa de cambio de intensidad de la salida de luz cambia significativamente. Al interpretar un conjunto de datos, los puntos en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz cambian significativamente será obvio para la persona experimentada.

Más preferiblemente, un punto en que la tasa de cambio de intensidad de la salida de luz cambia significativamente será un punto que representa una transición entre la intensidad de la salida de luz al incrementarse y la intensidad de la salida de luz al disminuirse. Un punto que representa una transición entre la intensidad de la salida de luz al disminuirse la intensidad de la salida de luz al incrementarse es también un punto en que la tasa de cambio de intensidad de la salida de luz cambia significativamente. Un punto que marca la transición entre la intensidad de la salida de luz al incrementarse y disminuíse o disminuirse y incremntarse será preferentemente representado como un punto de inflección cuando los resultados se expongan en un gráfico de intensidad de salida de luz como una función de tiempo. Un punto en que la intensidad de la salida de luz cambia de una intensidad constante a un incremento o disminución de intensidad o un punto en que intensidad de la salida de luz cambia de un incremento o disminución en intensidad a una intensidad constante también representa un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz cambia significativamente.

Alternativamente, un punto en que la intensidad de la salida de luz cambia significativamente puede ser un punto en que la tasa de incremento en intensidad aumenta o disminuye significativamente. Por tanto, la expresión "un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida d eluz cambia significativamente" preferiblemente se refiere a un punto en que la tasa de cambio de intensidad de la salida de luz en un intervalo de tiempo predeterminado antes de que los punto difieren por al menos 30% de la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz en el mismo intervalo de tiempo predeterminado después de ese punto. Más preferiblemente, "un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz cambia significativamente" se refiere a un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz en un intervalo de tiempo predeterminado antes de que los puntos difieren por al menos 50% de la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz en el mismo intervalo de tiempo predeterminado después de ese punto. Aún más preferiblemente, "un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz cambia significativamente" se refiere a un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz en un intervalo de tiempo predeterminado antes de que los puntos difieren por al menos 70% de la tasa de cambio en intensidad de la

salida de luz en un mismo intervalo de tiempo predeterminado después de ese punto. Alternativamente, "un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz cambia significativamente" se refiere a un punto en que la tasa de cambio en intensidad de la salida de luz en un intervalo de tiempo predeterminado antes de ese punto difiere por al menos 10%, 20%, 40%, 60% o 80% de la tasa de cambio en intensidad de luz en el mismo intervalo de tiempo predeterminado después de ese punto. El intervalo de tiempo predeterminado es preferiblemente de 30 segundos, pero puede variar alternativamente ser de 1 minuto, 1 minuto 30 segundos o más. Alternativamente, el intervalo de tiempo predeterminado puede ser menos de 30 segundos. El intervalo de tiempo predeterminado elegido dependerá de los intervalos de tiempo en que la intensidad de la salida de luz se vigila y dependerá de la cinética de la reacción de amplificación particular que se estudia.

Por tanto, para la determinación cuantitativa, uno o más de los siguientes puntos del conjunto de datos se vigilan preferentemente: i) el punto en que la intensidad de la salida de luz empieza a incrementarse; ii) el punto en que la tasa de cambio del incremento de intensidad de la salida de luz se incrementa o disminuye significativamente; iii) el punto en que la tasa de cambio de la intensidad de la salida de luz cambia de un incremento a una disminución (preferiblemente el punto de intensidad máxima de la salida de luz) o de una disminución a un incremento y/o iv) el punto en que la tasa de cambio de la disminución en intensidad de la salida de luz se incrementa o disminuye significativamente. El tiempo en que la intensidad de la salida de luz alcanza o cruza un nivel predeterminado puede también vigilarse.

La cantidad de ácido nucleico presente en la muestra se determina preferiblemente de un modo cuantitativo, al vigilarse uno o más de los siguientes puntos: i) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la intensidad de la salida de luz empieza a incrementarse, ii) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la tasa de cambio de intensidad de la salida de luz cambia de un incremento a una disminución; iii) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la tasa de cambio de una disminución de la intensidad de la salida de luz se incrementa significativamente; iv) el tiempo necesario para alcanzar el punto en que la tasa de cambio de una disminución en intensidad de la salida de luz significativamente disminuye; y v) el tiempo necesario para que la intensidad de la salida de luz alcance o cruce el nivel predeterminado.

Como se ha mencionado arriba, el tiempo necesario para alcanzar un punto particular de un ácido nucleico de modelo particular depende de la concentración de ácido nucleico de modelo presente en la muestra al principio de la reacción de amplificación. Por tanto, el paso iv) de un método de la invención preferiblemente comprende la comparación de la intensidad de la salida de luz a la intensidad de la salida de luz de una curva estándar formada por los resultados de una serie de controles en que las muestras comprenden cantidades conocidas de un ácido nucleico de modelo para determinar la cantidad de ácido nucleico en la muestra.

Para la determinación de la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra de un modo cualitativo, es decir, esté o no el ácido nucleico de modelo presente en la muestra, el punto en el conjunto de datos que se vigila es preferiblemente el punto en que la intensidad de la salida de luz alcanza o cruza un nivel predeterminado.

Un incremento en la intensidad de la salida de luz indicará la presencia del ácido nucleico de modelo en la muestra. Preferiblemente, el incremento en la intensidad de la salida de luz es relativo a la reacción de control en que ninguna amplificación ha tenido lugar. Por ejemplo, tal reacción de control será preferiblemente aquella en que ningún ácido nucleico de modelo está presente o aquella en que ninguna polimerasa está presente. Por tanto, en estas realizaciones, la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra puede determinarse de un modo cualitativo al vigilarse si la intensidad de la salida de luz se alza por encima del control en que ninguna amplificación ha tenido lugar. Más preferiblemente, en estas realizaciones, la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra puede determinarse de un modo cualitativo al vigilarse si la intensidad de la salida de luz alcanza o se alza por encima de un nivel predeterminado. Por ejemplo, el nivel predeterminado podría fijarse en un 125%, 150%, 175% o 200% de la salida de luz al comienzo de la reacción de amplificación en el punto en que la tasa de disminución de la salida de luz está en el mínimo. Si la intensidad de la salida de luz alcanza este nivel predeterminado o se alza más allá de él, esto indicará la presencia del ácido nucleico de modelo en la muestra. Sin embargo, si la intensidad de la salida de luz no alcanza este nivel predeterminado, esto indicará la ausencia del ácido nucleico de modelo en la muestra.

El nivel predeterminado puede variar dependiendo de uno o más factores, incluyen: el ácido nucleico de modelo utilizado, la concentración de los componentes usados en la reacción de amplificación del ácido nucleico y la temperatura usada para la reacción de amplificación del ácido nucleico. Al llevarse a cabo experimentos de control en que el ácido nucleico de modelo está presente o el ácido nucleico de modelo no está presente, la persona experimentada será capaz de determinar un nivel predeterminado apropiado.

Preferiblemente, la presencia del incremento en la intensidad de la salida de luz dentro de un período de tiempo posterior al comienzo de la reacción de amplificación del paso ii) indica la presencia del ácido nucleico de modelo en la muestra y la ausencia del incremento en la intensidad de la salida de luz dentro de un período de tiempo predeterminado posterior al comienzo de la reacción de amplificación del paso ii), indicando la ausencia del ácido nucleico de modelo en la muestra. Por ejemplo, donde un método de la invención se use para genotipo, en que una cantidad determinada de material de prueba siempre contendría una cantidad determinada de modelo de referencia,

luego si el ácido nucleico de modelo de referencia no está presente, se puede afirmar con seguridad que la intensidad de la salida de luz no se ha visto incrementado dentro de un período de tiempo predeterminado, entonces la referencia está ausente.

5 Preferiblemente, el período de tiempo sera un período que ocurre durante la reacción de amplificación del paso ii). Cuanto menos ácido nucleico de referencia esté presente al comienzo de la reacción , cuanto más tiempo durará la reacción de amplificación del paso ii). Al llevarse a cabo un número de experimentos de control para un ácido nucleico particular de modelo bajo un conjunto de condiciones reactivas particulares, en que el ácido nucleico de modelo está presente en concentraciones variantes o un ácido nucleico de modelo no está presente, la persona experimentada será capaz de determinar un momento apropiado predeterminado antes del cual el incremento tendrá que haberse ocurrido o no para ese ácido nucleico de modelo particular bajo ese conjunto particular de condiciones reactivas. Por ejemplo, el período predeterminado de tiempo puede estar dentro de los 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más minutos del comienzo de la reacción de amplificación del ácido nucleico.

15 Alternativamente o adicionalmente, en un método dependiendo de la invención, una disminución de la intensidad de la salida de luz relativa al nivel predeterminado indica la presencia del ácido nucleico de modelo en la muestra. Se cree que esta disminución ocurre cuando la luciferasa se inhibe por el PPI. Por ejemplo, el nivel predeterminado podría fijarse en un 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de la salida de luz al comienzo de la reacción de amplificación en el punto en que la tasa de disminución de la intensidad de luz está en un punto mínimo. Si la intensidad de la salida de luz disminuye a este nivel predeterminado o disminuye más allá de él, esto indicará la presencia del ácido nucleico de modelo en la muestra. Sin embargo, si la intensidad de la salida de luz no alcanza este nivel predeterminado, esto indicará la ausencia del ácido nucleico de modelo en la muestra.

25 Este nivel predeterminado puede variar dependiendo de uno o más factores, incluyendo: el ácido nucleico de modelo utilizado, la concentración de componentes usada en la reacción de amplificación del ácido nucleico y la temperatura de la reacción de amplificación del ácido nucleico. Al llevar se a cabo experimentos de control en que el ácido nucleico de modelo está presente o el ácido nucleico de modleo no está presente, la persona experimentada será capaz de determinar un nivel predeterminado apropiado.

30 El paso iv) de un método de la invención comprende preferiblemente la comparación de la intensidad de la salidad de luz a la intensidad de la salida de luz de un control en que ninguan amplificación ha tenido lugar. Por ejemplo, tal contorl puede consistir en los mismos pasos que en un método acorde con la invención, excepto que se omiten el ácido nucleico de modelo y/o uno de los otros componentes necesarios para la reacción de amplificación (p.ej. la polimerasa). Esto permite que se tenga en cuenta el deterioro de la bioluminescencia a lo largo del tiempo.

35 En un método acorde con la invención, aunque el control preferiblemente se lleve a cabo simultáneamente a la muestra que se analiza, no es necesario que esto sea el caso. Por ejemplo, el control puede ser un contorl que se ha llevado a cabo previamente y los datos obtenido pueden ser usados para una comparación con otras muchas muestras.

40 En un método acorde con la invención, una disminución en la intensidad de la salida de luz relativa a la reacción de contorl en que ninguan amplificación ha tenido lugar indica la presencia del ácido nucleico de modelo en la muestra. Esta disminución relativa al control ocurrirá posteriormente a los demás cambios en la intensidad de la salida de luz relativa al control que se describe arriba. Es sorprendente el dato de que la intensidad de la salida de luz eventualmente disminuirá al nivel que está por debajo de la reacción de contorl en que ninguna reacción ha tenido lugar, ya que la persona experimentada esperaría que la intensidad de la salida de luz continuaría incrementándose a un nivel menor al control, ya que la luciferasa se inhibe por el PPI. Aunque la vigilancia de que la intensidad de la salida de luz para determinar si es menor que aquella del control en que ninguna amplificación ha tenido lugar se lleve cabo preferiblemente durante la reacción de amplificación del pasoii), puede llevarse a cabo alternativamente tras la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii). Preferiblemente, la intensidad de la salida de luz disminuye a un nivel que está al 30% o menos de la intensidad de la salida de luz de la reacción de control. Más preferiblemente, la intensidad de la salida de luz disminuye a un nivel que está al 20% menos de la intensidad de la salidad de luz en la reacción de control. Aún más preferiblemente, la intensidad de la salida de luz disminuye a un nivel que está el 10% o menos de la intensidad de la salda de luz de la reacción de control. Alternativamente, la intensidad de la salida de luz puede disminuir hasta un nivel que está el 90% o menos, 80% o menos, 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 25% o menos, 15% o menos, 5% o menos de la intensidad de la salida de luz de la reacción de control.

60 Preferiblemente, la presencia de la disminución de la intensidad de la salida de luz relativa a un nivel predeterminado o a una reacción de control dentro del período de tiempo prederminado tras el comienzo de la reacción de amplificación del ácido nucleico indica la presencia de ácido nucleico de modelo en la muestra y la ausencia de una disminución en la intensidad de la salida de luz reactiva a un nivel predeterminado o a una reacción de control dentro del período de tiempo tras el comienzo de la reacción de amplificación indica la ausencia del ácido nucleico de modelo en la muestra. El período predeterminado de tiempo está preferiblemente dentor de los 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más minutos desde el comienzo de la reacción de amplificación del ácido nucleico. Al llevarse a cabo experimentos de control en que diferentes concentraciones de ácido nucleico de modelo están presentes o ácido

nucleico de modelo no está presente, la persona experimentada será capaz de determinar un momento apropiado predeterminado antes del cual la disminución deber haber o no haber ocurrido.

La reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo preferiblemente dentro de un rango de temperatura en que la luciferasa está suficientemente activo y estable para dar una salida de luz suficiente y estable a lo largo de la duración de la reacción de amplificación. Es más, la reacción de amplificación del paso ii) es preferiblemente una que pueda llevarse a cabo a una temperatura lo suficientemente baja y que sea lo suficientemente rápida para que la luciferasa se mantenga estable durante la reacción de amplificación. La reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii) de un método de invención puede llevarse a cabo isotérmicamente o puede llevarse a cabo a una o más temperaturas o puede ser un método de termociclaje. Preferiblemente, la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii) de un método de la invención de lleva a cabo isotérmicamente. Las reacciones de amplificación del ácido nucleico que se llevan a cabo isotérmicamente son aquellas reacciones de amplificación de ácido nucleico que no dependen del termociclaje para que la reacción de amplificación proceda.

Ejemplos de reacción de amplificación del ácido nucleico que no implican un paso de síntesis RNA que son apropiados para vigilar un método acorde con la invención incluyen tanto los métodos isotérmicos y también los métodos de termociclaje, tales como el PCR.

Los métodos isotérmicos que no implican un paso de síntesis RNA normalmente proceden por vía del desplazamiento de cadena. Tales métodos incluyen: La amplificación de círculo rodante (ver Fire, A. y Xu, S.Q. (1995) "Rolling replication of shore DNA circles", Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU, 92, 4641-4645), la tecnología de círculo rodante (ver <http://www.molecularstaging.com/Pages/RCATdetails.html>; el equipo de amplificación basada de el Phi29 de Amersham, códigos de producto: 25-6400-10 y 25-6400-50), la amplificación isotérmica de ramificación (Zhang, W. et al., "Detection of Chlamydia trachomatis by isothermal ramificación amplification methos: a feasibility study", J. Clin. Microbiol., enero 2002, 128-132), La amplificación del desplazamiento de cadena dependiente de la restricción de la endonucleasa (Walker, G.T., "Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme / DNA polymerase system", PNAS, (1992), 89, 392-396), la amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP) (Notomi, T., "Loop-mediated isothermal amplification of DNA", Nucl. Acids. Res., 2000, 28(12), e63, i-vii) y variantes de estos métodos. Las técnicas de amplificación de ácido nucleico isotérmico que no implican un paso de síntesis de RNA y que proceden por mecanismos de desplazamiento de cadena también se conocen como técnicas "isotérmicas de PCR". El descubrimiento de que un ensayo de bioluminiscencia basado en un ensayo de ELIDA puede ser usado para vigilar las reacciones de amplificación que procedan por el desplazamiento de cadena es sorprendente, dado el número de reacciones de fondo que ocurren debido a la temperatura baja de la reacción de amplificación.

Alternativamente, los métodos de termociclaje que no impongan un paso de síntesis de RNA pueden usarse en un método de la invención, siempre que todos los componentes de la reacción de amplificación y del ensayo de bioluminiscencia sean estables a las temperaturas a través de las cuales la reacción cicla. Preferiblemente, la reacción de termociclaje es un método de termociclaje a temperatura baja en la que las extensión primera se lleva a cabo en un rango de temperatura de diclaje que no exceda de 75°C y que preferiblemente no exceda del 70°C y que utilice una polimerasa de ADN moderadamente termoestable. Un ejemplo de tal método es LoTemp® PCR, que usa una polimerasa HiFi® ADN y que se describe en www.hifidna.com/FQAall.htm. Alternativamente, la reacción de termociclaje puede ser a una temperatura de termociclaje baja, la cual utiliza el fragmente Klenow de polimerasa de ADN I en la presencia de prolina (ver Investigación de Ácido Nucleico, (1999), 27(6), 1566-1568).

Ejemplos de reacciones de amplificación isotérmicas que implican un paso de síntesis RNA y que puede vigilarse mediante un método de la invención que incluye la amplificación de transcripción mediada (TMA) o la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Guatelli, J.C. et al., "Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modelled after retroviral replication", PNAS, (1990), 87, 1874-1878) y variantes de estos métodos.

La reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura dentro del cual los componentes de la reacción de amplificación y del ensayo de bioluminiscencia se mantengan estables. Preferiblemente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se llevan a cabo dentro de un rango de temperatura que no excede del 75°C. Más preferiblemente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura que no exceda del 70°C. Aún más preferiblemente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura que no exceda de 65°C. Lo más preferible es que la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura que no exceda del 60°C, es decir, un rango de temperatura dentro del cual la luciferasa termoestable Ultra-Glow de Promega sea suficientemente activa y estable para dar una salida de luz suficiente y estable a lo largo de la duración de la reacción de amplificación. Alternativamente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) puede llevarse a cabo dentro de un rango de temperatura que no exceda de 55°C, 50°C, 45°C o 40°C.

Preferiblemente, la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura que no descienda por debajo de los 20°C. Más preferiblemente, la reacción de amplificación de ácido

nuclieco del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura que no descienda por debajo de los 30°C. Aún más preferiblemente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura que no descienda por debajo de los 40°C. Alternativamente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) puede llevarse a cabo dentro de un rango de temperatura que no descienda de los 25°C, 35°C, 45°C, 50°C, 55°C o 60°C.

Preferiblemente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro de un rango de temperatura de 30°C a 75°C. Más preferiblemente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro del rango de temperatura de los 30°C a los 65°C. Por ejemplo, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) puede llevar a cabo dentro del rango de temperatura de los 45°C a los 65°C, 50° a 55°C o 35°C a 40°C. Se ha demostrado que el rango de temperatura de 50°C a 55°C es particularmente preferido cuando la polimerasa de ADN Bst (Stanesh, J. y Row, B.A., *Biochim. et Biophys. Acta* 272, 156 (1972)) se use en la reacción de amplificación, por ejemplo en LAMP y Círculo Rodante utilizando la polimerasa de ADN Bst (aunque la amplificación del Círculo Rodante puede usar las polimerasas también). Las polimerasas de ADN Bst funcionan mal por debajo de los 50°C y funcionan óptimamente a los 65°C. Sin embargo, por encima de los 55°C la salida de luz de la luciferasa Ultraglow es baja y, por tanto, es ventajoso usar la polimerasa de ADN Bst en los rangos de temperatura entre los 50°C y los 55°C. El uso de la polimerasa de ADN Bst en temperaturas más o menos elevadas en adición o en lugar de en el rango de 50°C a 55°C también se incluye dentro del ámbito de la invención, aunque esto puede requerir el uso de aparatos muy sensibles de detección o reducir la utilidad del método.

La reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) puede llevarse a cabo a una temperatura constante dentro de los rangos de temperatura especificadas arriba. En una realización preferida, la reacción de amplificación de ácido nucleico se lleva a cabo a 37°C. Por ejemplo, mediante el uso de una enzima de luciferasa mutante de luciérnagas que es estable a 37°C (la enzima de tipo silvestre rápidamente se inactiva a esta temperatura), se puede vigilar la generación del PPI durante la reacción de amplificación de ácido nucleico isotérmico, usando una reacción de ELIDA estándar. Un ejemplo de una enzima de luciferasa mutante de luciérnagas que es estable a los 37°C y que es apropiado para el uso en un método de la presente invención se describe por Tisi, L. et al. (Tisi, L. C et al., (2002) "Developmente of a thermostable firely luciferasa", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 457, 115-123).

Alternativamente, la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) puede llevarse a cabo a más de una temperatura dentro del rango preferido de temperaturas.

Cuando resulte que la luciferasa usada produce una intensidad de salida de luz total inferior al ensayo de bioluminescencia (ocurra o no la amplificación) cuando la temperatura a la que la reacción de amplificación de ácido nucleico se lleve a cabo se incrementa, es ventajoso que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se produzca a una temperatura más baja. Esto tiene la doble ventaja de que la intensidad de la salida de luz se incrementa y que la reacción de amplificación ocurre más lentamente. Una reacción de amplificación más lenta es particularmente beneficiosa para el análisis cuantitativa, ya que los datos que corresponden a varios puntos en que hay alguna variación en la tasa de cambio de la intensidad de luz con tiempo para muestras ocurriendo cantidades diferentes del ácido nucleico de modelo a lo largo de un período mayor de tiempo que cuando la reacción de amplificación se vigile a una temperatura más alta y, por tanto, se vigilan más fácilmente.

Sin embargo, llevarse a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico a una temperatura más baja podría potencialmente afectar la especificidad de la reacción de amplificación. Por ejemplo, podría haber una posibilidad mayor de resultados falsos positivos cuando la temperatura de la reacción de amplificación esté reducida, ya que la posibilidad de que iniciadores hibriden secuencias diferentes a la secuencia deseada incrementan a medida que la temperatura de la reacción de amplificación de ácido nucleico se reduce. Por tanto, la invención también proporciona un método en que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) es comenzado a una temperatura más alta y posteriormente desciende a una temperatura más baja. Preferiblemente, esta temperatura alta y baja están dentro del rango de temperaturas preferidas que se mencionó arriba. Esto tiene la ventaja de que la reacción de amplificación de ácido nucleico puede iniciarse a una temperatura más alta en la que la especificidad es mayor, antes de que la amplificación entre en una fase exponencial detectible, la temperatura puede bajarse para incrementar la intensidad de la luz y enlentecer el progreso de los resultados. Por ejemplo, la temperatura de la reacción de amplificación de ácido nucleico puede iniciarse a los 55°C y posteriormente reducirse a los 50°C, lo cual es especialmente ventajoso en realizaciones en que la reacción de amplificación de ácido nucleico utiliza la polimerasa de ADN Bst.

La temperatura relativamente baja de los métodos isotérmicos y el método termocíclico de temperatura baja comparado con métodos que utilizan el PCR de termociclaje convencional en que la temperatura se alza a los 95°C, permitiendo que se analicen volúmenes de muestras más pequeños. En particular, en realizaciones en que el rango de temperatura no exceda de 55°C, volúmenes exquisitamente pequeños pueden analizarse por un método de la invención. Por ejemplo, volúmenes de muestra de menos de 10µl e incluso volúmenes de muestra de menos de 1 µl pueden analizarse por un método de la invención. Las temperaturas altas requeridas en PCR convencional hacen que volúmenes muy pequeñas de muestras sean un desafío técnico. La capacidad de analizar volúmenes de muestras muy pequeñas también tiene la ventaja de reducir los gastos de reactivos.

Por tanto, en una realización preferida, un método de la invención requiere que en la reacción de amplificación del paso ii), la reacción de polimerasa se lleve a cabo isotérmicamente y que la luciferasa que se use sea estable a esa temperatura. Esto ofrece las siguientes ventajas:

- 5 i) la reacción de amplificación isotérmica de ácido nucleico puede vigilarse continuamente en tiempo real;
- ii) la reacción de amplificación isotérmica de ácido nucleico puede vigilarse en un sistema totalmente cerrado, sin la necesidad de la adición de reactivos complementarios;
- 10 iii) la temperatura relativamente bajo del ensayo permitirá que los volúmenes exquisitamente pequeños se analicen (la temperatura alta de PCR convencional hacen que los volúmenes de muestras muy pequeños sean un desafío técnico para reducir gastos de reactivos); y
- 15 iv) una cámara sencilla de CCD puede usarse para vigilar simultáneamente miles de reacciones isotérmicas de PCR.

Es una característica de la invención que el PPI del síntesis de ácido nucleico durante la amplificación de ácido nucleico puede detectarse cuando el ácido nucleico que ha sido sintetizado no sería detectable por electroforesis de gel, resultando en sensibilidad incrementada y tiempos de reacción reducidos. Es más, mientras que el método de turbidez de Mori et al (Mori, Y. et al., *Biolchem. Biophys. Res. Comm.*, (2001) 289, 150-154) requiere concentraciones de PPI de -0,6 mM antes de que turbidez significativa se observe, utilizando un ensayo de pirofosfato en que una enzima se usa que convierte el PPI al ATP, concentraciones de PPI de menos de 0,5 μ M resultan en una relación lineal entre la concentración de PPI y la bioluminescencia (Nyren & Lundin, *Bioquímica Analítica*, 151(2), 405-409 (1985)). Esto representa un incremento de la sensibilidad de un método de la invención para detectar el PPI de al menos 1.200 veces por encima de un ensayo de turbidez. Los métodos de la invención también son más sensibles que los métodos basados en la fluorescencia.

Un método acorde con la invención puede ser útil en las aplicaciones médicas diagnósticas. En este momento, la mayoría de los centros de pruebas diagnósticas necesitan enviar sus pruebas para análisis, ya que los métodos convencionales de analizar las reacciones de amplificación de ácido nucleico, tales como el PCR requieren de equipos complicados y ópticas. El uso de un método como se describe arriba permitirá que se analicen los resultados de las pruebas en el lugar de atención. Por ejemplo, podría usarse en clínicas de salud sexual, por ejemplo para ver si un patógeno, tal como una bacteria particular o virus está presente en una muestra. Podría también usarse para determinar la cantidad de bacteria (p.ej., la *Chlamydia*, en particular la *Chlamydia Trachomatis* o *E.Coli*) o virus presente en una muestra, por ejemplo, para determinar la extensión de una infección.

Una aplicación posterior de un método acorde con la invención es para determinar si una secuencia de ácido nucleico particular está presente en el código genético de un organismo. Por ejemplo, podría utilizarse para determinar si un ácido nucleico en el que un ácido nucleico de modelo ha originado ha sido modificado genéticamente, para detección de ADN asociado con una especie de planta no modificada genéticamente o una especie de planta genéticamente modificada, para detección de ADN asociado con razas pedigrís de animales o para aplicaciones diagnósticas médicas o veterinarias, tales como las pruebas genéticas o la forense.

Un método acorde con la invención puede usarse para detectar la presencia de un organismo en una muestra. Como se ha dicho arriba, este organismo puede ser un patógeno. Sin embargo, el método puede también usarse para detectar un organismo no patógeno.

Un método de la invención puede también usarse en la tecnología de amplificación de ácido inmunonucleico (por ejemplo, ver Sano, T. et al., (1992) *Science*, Vol. 258, 120-122) (p.ej. para la identificación de un ácido nucleico de modelo particular enlazado a un anticuerpo). El método también es apropiado para el uso *in situ* cuando las técnicas como la fluorescencia o absorbancia serían técnicamente difíciles de usar. Por ejemplo, un método de la invención podría usarse en una superficie de metal. Por tanto, un método de la invención podría usarse, por ejemplo, para buscar priones en la cuchilla de un escalpelo.

55 Un equipo para uso en un método acorde con la invención se describe.

Un equipo para uso en un método acorde con la invención preferiblemente comprende una polimerasa de ácido nucleico, los sustratos de la polimerasa de ácido nucleico, al menos dos iniciadores, una luciferasa termoestable, la luciferina y una enzima que convierte el PPI al ATO, en la que dicha enzima no es una sulfurilasa y cualesquiera otros sustratos o cofactores requeridos de la enzima que convierte el PPI al ATP. Más preferiblemente, el equipo comprende también reactivos de amortiguación, tales como un fuente de iones de magnesio. Alternativamente, un equipo para el uso en un método acorde con la invención puede comprender sólo algunos de estos componentes y/o componentes adicionales. La muestra y cualesquiera otros componentes que han sido omitidos del equipo pueden luego añadirse al equipo durante su uso.

65 Por ejemplo, un equipo para el uso en un método de la invención puede comprender contenedores que contienen

respectivamente:

- a) una mezcla amortiguado de polimerasa de ácido nucleico, una fuente de Mg y dNTPs; y
 b) una luciferasa, luciferina y una enzima que convierte el PPi al ATP, en las que dicha enzima no es una sulfurilasa de ATO.

Uno o más de los dNTPs o NTPs en el equipo pueden reemplazarse con un dNTP apropiado o análogo NTP. Por ejemplo, cuando el equipo se use en un método en el que la reacción de amplificación del paso ii) implique un paso de síntesis RNA, el ATO puede reemplazarse con un análogo de ATO que puede ser usado por una polimerasa de RNA, pero no por la luciferasa.

Preferiblemente, al menos uno de los componentes del equipo está liofilizado o está en otra forma apropiada para el almacenamiento en el equipo. Más preferiblemente, todos los componentes del equipo están liofilizados o en una o más formas apropiadas para el almacenamiento. Tales otras formas incluyen los componentes a los cuales los factores estabilizantes han sido añadidos y/o una mezcla de reacción refrigerada o congelada que contenga los componentes del equipo.

Una forma preferida del equipo es un circuito "líquida" en miniatura. Preferiblemente, un equipo para su uso en la presente invención será el tamaño de una tarjeta de crédito para una facilidad e uso.

Un equipo para uso en un método acorde con la invención puede ser usado para analizar una muestra a la vez o más de una muestra a la vez. Por ejemplo, un equipo para uso en un método acorde con la invención puede ser usado para vigilar 2, 3, ..., 50, ..., 100, ... 200 hasta los 1000s de muestra a la vez.

En realizaciones en que un método de la presente invención se usa para vigilar más de una muestra a la vez, el método puede ser para detectar la presencia de un ácido nucleico de modelo de la misma secuencia en cada muestra o puede ser para detectar la presencia de ácido nucleico de modelo, teniendo secuencias diferentes en muestras diferentes.

Los resultados pueden exponerse en una tarjeta de prueba que exponga los resultados de una muestra o de más de una muestra. Preferiblemente, la tarjeta de muestra es del tamaño de una tarjeta de crédito para su facilidad de uso.

También descrito es un dispositivo para llevar a cabo un método de la invención y que incorpora los componentes que están presentes en un equipo para su uso en la invención. Por ejemplo, un dispositivo preferiblemente incorpora una polimerasa de ácido nucleico, los sustratos de la polimerasa de ácido nucleico, al menos dos iniciadores, una luciferasa termoestable, la luciferina, una enzima que convierte el PPi al ATP, en la que la enzima no es una sulfurilasa de ATO y otros sustratos o cofactores requeridos de una enzima que convierten el PPi al ATO.

La invención ahora será descrita por medio de ejemplo con referencia a las siguientes cifras, en las que:

La Figura 1 muestra un marco usado para seguir la reacción LAMP;

La Figura 2 muestra el rendimiento del LAMP en la presencia de ADN de modelo y en un control sin la polimerasa de ADN Bst;

La Figura 3 muestra los resultados de muestras duplicadas LAMP y controles duplicados;

La Figura 4 muestra los resultados de muestras preparadas como en Figuras 2 & 3, pero mostrando diferencias en la intensidad de luz absoluta;

La Figura 5 muestra los perfiles de emisión de luz para LAMP, usando cantidades diferentes de duplicados a 55°C;

La Figura 6 muestra el tiempo hasta emisión máxima de luz;

La Figura 7 muestra una curva del rendimiento crudo de la reacción LAMP en triplicado;

La Figura 8 muestra curvas del 1º derivativo de las curvas de la Figuras 7;

La Figura 9 muestra una comparación de controles a muestras;

La Figura 10 muestra una reacción LAMP en la que la temperatura se disminuye de los 55°C a los 50°C después de 10 minutos;

La Figura 11: Curva de intensidad de luz contra tiempo para LAMP usando PPDK como la enzima que convierte el PPi al ATP y comparando esto a la reacción de LAMP usando la sulfurilasa de ATP como la enzima que convierte el PPi al ATP y también a dos controles de los que la polimerasa de ADN Bst está ausente;

La Figura 12: Amplificación de Círculo Rodante y ELIDA, usando concentraciones diferentes de modelo; y

La Figuras 13: Período del pico de la señal para Amplificaciones de Círculo Rodante y ELIDA.

5

EJEMPLOS

Los ejemplos 1 a 5 y 7 a 14 utilizan la sulfúrilasa de ATP como un ejemplo de una enzima que convierte el PPI al ATP. Ejemplos 1 a 5 y 7 que usan la sulfúrilasa ATP ilustran la invención en práctica. Es más, ejemplos 8 a 14 (aunque basado en un método analítico de puntos finales) ilustra como la reducción de interferencia del dATP puede lograrse. Sin embargo, como se ha mencionado antes, el uso de la sulfúrilasa de ATP como la enzima que convierte el PPI al ATP está específicamente excluido del ámbito de las reclamaciones y, por tanto, los ejemplos 1 a 5 y 7 a 14 no caen dentro del ámbito de las reclamaciones. Sin embargo, la persona experimentada también sería capaz de adaptar los métodos ilustrados en ejemplos 8 a 14 y aplicarlos a un método de la presente aplicación. El uso de un método que no cae dentro del ámbito de las reclamaciones se ilustra en el Ejemplo 6.

15

Ejemplo 1: Demostración de un método de la presente invención

La reacción de amplificación isotérmica de ácido nucleico conocida como amplificación mediada por asas (LAMP) se seleccionó para ejemplificar el potencial para usar un ensayo sencillo de bioluminiscencia para seguir la amplificación de ácido nucleico en tiempo real.

20

La manifestación presente, más rápida del método LAMP usa seis iniciadores. Esta manifestación ha sido demostrada para detectar 10^5 copias del ADN diana en sólo 15 minutos (Nagamine et al. 2002 Sondas moleculares y celulares, 16, p223-229). Las reacciones LAMP normalmente operan a 60-65°C y requieren al menos 4mM de iones de magnesio.

25

Para demostrar un rendimiento de bioluminiscencia en tiempo real de una reacción LAMP en particular, ha sido necesario buscar medios de bajar la temperatura en que la reacción de LAMP opera. Esto es debido al hecho de que a temperaturas tan altas como 65°C, incluso la luciferasa más termoestable de escarabajo conocida a fecha de hoy (la luciferasa termoestable Ultra-Glow de Promega) no es suficientemente activo y/o estable para dar salida de luz suficiente y estable a lo largo de la duración de una amplificación LAMP (alrededor de 45 minutos o más puede ser necesario para confirmar que una muestra no contiene ninguna molécula de ADN diana particular).

30

Ha sido reconocido que la bajada de las concentraciones de los iones de Magnesio de 4mM a 2mM permiten que las reacciones LAMP operen exitosamente a temperaturas bajas. Es más, las concentraciones altas de Betaína pueden reducir la capacidad de las reacciones de LAMP para operar exitosamente a temperaturas más bajas. Finalmente, agentes estabilizantes apropiados que no interfieren con la reacción LAMP fueron seleccionados e incluidos en las formulaciones. Como resultado, fue posible formular condiciones en que el ensayo de bioluminiscencia podría ocurrir simultáneamente con una reacción LAMP a lo largo de un período completo de amplificación.

35

40

Materiales de partida:

45

1) Mezcla de reacción (menos la polimerasa de ADN Bst o ADN diana)

Cantidad	Reactivo	Suministrador
20mM	Tris-acetato	Sigma
10 mM	KCl	"
10 mM	Sulfato de amonio	"
2 mM	Sulfato de magnesio	"
0,10% V/V	Triton X-100	"
0,5% W/V	BSA	"
5% W/V	Trehalosa	"
0,4mg/ml	Polivinilpirolidona	"
9mM	Ditiotreitol	Melford
100µg/ml	D-luciferina (sal potásico)	Europa
54ng/ml	rLuciferasa Ultra-Glow	Promega
100µM	Fosfosulfato Adenosina 5'	Sigma
0,5U/ml	Sulfúrilasa ATP	"
250µM	Cada uno de los cuatro dNTPs	Mersham Biosci.
0,8µM	Iniciador LAMP B1cB2	PNAC Cambridge UK
0,8µM	Iniciador LAMP F1F2c	"
0,4 µM	Iniciador LAMP asa B	"
0,4 µM	Iniciador LAMP asa F	"
0,2 µM	Iniciador LAMP B3	"
0,2 µM	Iniciador LAMP F3c	"

65

5

pH 8,8 @ 25°C (ver abajo para secuencia de iniciador)

2) Polimerasa de ADN

10

8U/μl Polimerasa de ADN Bst New England Biolabs

3) ADN diana

15

**catgaattcgtcaagtctacgataacttagcgcttaggatgacagatacttatgatgataagctgatagactatcttgcctggaagctta
cttcataatggatgacgtatgccatgatagataaccattgtctagacataagactttcaatctgcatagtcgatcgcgatccatgctcgag
tccaagctagtcgatagcttatcatcaactgaatctagtaagtcattgaattctag**

20

Secuencia de iniciación:

25

Lamp B1cB2: tat cat ggc ata cgt cat cca ttt tta taa gct gat aga cta tct tgc
Lamp F1F2c: tca atc tgc ata gtc atg atc gtt ttt tga tga taa gct atg act agc
Lamp asa B: tat gaa gta agc ttc cag
Lamp asa F: atc cat gct cga gtc caa
Lamp B3 iniciador atg tca gat act tat gat g
Lamp F3c iniciador aat gac tta cta gat tca g

30

Método

35

A un tubo de PCR de 200μl, 18,6μl de la mezcla de reacción fue añadido, seguido por 1μl de 0,4ng/μl ADN diana y 0,4μl de polimerasa de ADN Bst. Como un control, en otro tubo PCR de 200μl, 18,6μl de la mezcla de reacción fue añadido y 0,4ng/μl del ADN diana fueron añadidos, pero ninguna polimerasa de ADN Bst.

40

Las muestras fueron ubicadas en un bloque de calefacción sujeta a 50°C que había sido colocado dentro de un gabinete ligero de Syngene Genegenius (www.syngene.co.uk). Usando el software de Syngene Genesnap (www.syngene.co.uk), la emisión de luz de las muestras fue grabada (por las tapas cerradas de los tubos de PCR) en una serie de imágenes tomadas con un cámara CCD dentro del gabinete ligero Syngene (Figura 1). Cada imagen representó la emisión de luz integrada de la muestra a lo largo de un período de 1 minuto.

45

Un total de 40 cuadros fueron grabado, por lo que la reacción de LAMP fue observada durante un total de 40 minutos.

Resultos

50

Usando el software de Syngene, la salida de luz de cada una de las muestras fue cuantificada como una función de tiempo. Los resultados obtenidos se muestra en la Figura 2.

55

Usando el electroforesis de gel de agarosa, se confirmó que la "muestra" (con el ácido nucleico de modelo) había amplificado cantidades significativas de ADN mientras que el control no había sintetizado nada.

Una serie de características fueron observadas en relación a la emisión de luz que resultó en el caso de la amplificación:

- i) Inicialmente, la tasa de disminución de luz para la muestra y la del control eran parecidas;
- ii) Después de un período, la intensidad de luz de la muestra empezó a aumentar, mientras que el control continuó disminuyéndose paulatinamente;
- iii) La tasa de incremento de la emisión de luz de la muestra aumentó, alcanzó un máximo, luego disminuyó hasta que se alcanzó un punto en que la magnitud más grande de emisión de luz durante la reacción de LAMP se registró;
- iv) A continuación de este máximo de emisión de luz de la muestra, una disminución de emisión de la luz se observó;
- v) La tasa de disminución de la emisión de luz aumentó tras de la emisión máxima de luz y la magnitud de la emisión de luz se hizo menos que aquella del control;

vi) La tasa de disminución de la emisión de luz disminuyó y eventualmente se hizo similar a la del control.

vii) Tras 40 minutos, la magnitud de la emisión de luz de la muestra fue considerablemente menos que la del control, aunque, en este caso, la intensidad de partida de la luz de la muestra fue ligeramente más alta (lo que se relaciona con el hecho de que la emisión de luz de las muestras no fue procesada de un modo que se tendría en cuenta la posición relativa de las muestras relativas a la cámara).

Se plantea que la disminución de la intensidad de la luz tras el punto máximo de la intensidad de la luz como resultado de que la luciferasa se inhiba por el pirofosfato. Como tal, en un método acorde con la invención, el pico en la intensidad de la luz representa un punto en el tiempo en que una cantidad específica de pirofosfato se ha acumulado. Por tanto, el pico en la intensidad de la luz representa un punto en el tiempo en que una cantidad específica de ADN ha sido sintetizada.

Ejemplo 2: Reproducibilidad del método de la invención utilizando la reacción de amplificación LAMP

El mismo procedimiento que en el ejemplo 1 se llevó a cabo, excepto que las muestras múltiples se usaron para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos de la reacción de LAMP.

Materiales y métodos de partida

Como en el ejemplo 1, excepto la muestra y control fueron llevados a cabo en duplicado o triplicado y las temperaturas de la reacción se alzaron a los 55°C.

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 3. El mismo progreso de la curva de muestra como en el Ejemplo 1 se ve en este caso.

En este ejemplo, tanto la tasa de cambio de la emisión de luz y el tiempo a emisión máxima de luz son extremadamente similares para las dos muestras. Otra vez, la generación de ADN amplificado en las muestras fue confirmada por el electroforesis de gel de agarosa. Para los controles, mientras que la tasa de cambio de la emisión de luz para los dos casos es similar, hay una pequeña diferencia en el valor absoluto. Otra vez, se cree que es por los efectos asociados a la captura de luz por el sistema usada y no el aspecto bioquímico. No obstante, incluso sin la manipulación de datos, resultados claros pueden extraerse.

En algunos casos, la intensidad absoluta de la luz observada dentro de, por ejemplo, las muestra triplicadas podría variar, debido a los efectos de captura de luz. No obstante, la tasa de cambio de luz y el tiempo a la emisión máxima de luz es similar (Figura 4).

Ejemplo 3: Uso de un método de la invención de un modo cuantitativo

Materiales y métodos de partida

El procedimiento explicado en el ejemplo 1 se repitió pero con cantidades diferentes de ADN diana en las muestras. Muestras duplicadas se constituyeron, conteniendo un total de 0,4ng, 40pg, o 0,4pg de ácido nucleico de modelo. La temperatura de la reacción LAMP fue de 55°C.

Resultados

Los perfiles de emisión de luz resultante para cada una de las muestras se expone en la figura 5. Los resultados conseguidos en la Figura 5 demuestran una característica clave de los métodos de la invención. Mientras que no hay una correlación convincente entre la cantidad de modelo diana y emisión de luz absoluta, hay una relación clara entre el tiempo a la emisión máxima de luz o el tiempo a cambios en la tasa de cambio de la emisión de luz.

Una curva de tiempo a emisión máxima de luz contra la cantidad de ADN diana demuestra que la correlación es cuantitativa (ver Figura 6a en que el tiempo a la emisión de luz máxima tiene una correlación lineal con el log₁₀ de la concentración de ADN diana de modelo en la muestra). En la Figura 6b, el tiempo para producir 25% de la cantidad total final del amplicón está trazado con el tiempo a la emisión máxima de luz y puede verse que los dos parámetros muestran correlación. Por tanto, comparando los tiempos a emisión máxima de luz contra los resultados obtenidos con el electroforesis de gel de agarosa demuestra que el tiempo a la emisión máxima de luz refleja la acumulación del amplicón y, por tanto, la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.

Ejemplo 4: Manipulación de datos de resultados de un método de la invención en que la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción LAMP

El mismo procedimiento que en el ejemplo 1 se llevó a cabo otra vez, pero usando muestras múltiples para comprobar la reproducibilidad de resultados obtenidos en la reacción LAMP después de ciertos datos simples de

manipulación de datos crudos había se había llevado a cabo. Específicamente, el 1º derivativo de las salidas se trazaron.

Materiales y métodos de partida

5 Estos fueron como en el Ejemplo 1, excepto que la muestra y el control se llevaron a cabo en triplicato, la temperatura era de 50°C y el total de 1ng de modelo se usó en cada muestra.

10 La Figura 7 muestra una curva de datos crudos de un método de la invención en estas muestras. Al trazarse la tasa de cambio en la emisión de luz a lo largo del tiempo en comparación a la intensidad de luz a lo largo del tiempo (es decir, trazando el 1º derivativo), los puntos de inflexión están señalados. En particular, regiones de las curvas mostradas en la Figura 7 que van por el mínimo o el máximo cruzan el eje Y en el punto cero, cuando el 1º derivativo de la curva se traza (Figura 7). Mientras que la magnitud de las intensidades muestran variancia considerable, los puntos de inflexión dentro de los conjuntos de las curvas son similares.

15 Las curvas de la Figura 8 para las muestras en que las reacción de amplificación LAMP han ocurrido muestra dos puntos cruzando el eje Y. La primera representa el primer punto de inflexión de la Figura 7 y la segunda representa el punto máximo de intensidad de luz. El mínimo y el máximo expuestos en la Figura 8 señalan puntos de tiempo asociados con tasas máximas de cambio en la emisión de luz. Todos los cuatro puntos de datos (los dos cruces del eje Y y el mínimo y máximo) muestran buena superposición entre las muestras triplicadas. Nota que el primer cruce de eje Y ocurre caso diez minutos antes del segundo.

20 La Figura 9 muestra un imagen expandido de las curvas de la figura 8 y señalan como el trazado del 1º derivativo diferencia la muestra del control.

25 Por tanto, debido al contenido inherente de la información de los datos crudos de un método de la invención usando una reacción LAMP, incluso manipulación muy simple de datos, tal como tomar el 1º derivativo, no solamente permite que puntos claros en las curvas resultantes se identifiquen (curvas en el eje-Y y máximo y mínimo), pero también hace que los resultados sean menos sensibles a la magnitud de las señales de luz (p.ej. en comparación a la superposición de las curvas en las Figuras 7 y 8 - en Figura 8 la superposición es más similar.

Ejemplo 5: Cambiando la temperatura de la reacción de amplificación durante la amplificación

35 El método LAMP puede funcionar a lo largo de un rango de temperatura de aproximadamente 45°C a 65°C. Sin embargo, cuánto más alta sea la temperatura en que opere la reacción LAMP, cuanto menor será la intensidad total de luz de un método de la invención (con independencia de si la amplificación ocurre o no). Esto es debido a la luciferasa termoestable particular usada (la luciferasa Ultra-glow de Promega) aparentemente catalizando la reacción de luz en una tasa menor a temperaturas más altas. Por tanto, la tasa de emisión de luz observada para la luciferasa Ultra-Glow a 55°C es considerablemente menor que la observada a 50°C. Sin embargo, al enfriarse de, p.ej. 55°C a 50°C, se observa un incremento en la tasa de emisión de luz catalizada por la luciferasa Ultra-Glow, siendo el efecto claramente reversible. La reversibilidad implica que la disminución observada en la emisión de luz a temperaturas altas no es solamente el resultado de la que la luciferasa se denaturaliza.

40 Produciéndose una reacción LAMP a una temperatura más baja aumenta la emisión de luz del ensayo. Es más, operándose LAMP a temperaturas más bajas puede enlentecer la propia reacción. Esto puede ser beneficioso en ciertas circunstancias. Por ejemplo, cuando se use un método de la invención cuantitativamente, puede haber beneficios de enlentecer la amplificación para que los períodos necesarios para alcanzar, p.ej. la emisión de luz máxima para muestras con cantidades diferentes de modelo diana, están más claramente separados en el tiempo que cuando la reacción LAMP se opera a una temperatura más alta.

45 Sin embargo, llevando a cabo reacciones de LAMP a temperaturas más bajas podría potencialmente afectar la especificidad del proceso, es decir, podría haber una probabilidad mayor de un resultado falso positivo al reducirse al temperatura del LAMP. Dicho de otra manera, las posibilidades de que los iniciadores recozcan a secuencias diferentes a la secuencia diana deseada, aumenta a medida que la temperatura de la reacción LAMP se reduce.

50 Una posible solución para aprovechar los beneficios de llevarse a cabo la reacción LAMP a temperaturas bajas a la vez que se mantiene la especificidad máxima es cambiar la temperatura durante la reacción LAMP. Específicamente, la reacción LAMP puede iniciarse a una temperatura más alta en que la especificidad es mayor, y después, una vez que la amplificación abarca una fase exponencial detectable, la temperatura puede bajarse para aumentar la intensidad de la luz y enlentecer el progreso de los resultados.

Materiales y métodos de partida

55 Como en el Ejemplo 1, excepto que una variedad de muestras fueron puestas a prueba con cantidades diferentes de modelo diana como en el Ejemplo 3 (a lo largo del rango 0,02pg/μl a 20pg/μl, es decir, 0,4pg de muestra total a 0,4ng de muestra total). La reacción de LAMP se inició a 55°C y después la temperatura se bajó a los 50°C después de 10

minutos.

Resultados

5 Los datos crudos obtenidos del de cambio de temperatura se expone en la Figura 10. Los datos expuestos en la
 Figura 10 muestran que el método de cambio de temperatura resulta en un incremento en la intensidad de la
 10 emisión de luz en la caída de temperatura. Es más, el LAMP permanece cuantitativo, en que el tiempo a emisión
 máxima de luz permanece una función de la cantidad de comienzo del ADN de modelo. Comparando la Figura 10
 con la Figura 5, en que cantidades equivalentes de modelo diana se ponen a prueba con LAMP, pero a una sola
 temperatura de 55°C, puede observarse que la diferencia de tiempo entre la muestra con el más modelo (0,4ng
 total/20pg/ul) y menos modelo (0,4pg total/0,2pg/ul) es aproximadamente de 8 minutos, mientras que el método de
 cambio de temperatura expuesta en la Figura 10, la diferencia de tiempo es aproximadamente de 14 minutos.

15 De hecho, las temperaturas mayores de 55°C pueden inicialmente usarse, ya que, aunque la luciferasa Ultra-Glow
 empieza a se inestable por encima de los 60°C, puede tolerar estar a temperaturas más altas durante periodos
 cortos. Este proceder, por tanto, aumenta los rangos de temperatura disponibles.

20 Es más, este proceder puede permitir que luciferasas menos estables se empleen, donde la reacción de
 amplificación no requiere de períodos largos a temperaturas que pueden inactivar irreversiblemente la luciferasa.

Finalmente, mientras que los falsos positivos claramente todavía pueden ocurrir con el uso del método de cambio de
 temperatura, deberían ser menos comunes debido a la exigencia incrementada de las temperaturas altas en la fase
 clave inicial de amplificación (es decir, justo antes de la fase exponencial).

25 Ejemplo 6: Uso de PPDK como una enzima que convierte el PPI al ATP

El uso de PPDK como una enzima que convierte el PPI a ATP, en que la reacción de amplificación de ácido nucleico
 es una reacción LAMP, se puso a prueba. Los componentes del ensayo eran:

30 Materiales de partida:

1) Mezcla reactiva (menos polimerasa de ADN-Bst o ADN diana)

35

40

	Cantidad	Reactivo	Suministrador
45	20mM	Tris-acetato	Sigma
	10 mM	KCl	"
	10 mM	Sulfato de amonio	"
	2 mM	Sulfato de magnesio	"
	0,10% V/V	Triton X-100	"
50	0,5% W/V	BSA	"
	5% W/V	Trehalosa	"
	0,4mg/ml	Polivinilpirolidona	"
	9mM	Ditiotreitol	Melford
	100µg/ml	D-luciferina (sal potásico)	Europa
55	2,8mM	Fosfoenolpiruvato	Sigma
	50µM	AMP	Sigma
	54ng/ml	Ultra-Glow rLuciferasa	Promega
	1 U/ml	PPDK	Kikkoman
	250µM	Cada uno de los cuatro dNTPs	Amersham Biosci.
60	0,8µM	Iniciador LAMP B1cB2	PNAC Cambridge UK
	0,8µM	Iniciador LAMP F1F2c	"
	0,4 µM	Iniciador LAMP asa B	"
	0,4 µM	Iniciador LAMP asa F	"
	0,2 µM	Iniciador LAMP B3	"
65	0,2 µM	Iniciador LAMP F3c	"

pH 8,8 @ 25°C (ver abajo para secuencia de iniciadores)

5 Los resultado expuestos en la figura 11 muestra que la curva de intensidad de salida d eluz como un función de tiempo usando PPDK es, en gran medida, similar a la curva obtenida susando la sulfurilasa ATP. Sorprendentemente, la señal de luz de fondo al comienzo del ensayo con PPDK es sólo ligeramente menor a l con la sulfurilasa de ATP: esto es sorprendente, ya que la adenosina 5' fosfosulfato ("APS") (usado en el sistema de sulfurilasa de ATP) es un sustrato de luciferasa que se cree que contribuye al fondo de la emisión de luz. Sin embargo, el PPDK no usa el APS y pesa a ello tiene un fondo de la misma orden de magnitud que el sistema de sulfurilasa de ATP. Es más, con el PPDK, hay un incremento continuo de intensidad de luz antes del incremento rápido de intensidad de luz. En los dos casos, la curva difiere considerablemente del control en que la polimerasa de ADN BST está presente.

15 Ejemplo 7: Amplificación de Círculo Rodante y ELIDA, usando concentraciones diferentes de modelo

Las Figuras 12 y 13 muestran que la Amplificación de Círculo Rodante, como con el LAMP, da picos de luz en períodos proporcionales a la cantidad del modelo de partida.

20 Ejemplo 8: Uso de filtros para remover la luz contribuida de bioluminescanecia estimulada de dATP

El amortiguador de ensayo de pirofosfato (PAB) se hizo como sigue:

25	0,1M	Tris-acetato	Sigma
	2 mM	EDTA	"
	10 mM	Acetato de magnesio	"
	0,1%	Albúmina de suero bovino	"
	5 µM	Adenosina 5' fosfosulfato	"
	0,4 mg/ml	Polivinilpirolidona (360.000)	"
30	0,3 U/ml	Sulfurilasa ATP	"
	100 mg/ml	D-luciferina	Europa
	5,5x10 ⁸ unidades de luz	Luciferasa fótina de piralo	Promega
	1 mM	Ditiotreitol	Melford

35 Soluciones de sodio pirofosfato (Sigma) se confeccionaron en el momento y se almacenaron en hielo.

40 50 µl de PAB se alicuotaron en dos pozos de un plato de pozo de 96. A una muestra se añadió 15 µl de 0,1 mM pirofosfato de sodio; a la otra se añadió 1 5 µl de 2 mM dATP. La emisión de luz resultante se observó usando la caja de luz Syngene con una cámara CCD en blanco y negro, integrando la señal a lo largo de 5 segundos. Mientras que a muestra en que el pirofosfato se añadió en mucho más brillante, hay emisión de luz significativa de la muestra dATP. La cantidad de dATP añadida es equivalente a 1/5 de la cantidad usada en una reacción PCR estándar de 505 µl. De allí que la contribución del dATP a la bioluminescencia es significativa.

45 Un filtro verde se colocó delante del lente de la cámara CCD y la muestra arriba se observó de nuevo. Podría claramente verse cque la presencia del filto verde redujo marcadamente la seña de la muestra dATP relativa a la muestra de pirfosfato. Estoera en virtud de la emisión de luz de la muestra de dATP, teniendo una emisión máxima de luz a 620 nm, meintras que la emisión del ATP está a un máximo de 550 nm (a pH 7,8). De allí, el filtro verde bloqueó más de la luz de la muestra dATP.

50 Ejemplo 9: PCR usando e. dATP análogo d-a-SATP

Una reacción de PCR 50 µl contiene lo siguiente:

55	5 µl	Tris-HCl	100 nM	Sigma
	4 µl	Clorida de magnesio	50 nM	Gibco
	5 µl	d-a-SATP	2 mM	Glen research
	5 µl	dCTP	2 mM	Farmacia
	5 µl	dGTP	2 mM	Farmacia
	5 µl	dTTP	2 mM	Farmacia
60	1 µl	Plásmido de prueba pPw601a	0,5 ng/µl	
	1,25 µl	Iniciador 1	10 µM	
	1,25 µl	Iniciador 2	10 µM	
	0,5 µl	Polimerasa Taq	5 U/ µl	Roche
65	19 µl	Agua Milli-Q		

Las secuencias de los iniciadores 1 y 2 y el plásmido se dan en SEQ ID N^{os} 1, 2 y 3, respectivamente. El tamaño del producto PCR esperado era de 158 bp.

5 µl de marcador molecular de peso "escalera inteligente" de Eurogentec se usó en electroforesis de gel. 2 µl de 10 mg/ml bromida de etidio se añadió a los geles e agarosa y al amortiguador de gel.

La polimerasa taq se añadió a la muestra después de calentarse a 95°C durante 30 segundos. Los siguientes parámetros de ciclaje se implementaron en un sistema de PCR Perkin-Elmer GeneAmp 2400.

95°C	30 segundos
(Adición de polimerasa taq)	
95°C	30 segundos
95°C	30 segundos
55°C	30 segundos
72°C	5 segundos
72°C	20 segundos

(30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 5 segundos a 72°C)

10 µl de la reacción resultante de PCR se cargó en un gel de agarosa de 10%, conteniendo bromida de etidio, junto al marcador molecular de peso. el gel se operó a 60V durante 50 minutos y después se visualizó bajo un transiluminador. Podría observarse que el producto PCR se generó usando d-a-SATP en lugar de dATP. Bajo las mismas condiciones, si el dATP se usa en su lugar, pero a 1/10 de la concentración habitual de 0,2 mM, ningún producto PCR se detecta. Esto muestra que el producto PCR producido usando d- a-SATP no es simplemente el resultado de la contaminación por dATP, ya que el d-a-SATP era más de 98% puro; de allí que el producto de PCR no podría haber ocurrido como consecuencia de la contaminación del dATP.

Ejemplo 10: Detección de pirofosfato de la reacción PCR, usando d-a-SATP

Tres reacciones PCR se practicaron en Ejemplo 9. Una de las muestras no estaba sujeta a termociclaje, el remanente fueron termocicladas, pero a una no se le había añadido el Taq. El resultado esperado era que sólo la muestra termociclada con el Taq produciría un producto PCR. Esto se confirmó por el electroforesis de gel. 5µl de cada reacción de PCR se añadió a 25 µl de amortiguador de ELIDA en una placa de 96 pozos. Emisiones de luz de las muestras se midieron usando una cámara CCD y se demostró que la emisión de luz de las muestras, al ensayarse para pirofosfato, claramente corresponde al resultado de gel.

Ejemplo 11: Detección de pirofosfato de la reacción PCR usando dATP

Las reacciones de PCR se operaron como en el Ejemplo 9, excepto que el dATP se usó en lugar de d-a-SATP, es decir, las condiciones estándar de PCR se usaron. Dos muestras se prepararon, una con el modelo de ADN correcto presente. El resultado esperado era que sólo la muestra con el modelo correcto produciría el producto PCR. Habiéndose llevado a cabo la reacción de PCR, las muestras se analizaron por electroforesis de gel. 5 µl de cada reacción de PCR luego de añadió a 25 µl de reactivo de ensayo ELIDA y la luz emitida detectada con la cámara CCD equipada con un filtro verde, como en el Ejemplo . La emisión de luz detectada corresponde con aquella del electroforesis de gel, tal que el ensayo de ELIDA es capaz de indicar correctamente qué muestra ha producido exitosamente el producto PCR.

Ejemplo 12: La cuantificación y sensibilidad de detección del producto PCR

Siete muestras PCR se prepararon como en Ejemplo 9 (es decir, usando d-a-SATP). Durante el termociclaje, uno de los tubos se quitó y se colocó en hielo tras cada 5 ciclos hasta los 35 ciclos de la reacción PCR. La producción del producto PCR se analizó usando de electroforesis de gel. 5 µl de cada una de las muestras se añadió a 25 µl de amortiguador de ELIDA y la luz emitida se registró con la cámara CCD. La figura 14 (un gráfico de luz contra el número de ciclos de PCR) muestra que, no solamente la luz emitida de los ensayos de ELIDA aumenta con el número de ciclos, sino que la emisión de luz se aumenta antes de que el producto de PCR puede detectarse en el gel.

Ejemplo 13: La estabilidad de la emisión de luz de ensayos de ELIDA de reacciones conteniendo d-a-SATP comparado con dATP

Las reacciones de PCR se operaron y llevaron a cabo como en el Ejemplo 12. El análisis de cada muestra de PCR se inició mezclando 1 µl de la reacción PCR con 20 µl del amortiguador de ensayo de ELIDA. La luz emitida de la muestra luego se midió con luminómetro de la marca Labsystems Luminoscan Ascent en una serie de cuatro lecturas de luz consecutivas durante un período de 1 minuto. Cada lectura de luz representó la emisión de luz de la muestra integrada en un intervalo de diez segundos (usando el voltaje PMT por defecto de la máquina).

La Figura 15 (un gráfico de las unidades relativas de luz contra tiempo) demuestra la magnitud de la emisión de luz a lo largo de cuatro lecturas de luz consecutivas de ensayos de ELIDA de reacciones PCR operadas para 5 y 35 ciclos, ya sea con dATP, ya sea con d-a-SATP. Las reacciones de PCR operadas con dATP muestran un deterioro significativo en la emisión de luz a lo largo del tiempo. Este efecto se hace más grande con el número de ciclos de PCR. Como resultado, el diferencial entre la luz emitida entre los 5 y los 35 ciclos se disminuye significativamente. Conversamente, usando el d-a-SATP, la emisión de luz a lo largo del tiempo es casi constante tanto para las muestras de 5 como de 35 ciclos. Como resultado, la magnitud del diferencial entre las lecturas de 5 y 35 ciclos a lo largo de las cuatro lecturas tomadas, es casi constante (sólo un 5% de diferencia).

Ejemplo 14: Fondo a la relación de señal en ensayos de ELIDA de reacciones PCR, conteniendo d-a-SATP, en comparación a dATP

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo del mismo modo que en el Ejemplo 9, excepto que sólo 0,5 pg del plásmido pPw601a se usó. Es más, las reacciones de PCR contenían el d-a-SATP o el dATP. La emisión de luz de un ensayo de ELIDA de mezclas de PCR no reaccionadas, conteniendo d-a-SATP o dATP se midió en el Ejemplo 13. Un ensayo posterior de ELIDA se llevó a cabo en las mismas muestras, después de que había completado 30 ciclos de una reacción de PCR (y habían producido la misma cantidad de amplicón como se comprobó con el análisis de agarosa de gel). La relación de la emisión de luz de la mezcla no reaccionada de PCR a la mezcla reaccionada de PCR se expone en la Figura 16 (mostrando señal: ratio de fondo). Puede observarse que el uso de d-a-SATP mejora considerablemente la señal: ratio de fondo. Esto es debido al hecho de que d-a-SATP no reacciona con la luciferasa en el mismo grado que el dATP.

Se apreciará que la invención ha sido descrita arriba a modo de ejemplo solamente y que futuras modificaciones de fondo podrían llevarse a cabo, las cuales se mantendrán dentro del ámbito de la invención definida por estas reclamaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en una muestra que comprende los siguientes pasos:
- 5
- i) relacionándose con la muestra todos los componentes necesarios para la amplificación de ácido nucleico y todos los componentes necesarios para el ensayo de bioluminiscencia para la amplificación de ácido nucleico, incluyendo:
 - 10 a) una polimerasa de ácido nucleico,
 - b) los sustratos de polimerasa de ácido nucleico,
 - c) al menos deos iniciadores,
 - d) una luciferasa termoestable,
 - e) luciferina,
 - 15 f) una enzima que convierte el PPI en ATP, en la que la enzima no es sulfurilasa ATP y
 - g) cualesquiera otros sustratos o cofactores de la enzima de parte f)
- y consecuentemente:
- 20 ii) llevando a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico del ácido nucleico de modelo, en la que las propias copias generadas se copia;
 - iii) vigilando la intensidad de la salida de luz de la reacción de bioluminiscencia y
 - 25 iv) determinando la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra.
2. Un método acorde con la reclamación 1, en el que al menos los pasos ii) y iii) se llevan a cabo en un recipiente cerrado.
3. Un método acorde con la reclamación 1 o la reclamación 2, en el que en el paso iii) la intensidad de la salida de luz se vigila durante la reacción de amplificación de ácido nucleico.
- 30
4. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 1 a 3, en el que el paso iii) también incluye la producción de un conjunto de datos de la intensidad de la salida de luz como función del tiempo.
- 35
5. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 1 a 4 para determinar la cantidad de ácido nucleico de modelo presente en la muestra al comienzo de la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii).
6. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 1 a 4 para determinar la cantidad del ácido nucleico de modelo presente en la muestra como resultado de la reacción de amplificación del ácido nucleico del paso ii).
- 40
7. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 4 a 6, en el que la cantidad de ácido nucleico de modelo presente se determina al medirse del conjunto de datos el tiempo necesario para alcanzar un punto en que la tasa de cambio de intensidad de la salida de luz cambie significativamente.
- 45
8. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 5 a 7, en el que la cantidad e ácido nucleico de modelo presente se determina al medirse del conjunto de datos el tiempo necesario para alcanzar un punto en que la intensidad de la salida de luz empieza a aumentarse.
- 50
9. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 5 a 7, en el que la cantidad de ácido nucleico de modelo presente se determina al medirse del conjunto de datos el tiempo necesario para alcanzar un punto en que la intensidad de la salida de luz está en su punto máximo.
10. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 5 a 7, en el que la cantidad de ácido nucleico de modelo presente se determina al medirse del conjunto de datos el tiempo necesario para alcanzar un punto en que la tasa de disminución de la intensidad de la salida de luz aumenta.
- 55
11. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 5 a 7, en el que la cantidad de ácido nucleico de modelo presente se determina al medirse del conjunto de datos el tiempo necesario para alcanzar un punto en que la tasa de disminución de la intensidad de la salida de luz disminuye.
- 60
12. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 5 a 7, en el que la cantidad de ácido nucleico de modelo presente se determina al medirse del conjunto de datos el tiempo necesario para alcanzar un punto en que la intensidad de la salida de luz alcanza o cruza un nivel predeterminado.
- 65
13. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones anteriores, en el que el paso iv) consiste en la comparación de la intensidad de la salida de luz a la intensidad de la salida de luz de un control en que la muestra

consiste en una cantidad conocida de ácido nucleico de modelo.

- 5 14. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 1 a 13 para determinar si el ácido nucleico de modelo está presente en la muestra.
- 15 15. Un método acorde con la reclamación 14, en el que si el el ácido nucleico de modelo está presente en la muestra se determina al medirse del conjunto de datos si la intensidad de la salida de luz alcanza o cruza un nivel predeterminado.
- 10 16. Un método acorde con la reclamación 15, en el que un incremento de la salida de luz relativo a un nivel predeterminado indica la presentica del ácido nucleico de modelo en la muestra.
- 15 17. Un método acorde con la reclamación 15, en el que una disminución de la intensidad de la salida de luz relativa a un nivel predeterminado indica la presencia del ácido nucleico de modelo en la muestra.
- 20 18. Un método acorde con cualesquiera de las reclamaciones 15 a 17, en el que si el ácido nucleico de modleo está presente en la muestra se determina al medirse del conjunto de datos si la intensidad de la salida de luz alcanza o cruza el nivel predeterminado dentro de un período de tiempo predeterminado tras el comienzo de la reacción de amplificación del paso ii).
- 25 19. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones anteriores, en el que el paso iv) consiste en la comparación de la intensidad de la salida de luz con la intensidad de la salida de luz de un control en que la amplificación no ha tenido lugar.
- 30 20. Un método acorde con la reclamación 19, en el que la disminución de la intensidad de la salida de luz relativa a una reacción de control en que ninguna amplificación ha tenido lugar indica la presencia de ácido nucleico de modelo en la muestra.
- 35 21. Un método acorde con las reclamaciones 1 a 20, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) es un método de amplificación de termociclaje a temperatura baja en que el rango de ciclaje de temperatura no excede de 75°C.
- 40 22. Un método acorde con las reclamaciones 1 a 20, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo isotérmicamente.
- 45 23. Un método acorde con la reclamación 22, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo dentro de un rango de temperatura que no excede de 75°C.
- 50 24. Un método acorde con las reclamación 22 o la reclamación 23, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo a una temperatura constante en la que los componentes de la reacción de amplificación y el ensayo de bioluminescencia estén estables.
- 55 25. Un método acorde con las reclamaciones 22 y 23, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se lleva a cabo a más de una temperatura dentro del rango de temperaturas en que los componentes de la reacción de amplificación y el ensayo de bioluminescencia estén estables.
- 60 26. Un método acorde con la reclamación 25, en el que la reacción de amplificación de ácido nucleico del paso ii) se comienza en una temperatura más alta y posteriormente se baja a una temperatura menor.
- 65 27. Un método acorde con la reclamación anterior para su uso en las diagnósticas médicas.
28. Un método acorde con cualquier reclamación anterior para su uso para determinar si un patógeno está presente en la muestra.
29. Un método acorde con cualquier reclamación anterior para su uso para determinar si una secuencia particular de ácido nucleico está presente en el código genético del organismo.
30. Un método acorde con la reclamación 29 para determinar si un ácido nucleico del que un ácido nucleico origina ha sido modificado genéticamente.
31. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 1 a 26 para determinar si un organismo está presente en la muestra.
32. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones 1 a 26 para su uso en tecnología de amplificación de ácido imunonucleico.

33. Un método acorde con la reclamación 31 para determinar si *Chlamydia trachomatis* está presente en la muestra.

34. Un método acorde con cualquiera de las reclamaciones anteriores para determinar en el que la enzima que convierte el PPI al ATP es piruvato ortofosfato (PPDK) y los sustratos de la enzima son fosfoenolpiruvato y AMP.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1: Configuración usada para seguir la reacción de la LÁMPARA

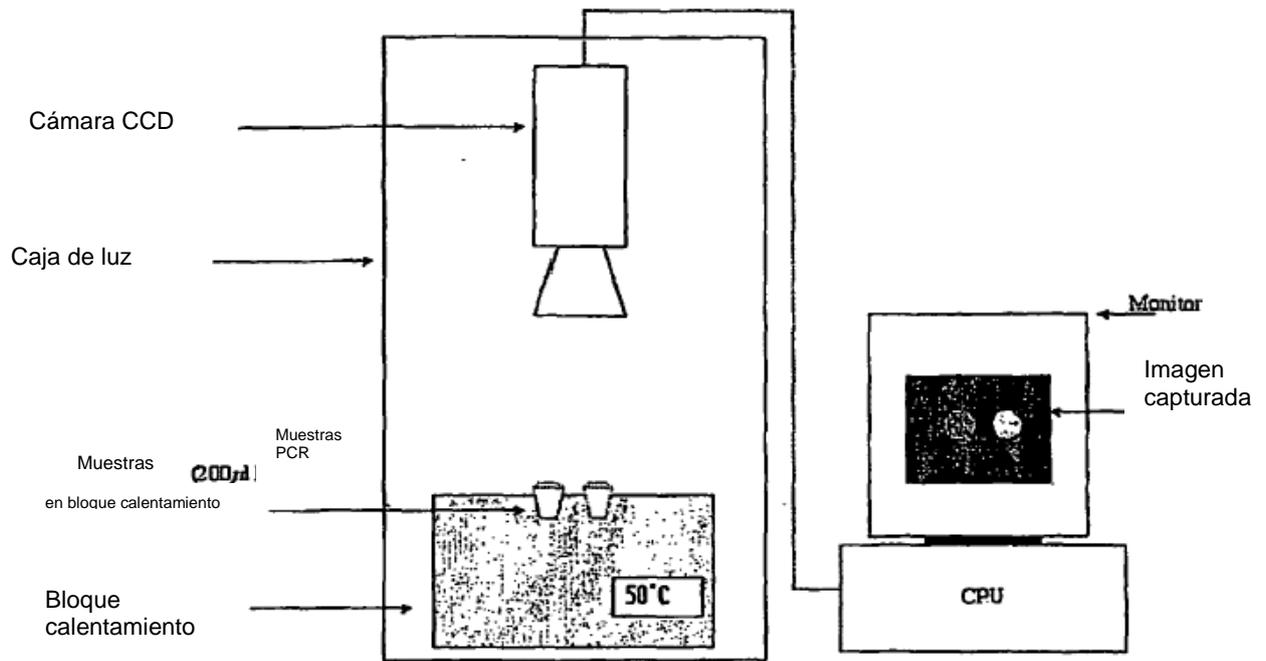


Figura 2: Producción de LAMPARA en presencia de ADN objetivo en un control swin ADN Bst Polimerasa

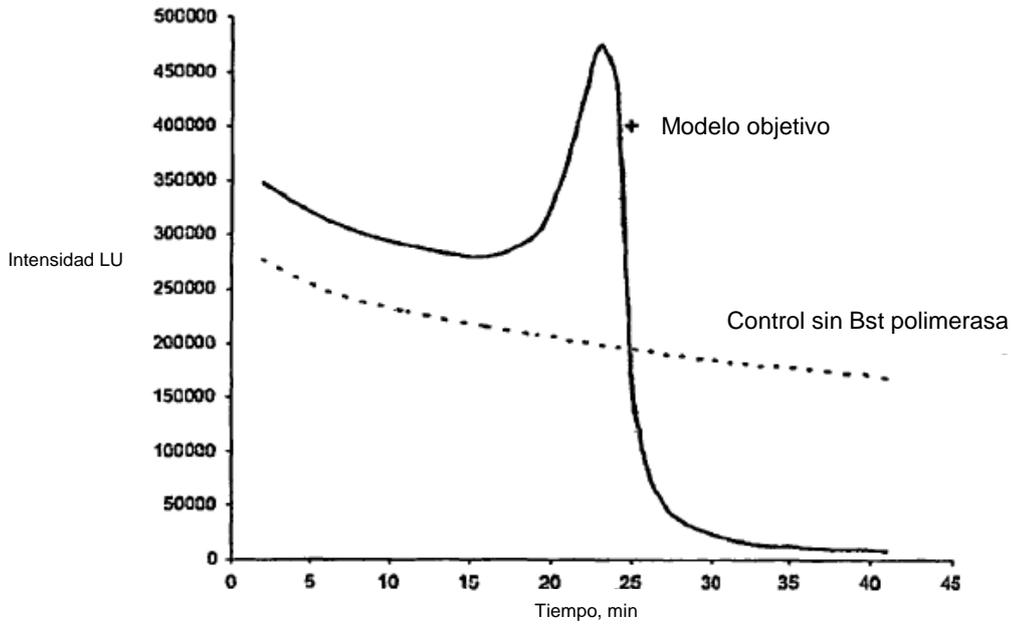


Figura 3: Muestras de LAMPARA duplicadas y controles duplicados

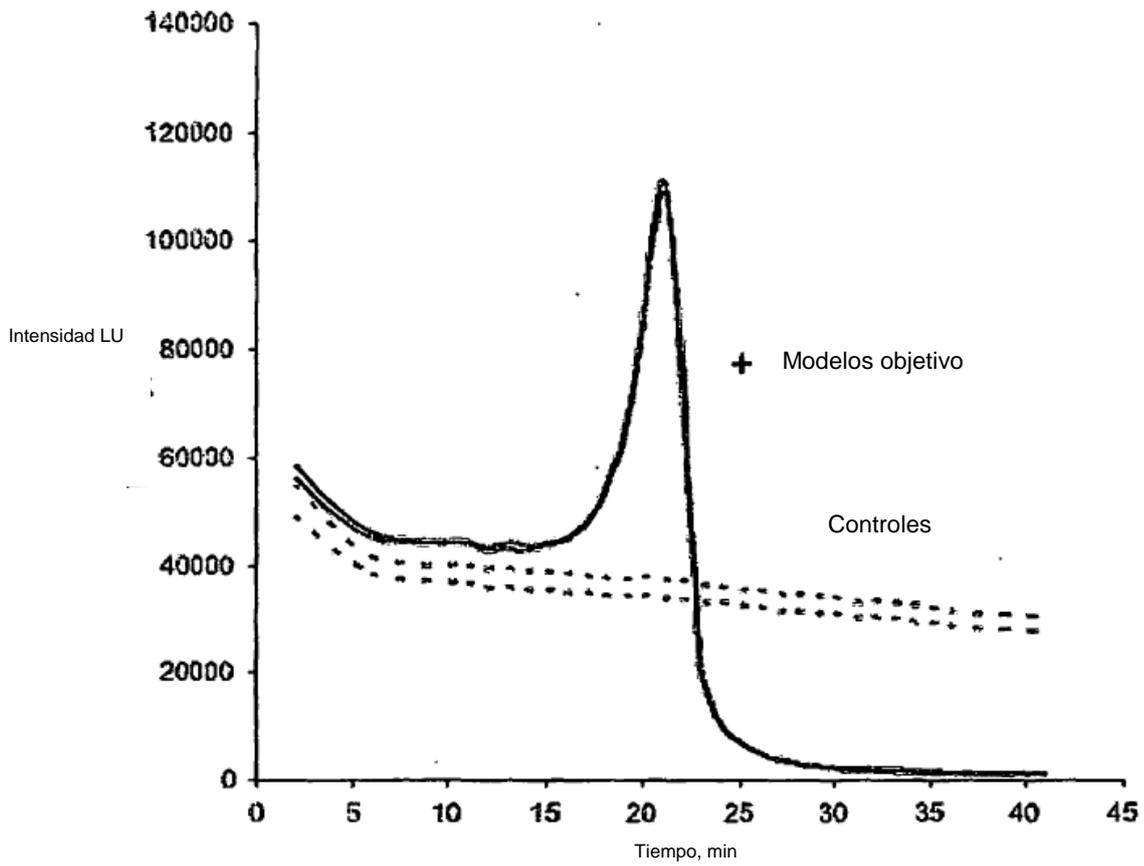


Figura 4: Muestras preparadas como en las Figuras 2 y 3 pero mostrando diferencias en intensidad absoluta de luz

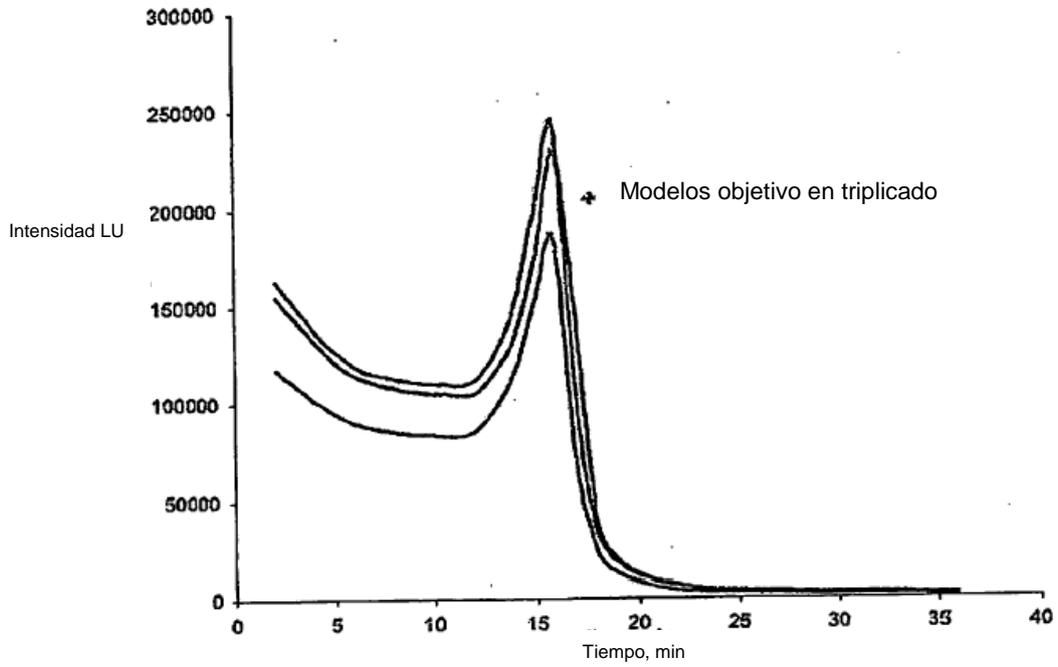


Figura 5: Perfiles de emisión de luz para LAMPARA usando diferentes cantidades de modelo objetivo (duplicados) a 55° C

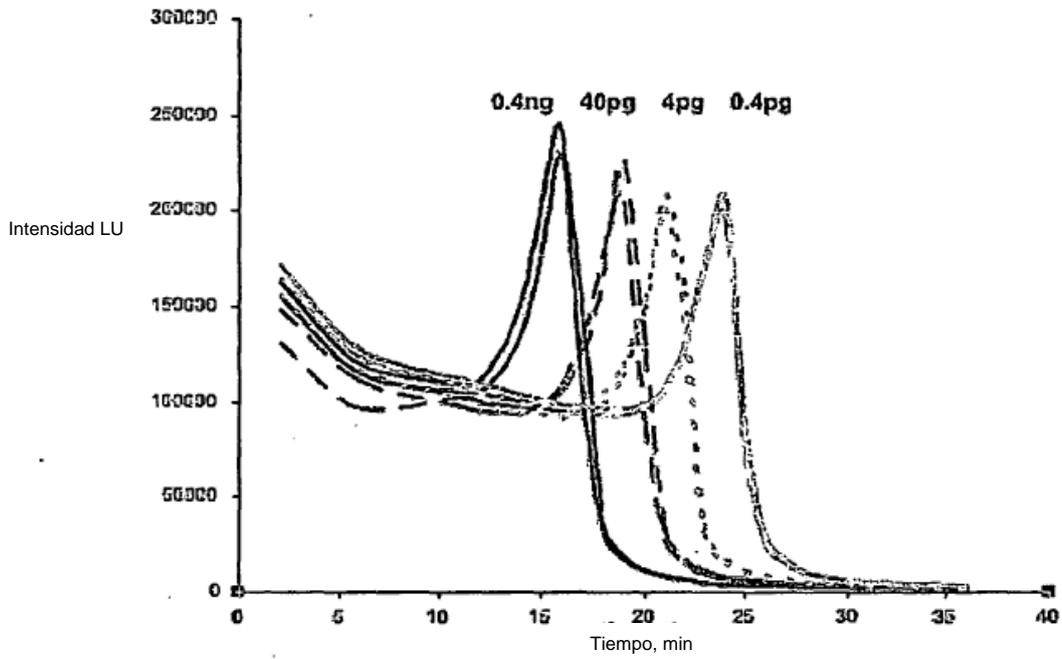
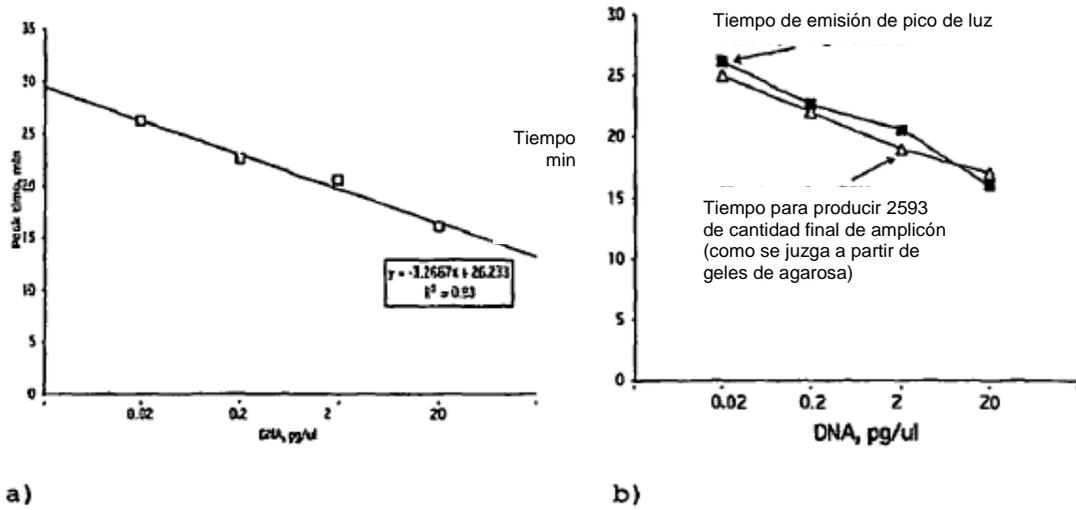


Figura 6: Tiempo de emisión de pico de luz



Tiempo de emisión de pico de luz

Figura 7: Gráfica del resultado en bruto de la reacción de la LAMPARA en triplicado

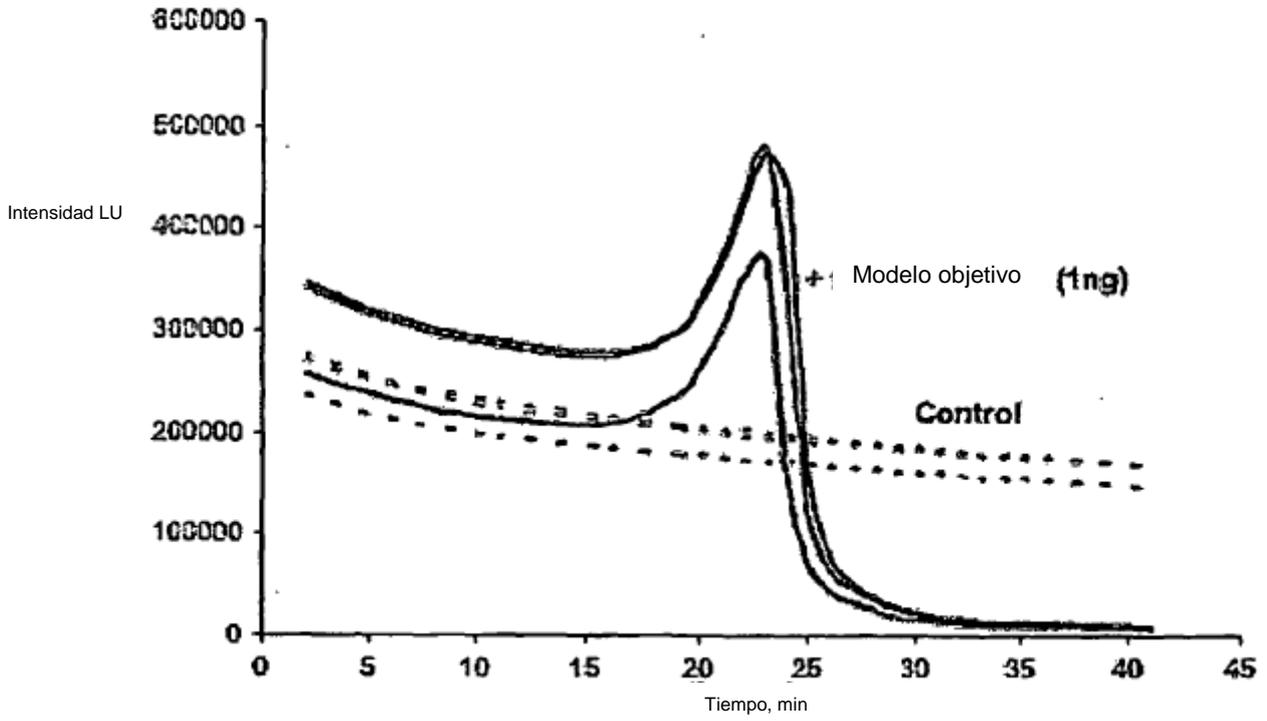


Figura 8: Gráfica del 1ra derivada de las curvas mostradas en la Figura 7

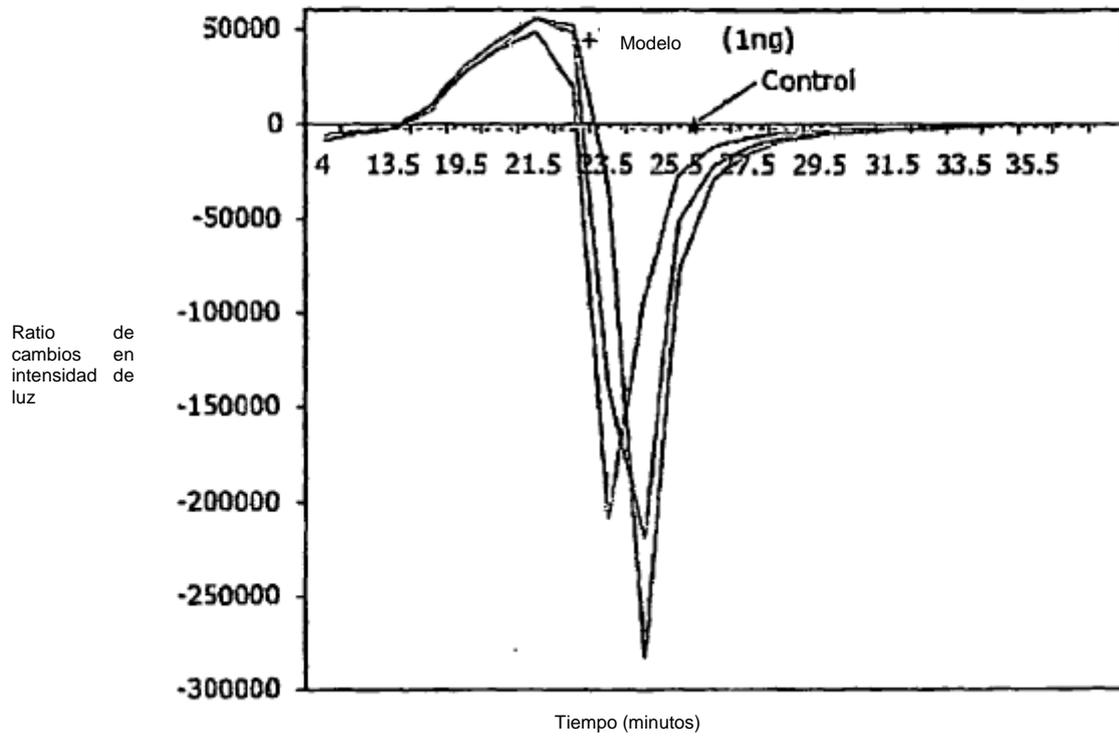


Figura 9: Comparación de controles con muestras

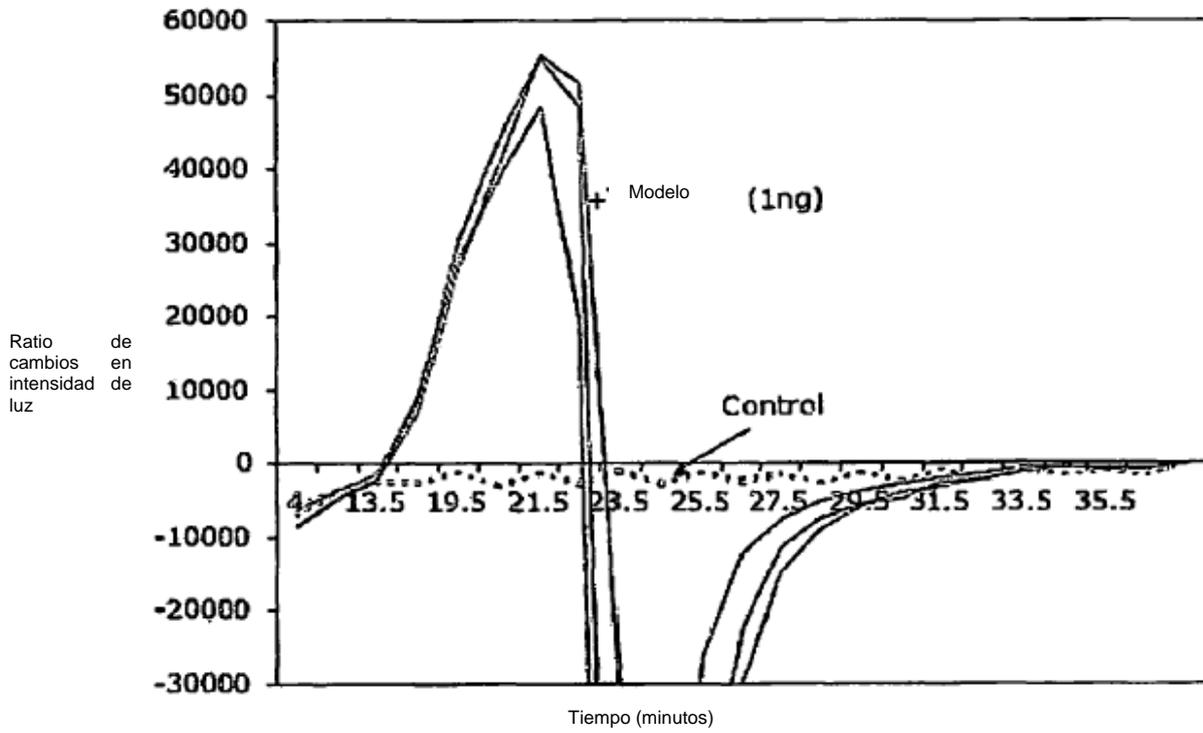


Figura 10: Reacción de una lámpara en la que su temperatura es reducida de 55° C a 50° C tras 10 minutos

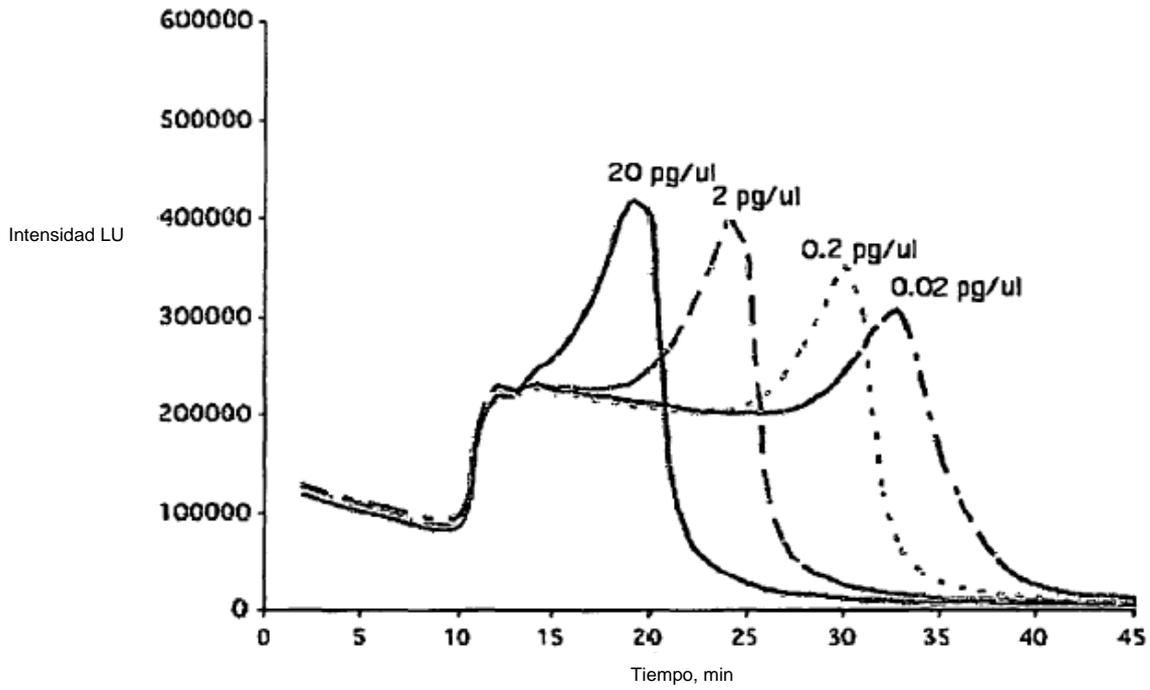


Figura 11: Gráfica de la intensidad de la luz contra el tiempo de la LAMPARA usando PPDK como una enzima que convierte PPI en ATP y compara esta con la reacción de la LAMPARA usando ATP sulfurilasa como la enzima que convierte PPI en ATP y también en dos controles.

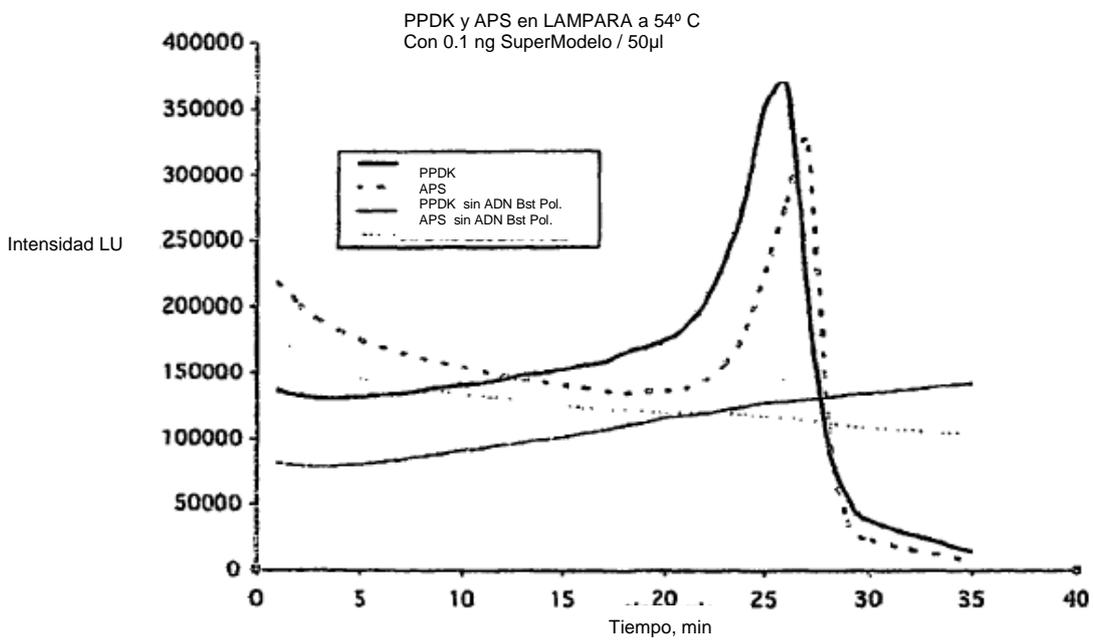


Figura 12

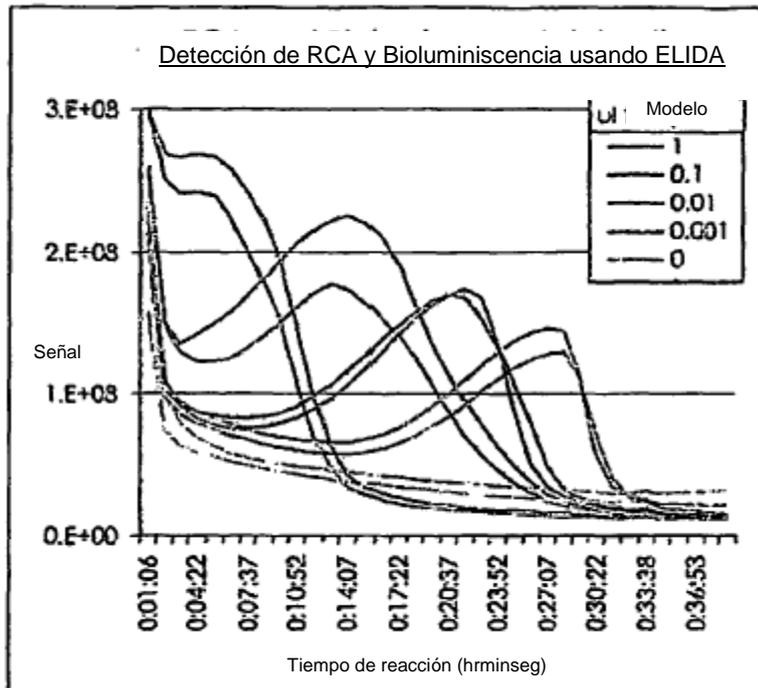


Figura 13

