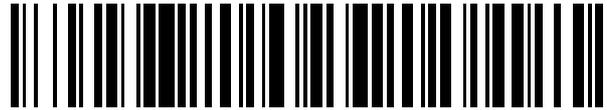


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 452**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2013 PCT/EP2013/052100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113910**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013 E 13704388 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2809806**

54 Título: **Método de amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**01.02.2012 DE 102012201475**

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

**09.01.2017**

73 Titular/es:

**GNA BIOSOLUTIONS GMBH (100.0%)  
Am Klopferspitz 19  
82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**STEHR, JOACHIM;  
BUERSEGENS, FEDERICO y  
ULLERICH, LARS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 596 452 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 de amplificación de ácidos nucleicos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método de amplificación de ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica. La memoria descriptiva de la patente  
 15 US 4 683 202 desvela un proceso para amplificar una secuencia de ácido nucleico específica contenida en un ácido  
 nucleico o en una mezcla de ácidos nucleicos, en el que cada ácido nucleico consiste en dos cadenas  
 20 complementarias separadas, de longitud igual o desigual. El proceso comprende: (a) tratar las cadenas con dos  
 cebadores de oligonucleótido, para cada secuencia específica diferente que se esté amplificando, en condiciones  
 tales que, para cada secuencia diferente que se esté amplificando, se sintetice un producto de extensión de cada  
 25 cebador que sea complementario a cada cadena de ácido nucleico, en el que dichos cebadores se seleccionan de  
 manera que sean suficientemente complementarios a diferentes cadenas de cada secuencia específica, de modo  
 que el producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, cuando se separe de su complemento, pueda servir  
 como un molde para la síntesis del producto de extensión del otro cebador; (b) separar los productos de extensión  
 del cebador de los moldes sobre los que se sintetizaron para producir moléculas monocatenarias; y (c) tratar las  
 moléculas monocatenarias generadas en la etapa (b) con los cebadores de la etapa (a) en condiciones en las que se  
 sintetice un producto de extensión del cebador usando cada una de las cadenas simples producidas en la etapa (b)  
 como un molde. Las etapas se pueden llevar a cabo consecutiva o simultáneamente. Además, las etapas (b) y (c) se  
 30 pueden repetir hasta que se haya alcanzado el grado deseado de amplificación de secuencia. En el caso de que, en  
 el proceso, las etapas (a) y (c) se realicen usando una polimerasa, el proceso se conoce comúnmente como la  
 reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

30 La solicitud de patente internacional WO 2007/143034 A1 desvela métodos que, supuestamente, son adecuados  
 para la ejecución de la PCR. Los métodos pueden comprender el uso de una fuente óptica para proporcionar el  
 calentamiento en una PCR. Los métodos también pueden incluir el uso de la resonancia de plasmón superficial o la  
 transferencia de energía de resonancia de fluorescencia para permitir la monitorización en tiempo real de una  
 35 reacción de PCR. Los métodos pueden comprender la inmovilización de un molde, un cebador o una polimerasa  
 sobre una superficie tal como una superficie de oro o en otra superficie activa de resonancia de plasmón superficial.

35 La solicitud de patente de US 2002/0061588 A1 desvela métodos para volver ácidos nucleicos local y directamente  
 sensibles a una señal externa. La señal actúa exclusivamente en una o varias partes localizadas, específicas, del  
 ácido nucleico. De acuerdo con la invención, la señal puede cambiar las propiedades de un determinado ácido  
 40 nucleico y, por lo tanto, modificar su función. Así pues, la invención proporciona métodos que controlan la estructura  
 y la función de un ácido nucleico en una muestra biológica, sin influir en otras partes de la muestra. En una  
 realización, un modulador transfiere calor a un ácido nucleico o a una parte de un ácido nucleico, lo que genera, por  
 ejemplo, una desestabilización de los enlaces inter- o intramoleculares y una alteración de la estructura y de la  
 estabilidad del ácido nucleico. Los moduladores preferidos incluyen nanopartículas metálicas, nanopartículas  
 semiconductoras, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de óxido y cromóforos. También se sugiere el uso de  
 45 estos métodos en combinación con la PCR. En particular, se propone controlar una reacción de PCR con un  
 modulador.

45 La solicitud de patente US 2003/0143604 A1 se refiere al uso de sondas de detección de nanopartículas para  
 monitorizar reacciones de amplificación, en particular, PCR. En especial, la solicitud de patente aborda el uso de  
 50 conjugados de oligonucleótidos de nanopartículas tratados con un agente protector tal como albúmina de suero  
 bovino para detectar cualitativa y cuantitativamente un polinucleótido diana. La solicitud de patente desvela la  
 amplificación y la detección de un ácido nucleico usando cebadores de nanopartículas de oro. En una primera etapa,  
 el ácido nucleico diana se desnaturaliza en presencia de las nanopartículas de oro, que están funcionalizadas con  
 55 cebadores. En una segunda etapa, las nanopartículas de oro y los oligonucleótidos unidos a las mismas se hibridan  
 con el ácido nucleico diana, y se produce una copia de la secuencia de ADN complementaria a partir de los  
 cebadores de ácido nucleico que están unidos a las nanopartículas. Se repiten las etapas uno y dos, y se detecta la  
 señal óptica que se crea mediante la unión de las sondas de nanopartículas complementarias amplificadas.

60 El artículo "Enhancing the efficiency of a PCR using gold nanoparticles" de Li Min *et al.*, *Nucleic Acids Research*  
 2005, Oxford University Press, Surrey, GB, vol. 33, n.º 21, páginas e184, describe que la PCR se podría mejorar  
 espectacularmente con nanopartículas de Au. Con la adición de 0,7 nM de nanopartículas de Au de 13 nm al  
 reactivo de PCR, se aumentó la eficacia de la PCR. En especial, cuando se mantienen los mismos o mayores  
 65 rendimientos de amplificación, se podría acortar el tiempo de reacción, y se podrían aumentar las velocidades de  
 calentamiento/enfriamiento. La propiedad de transferencia de calor de las nanopartículas debería ser el factor  
 principal en la mejora de la eficacia de la PCR. Se compararon diferentes sistemas de PCR, ADN polimerasas,  
 tamaños de ADN y muestras de complejos. Las nanopartículas de Au aumentan la sensibilidad de la detección de la

PCR de 5 a 10 veces en un sistema de PCR más lento (es decir, PCR convencional) y al menos  $10^4$  veces en un sistema de PCR más rápido (es decir, PCR en tiempo real). Una vez acortada la duración de la PCR a la mitad, eran detectables las 100 copias/ $\mu$ l de ADN en la PCR en tiempo real con oro coloidal añadido. Sin embargo, se necesitaron al menos  $10^6$  copias/ $\mu$ l de ADN para alcanzar el nivel de señal detectable usando el reactivo de PCR sin oro coloidal. Esto podría mejorar la eficacia de la PCR usando polimerasas de bajo coste y el reactivo de PCR general.

La solicitud de patente europea EP 1 840 222 A1 describe un método de optimización de la amplificación por PCR mediante la adición de material elemental al sistema de PCR, en el que el material elemental se selecciona de un grupo que consiste en oro elemental, titanio elemental, níquel elemental, bismuto elemental, estibio elemental, selenio elemental, cromo elemental y mezclas de los mismos. El método comprende: (1) la preparación del material elemental para la optimización; (2) la esterilización del material elemental; (3) la optimización del sistema de PCR; (4) el análisis de los productos de PCR; (5) la retirada del material de optimización del sistema de reacción.

La solicitud de patente internacional WO 2009/115335 A1 describe un método y un dispositivo para el control térmico de las reacciones enzimáticas dependientes de la temperatura en presencia de partículas magnéticas, en particular, de nanopartículas o de perlas magnéticas, *in vitro* mediante el calentamiento de las perlas magnéticas o las partículas magnéticas hasta al menos una temperatura diana definida usando campos magnéticos alternos. Preferentemente, la reacción enzimática controlable térmicamente llevada a cabo con el método de acuerdo con la invención es una reacción de PCR, u otra reacción para alargar o multiplicar los ácidos nucleicos, incluyendo el ADN, ARN o híbridos de sus derivados, que tiene lugar directamente sobre las perlas magnéticas funcionalizadas.

La solicitud de patente internacional WO 2002/48399 A2 describe un método de disección simultánea en posiciones específicas de cadenas moleculares orgánicas filiformes, en particular, de ADN. El objetivo de la invención es proporcionar un método mediante el que pueda tener lugar una disección altamente específica en ciertas secuencias que se pueden seleccionar libre y simultáneamente en numerosas moléculas filiformes. Para ello, se proporcionan nanopartículas con una cadena molecular de cualquier secuencia predeterminable que se seleccione para que sea complementaria a una secuencia de una molécula que se vaya a diseccionar, estando dicha/s cadena/s molecular/es hibridada/s de una manera habitual con la molécula o enlazada/s específicamente a dicha molécula de otra manera, y posteriormente, se someten las nanopartículas a una radiación de alta energía de al menos una longitud de onda que pueda ser absorbida por dichas nanopartículas.

La solicitud de patente europea EP 2 481 817 A1 describe un proceso de detección de ácidos nucleicos que tiene las siguientes etapas: proporcionar al menos una nanopartícula que esté funcionalizada para el ácido nucleico que se vaya a detectar por medio de al menos un oligonucleótido que esté unido al mismo y que sea capaz de hibridarse con al menos un segmento de un ácido nucleico que se vaya a detectar; poner la nanopartícula funcionalizada en contacto con una muestra en la que el ácido nucleico se vaya a detectar; y medir una propiedad que proporcione información sobre el grado de hibridación de al menos un oligonucleótido con el ácido nucleico que se vaya a detectar. Además, el proceso incluye la etapa de excitar las nanopartículas para generar calor, por ejemplo, por medio de un efecto fototérmico. La invención es adecuada, en particular, para los análisis de ADN de alto rendimiento.

El artículo "Gold NanoStoves for Microsecond DNA Melting Analysis" de Joachim Stehr *et al.*, Nano Letters 2008, vol. 8, n.º 2, páginas 619 a 623 describe un ensayo de fusión de ADN, en el que se usan pulsos de láser de 300 ns para calentar rápidamente agregados de nanopartículas de oro unidas a ADN. Se muestra que el ADN bicatenario se funde a una escala de tiempo de microsegundos que conduce a una desintegración de los agregados de nanopartículas de oro a una escala de tiempo de milisegundos. Se puede distinguir una secuencia de ADN perfectamente coincidente en menos de un milisegundo incluso en una mezcla 1:1 de ambas dianas.

#### 50 Problema de acuerdo con la invención

El problema subyacente de la invención es proporcionar un método mejorado para la amplificación de ácidos nucleicos.

#### 55 Solución de acuerdo con la invención

El problema se resuelve mediante un método con las características de la reivindicación 1. El método sirve para amplificar ácidos nucleicos, en el que, en un volumen de reacción, las nanopartículas transfieren calor a su entorno por excitación.

El volumen de reacción es el volumen en el que se realiza el método de acuerdo con la invención. El volumen puede estar rodeado de un recipiente de reacción. El volumen de reacción contiene una muestra. La muestra contiene un líquido, preferentemente, agua. Los ácidos nucleicos que se pueden amplificar mediante el método pueden estar contenidos en la muestra.

Las nanopartículas de acuerdo con la divulgación son, preferentemente, partículas que, debido a su tamaño, muestran propiedades ópticas especiales, particularmente características de los espectros de absorción o de dispersión, que no se observan o no se diferencian tanto en el material a granel. Preferentemente, las nanopartículas tienen un diámetro de entre 2 y 500 nm, más preferentemente de entre 3 y 300 nm, y lo más preferentemente de entre 5 y 200 nm. Las nanopartículas preferidas tienen un diámetro de entre 7 y 150 nm. Las nanopartículas pueden ser esféricas, sin embargo, también son posibles las formas no globulares, por ejemplo, las nanopartículas alargadas (nanobarras). En una realización preferida de la invención, la nanopartícula comprende al menos un semiconductor o un metal, preferentemente, un metal noble, por ejemplo, oro o plata. En una realización, la nanopartícula consiste en su totalidad en metal; en otra realización, el metal solo forma una parte de la nanopartícula, por ejemplo, su cubierta. Una nanopartícula preferida puede ser una nanopartícula cubierta-núcleo. Una nanopartícula preferida puede poseer poros en su superficie, poros que pueden estar ocupados por átomos o moléculas con un tamaño y una carga definidos por las propiedades de los poros, en particular preferentemente, dichos átomos o dichas moléculas solo se adsorben a la nanopartícula cuando la nanopartícula se encuentra en una solución. De acuerdo con la invención, la nanopartícula también comprende los átomos y las moléculas adsorbidos a su superficie. Debido a la resonancia de su material o resonancia de plasmón, las nanopartículas preferidas son adecuadas para la absorción de energía óptica.

Cuando - a través de la excitación de una nanopartícula - se transfiere calor desde la nanopartícula a su entorno, esto significa - de acuerdo con la invención - que la energía se transfiere a la nanopartícula, de manera que la nanopartícula calienta su entorno a través de la transferencia de la energía. Con ello, preferentemente, a través de la excitación, el entorno inmediato se calienta más intensamente que el entorno más amplio de las nanopartículas. Por lo general, las nanopartículas se calientan primero a través de la excitación y luego transfieren el calor a su entorno. También es concebible que, a través de la excitación de las nanopartículas, se transfiera calor a su entorno sin que primero se calienten las propias nanopartículas. Preferentemente, el entorno de las nanopartículas es un volumen esférico que tiene un diámetro igual a 100 veces el diámetro de la nanopartícula que está situada en el centro del volumen; más preferentemente, el volumen tiene 10 veces, lo más preferentemente, 4 veces y preferentemente menos de 2 veces el diámetro de la nanopartícula de su centro.

Preferentemente, a través de la excitación de las nanopartículas, el entorno de las nanopartículas se calienta localmente. Son posibles cambios especialmente rápidos en la temperatura si el volumen calentado es solo una fracción del volumen total. Por un lado, se puede producir una alta diferencia de temperatura con solo una pequeña cantidad de entrada de energía. Por otra parte, es posible un enfriamiento rápido del volumen calentado si hay un depósito suficientemente grande de baja temperatura en el volumen irradiado, de manera que, tras la irradiación de las nanopartículas, su entorno se enfría. Esto se puede lograr mediante la irradiación suficientemente intensa de las nanopartículas (para obtener el aumento de la temperatura deseado) y durante un período de tiempo suficientemente corto (para que el calor permanezca localizado).

Por lo tanto, el calentamiento local de acuerdo con la invención está presente si el intervalo  $t$  de excitación en el volumen individual irradiado (por ejemplo, en el foco del láser) se selecciona para que sea más corto o igual a un intervalo  $t_1$  de excitación crítico. En el presente documento,  $t_1$  es el tiempo que requiere el calor para difundirse desde una nanopartícula a la siguiente a una distancia media de las nanopartículas, multiplicado por un factor de escala  $s_1$ ; si  $|x|$  es la distancia media de las nanopartículas y la difusividad térmica del medio entre las nanopartículas es  $D$ , entonces  $t_1$  está dado por  $t_1 = (s_1 * |x|)^2 / D$ , en la que la difusividad térmica  $D$  normalmente tiene un valor de  $D = 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$  en solución acuosa.

El factor de escala  $s_1$  es una medida de hasta qué punto el frente caliente de una partícula se propaga durante el intervalo de excitación. El aumento de la temperatura causado por una nanopartícula excitada a una distancia de unos cuantos diámetros de nanopartícula es solo una fracción muy pequeña del aumento de la temperatura máximo en la superficie de la partícula. En una realización de la invención, se permite una superposición de los frentes calientes de unas cuantas nanopartículas en el sentido de que, para la definición del intervalo de excitación crítico  $t_1$  de acuerdo con la ecuación anterior, se usa un factor de escala superior a 1. En otra realización de la invención, no se permite la superposición de los frentes calientes durante el intervalo de excitación (corresponde a un calentamiento notablemente local) en el sentido de que, para la definición del intervalo de excitación crítico  $t_1$  de acuerdo con la ecuación anterior, se usa un factor de escala  $s_1$  inferior o igual a 1. Para la definición del calentamiento local de acuerdo con la invención, preferentemente  $s_1 = 100$ , preferentemente  $s_1 = 30$ , preferentemente  $s_1 = 10$ , preferentemente  $s_1 = 7$ , preferentemente  $s_1 = 3$  y lo más preferentemente  $s_1 = 1$ , preferentemente,  $s_1 = 0,7$ , preferentemente  $s_1 = 0,3$ .

Los valores para  $s_1 > 1$  pueden ser ventajosos en los casos (entre otros) en los que el volumen irradiado muestre una alta relación de aspecto (por ejemplo, en el foco de un haz láser moderadamente centrado), de manera que comparativamente muchas nanopartículas están situadas en la superficie del volumen irradiado y, por lo tanto, hay un menor número de nanopartículas calentadas en su entorno, y se produce un flujo de salida de calor destacado desde el volumen irradiado, de manera que la contribución del calentamiento de las nanopartículas vecinas más lejanas sigue siendo insignificante durante un período de tiempo más largo.

Esto significa que, por ejemplo, a una concentración de nanopartículas de 1 nM, que resulta en una distancia de nanopartículas media de  $|x| = 1,2 \mu\text{m}$ , tiene lugar un calentamiento local de acuerdo con la invención si el intervalo de excitación permanece más corto que  $t_1 = 14 \mu\text{s}$  (el factor de escala se selecciona como  $s_1 = 1$ ,  $D = 10^{-7} \text{m}^2/\text{s}$ ). Se puede suponer que cuando  $t$  se selecciona para que sea  $t > t_1$ , el calor emitido por las nanopartículas puede - durante la irradiación - cubrir una distancia por difusión que sea superior a la distancia media de las partículas, lo que, en efecto, conduce a un solapamiento de los frentes calientes de muchas nanopartículas, de modo que haya un aumento de la temperatura en todo el volumen entre las nanopartículas; el aumento de temperatura en el volumen irradiado será espacialmente más homogéneo cuanto más largo sea el calentamiento, dado que la influencia en la distribución de la temperatura alrededor de una nanopartícula no solo está ejercida por las nanopartículas más cercanas, sino también por las nanopartículas vecinas más lejanas.

Si el volumen de reacción se irradia con una radiación absorbida por las nanopartículas durante más de  $t_1$ , el calentamiento se denomina global.

Se puede llevar a cabo un calentamiento global de acuerdo con la invención, por ejemplo, calentando el volumen de reacción desde el exterior con un elemento Peltier o un calentador de resistencia. El calentamiento global también puede tener lugar, por ejemplo, mediante la irradiación del volumen de reacción con radiación, que es absorbida por el agua con más intensidad que o con tanta intensidad como por las nanopartículas. En el presente documento, la expresión "aumento de la temperatura" significa la diferencia en la temperatura en un lugar en el momento de la observación inmediatamente después de la excitación y la temperatura en el mismo lugar inmediatamente antes de la excitación.

El calentamiento global y el calentamiento local se pueden llevar a cabo simultáneamente.

Los métodos conocidos para la amplificación de ácidos nucleicos comprenden una o varias etapas, en los que se requiere el calentamiento de al menos partes de la muestra.

La invención hace que sea factible que, en el método de amplificación de ácidos nucleicos, no sea necesario calentar todo el volumen de reacción. Al contrario, es posible calentar solo determinadas partes del volumen de reacción mediante la excitación de las nanopartículas. Ventajosamente, de este modo, se hace posible calentar solo aquellas partes del volumen de reacción que deben ser calentadas para la amplificación de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, se pueden proteger las partes de la muestra que sean sensibles al calor. El calentamiento local puede ser más rápido que el calentamiento global de todo el volumen de reacción, si se requiere transferir menos energía. Por lo tanto, ventajosamente, la invención hace posible proporcionar un método de amplificación de ácidos nucleicos que es más rápido y requiere menos energía.

### Realizaciones preferidas de acuerdo con la invención

Un ácido nucleico se puede amplificar, en particular, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se lleva a cabo en el volumen de reacción. El volumen de reacción contiene un ácido nucleico que se va a amplificar, que se denomina el original. El original es una sola cadena. En el volumen de reacción, el original puede formar una cadena doble junto con su cadena complementaria, que se denomina complemento. Si están presentes el original y el complemento como una cadena doble, esta cadena doble deberá desnaturalizarse en una primera etapa, es decir, la cadena doble se debe separar en dos cadenas simples. La fusión es otro término para la desnaturalización. La desnaturalización se produce a una temperatura, que se denomina temperatura de desnaturalización. El volumen de reacción contiene además al menos dos oligonucleótidos, que se denominan cebadores. Uno de los cebadores se denomina cebador directo, el otro se denomina cebador inverso. El cebador directo es complementario al extremo 3' del original. El cebador inverso es complementario al extremo 3' del complemento. En una segunda etapa, el cebador directo se hibrida con el original y el cebador inverso se hibrida con el complemento. La hibridación de los cebadores con las partes complementarias del original o del complemento, respectivamente, se denomina hibridación. La segunda etapa tiene lugar a una temperatura, que se denomina temperatura de hibridación. El volumen de reacción contiene, además, una ADN polimerasa. En una tercera etapa, la ADN polimerasa sintetiza una copia del complemento a partir del cebador directo. A partir del cebador inverso, la ADN polimerasa sintetiza una copia del original. A través de la síntesis, la copia del complemento se hibrida con el original, y la copia del original se hibrida con el complemento. La tercera etapa se denomina elongación y se lleva a cabo a una temperatura denominada temperatura de elongación. Tras ello, se repiten la primera, segunda y tercera etapa cíclicamente hasta que se alcanza el grado deseado de amplificación, en el que la copia del original es el original, y la copia del complemento es el complemento. Si el original se encuentra en una cadena simple de ADN que es más larga que el original, entonces la PCR no solo produce copias del original, sino también copias de dicha cadena de ADN que son más largas en la dirección 3' y que contienen el original. Por consiguiente, en este caso, la PCR no solo produce copias del complemento, sino también copias de la cadena simple de ADN complementaria a dicha cadena simple de ADN, copias que son más largas en la dirección 3' y que contienen el complemento.

Dado que las distintas etapas de la PCR se pueden llevar a cabo a diferentes temperaturas, puede ser necesario realizar una o varias etapas de calentamiento y - en su caso - etapas de enfriamiento durante o entre las etapas de la PCR, en cuyas etapas de calentamiento y enfriamiento, el volumen de reacción o partes del mismo se calienta o

se enfría, respectivamente. Preferentemente, el calentamiento en la etapa de calentamiento o en al menos una de las etapas de calentamiento se consigue al menos parcialmente a través de la excitación de las nanopartículas, y el calentamiento es preferentemente un calentamiento local.

5 En la PCR, la temperatura de desnaturalización se selecciona preferentemente de modo que las cadenas simples de ADN se fundan sin dañar la ADN polimerasa de una manera significativa. Un valor típico para la temperatura de desnaturalización es, por ejemplo, de 95 °C. La temperatura óptima de hibridación depende normalmente de la secuencia y de la longitud de los cebadores. Por lo general, los cebadores se diseñan para la temperatura de hibridación de entre 50 °C y 65 °C. La temperatura óptima de elongación depende normalmente de la ADN polimerasa usada. Cuando se usa polimerasa *Taq*, por ejemplo, normalmente se selecciona una temperatura de elongación de 72 °C.

15 “Hibridación”, en el sentido de la presente invención, significa la formación de una cadena doble a partir de dos cadenas simples, pudiendo consistir cada una de ellas en un ácido nucleico y/o un oligonucleótido. En condiciones de reacción apropiadas, la hibridación normalmente conduce al estado de menor energía, que se puede alcanzar mediante la unión de las dos cadenas simples entre sí. En otras palabras, esto significa que, en las condiciones apropiadas, las dos cadenas simples se unen entre sí de modo que, en referencia a las secuencias de las dos cadenas simples, se produzca la mayor complementariedad posible.

20 Cuando un ácido nucleico A es parcialmente complementario a un ácido nucleico B, esto significa que una parte del ácido nucleico A es complementaria a una parte del ácido nucleico B.

La excitación de las nanopartículas tiene lugar preferentemente por medio de un campo alterno, más preferentemente, por medio de un campo electromagnético alterno, lo más preferentemente ópticamente. Preferentemente, la excitación se produce en el intervalo entre el infrarrojo lejano y la luz ultravioleta lejana (en un intervalo de 100 nm a 30 μm de longitud de onda), más preferentemente, en el intervalo del infrarrojo cercano a la luz ultravioleta cercana (en un intervalo de 200 nm a 3 μm de longitud de onda), lo más preferentemente, en el intervalo de la luz visible (en un intervalo de 400 nm a 800 nm). En comparación con el calentamiento global convencional del recipiente de reacción del exterior, esto puede ofrecer la ventaja de que no sea necesario superar la pared térmicamente aislante del recipiente de reacción, ya que la energía se transfiere directamente sobre las nanopartículas. De esta manera, se puede conseguir un calentamiento más rápido de las partes deseadas de la muestra.

35 En una realización preferida de la invención, las nanopartículas son excitadas por un láser. Más preferentemente, la luz láser tiene una frecuencia que excita la resonancia de plasmón superficial de las nanopartículas. El láser puede suministrar la luz de forma continua o como luz pulsada. El láser puede, por ejemplo, ser un láser de gas, un láser de diodo o un láser en estado sólido bombeado por diodos. El intervalo de tiempo en el que el láser excita las nanopartículas en el volumen irradiado, se encuentra preferentemente en el intervalo de los picosegundos a los segundos, más preferentemente entre los nanosegundos y los segundos, y lo más preferentemente entre 10 ns y 500 μs. Preferentemente, el intervalo de excitación es más corto que el tiempo medio necesario para que el calor que surge en el entorno de las nanopartículas se difunda a través de la distancia media de las nanopartículas, de manera que no se produzca un solapamiento, como media, significativo de los frentes calientes de las partículas vecinas. Más preferentemente, el intervalo de excitación se selecciona para que el aumento de la temperatura alrededor de cada nanopartícula irradiada caiga, como media, menos de la mitad de su máximo en una distancia de 45 20 diámetros de nanopartícula, más preferentemente en una distancia de 2 diámetros de nanopartícula y lo más preferentemente en una distancia de 1 diámetro de nanopartícula. En una realización, se prefiere un período de irradiación corto del láser por volumen, de manera que una cadena simple de ADN deshibridada solo se pueda difundir fuera de la nanopartícula en menos de 100 nm, más preferentemente en menos de 20 nm durante la desnaturalización. De este modo, la probabilidad de que la cadena simple de ADN deshibridada se una a un oligonucleótido en la misma nanopartícula es alta. Esto puede conducir a una aceleración del método de acuerdo con la invención. En una realización preferida, la concentración de las nanopartículas conjugadas al cebador es inferior a 10 nM, siendo el intervalo de excitación preferentemente de entre 1 ns y 10 μs, más preferentemente de entre 10 ns y 1 μs, y lo más preferentemente de entre 15 ns y 300 ns. El intervalo de excitación preferentemente no se selecciona para que sea significativamente inferior a 1 ns; de lo contrario, el período de calentamiento de la cadena doble de ADN no es suficiente para que las cadenas simples contenidas en el mismo se separen lo suficiente por difusión de modo que no se vuelvan a hibridar de inmediato entre sí.

60 El coeficiente de utilización es la proporción del intervalo de excitación con respecto la duración del ciclo de PCR. El coeficiente de utilización se selecciona preferentemente para que sea lo suficientemente elevado para que la excitación conduzca a una desnaturalización suficiente de las cadenas dobles de ADN mediante el calentamiento local. Al mismo tiempo, el coeficiente de utilización se selecciona para que sea tal que el aumento medio de la temperatura de toda la muestra se mantenga lo suficientemente bajo para evitar perturbaciones en la hibridación, elongación y desnaturalización. Preferentemente, el coeficiente de utilización para el volumen irradiado es inferior al 50 %, más preferentemente inferior al 20 % y lo más preferentemente inferior al 1 %. El coeficiente de utilización en el volumen irradiado es preferentemente superior a  $10^{-12}$ , más preferentemente superior a  $10^{-10}$ , más preferentemente superior a  $10^{-9}$  y lo más preferentemente superior a  $10^{-8}$ . Las densidades de potencia superficial,

con las que las nanopartículas se excitan, son preferentemente de entre 20 W/mm<sup>2</sup> y 1.000 kW/mm<sup>2</sup>, más preferentemente de entre 100 W/mm<sup>2</sup> y 100 kW/mm<sup>2</sup> y lo más preferentemente de entre 250 W/mm<sup>2</sup> y 10 kW/mm<sup>2</sup>.

En otra realización preferida, la energía de la luz láser se transfiere a las nanopartículas debido a la absorción de su material. La luz, que se usa para la excitación de las nanopartículas, también puede originarse a partir, por ejemplo, de un radiador térmico, por ejemplo, una bombilla ultrarrápida. En otra realización preferida de la invención, las nanopartículas se excitan a través de un campo electromagnético alterno o las ondas electromagnéticas, que inducen corrientes inducidas en las nanopartículas. Las nanopartículas adecuadamente diseñadas también pueden ser excitadas por ultrasonidos.

El término "oligonucleótido" en relación con la presente invención comprende preferentemente no solo (desoxi)oligorribonucleótidos, sino también oligonucleótidos que contienen uno o más análogos de nucleótido con modificaciones en su cadena principal (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotioatos o ácidos nucleicos peptídicos [PNA]), en particular, en un azúcar de la cadena principal (por ejemplo, derivados de 2'-O-alkilo, 3'- y/o 5'-aminorribosas, ácidos nucleicos bloqueados [LNA], ácidos nucleicos de hexitol, morfolinós, ácidos nucleicos de glicol (GNA), ácidos nucleicos de treosa (TNA) o triciclo-ADN; en este sentido, véase la publicación de D. Renneberg y C. J. Leumann, titulada "Watson-Crick base-pairing properties of Tricyclo-DNA", *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, Vol. 124, páginas 5993-6002, cuyo contenido relacionado forma parte de la presente divulgación a modo de referencia) o que contienen análogos de bases, por ejemplo, 7-deazapurina o bases universales tales como nitroindol o bases naturales modificadas tales como *N*-4-etilcisteína. En una realización de la invención, los oligonucleótidos son conjugados o quimeras con análogos no nucleosídicos, por ejemplo, PNA. En una realización, los oligonucleótidos contienen, en una o más posiciones, unidades no nucleosídicas tales como espaciadores, por ejemplo, hexaetilenglicol o espaciadores C<sub>n</sub>, donde n es de entre 3 y 6. En la medida en que los oligonucleótidos contienen modificaciones, éstos se seleccionan de modo que también sea posible una hibridación con analitos de ADN/ARN naturales con la modificación. Las modificaciones preferidas influyen en el comportamiento de fusión, preferentemente a la temperatura de fusión, en particular, para distinguir los híbridos que tienen diferentes grados de complementariedad de sus aminoácidos (diferenciación de desapareamientos). Las modificaciones preferidas incluyen LNA, 8-aza-7-desaza-purina, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina y/o interrupciones abásicas en el oligonucleótido. Otras modificaciones de acuerdo con la invención son, por ejemplo, modificaciones con biotina, tiol y donante de fluorescencia y moléculas aceptoras de fluorescencia.

En una realización preferida de la divulgación, las nanopartículas se conjugan con oligonucleótidos. De esta manera, las nanopartículas forman conjugados de nanopartículas y oligonucleótidos.

De esta manera, se puede lograr que los oligonucleótidos que forman parte del método de acuerdo con la invención se puedan calentar específicamente a través de la excitación de las nanopartículas sin tener que calentar el volumen de reacción en su conjunto. En una realización especialmente preferida, las nanopartículas se conjugan con cebadores. Más preferentemente, las nanopartículas se conjugan con cebadores directos e inversos de la PCR. En una realización preferida de la invención, un tipo de conjugados de nanopartículas y oligonucleótidos tiene cebadores directos, pero no cebadores inversos unidos; otra clase tiene cebadores inversos, pero no cebadores directos unidos.

En otra realización preferida de la invención, un tipo de conjugados de nanopartículas y oligonucleótidos se conjuga con cebadores directos, así como cebadores inversos. En dicha realización, se sintetiza una nueva cadena simple de ADN complementaria a la original en una PCR a partir del cebador directo en una nanopartícula. Esta nueva cadena simple de ADN se conjuga con la nanopartícula cuando la nueva cadena simple de ADN contiene el cebador directo. Inmediatamente después de la síntesis, la nueva cadena simple de ADN forma una cadena doble con la original. En una etapa de desnaturalización posterior, la nueva cadena simple de ADN se separa de la original. A una temperatura de hibridación, la nueva cadena simple de ADN se hibrida con un cebador inverso que está situado en la superficie de la nanopartícula, de manera que se forma un bucle. Para la hibridación con el cebador inverso en la misma nanopartícula, solo hay que cruzar una pequeña distancia. Para lograr la hibridación con un cebador inverso en una nanopartícula diferente a concentraciones de nanopartícula preferidas, como media, la distancia que hay que cruzar es mayor. Por lo tanto, en dicha realización, se puede conseguir ventajosamente que la hibridación se produzca más rápidamente y que la PCR pueda completarse más rápidamente.

En una realización preferida de la invención, las nanopartículas están conectadas a los cebadores de modo que hay enlaces covalentes con más de un tiol entre los cebadores y las nanopartículas. En general, los tampones de PCR contienen ditiotreitól, que desestabiliza el enlace tiol entre las nanopartículas de oro y los cebadores, y que puede - sobre todo bajo tensión térmica, por ejemplo, durante la desnaturalización - hacer que los cebadores se separen de las nanopartículas. Los enlaces covalentes con más de un tiol entre los cebadores y las nanopartículas pueden reducir la separación de los cebadores y, por lo tanto, mejorar la eficacia de la PCR.

En una realización preferida, se usan secuencias homólogas, que se pueden unir a dichos oligonucleótidos, que se han desprendido de las nanopartículas con las que se habían conectado previamente. Las secuencias homólogas son oligonucleótidos. En el método, puede ocurrir que los oligonucleótidos, que están conjugados a las nanopartículas, se desprenden de dichas nanopartículas y se liberan. En el caso de que dichos oligonucleótidos

libres sean los cebadores de acuerdo con la invención, estos cebadores libres pueden unirse al original o al complemento. Como los cebadores libres no se unen a las nanopartículas, los cebadores libres no se pueden deshibridar del original ni del complemento, respectivamente, mediante la excitación de las nanopartículas. De este modo, disminuyen la eficacia y la sensibilidad del método. Las secuencias homólogas son al menos parcialmente complementarias a los oligonucleótidos libres, y se unen a estos con afinidad suficiente para limitar la función de los oligonucleótidos libres. De esta manera, se pueden reducir la eficacia y la sensibilidad del método. En una realización particularmente preferida del método, se añade a la muestra una cantidad de secuencias homólogas suficiente para bloquear los cebadores libres, incluso antes de la adición del original. Al mismo tiempo, dicha cantidad es lo suficientemente pequeña como para que las nanopartículas muestren un número suficientemente grande de cebadores no bloqueados. Esto es posible si el número de cebadores en las nanopartículas supera el número de cebadores libres.

En una realización preferida, se unen moléculas de carga a las nanopartículas. Las moléculas de carga previenen la agregación no deseada de las nanopartículas en la muestra. Por lo tanto, las moléculas de carga sirven ventajosamente para estabilizar las nanopartículas. La carga de las nanopartículas se puede modular usando las moléculas de carga. De esta manera, se puede adaptar la concentración de sal que está presente en el entorno de las nanopartículas, de modo que la ADN polimerasa puede sintetizar lo más rápidamente posible y que, ventajosamente, el método se pueda realizar rápidamente. Las moléculas de carga pueden consistir en oligonucleótidos que no sean cebadores y que sean preferentemente más cortos que los cebadores. Las moléculas de carga también pueden consistir, por ejemplo, en polímeros tales como, por ejemplo, polietilenglicol. En una realización preferida, las moléculas de carga permiten reducir el número de cebadores de las nanopartículas y usar en su lugar más secuencias de carga sin reducir la eficacia del método en una cantidad significativa.

En una realización preferida adicional del método, los oligonucleótidos de las nanopartículas muestran una secuencia espaciadora como una secuencia parcial. La secuencia espaciadora está situada en la parte del oligonucleótido más cercana a la nanopartícula. De esta manera, la secuencia espaciadora sirve a la parte restante del oligonucleótido como un espaciador. En una realización preferida, un oligonucleótido contiene una secuencia parcial que tiene la función de un cebador, y se denomina secuencia cebadora, así como una secuencia parcial, que es una secuencia espaciadora. Como las secuencias cebadoras están espaciadas más lejos debido a las secuencias espaciadoras, los ácidos nucleicos que se va a amplificar y las ADN polimerasas pueden, ventajosamente, obtener un mejor acceso a las secuencias cebadoras. En una realización preferida, las copias del original y del complemento permanecen unidas a la superficie de las nanopartículas a través de las secuencias espaciadoras. En una realización particularmente preferida, las secuencias espaciadoras contienen sitios de restricción para endonucleasas de restricción de modo que las copias sintetizadas se pueden cortar de las nanopartículas.

Esto tiene lugar preferentemente una vez finalizado el método. Sin embargo, también puede ocurrir mientras que se lleva a cabo el método. De esta manera, el método hace posible la producción de copias de ácidos nucleicos que están presentes libremente en la muestra. En una realización preferida del método, las secuencias espaciadoras son al menos tan largas como las moléculas de carga, de modo que las secuencias cebadoras no están obstruidas por las moléculas de carga.

En una realización preferida, el calor, que se transfiere de las nanopartículas a su entorno a través de la excitación de las nanopartículas, es suficiente para deshibridar los oligonucleótidos en la superficie de las nanopartículas de los ácidos nucleicos hibridados con dichos oligonucleótidos. En esta realización, las nanopartículas se conjugan con los oligonucleótidos y al menos una parte de dichos oligonucleótidos se hibrida a ácidos nucleicos al menos parcialmente complementarios. A través de la excitación de las nanopartículas, se transfiere energía térmica al agua circundante, de manera que, preferentemente, la temperatura del agua en torno a las nanopartículas es suficiente para deshibridar los oligonucleótidos de los ácidos nucleicos unidos a los mismos. En una realización particularmente preferida, el método de acuerdo con la invención es una PCR, y las nanopartículas se conjugan con cebadores. Al llevar a cabo la PCR, preferentemente, se forman productos de PCR bicatenarios, en cada uno de los cuales al menos una cadena simple de los productos de PCR bicatenarios se conjuga con una nanopartícula. En dicha realización, se puede conseguir ventajosamente producir la temperatura de desnaturalización alrededor de las nanopartículas a través de la excitación de las nanopartículas y llevar a cabo la desnaturalización de los productos de PCR bicatenarios sin calentar todo el volumen de reacción. De esta manera, la desnaturalización se puede acelerar, de forma que la PCR puede ocurrir más rápidamente. En otra realización preferida, la temperatura de hibridación y la temperatura de elongación también se producen a través de la excitación de las nanopartículas. De esta manera, preferentemente, solo se ha de transferir una pequeña cantidad de energía en comparación con el calentamiento de toda la sonda hasta la temperatura de hibridación y la temperatura de elongación. Más preferentemente, la desnaturalización, hibridación y elongación de la PCR tienen lugar sin un calentamiento global, sino exclusivamente a través del calentamiento local por la excitación de las nanopartículas. De esta manera, el método se puede llevar a cabo sin un dispositivo para el calentamiento global, de modo que se requiere menos equipo para realizar el método.

En otra realización preferida, el método comprende una etapa de calentamiento global. En ella, la temperatura en al menos una etapa del método se alcanza, al menos parcialmente, mediante el calentamiento global. En una

realización más preferida de la invención, el método es una PCR, y la temperatura de hibridación se logra mediante el calentamiento global del volumen de reacción. Lo más preferentemente, el volumen de reacción se calienta globalmente a través de todo el método en un intervalo de temperaturas predeterminado, en el que se lleva a cabo la hibridación. En este caso, la temperatura de elongación y la temperatura de desnaturalización se alcanzan a través de la excitación de las nanopartículas. De este modo, ventajosamente, el dispositivo que produce el calentamiento global se puede implementar en un diseño sencillo, ya que solo es necesario mantener una temperatura predeterminada.

En otra realización preferida, la temperatura de hibridación y la temperatura de elongación se alcanzan mediante calentamiento global, y exclusivamente la desnaturalización se logra mediante la excitación de las nanopartículas. De esta manera, ventajosamente, se puede lograr que el dispositivo que crea el calentamiento global solo tenga que producir un ciclo de temperatura con dos temperaturas diferentes y, por lo tanto, se pueda implementar en un diseño sencillo. Por lo general, la elongación y la hibridación tienen lugar en un intervalo limitado de temperaturas. A diferencia de esto, para conseguir la desnaturalización, solo se ha de superar una cierta temperatura. Por lo tanto, las faltas de homogeneidad en la excitación de las nanopartículas para producir la desnaturalización son un problema menor que en el ajuste de la temperatura de hibridación y la temperatura de elongación. Por lo tanto, se puede implementar técnicamente de una manera más sencilla una realización preferida en la que la excitación de las nanopartículas sirve exclusivamente para producir la desnaturalización. Esto se cumple en particular para el caso preferido, en el que la temperatura de hibridación y la temperatura de elongación están muy cercanas entre sí, por ejemplo, cuando la temperatura de hibridación es de 60 °C y la temperatura de elongación es de 72 °C, de manera que el calentamiento global solo necesita producir un pequeño aumento de la temperatura.

En una realización especialmente preferida, la temperatura de hibridación es la misma que la temperatura de elongación. En este caso, el método es una PCR. Si la temperatura de hibridación es igual a la temperatura de elongación, se requiere un ciclo de temperatura con solo dos temperaturas diferentes para llevar a cabo la PCR, lo que significa que el método se puede realizar con una configuración simple.

Preferentemente, las temperaturas de fusión de los cebadores y la ADN polimerasa usada se seleccionan de manera que, a la temperatura de fusión, la ADN polimerasa usada todavía pueda sintetizar ADN a una velocidad suficiente. En una realización especialmente preferida, la temperatura de elongación, que es igual a la temperatura de hibridación, se consigue mediante el calentamiento global, y la desnaturalización se logra mediante la excitación de las nanopartículas. De esta manera, el dispositivo que produce el calentamiento global se puede implementar de una manera sencilla, ya que solo necesita mantener una temperatura.

En una realización preferida, solo una parte de las nanopartículas se excita en cualquier momento durante la ejecución del método. Con este fin, por ejemplo, los medios para la excitación de las nanopartículas se pueden diseñar de modo que solo exciten las nanopartículas en una parte del volumen de reacción. En una realización especialmente preferida, las nanopartículas son excitadas ópticamente usando un láser, y el dispositivo óptico, que guía la luz al volumen de reacción, está diseñado de modo que la luz solo se dirige a una parte del volumen de reacción. La parte de las nanopartículas que es excitada, preferentemente, cambia durante la ejecución del método. En otras palabras, un primer conjunto de nanopartículas que es excitado en un primer momento no es idéntico a un segundo conjunto de nanopartículas excitado una segunda vez. En este caso, puede haber cualquier número de nanopartículas presente en el primero, y puede haber cualquier número de nanopartículas en el segundo conjunto, siempre que el primer y segundo conjunto no sean idénticos. De los dos dichos conjuntos, por ejemplo, uno puede solaparse con el otro, de manera que los conjuntos formen una intersección de los conjuntos. Un conjunto puede, por ejemplo, ser un subconjunto del otro conjunto, de modo que un conjunto contenga un menor número de nanopartículas que el otro conjunto. Los dos conjuntos también se pueden modelar de modo que no formen una intersección, de manera que no haya ninguna nanopartícula presente en el primer conjunto, ni en el segundo conjunto. Uno de los dos conjuntos también puede ser el conjunto vacío de modo que, por ejemplo, una vez, las nanopartículas son excitadas y, en otro momento, no se excita ninguna nanopartícula. En una realización preferida, el primer y segundo conjunto contienen esencialmente el mismo número de nanopartículas. Se prefiere especialmente, en diferentes momentos, que un láser excite diferentes fracciones de las nanopartículas. De este modo, en la ejecución del método, se puede emplear un láser con una potencia inferior, que sea apenas suficiente, para excitar una fracción de las nanopartículas. En una realización especialmente preferida, se usan dos o más láseres para excitar diferentes partes de las nanopartículas. De esta manera, ventajosamente, es posible excitar diferentes fracciones de las nanopartículas, sin necesidad de un elemento óptico que dirija el láser a diferentes partes del volumen de reacción.

En otra realización preferida de la invención, está teniendo lugar un movimiento dirigido de la muestra en relación con un campo de excitación, de modo que, en momentos diferentes, se excitan las nanopartículas de diferentes volúmenes parciales de la muestra. Más preferentemente, el campo de excitación es la luz de un láser. En una realización más preferida, la luz del láser es dirigida por un elemento óptico para excitar las nanopartículas en diferentes volúmenes parciales del volumen de reacción en diferentes momentos. El elemento óptico puede ser desplazable, por ejemplo, el elemento óptico puede contener un espejo móvil, un modulador espacial o un modulador acústico-óptico. El láser en sí también puede ser móvil. El movimiento de la muestra se puede implementar moviendo el recipiente de reacción que contiene la muestra. En una realización especialmente

preferida, el haz láser, así como el recipiente de reacción se mueven. En una realización preferida adicional, la muestra se mueve en el volumen de reacción de modo que la luz del láser capture diferentes volúmenes parciales de la muestra en diferentes momentos. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por agitación de la muestra en el volumen de reacción, por ejemplo, mediante el uso de un agitador magnético. El volumen de reacción puede, por ejemplo, adoptar una forma alargada, por ejemplo, un canal o un tubo. La muestra puede, por ejemplo, moverse a través de un canal, pasando un haz láser por la muestra en uno o varios lugares. Preferentemente, la muestra fluye a través de un canal y pasa n posiciones, en cada una de las cuales el haz láser se dirige a la muestra en el canal; debido al flujo lineal de la muestra a través de los n haces de láser, se realiza una PCR con n ciclos. De esta manera, el método se puede llevar a cabo con una pequeña cantidad de partes móviles. Mediante el uso de un canal, es posible una miniaturización, por ejemplo, en el sentido de un laboratorio en un chip. Preferentemente, el haz láser genera la desnaturalización mientras se producen la temperatura de elongación y la temperatura de hibridación mediante el calentamiento global. Se prefiere especialmente que la temperatura de elongación sea igual a la temperatura de hibridación, de modo que solo haya que mantenerse una temperatura a través del calentamiento global. De esta manera, el método de acuerdo con la invención se puede realizar con el mínimo esfuerzo.

En una realización preferida, en el método, se usa una ADN polimerasa termolábil. Para el caso en el que la excitación de las nanopartículas se use para la desnaturalización, se puede evitar la exposición de todo el volumen de reacción a temperaturas elevadas. Más bien, es posible calentar exclusivamente el entorno inmediato de las nanopartículas hasta la temperatura de desnaturalización. De esta manera, las ADN polimerasas que no se encuentran en el entorno inmediato no se exponen a altas temperaturas. De este modo, es posible usar ADN polimerasas que no sean termoestables, sino termolábiles. Mediante la inclusión de ADN polimerasas termolábiles, hay una mayor selección de polimerasas disponible para el método de acuerdo con la invención. Debido a la mayor libertad de elección de las ADN polimerasas, las condiciones de reacción pueden variar en mayor medida, mientras que, al mismo tiempo, se mantiene el funcionamiento suficiente de la ADN polimerasa usada. Para que los ácidos nucleicos que se va a amplificar sean capaces de unirse a los oligonucleótidos cargados negativamente sobre las nanopartículas, puede ser necesario el uso de sustancias, en particular, de sales, en la muestra a una concentración que pueda tener un efecto perjudicial sobre el funcionamiento de una ADN polimerasa termoestable, lo que reduce la eficacia del método. La mayor libertad de elección de las ADN polimerasas - en particular, de las que tienen una alta tolerancia a la sal - puede conducir a un aumento de la eficacia del método. Parte de la mayor variedad de las ADN polimerasas son ADN polimerasas pequeñas tales como, por ejemplo, el fragmento de Klenow y Phi29. En las proximidades de las nanopartículas, las ADN polimerasas termoestables, grandes, pueden experimentar el impedimento estérico debido a los cebadores unidos y, posiblemente, ya alargados. Como resultado de ello, puede ser que la ADN polimerasa no llegue al ácido nucleico que se va a copiar o que la ADN polimerasa se interrumpa antes de que haya sintetizado una copia completa del original o del complemento, lo que provoca una reducción de la eficacia del método. La mayor posibilidad de elección de las ADN polimerasas, por lo tanto, hace posible un aumento de la eficacia del método. Debido a la mayor capacidad de elección de las ADN polimerasas, ventajosamente, también se pueden adquirir enzimas con menores costes de producción. Las ADN polimerasas que no están situadas en el entorno inmediato de las nanopartículas experimentan un menor grado de desactivación inducida por calor. De este modo, ventajosamente, en el método, se puede usar una cantidad más pequeña de la ADN polimerasa.

En una realización preferida de la invención, hay cebadores solubles, así como cebadores en nanopartículas presentes en el volumen de reacción. Los cebadores solubles no se conjugan a las nanopartículas, sino que se disuelven en la muestra. Preferentemente, los cebadores solubles son más pequeños que los conjugados de cebadores y nanopartículas, y pueden, por lo tanto, existir a una concentración superior a la de los conjugados de cebadores y nanopartículas. Debido a esto, los cebadores solubles pueden tener un acceso mejor y más rápido a los ácidos nucleicos bicatenarios, largos, tales como, por ejemplo, ADN genómico. En una realización especialmente preferida, en una primera etapa del método, los ácidos nucleicos bicatenarios largos se desnaturalizan mediante el calentamiento global de todo el volumen de reacción, tras lo que los cebadores solubles se hibridan con los ácidos nucleicos. La PCR, en un primer momento, se ejecuta a través de uno o varios ciclos con calentamiento global, durante el que la ADN polimerasa sintetiza las copias cortas deseadas de los ácidos nucleicos bicatenarios largos. Posteriormente, se prosigue con la PCR, usándose también un calentamiento local a través de la excitación de las nanopartículas.

En una realización preferida de la invención, la difusión de partículas de los conjugados de cebadores y nanopartículas se puede amplificar mediante el uso de campos ópticos. A través de los campos de vórtices ópticos (de acuerdo con Silvia Albaladejo *et al.*, *Nano Letters*, 2009, volumen 9, número 10, páginas 3527 a 3531, cuyo contenido relacionado forma parte de la presente divulgación a modo de referencia), con los que las nanopartículas son excitadas o debido a las fuerzas ópticas (de acuerdo con Arthur Ashkin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, volumen 94, número 10, páginas 4853 a 4860, cuyo contenido relacionado forma parte de la presente divulgación a modo de referencia), que se ejercen sobre las nanopartículas, se puede aumentar la difusión de las nanopartículas. De este modo, ventajosamente, puede tener lugar una hibridación más rápida del ácido nucleico que se va a amplificar con los cebadores en las nanopartículas a una concentración de nanopartículas dada. Esto se puede utilizar para lograr una aceleración del método de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, la concentración de los productos de una reacción de amplificación se puede detectar con sondas de ensayo. Las sondas de ensayo son nanopartículas que contienen oligonucleótidos con secuencias de ensayo en sus superficies. En una realización preferida del método, los oligonucleótidos de las sondas de ensayo tienen una secuencia espaciadora como secuencia parcial. La secuencia espaciadora está situada en el lado del oligonucleótido más cercano a la nanopartícula. Por lo tanto, la secuencia espaciadora sirve a la parte restante del oligonucleótido como un espaciador. En una realización preferida, el oligonucleótido de las sondas de ensayo contiene tanto una secuencia parcial que se denomina secuencia de ensayo, como una secuencia parcial que es una secuencia espaciadora. En una realización preferida, las sondas de ensayo tienen moléculas de carga unidas a las mismas. Las secuencias de ensayo se pueden hibridar con los productos de la reacción de amplificación. En este caso, las secuencias de ensayo son preferentemente al menos parcialmente complementarias a los productos de la reacción de amplificación. En una realización preferida, las primeras nanopartículas se conjugan con cebadores directos. En presencia del original y de una ADN polimerasa, los cebadores directos se extienden de modo que se crean complementos, que se unen a las primeras nanopartículas a través de los cebadores directos. En este caso, un complemento consiste en un cebador directo y una secuencia de extensión, que se crea mediante la extensión del cebador directo. Se prefiere especialmente realizar una PCR usando cebadores inversos solubles y/o conjugados con nanopartículas de modo que, en una amplificación exponencial, preferentemente se produzca un gran número de copias del original y de complementos conjugados con nanopartículas. Lo más preferentemente, las primeras nanopartículas contienen en su superficie cebadores tanto directos como inversos. En una etapa intermedia opcional, los originales y, posiblemente, sus copias se desnaturalizan a partir de los complementos a través de un calentamiento local o global. Las primeras nanopartículas se reúnen luego con las sondas de ensayo, si esto no ha ocurrido anteriormente. Las secuencias de ensayo de las sondas de ensayo son complementarias a las secuencias de extensión, de modo que las sondas de ensayo se pueden unir a los cebadores directos extendidos en las primeras nanopartículas a través de las secuencias de ensayo. En condiciones de reacción apropiadas, la conexión de las primeras nanopartículas y las sondas de ensayo tiene lugar en un grado en el que haya presentes complementos unidos a nanopartículas. Esto significa que si no se forman secuencias de extensión, no se realiza ninguna conexión entre las sondas de ensayo y las nanopartículas. Más preferentemente, las condiciones de reacción de la amplificación y la detección de acuerdo con la invención usando sondas de ensayo se seleccionan de manera que el grado de la conexión de las primeras nanopartículas con las sondas de ensayo permita llegar a una conclusión sobre qué concentración del original estaba presente en la muestra antes de la amplificación. A través de la conexión de las primeras nanopartículas con las sondas de ensayo, puede surgir un cambio medible, por ejemplo, un desplazamiento hacia el rojo o una ampliación de la resonancia de plasmón en el espectro de absorbancia. En una realización especialmente preferida, el cambio medible que se produce a través de la conexión de las sondas de ensayo con las nanopartículas es proporcional a la concentración del original en la muestra antes de la amplificación. De esta manera, ventajosamente, se pueden usar herramientas sencillas para verificar la concentración.

En otra realización preferida, el método comprende cebadores directos que están conjugados a las primeras nanopartículas y cebadores inversos libres y/o unidos de nanopartículas. Es especialmente preferido que las nanopartículas contengan cebadores directos, así como cebadores inversos en su superficie. En una primera etapa, una ADN polimerasa extiende los cebadores directos a complementos unidos a nanopartículas en presencia del original. En una segunda etapa, a partir de los cebadores inversos que se unen al complemento unido a nanopartículas, se sintetizan copias del original. Tras ello, las primeras nanopartículas se unen con las sondas de ensayo, si esto no ha ocurrido ya. En dicha realización, las secuencias de ensayo son complementarias a los cebadores directos. Si los cebadores directos no se extendieron, entonces las sondas de ensayo pueden unirse bien a las primeras nanopartículas. Si los cebadores directos se extendieron, entonces, la unión de las secuencias de ensayo con los cebadores directos se inhibe debido al impedimento estérico. Si una copia recién sintetizada del original se hibrida con un cebador directo extendido, entonces se impide la unión de la secuencia de ensayo con el cebador directo extendido. De esta manera, el grado de la conexión entre las primeras nanopartículas y las sondas de ensayo disminuye en la medida en que los productos de la reacción de amplificación, es decir, los complementos y las copias del original, se sintetizan. Al elegir las condiciones de reacción adecuadas, la concentración del original se puede detectar de manera que un cambio medible sea menor cuanto más original haya presente en la muestra antes de la amplificación. El cambio medible puede, por ejemplo, ser un desplazamiento hacia el rojo o una ampliación de la resonancia de plasmón en el espectro de absorbancia. De esta manera, ventajosamente, se puede diseñar un ensayo sencillo que permita la determinación de las concentraciones de ácidos nucleicos específicos.

La invención hace posible proporcionar un método mejorado para la amplificación de ácidos nucleicos.

#### Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra, en una representación esquemática, las nanopartículas de acuerdo con la invención conjugadas con moléculas de carga, secuencias espaciadoras y secuencias cebadoras.

La Figura 2 muestra, en otra representación esquemática, las nanopartículas de acuerdo con la invención conjugadas con moléculas de carga, secuencias espaciadoras y secuencias cebadoras.

5	La Figura 3	muestra, en una representación esquemática, la configuración para realizar el método de acuerdo con la invención con un láser, un escáner con espejo bidimensional y una muestra.
5	La Figura 4	muestra, en una representación esquemática, una configuración adicional para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención con un láser, un espejo y una muestra, que se mueve con relación al haz láser.
10	La Figura 5	muestra, en una representación esquemática, otra configuración para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención con un láser, un escáner con espejo monodimensional y una muestra movida en una dimensión.
15	La Figura 6	muestra, en una representación esquemática, las nanopartículas de acuerdo con la invención y las sondas de ensayo de acuerdo con la invención para la detección positiva de ADN.
20	La Figura 7	muestra, en una representación esquemática, otra configuración para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención con un láser, un escáner con espejo bidimensional y un tubo de muestra en un baño de agua.
25	La Figura 8	muestra, en dos diagramas, los resultados de las reacciones de amplificación con calentamiento global y local con sondas de ensayo para la detección positiva de ADN.
30	La Figura 9	muestra, en una representación esquemática, las nanopartículas de acuerdo con la invención y las sondas de ensayo de acuerdo con la invención para la detección negativa de ADN.
35	La Figura 10	muestra, en dos diagramas, los resultados de las reacciones de amplificación con calentamiento global y local con sondas de ensayo para la detección negativa de ADN.
40	La Figura 11	muestra, en un diagrama, los resultados de las reacciones de amplificación con el fragmento de Klenow no termoestable.
45	La Figura 12	muestra, en un diagrama, los resultados de las reacciones de amplificación con un haz láser fijo y en movimiento.
50	La Figura 13	muestra, en una representación esquemática, una configuración para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención con una fuente de luz, un elemento de desviación y un tubo de muestra móvil.
55	La Figura 14	muestra, en una representación esquemática, una sección de una nanopartícula de acuerdo con la invención con moléculas de carga, oligonucleótidos y ADN polimerasas.
60	La Figura 15	muestra, en cuatro diagramas, los resultados de las reacciones de amplificación con sondas de ensayo para la detección negativa de ADN.
65	La Figura 16	muestra, en una representación esquemática, un primer láser para la excitación de las nanopartículas en un tubo de muestra, y un segundo láser y un fotodiodo para la medición de la transmisión de la muestra.

**Descripción detallada de la invención de acuerdo con varias realizaciones**

50 La Figura 1 muestra una realización del método 1 de acuerdo con la invención para la amplificación de ácidos nucleicos, que se implementa como una PCR. Un volumen de reacción 2 contiene las primeras nanopartículas 3. Las primeras nanopartículas 3 muestran los oligonucleótidos 4 en su superficie como se observa en la Figura 1a. Cada tipo de oligonucleótidos 4 contiene, como secuencia parcial, una secuencia cebadora 5 con una secuencia A, y, como secuencia parcial opcional, adicional, una secuencia espaciadora 6 S. Una secuencia cebadora 5 se define como la secuencia de un cebador 7. La secuencia espaciadora 6S sirve para mantener la secuencia cebadora 5 lo suficientemente lejos de la superficie de la nanopartícula 8 como para que un ácido nucleico 1 que se vaya a amplificar se una a la secuencia cebadora 5 con una mejor eficacia y para que la ADN polimerasa 10 encuentre un mejor acceso a la secuencia cebadora 5. Los oligonucleótidos 4 con una secuencia cebadora 5 A están unidos, por ejemplo, a través de un enlace tiol a la superficie de la primera nanopartícula, de modo que el extremo 3' está de espaldas a la primera nanopartícula 3. Opcionalmente, otro tipo de oligonucleótidos 4 puede estar presente en la superficie de las primeras nanopartículas 3; se trata de las moléculas de carga 9 F. Usando las moléculas de carga 9, la carga de las nanopartículas 8 se puede modular, de modo que se eviten las agregaciones no deseadas de las nanopartículas 8. Además, las moléculas de carga 9 pueden aumentar la distancia de las secuencias cebadoras 5 entre sí en la superficie de las nanopartículas 8, de modo que los ácidos nucleicos 1 que se vayan a amplificar y la ADN polimerasa 10 puedan encontrar un mejor acceso a las secuencias cebadoras 5. Esto puede aumentar la eficacia del método. La secuencia espaciadora 6 es preferentemente al menos tan larga como la molécula de carga

9, de modo que, ventajosamente, las secuencias cebadoras 5 sobresalen de las moléculas de carga 9.

Una muestra 11 está presente en el volumen de reacción 2, muestra 11 que contiene las primeras nanopartículas 3 de la Figura 1a con las secuencias cebadoras 5, secuencias espaciadoras 6 y moléculas de carga 9 y, además de esto, los dNTP y las ADN polimerasas 10. Un ácido nucleico 1 que se va a detectar puede estar presente en la muestra 11. En dicha realización, el ácido nucleico 1 que se va a detectar es una sola cadena de ADN, que también se denomina el original 12 y contiene una secuencia parcial A', así como una secuencia parcial B'. El original 12 puede contener secuencias parciales adicionales, por ejemplo, en forma de saliente en el extremo 5' o 3' o entre las dos secuencias parciales A' y B'. En la Figura 1b, el original 12 se une con su secuencia parcial A' a la secuencia cebadora 5A en la superficie de la primera nanopartícula 3. En la Figura 1c, se muestra que una ADN polimerasa 10 se une al original 12 y a la secuencia cebadora 5A hibridada al original 12. Posteriormente, la ADN polimerasa 10 sintetiza, en una etapa de elongación que se muestra en la Figura 1d, comenzando desde el extremo 3' de la secuencia cebadora 5 A, un ácido nucleico 1 complementario al original 12, ácido nucleico que se denomina complemento 13 y que está conectado a una secuencia espaciadora 6 en la superficie de la primera nanopartícula 3. En la Figura 1e, la primera nanopartícula 3 se irradia entonces con luz, que es absorbida por la primera nanopartícula 3 a causa de las propiedades plasmónicas o de su material y que se transforma en calor. El calor se transfiere al entorno de la primera nanopartícula 3 y dentro de la región del original 12, y el complemento recién sintetizado 13 hibridado al original 12 es suficiente para que el original 12 se desnaturalice desde el complemento 13. El original 12 vuelve a ser libre, como se muestra en la Figura 1f, de modo que se puede unir a otra secuencia cebadora 5 y se pueden sintetizar complementos unidos a nanopartículas adicionales 13 en ciclos adicionales del método. De esta manera, se crea un aumento lineal de la concentración de los complementos 13 con un número creciente de ciclos. Las etapas del método descrito en las Figuras 1g y 1 h se aclaran en el presente documento más adelante.

La Figura 2 muestra una realización del método de acuerdo con la invención, en el que las nanopartículas 8 están situadas en una muestra 11. Las nanopartículas 8 muestran moléculas de carga 9 F en su superficie. Por otra parte, las nanopartículas 8 están conjugadas con oligonucleótidos 4. Una primera clase de oligonucleótidos 4 consiste en una secuencia espaciadora 6 S y una secuencia cebadora 5 A. Una segunda clase de oligonucleótidos 4 consiste en una secuencia espaciadora 6 S y una secuencia cebadora 5 B'. En dicha realización, el original 12 que se va a amplificar es de una molécula de ADN monocatenario con las secuencias parciales A, C, B (no se muestran). A partir de una secuencia cebadora B' en la superficie de la nanopartícula 8, una ADN polimerasa 10 sintetiza una cadena complementaria al original 12, de modo que, como se muestra en la Figura 2a, una cadena simple de ADN con la secuencia S, B', C' y A' está situada en la nanopartícula 8. Al mismo tiempo, se puede ver en la Figura 2a que una ADN polimerasa ha sintetizado una copia del original 12 a partir de la secuencia cebadora 5 A, que está conectada con la secuencia espaciadora 6 S en la superficie de la nanopartícula 8. Como se muestra con la flecha de la Figura 2a, la copia del original 12 unida a la nanopartícula 8 se hibrida con su secuencia parcial B a una secuencia cebadora 5 B' en la superficie de la misma nanopartícula 8. Una segunda flecha en la Figura 2a muestra que el complemento 13 sintetizado en la superficie de la nanopartícula 8 se hibrida con su secuencia parcial A' a una secuencia cebadora 5 A en la superficie de la misma nanopartícula 8. El resultado de los dos dichas hibridaciones se muestra en la Figura 2b. En ella, el original 12, así como el complemento 13 forman un bucle en la superficie de la nanopartícula 8. La Figura 2c muestra que se sintetiza una cadena complementaria al original 12 empezando a partir del cebador 7 B', cuya cadena está conectada a la superficie de la nanopartícula 8 a través de una secuencia espaciadora 6 S. Otra ADN polimerasa 10 sintetiza una copia del original 12 a partir de la secuencia cebadora 5A, cuya copia también está conectada a la superficie de la nanopartícula 8 a través de una secuencia espaciadora 6. El resultado de las dos síntesis se muestra en la Figura 2d. En dicha realización, el cebador directo 14, así como el cebador inverso 15 están situados en la misma nanopartícula 8. De esta manera, una cadena de ADN recién sintetizada se puede volver a hibridar a un cebador 7 en la misma nanopartícula 8. Esto puede conducir a la aceleración del método de acuerdo con la invención, pues la cadena de ADN recién sintetizada no tiene que desplazarse para encontrarse con un cebador complementario 7. En cambio, la cadena de ADN recién sintetizada se puede unir con especial rapidez a un cebador complementario 7 en la superficie de la misma nanopartícula 8, lo que se facilita especialmente por la alta concentración local del cebador 7 en la nanopartícula 8. Tras la excitación de la nanopartícula 8 en la Figura 2d, por ejemplo, con un láser 16, las copias del original 12 y las copias del complemento, que están cada una unida a la superficie de la nanopartícula 8 a través de secuencias espaciadoras 6, se deshibridan. Tras ello, una copia del original 12, que está unida a la nanopartícula 8, puede hibridarse con un complemento 13, que está unido a la superficie de otra nanopartículas idéntica 8. A través de la hibridación, las nanopartículas 8 se conectan, de manera que se produce un cambio medible. El cambio medible puede, por ejemplo, consistir en un cambio de color de la muestra 11. La realización del método de acuerdo con la invención mostrada en las Figuras 2a a 2e hace que sea posible proporcionar un ensayo sencillo que sirva para detectar el original 12.

La Figura 3 muestra una configuración que es adecuada para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención. La configuración contiene una fuente de luz 17 que, en este caso, se implementa como un láser 16, y un escáner con espejo bidimensional 18, que puede dirigir la luz desde el láser 16 a la muestra 11. El escáner con espejo bidimensional 18 puede desviar el láser en dos dimensiones. En esta configuración, la desnaturalización de la muestra 11 se produce centrando un haz láser sobre una parte de la muestra 11. Durante el método, el haz láser es desviado de modo que llega a diferentes partes de la muestra 11. En el ejemplo mostrado en la Figura 3, el haz láser

es desviado por el escáner con espejo 18 de modo que el haz láser se mueve fila por fila a través del volumen de reacción 2 en el que la muestra 11 está situada. En la Figura 3, la trayectoria seguida por el haz láser en la muestra 11 se muestra en una línea discontinua. Debido al hecho de que en cualquier momento durante el método, solo partes de la muestra 11 son excitadas, se pueden usar láseres 16 con una potencia de salida menor. Como las excitaciones inferiores a un microsegundo son suficientes para desnaturalizar el ADN con ayuda de nanopartículas 8 calentadas optotérmicamente, un diámetro de foco típico de un láser 16 de aproximadamente 10 a 100  $\mu\text{m}$  permite a un haz láser explorar la muestra de 11 a una velocidad de aproximadamente 10 a 100 m/s, mientras conduce una desnaturalización del ADN en cada punto barrido por el láser. Esto permite una exploración muy rápida de grandes volúmenes de muestra. La exploración completa de una superficie de 1  $\text{cm}^2$  lleva, por ejemplo, solo 128 ms a un diámetro de foco de 78  $\mu\text{m}$  y 128 filas a una distancia entre filas de 78  $\mu\text{m}$  y una longitud de las filas de un centímetro a una velocidad de exploración del haz láser de 10 m/s. Ventajosamente, esto es significativamente más corto que lo que, en general, requeriría una etapa de desnaturalización en la que se usara calentamiento global. Los elementos ópticos tales como, por ejemplo, un escáner con espejo 18 mostrado en la Figura 3 y las denominadas lentes F-theta pueden lograr una buena homogeneidad de la calidad de enfoque y el tamaño a través de toda la muestra 11 explorada. Como alternativa a un láser de emisión continua 16, se pueden usar un láser de impulsos 16 o un radiador térmico.

La Figura 4 muestra una configuración para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención en la que un láser 16 y un espejo 19 están fijos, y el haz láser del láser 16 se dirige hacia la muestra 11 usando el espejo 19. En este caso, la muestra 11 está dispuesta para ser móvil en dos dimensiones, de modo que moviendo la muestra 11, toda la muestra 11 o grandes partes de la muestra 11 se pueden alcanzar con el foco del láser 16.

La Figura 5 muestra una configuración para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención, en la que un láser 16 está fijo y un escáner con espejo 18 puede desviar el haz láser del láser 16 en una dirección. La muestra 11 está dispuesta para poder moverse en una dirección de modo que, moviendo el escáner con espejo 18 y la muestra 11, toda la muestra 11 o grandes partes de la muestra 11 pueden ser alcanzadas por el haz láser. En la Figura 6, se muestra una posibilidad para la detección de un ácido nucleico 1 por PCR de acuerdo con la invención. En este caso, se sitúan en una muestra las primeras nanopartículas 3, que muestran moléculas de carga 9 F y primeros oligonucleótidos 20 en su superficie. Los primeros oligonucleótidos 20 consisten en una secuencia espaciadora 6 S y una secuencia cebadora 5 A, como se muestra en la Figura 6a. Si un original 12 con las secuencias parciales A' y B' está presente en la muestra 11, entonces el original 12 se hibrida a la secuencia cebadora complementaria 5 A en una de las primeras nanopartículas 3. Una ADN polimerasa 10 sintetiza el complemento 13 con las secuencias parciales A y B, a partir de la secuencia cebadora 5 A, de modo que el complemento 13 se conecta a la superficie de la primera nanopartícula 3 a través de la secuencia espaciadora 6 S, como se muestra en la Figura 6c. En una siguiente etapa, se añaden las sondas de ensayo 21 que se muestran en la Figura 6d a la muestra. Las sondas de ensayo 21 son las segundas nanopartículas 22, que muestran moléculas de carga 9 y segundos oligonucleótidos 23 en su superficie. Los segundos oligonucleótidos 23 contienen una secuencia espaciadora 6 S y una secuencia de ensayo de 5 B'. La secuencia de ensayo 5 B' puede hibridarse con la secuencia parcial complementaria B del complemento 13 en la superficie de la primera nanopartícula 3, como se muestra en la Figura 6f. De este modo, las primeras nanopartículas 3 y las segundas nanopartículas 22 están conectadas de modo que se puede producir un cambio medible. Si el original 12 no está presente en la muestra 11, entonces no se crea complemento 13 en la superficie de la primera nanopartícula 3, como se observa en la Figura 6b. Como no hay complemento 13 en las primeras nanopartículas 3, las primeras nanopartículas 3 y las segundas nanopartículas 22 no se pueden conectar entre sí y el cambio medible no se produce. En dicha realización, la secuencia B' es complementaria a la secuencia B; la secuencia B' también puede ser complementaria a partes de la secuencia A. La secuencia espaciadora 6 S en las primeras nanopartículas 3 es idéntica a la secuencia espaciadora 6 S en las segundas nanopartículas 22. Sin embargo, en una realización adicional, se pueden usar diferentes secuencias espaciadoras 6 en las primeras nanopartículas 3 y las segundas nanopartículas 22. Además, se pueden usar varias secuencias espaciadoras 6 diferentes en el mismo tipo de nanopartículas 8. Las condiciones de tamponamiento e hibridación, por ejemplo, temperatura, concentraciones de sal, concentraciones de nanopartículas, concentraciones de aditivos de tamponamiento adicionales, pH, se seleccionan preferentemente de modo que una hibridación que conecte las primeras nanopartículas 3 con las segundas nanopartículas 23 solo puede producirse una vez completada la extensión de la secuencia cebadora 5 A en las primeras nanopartículas 3. La conexión de las primeras nanopartículas 3 con las segundas nanopartículas 22 se puede detectar, por ejemplo, como un cambio al color rojo y la ampliación de la resonancia de plasmón en el espectro de absorbancia. La conexión también se puede detectar, por ejemplo, midiendo el cambio en la transmisión en una o varias longitudes de onda tras la excitación optotérmica de las nanopartículas 8 y la desnaturalización resultante de los ácidos nucleicos 1 que conectan las primeras nanopartículas 3 con las segundas nanopartículas 22. Las sondas de ensayo 21 se pueden suministrar en un tampón de hibridación especial al que se añade al menos una parte de la muestra 11 que contiene las primeras nanopartículas 3 tras la etapa del método en la que se habilita la síntesis del complemento 13. Las sondas de ensayo 21 pueden, junto con las primeras nanopartículas 3, estar presentes en la muestra ya antes del inicio del método. En este caso, las sondas de ensayo 21 se pueden someter a pasivación de modo que no actúen como cebador 7. La pasivación de las sondas de ensayo 21 puede consistir en la selección de la secuencia cebadora 5 en las sondas de ensayo 21 de modo que no se produzca la hibridación de dicha secuencia cebadora 5 con el original 12 a la temperatura de hibridación durante la PCR, sino solo tras la posterior reducción de la temperatura. La pasivación de las sondas de ensayo 21 se puede crear uniendo el segundo oligonucleótido 23, que contiene

secuencias parciales del original 12, al extremo 3' de las segundas nanopartículas 22, de modo que la ADN polimerasa 10 no puede extender el segundo oligonucleótido 23. En este caso, los segundos oligonucleótidos 23 pueden estar libres en su extremo 5' o conectados a las segundas nanopartículas 22. Las sondas de ensayo 21 también se pueden someter a pasivación mediante la modificación de una base, por ejemplo, con didesoxi-citosina (ddC) en el extremo libre del cebador del segundo oligonucleótido 23, lo que impide la elongación.

En la realización del método mostrado en la Figura 6, las primeras nanopartículas 3, de oro y con un diámetro de 60 nm, están funcionalizadas con oligonucleótidos 4 (de acuerdo con J. Hurst *et al.*, *Anal. Chem.*, 78 (24), 8313-8318, 2006, cuyo contenido relacionado forma parte de la presente divulgación a modo de referencia). En este caso, se usan una parte de oligonucleótido 4 ID1 y - como molécula de carga 9 - cuatro partes de oligonucleótido de 4 ID2. Tras la funcionalización y seis etapas de lavado, las primeras nanopartículas 3 están presentes en un tampón de PBS (PBS 20 mM, NaCl 10 mM, Tween 20 al 0,01 %, azida al 0,01 %, EDTA 1 mM, pH 7,5) a una concentración de 200 pM. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 10 µl en tubos de muestra 24 de 200 µl (5 µl de mezcla maestra para PCR DreamTaq x 2 (Fermentas), 0,1 µl de NaCl 5 M, 0,1 µl de MgCl<sub>2</sub> 250 mM, 0,1 µl de MgSO<sub>4</sub> 250 mM, 1 µl de las primeras partículas funcionalizadas 200 pM, 1 µl de oligonucleótido 4 ID3 (como un original 12 que se va a amplificar, en el que la concentración del original 12 que se determinará está en un volumen total de 10 µl, por ejemplo, 0 pM, 10 pM, 20 pM o 50 pM) disuelto en agua con oligonucleótido 4 ID4 100 nM (el oligonucleótido 4 ID4 sirve para saturar las superficies, por ejemplo, durante el almacenamiento del original 12 antes de la reacción), 2,7 µl de agua). Como se muestra en la Figura 7, los tubos de muestra 24 se llevan a una temperatura de 65 °C en una cubeta de vidrio 25 en un baño de agua 26, en el que dicha temperatura es la temperatura de hibridación, así como la temperatura de elongación. El baño de agua 26 sirve - además de para mantener la temperatura correcta - también para mejorar el acoplamiento del láser 16 a la superficie no plana de los tubos de muestra 24. El agua del baño de agua 26 permite la reducción de la diferencia en los índices de refracción entre el exterior de los tubos de muestra 24 y su interior, que está lleno con la mezcla de reacción PCR; de este modo, se suprime una refracción del haz láser y una influencia negativa resultante sobre la calidad del enfoque y la nitidez. De este modo, ventajosamente, se mejora el acoplamiento del láser 16. El láser 16, que sirve para excitar las nanopartículas, es un láser Nd:YAg bombeado por diodos de frecuencia duplicada (Coherent Verdi V10), que se enfoca en los tubos de muestra 24 del baño de agua 26 (diámetro focal de aproximadamente 20 µm) con una potencia de salida de 0,5 W con una lente F-theta (Jenoptik, distancia focal de 100 mm) detrás de un escáner con espejo 18 (Cambridge technologies, Pro Series 1). El escáner con espejo 18 permite mover el foco fila por fila a través de los tubos de muestra 24, como ya se ha mostrado en la Figura 3 y, por lo tanto, incluye todo el volumen de reacción de PCR en la amplificación optotérmica. Por cada tubo de muestra 24, se exploran 400 filas con el foco a una distancia de aproximadamente 12 µm a una velocidad por fila en los tubos de muestra 24 de aproximadamente 2 m/s. Esto corresponde a un ciclo en el primer tubo de muestra 24. Seguidamente, se exploran todos los demás tubos de muestra 24 uno tras otro, de manera que cada tubo de muestra 24 experimenta un ciclo. Tras un tiempo de espera de 40 s tras la exploración del primer tubo de muestra 24, se inicia el siguiente ciclo, y esto se repite hasta que cada tubo de muestra 24 haya completado 25 ciclos. Como concentración de partida del original 12, en el primer tubo de muestra, se selecciona 24, 0 pM, en el segundo tubo de muestra 24, 20 pM, y en el tercer tubo de muestra 24, 50 pM. Para el control negativo, se inserta un cuarto tubo de muestra 24 en el baño de agua 26 que también contiene el original 12 a una concentración de 50 pM, pero que no es alcanzado por el haz láser. Una vez que el primer, segundo y tercer tubo de muestra 24 han completado 25 ciclos, los cuatro tubos de muestra 24 se retiran del baño de agua 26. Para examinar el efecto de los ciclos de láser y de la concentración del original 12, se usa una sonda de ensayo 21 que es capaz de hibridarse exclusivamente a las secuencias de ensayo producidas mediante la extensión de los cebadores unidos a nanopartículas en las condiciones de tamponamiento y de hibridación seleccionadas. En este caso, la extensión del cebador 7 es complementaria al original 12, como se muestra en la Figura 6c. Para producir las sondas de ensayo 21, se funcionalizan las segundas nanopartículas 22, de oro y con un diámetro de 16 nm, con oligonucleótidos 4 (de acuerdo con J. Hurst, *supra*). En ellas, se usan una parte de oligonucleótido 4 ID5 y - como molécula de carga 9 - cuatro partes de oligonucleótidos 4 ID2. Tras la funcionalización y las seis etapas de lavado, las segundas nanopartículas 22 están presentes en un tampón de PBS (PBS 20 mM, NaCl 10 mM, Tween 20 al 0,01 %, azida al 0,01 %, EDTA 1 mM, pH 7,5) a una concentración de 200 pM. Para la hibridación de los oligonucleótidos 4 en las primeras nanopartículas 3 con los oligonucleótidos 4 en las segundas nanopartículas 22, se usa un tampón de fosfato modificado (PBS 13 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,02 %, EDTA 1 mM, citrato de sodio 20 mM, 1 µg/µl de PVP10, pH 7,5). 10 µl de solución de hibridación contienen 2,25 µl del tampón fosfato modificado, 3 µl de formamida, 2 µl de NaCl 5 M, 0,25 µl de la solución de sonda de ensayo 200 pM y 2,5 µl de la solución de PCR correspondiente de la amplificación optotérmica, que contiene las primeras nanopartículas 3. Si hay una cantidad suficiente del original 12 con la secuencia ID3 en el tubo de la muestra, el oligonucleótido 4 con la secuencia ID1 en la superficie de la primera nanopartícula 3 se extiende y es capaz de hibridarse con el oligonucleótido 4 con la secuencia ID5 en la superficie de la sonda de ensayo, como se muestra en la Figura 6f. La hibridación se verifica usando la excitación optotérmica de las nanopartículas 8 (de acuerdo con el documento EP 2162549, cuyo contenido relacionado forma parte de la presente divulgación a modo de referencia). Con este fin, los tubos de muestra 24, como se muestra en la Figura 16, son alcanzados por pulsos procedentes de un primer láser 27 (duración del pulso de 50 µs, longitud de onda de 532 nm, aproximadamente 700 mW de potencia máxima, diámetro del foco de aproximadamente 30 µm). De esta manera, las nanopartículas 8 se calientan optotérmicamente y transfieren el calor a su entorno. Si las primeras nanopartículas 3 y las segundas nanopartículas 22 se conectan debido a la hibridación de los oligonucleótidos 4, como se muestra en la Figura 6f, entonces se pueden separar por el pulso láser. Esto se puede detectar usando un segundo láser 28 (longitud de

onda de 630 nm, potencia de 5 mW continuamente) como se muestra en la Figura 16; el foco del segunda láser (diámetro de 30  $\mu\text{M}$ ) se superpone con el foco del primer láser 27, que se usa preferentemente exclusivamente para la deshibridación, el foco del segundo láser detecta la absorbancia antes y después del pulso de láser del primer láser 27. La trayectoria óptica en la que se induce optotérmicamente y se mide el cambio en la absorbancia asciende a aproximadamente 2 mm. La intensidad de la luz del segundo láser 28 transmitida a través de esta capa se mide con un fotodiodo 35. El cambio de transmisión inducido optotérmicamente se determina a partir de la diferencia de la corriente del fotodiodo antes y después del pulso, cambio de transmisión que se produce mediante la deshibridación de los primeros oligonucleótidos extendidos 20 y los segundos oligonucleótidos 23 entre las nanopartículas 8 y la posterior difusión de las nanopartículas entre sí.

La Figura 8a muestra el cambio de transmisión relativo que es producido por el pulso láser del primer láser 27, y la deshibridación resultante de los oligonucleótidos 4 entre las primeras nanopartículas 3 y las segundas nanopartículas 22; siendo el cambio de transmisión relativo una medida de la presencia de enlaces de oro-ADN-oro en los tubos de muestra 24. Bajo el diagrama de la Figura 8a, se muestra el número de ciclos completados en una primera fila. En una segunda fila, que está situada debajo de la primera fila, se muestra en pM la concentración del original 12 en el tubo de muestra 24 antes de llevarse a cabo la amplificación. En el lado derecho del diagrama de la Figura 8a, en la sección B, se muestran el primer, segundo y tercer tubo de muestra 24 de izquierda a derecha, cada uno de los cuales ha completado 25 ciclos optotérmicos; además, se muestra el cuarto tubo de muestra 24, que no ha recibido ningún tratamiento optotérmico. Se puede ver claramente que el cambio de transmisión medido como un indicador para los enlaces de oro-ADN-oro aumenta al aumentar la concentración del original 12 antes de la amplificación, una vez completados los 25 ciclos. Para el primer tubo de muestra 24 sin original 12 y el cuarto tubo de muestra 24 sin tratamiento optotérmico, solo se observa un pequeño cambio de transmisión. Esto demuestra que, en el presente documento, no se ha producido la extensión de las secuencias cebadoras 5 en las primeras nanopartículas 3 y, por tanto, no es posible la unión a la sonda de ensayo. Solo tras completar los ciclos optotérmicos y en presencia del original, se puede crear una extensión de las secuencias cebadoras 5 en las primeras nanopartículas 3 por la ADN polimerasa 10, lo que conduce a una conexión de las primeras nanopartículas 3 con las segundas nanopartículas 22 y, finalmente, a un cambio de la transmisión como resultado de la separación inducida optotérmicamente de las nanopartículas 8.

A modo de comparación, la Figura 8a muestra, en la sección A, a la izquierda, el resultado de un experimento correspondiente, en el que no se calentó el ADN localmente a través de la excitación optotérmica de las nanopartículas 8, sino que se calentó todo el volumen de reacción de 2 globalmente en un termociclador convencional (Labnet Multi Gen II). De izquierda a derecha, se muestran del primer al cuarto tubo de muestra 24, el contenido de los cuales es idéntico al del experimento descrito en el párrafo anterior. Se sometieron el primer, segundo y tercer tubo de muestra 24 a un protocolo de PCR clásico (93 °C durante 1 s, 53 °C durante 20 s, 35 ciclos). Como en el caso del calentamiento optotérmico, se puede observar que, cuanto más original 12 está presente en cada tubo de muestra 24 antes de la amplificación, mayor es el cambio de transmisión medido que se crea por el pulso láser y la deshibridación resultante del ADN entre la primera nanopartícula 3 y la segunda nanopartícula 22 y que el cambio de transmisión es la medida de la presencia de enlaces de oro-ADN-oro en la solución. El cuarto tubo de muestra 24, aunque contiene 50 pM del original 12, no se ha calentado de forma cíclica y no muestra casi ningún cambio de la transmisión. En este caso, las secuencias cebadoras 5 de las primeras nanopartículas 3 no se extendieron en un grado suficiente.

La Figura 8b muestra un experimento similar con calentamiento global de todo el volumen de reacción 2, sin embargo, la concentración del original 12 en los tubos de muestra 24 es constante a 10 pM antes de la amplificación (segunda fila debajo del diagrama), mientras que el número de ciclos va en aumento (primera fila debajo del diagrama). En el presente documento, se puede ver claramente que con un aumento del número de ciclos, el cambio de la transmisión medido aumenta, lo que es una señal clara de que cuanto más cebador 7 en las primeras nanopartículas 3 se extiende, más ciclos se han completado y, por lo tanto, un signo claro de que el origen de la señal medida es, de hecho, la elongación completada de los oligonucleótidos 4 en las primeras nanopartículas 3 por la ADN polimerasa 10.

En una realización del método, se usa un cebador inverso libre 15, que se une al extremo 3' del complemento tras la elongación de la secuencia cebadora 5 en la superficie 4 de las primeras nanopartículas 3, durante lo que se produce la extensión de un complemento unido a nanopartículas 13. La Figura 1g muestra que el complemento 13 con las secuencias parciales A y B ya sintetizadas, que está conectado a la superficie de la primera nanopartícula 3 a través de una secuencia espaciadora 6, se hibrida con un cebador 7 B', que antes se encontraba presente libremente en la muestra 11. En este caso, el cebador 7 tiene la secuencia B' y está conectado con la secuencia parcial B del complemento 13. Partiendo del cebador 7 con la secuencia B', la ADN polimerasa sintetiza una copia del original 12. En la Figura 1g, también se muestra que el original 12 se ha unido a otra secuencia cebadora 5 A en la superficie de la primera nanopartícula 3 y una ADN polimerasa 10 sintetiza otro complemento a partir de la secuencia cebadora 5 A. En la Figura 1 h, se muestran el original 12, la copia del original 12 y los dos complementos 13 conectados con la primera nanopartícula. Una desnaturalización posterior a través de la excitación de las primeras nanopartículas 3 da lugar que el original y su copia 12 se liberen. En este caso, el original 12, así como su copia pueden servir como molde para la amplificación en las etapas subsiguientes del método. Tras un tiempo de espera, que podría ser necesario para la hibridación del original 12 y las copias del original 12 con las secuencias

cebadoras 5 A en las primeras nanopartículas 3 y de los cebadores B' libres con las secuencias cebadoras 5 ya elongadas en las primeras nanopartículas 3, se puede realizar el siguiente ciclo del método con otra excitación de las primeras nanopartículas 3. Preferentemente, este ciclo se repite hasta que hay una cantidad suficiente de secuencias cebadoras 5 extendidas presente en las primeras nanopartículas 3 y/o hay una cantidad suficiente de copias del original 12 presentes en la muestra 11 para permitir efectuar una verificación de la amplificación o, respectivamente, la presencia del original 12 en la muestra 11. Mediante el uso de un cebador libre 7 B', como se muestra en la Figura 1g y 1h, es posible una amplificación exponencial del original 12. En la Figura 1 a 1f, solo se puede lograr una amplificación lineal del complemento unido a nanopartículas 13 sin dicho cebador libre 7. En una realización, la desnaturalización del ADN puede tener lugar en menos de un milisegundo. Incluso a 40 ciclos, la desnaturalización del ADN y el posterior enfriamiento a la temperatura de elongación solo requieren unos cuantos milisegundos en total en dicha realización. Esto significa que la duración del método de acuerdo con la invención no está determinado por limitaciones técnicas tales como el calentamiento y la velocidad de enfriamiento de los termocicladores convencionales. Además, se evitan los tiempos de termalización en el volumen de reacción 2, ya que el calor se produce siempre en el entorno de las nanopartículas 8 y se efectúa una distribución de la temperatura de equilibrio en nanosegundos. De este modo, una PCR se puede acelerar de manera significativa.

En la Figura 9, se muestra una posibilidad para verificar la amplificación obtenida. La Figura 9a y 9c esbozan la amplificación exponencial usando un cebador inverso disuelto 7 B' como ya se ha mostrado en la Figura 1a a 1h. Tras ello, se añaden las sondas de ensayo 21 a la muestra 11. En esta realización, las sondas de ensayo 21 consisten en segundas nanopartículas 22 que están funcionalizadas en su superficie con moléculas de carga 9 opcionales y la secuencia de ensayo A', como se muestra en la Figura 9d. Opcionalmente, se puede colocar una secuencia espaciadora 6 S, que no es necesariamente idéntica a la secuencia espaciadora 6 S de las primeras nanopartículas 3 de la Figura 1 o la Figura 9a, entre la secuencia de ensayo A' y la superficie de las segundas nanopartículas 22. La secuencia de ensayo A' es complementaria a al menos una parte de la secuencia cebadora 5 A de las primeras nanopartículas 3. La secuencia de ensayo A' compete por la secuencia cebadora 5 A con las copias del original 12 que contienen la secuencia parcial A' producida en el método de la Figura 1a a 1h. Esto significa que si hay muchas copias del original 12 presentes, entonces las secuencias cebadoras 5 A de la superficie de las primeras nanopartículas 3 ya están ocupadas con las secuencias parciales A' de las copias del original 12. En este caso, las secuencias cebadoras 5 A no pueden hibridarse o solo pueden hibridarse en un grado limitado a las sondas de ensayo A' de las segundas nanopartículas 22. Así pues, las primeras nanopartículas 3 no están conectadas o solo están conectadas en un grado limitado a las segundas nanopartículas 22. Como se muestra en la Figura 9c, las secuencias cebadoras 5 A elongadas de las primeras nanopartículas 3 se hibridan con el original 12 y sus copias, formando así ADN bicatenario rígido que puede representar un impedimento estérico; debido a esto, también se evita una conexión de las primeras nanopartículas 3 con las segundas nanopartículas 22 cuando hay un gran número de copias del original 12. En ausencia o presencia de un pequeño número del original 12 y de copias del original 12, las primeras nanopartículas 3 están presentes predominantemente con secuencias cebadoras 5 A no ocupadas, como se muestra en la Figura 9b. Cuando se añaden las sondas de ensayo 21, el segundo nucleótido 23 A' se hibrida a las secuencias cebadoras 5 A desocupadas de las primeras nanopartículas 3. Debido a esto, las primeras nanopartículas están conectadas a las segundas nanopartículas 22, como se muestra en la Figura 9e. En esta realización, cuanto más débil es el grado de la conexión de las primeras nanopartículas 3 con las segundas nanopartículas 22, más copias del original 12 se han producido por la reacción de amplificación, lo que depende de la concentración del original 12 en el inicio de la reacción de amplificación. Las condiciones de tamponamiento y de hibridación (por ejemplo, temperatura, concentración de sal, concentración de nanopartículas, concentraciones de otros aditivos de tamponamiento, pH) se seleccionan de manera que, una vez completada la extensión específica de la secuencia cebadora 5 A y la síntesis de copias del original 12, la supresión de la hibridación de las secuencias cebadoras 5 A con el segundo oligonucleótido 23 A' es tan eficaz como sea posible. Al mismo tiempo, las condiciones citadas se seleccionan de manera que cuando no haya tenido lugar la amplificación, se cree una hibridación eficaz de las secuencias cebadoras 5 A con los segundos oligonucleótidos 23 A'. La conexión de las primeras nanopartículas 3 con las segundas nanopartículas 22 procedentes de la hibridación se puede verificar mediante, por ejemplo, un viraje hacia el rojo y la ampliación de la resonancia de plasmón en el espectro de absorbancia o midiendo el cambio de transmisión a una o varias longitudes de onda tras la excitación optotérmica de las nanopartículas 8 y la desnaturalización resultante del ADN de unión a nanopartículas. Como alternativa, se pueden realizar la verificación o una cuantificación de las copias del original 12 producidas en el método, por ejemplo, mediante PCR, PCR en tiempo real, PCR cuantitativa en tiempo real, electroforesis en gel o mediante el uso de sondas marcadas con colorante.

En la realización del método mostrado en la Figura 9, se funcionalizan primeras nanopartículas 3 de oro y con un diámetro de 60 nm con oligonucleótidos 4 como ya se ha mostrado en la realización en la Figura 6, la proporción del oligonucleótido 4 ID1 con respecto al oligonucleótido 4 ID2 en la Figura 9, sin embargo, es de 1:9. Tras la funcionalización y seis etapas de lavado, las primeras nanopartículas 3 están presentes a una concentración de 200 pM en un tampón de PBS (PBS 20 mM, NaCl 10 mM, Tween 20 al 0,01 %, azida al 0,01 %, EDTA 1 mM, pH 7,5). La reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen total de 10 µl en tubos de muestra de 200 µl (5 µl de mezcla maestra para PCR DreamTaq x 2 (Fermentas), 0,1 µl de NaCl 5 M, 0,1 µl de MgCl<sub>2</sub> 250 mM, 0,1 µl de MgSO<sub>4</sub> 250 mM, 1 µl de las primeras partículas funcionalizadas 3 200 pM, 1 µl de cebador inverso ID6 500 nM, 1 µl de oligonucleótido 4 ID3 (como un original 12 que se va a amplificar, en el que la concentración del original 12 que se determinará está en un volumen total de 10 µl, por ejemplo, 0 pM o 10 pM) disuelto en agua con oligonucleótido 4

ID4 100 nM (en el presente documento, el oligonucleótido 4 ID4 sirve para saturar las superficies, por ejemplo, durante el almacenamiento del original 12 antes de la reacción), 2,7 µl de agua). Como se muestra en la Figura 7, los tubos de muestra 24 se mantienen a una temperatura de 54 °C en una cubeta de vidrio 25 en un baño de agua 26.

5 En este caso, 54 °C constituye la temperatura de hibridación, así como la temperatura de elongación. El baño de agua 26 sirve, además de para mantener el control de la temperatura, también para mejorar el acoplamiento del láser 16 a la superficie no plana de los tubos de muestra 24. El agua del baño de agua 26 permite la reducción de la diferencia en los índices de refracción entre el exterior de los tubos de muestra 24 y su interior, que está lleno con la mezcla de reacción PCR; de este modo, se suprime una refracción del haz láser y una influencia negativa resultante sobre la calidad del enfoque y la nitidez. De este modo, ventajosamente, se mejora el acoplamiento del láser 16. El láser 16, que sirve para excitar las nanopartículas, es un láser Nd:YAg bombeado por diodos de frecuencia duplicada (Coherent Verdi V10), que se enfoca con una potencia de salida de 3 W con una lente F-theta (Jenoptik, distancia focal de 100 mm) detrás de un escáner con espejo 18 a los tubos de muestra 24 del baño de agua 26. El escáner con espejo 18 permite mover el foco fila por fila a través de los tubos de muestra 24, como ya se ha mostrado en la Figura 3 y, por lo tanto, incluye todo el volumen de reacción 2 en la amplificación optotérmica. Por cada tubo de muestra 24, se exploran 400 filas con el foco a una distancia de aproximadamente 12 µm a una velocidad por fila en los tubos de muestra 24 de aproximadamente 2 m/s. Esto corresponde a un ciclo en el primer tubo de muestra 24. Seguidamente, se exploran todos los demás tubos de muestra 24 uno tras otro, de manera que cada tubo de muestra 24 experimenta un ciclo. Tras un tiempo de espera de 40 s tras la exploración del primer tubo de muestra 24, se inicia el siguiente ciclo, y esto se repite de acuerdo con el número predeterminado de ciclos. Se examinan 7 tubos de muestra 24, que se muestran en la Figura 10a, de izquierda a derecha. El primer y el segundo tubo de muestra 24 no contiene ningún original 12. Del tercer al séptimo tubo de muestra 24, hay 10 pM del original 12 presentes como concentración inicial. Como control, el primer y tercer tubo de muestra 24 no se tratan optotérmicamente. El cuarto tubo de muestra 24 se trató con 5 ciclos, el quinto tubo de la muestra 24, con 15 ciclos, y el sexto tubo de muestra 24 se trató con 25 ciclos optotérmicamente. El segundo y séptimo tubo de muestra 24 se trataron con el número máximo de 35 ciclos optotérmicamente. Todos los tubos de muestra 24 están dentro del baño de agua 26 durante la misma cantidad de tiempo, solo difiere la excitación optotérmica. Una vez que el segundo y el séptimo tubo de muestra 24 han completado los 35 ciclos, se retiran los siete tubos de muestra 24 del baño de agua 26. Una ventaja del método es que, sin gran esfuerzo, se pueden tratar diferentes muestras 11 con un número diferente de ciclos, pudiéndose aplicar esto, por ejemplo, a una PCR cuantitativa paralelizada.

La sonda de ensayo 21 sirve para determinar el efecto de los ciclos de láser y de la concentración del original 12, qué sonda de ensayo 21 puede - bajo el cebador y las condiciones de hibridación seleccionados - se hibrida preferentemente a las primeras nanopartículas 3 funcionalizadas con secuencias cebadoras 5, qué nanopartículas no son bloqueadas por copias complementarias del original de 12, qué copias se produjeron en la reacción de amplificación. Esto corresponde a la sonda de ensayo 21, como se muestra en la Figura 9. Para producir las sondas de ensayo 21, se funcionalizan las segundas nanopartículas 22, de oro y con un diámetro de 16 nm, con oligonucleótidos 4 (de acuerdo con J. Hurst, *supra*). En ellas, se usan cuatro partes de oligonucleótido 4 ID2 y una parte de oligonucleótidos 4 ID7. Tras la funcionalización y las seis etapas de lavado, las segundas nanopartículas 22 estaban presentes en un tampón de PBS (PBS 20 mM, NaCl 10 mM, Tween 20 al 0,01 %, azida al 0,01 %, EDTA 1 mM, pH 7,5) a una concentración de 200 pM. Para la hibridación, se usa un tampón de fosfato modificado (PBS 13 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,02 %, EDTA 1 mM, citrato de sodio 20 mM, 1 µg/µl de PVP10, pH 7,5). 10 µl de solución de hibridación contienen 5,75 µl del tampón fosfato modificado, 1,5 µl de formamida, 0,25 µl de la solución de sonda de ensayo 200 pM y 2,5 µl de la solución de PCR correspondiente de la reacción de amplificación optotérmica, que contiene las primeras nanopartículas 3. La detección de la conexión entre las primeras nanopartículas 3 y las segundas nanopartículas 22 se produce por la excitación optotérmica de las nanopartículas 8, como se describe en la Figura 8a. La Figura 10a muestra el cambio en la transmisión, que se produce por el pulso láser y la deshibridación resultante del ADN entre las primeras nanopartículas y las segundas nanopartículas 22, cambio de transmisión que es una medida de la presencia de enlaces de ADN-oro-ADN en la muestra 11. En la Figura 10a, a la izquierda de la sección A, se muestran el primer y el segundo tubo de muestra 24, ninguno conteniendo original, en la que el primer tubo simple 24 no ha completado ninguno y el segundo tubo simple 24 ha completado 35 ciclos optotérmicos. Ambos tubos de muestra 24 muestran un alto cambio de transmisión medido como un indicador de un alto grado de enlaces de ADN-oro-ADN. Por lo tanto, sin original de 12, el diferente número de ciclos completados, en este caso, no tiene ninguna influencia en el cambio de transmisión medido ni en la medida de los enlaces de ADN-oro-ADN; esto se debe a que no había original 12 disponible para la amplificación y, por lo tanto, no puede tener lugar el bloqueo de las secuencias cebadoras 5 por copias del original 12.

La Figura 10a muestra a la derecha, en la sección B, del tercer al séptimo tubo de muestra de 24 con un número creciente de ciclos optotérmicos en la reacción de amplificación a una concentración inicial del original 12 de 10 pM. En este caso, es evidente que el cambio de transmisión medido como un indicador de los enlaces de ADN-oro-ADN reduce esencialmente con un número creciente de ciclos optotérmicos completados. Esto demuestra que se producen más copias del original 12, cuanto más ciclos se hayan completado. En este caso, cabe señalar que a una concentración inicial del original 12 de 10 pM, hay presente el doble de primeras nanopartículas 3 que de originales 12 en la muestra 11. Cada primera nanopartícula 3 normalmente porta entre 1000 y 1.0000 secuencias cebadoras 5. A la concentración inicial del original 12, por lo tanto, se bloquea aproximadamente 1 de cada 2.000 secuencias

cebadoras 5, lo que no conduce a una supresión significativa de los enlaces de oro-ADN-oro entre las primeras nanopartículas 3 y las segundas nanopartículas 22. Una supresión eficaz de los enlaces de oro-ADN-oro, como se muestra en la Figura 10a, con un número creciente de ciclos optotérmicos, solo es posible a través de una amplificación considerable de la baja concentración inicial del original 12.

La Figura 10b muestra, en un método alternativo de detección, la concentración de las copias del original 12 tras la reacción de amplificación. En este caso, primero se diluyen las muestras 11 de los siete tubos de muestra 24 de la Figura 10a 50 veces en agua y, posteriormente, se lleva a cabo una PCR en tiempo real, lo que permite la detección cuantitativa de las copias del original. Con este fin, se usa una solución de PCR en tiempo real, en la que 10  $\mu$ l contienen 5  $\mu$ l de tampón de PCR Phusion Blood x2 (que incluye dNTP y  $MgCl_2$ ; Biozym), 0,2  $\mu$ l de polimerasa Phusion Blood, 1  $\mu$ l de SybrGreen I (x10; Roche), 1  $\mu$ l de cebador ID5 5  $\mu$ M y 1  $\mu$ l de cebador ID8 5  $\mu$ M, 0,8  $\mu$ l de  $H_2O$  y 1  $\mu$ l de la muestra diluida 11 50 veces. Para la PCR en tiempo real, en primer lugar, se lleva a cabo una desnaturalización a 98 °C durante 1 minuto, posteriormente, se completan 40 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en 1 segundo a 98 °C, 5 segundos a 66 °C y 1 segundo a 72 °C. Se mide la fluorescencia de SybrGreen I al final de cada fase de hibridación a 66 °C. Para la PCR en tiempo real, se usó un Stratagene Mx3005P de Agilent Technologies. En el eje y de la Figura 10b, se muestra el ciclo umbral (valor Ct) de la PCR en tiempo real, en el que las copias del original han alcanzado una concentración predeterminada por primera vez. Cuanto mayor sea la concentración de las copias del original 12 al inicio de la PCR en tiempo real, menor será el ciclo umbral. Los resultados de la Figura 10b confirman los resultados de 10a: cuantos más ciclos optotérmicos se hayan completado a una concentración inicial dada del original 12, mayor será el número de copias del original 12 tras la reacción de amplificación.

Preferentemente, en la desnaturalización optotérmica, solo se calientan pequeños volúmenes parciales de la muestra 11, de modo que también es posible usar ADN polimerasas no termoestables 10. En una realización, el fragmento de Klenow 29, que no es termoestable, se usa como ADN polimerasa. El fragmento de Klenow 29 tiene la ventaja de que es más tolerante a la sal en la reacción de amplificación. De este modo, preferentemente, se pueden escoger mejores condiciones de reacción en las reacciones de detección con primeras nanopartículas 3 y segundas nanopartículas 22, lo que puede conducir a una mejor especificidad y sensibilidad de la reacción de detección. Además, el fragmento de Klenow 29 ofrece la ventaja de que, a 76 kDa, es menor que la ADN polimerasa *Taq* normalmente usada con 95 kDa. Por lo tanto, muy cerca de las nanopartículas 8 funcionalizadas con oligonucleótidos 4, el fragmento de Klenow 29 experimenta un menor impedimento estérico de la ADN polimerasa *Taq* 10. Además, el fragmento de Klenow 29 ofrece la ventaja de que su temperatura óptima de elongación está a 37 °C. La elongación a 37 °C ofrece la ventaja de que se ejerce un menor esfuerzo térmico sobre las nanopartículas 8 y, de este modo, son necesarios menores requisitos para la estabilidad de las nanopartículas 8; al mismo tiempo hay una mayor flexibilidad en el uso de sales potencialmente desestabilizantes de nanopartículas. En dicha realización, en la que el fragmento de Klenow 29 se usa para la amplificación, primero se funcionalizan nanopartículas 3 de oro con un diámetro de 60 nm en analogía con el método usado en la Figura 1. En este caso, se usa la secuencia cebadora 5 ID9 más corta, pues a menor temperatura de hibridación y mayores concentraciones de sal, se puede lograr una mayor especificidad en la hibridación con el original 12. La proporción del oligonucleótido 4 ID9 con respecto al oligonucleótidos 4 ID2 asciende a 1:9. Tras la funcionalización y seis etapas de lavado, las primeras nanopartículas 3 están presentes en un tampón de PBS (PBS 20 mM, NaCl 10 mM, Tween 20 al 0,01 %, azida al 0,01 %, EDTA 1 mM, pH 7,5) a una concentración de 200 pM. La reacción de amplificación se lleva a cabo en 10  $\mu$ l de mezcla de PCR en tubos de muestra de 100  $\mu$ l (1  $\mu$ l de 10 x tampón de reacción para el fragmento de Klenow exo (no contiene dNTP ni polimerasa, Fermentas), 0,2  $\mu$ l de fragmento de Klenow exo (Fermentas), 1  $\mu$ l de dNTP, cada uno 2,5 mM (Fermentas), 0,2  $\mu$ l de NaCl 5 M, 0,2  $\mu$ l de  $MgCl_2$  250 mM, 0,2  $\mu$ l de  $MgSO_4$  250 mM, 1  $\mu$ l de las primeras partículas a una concentración de 200 pM, 1  $\mu$ l de cebador inverso ID6 500 nM, 1  $\mu$ l de oligonucleótido ID3 como original 12 (en este caso, el original 12 está presente en la mezcla de PCR a una concentración de, por ejemplo, 0 pM, 10 pM o 20 pM), 4,2  $\mu$ l de agua). Con la ADN polimerasa 10 de la Figura 10, no sería posible una amplificación suficiente a estas concentraciones de sal. Como se muestra en la Figura 7, los tubos de muestra 24 tienen la temperatura controlada a 37 °C en una cubeta de vidrio 25 en un baño de agua 26. La temperatura de 37 °C, en este caso, es la temperatura de hibridación y la temperatura de elongación. El láser 16 sirve para excitar las primeras nanopartículas 3, y es un láser Nd:YAg bombeado por diodos de frecuencia duplicada (Coherent Verdi V10), que se enfoca en los tubos de muestra 24 del baño de agua 26 con una potencia de salida de 1,5 W con una lente F-theta (Jenoptik, distancia focal de 100 mm) detrás de un escáner con espejo 18 (Cambridge technologies, Pro Series 1). El escáner con espejo 18 permite mover el foco fila por fila a través de los tubos de muestra 24, como ya se ha mostrado en la Figura 3 y, por lo tanto, incluye todo el volumen de reacción 2 en la amplificación optotérmica. Por cada tubo de muestra 24, se exploran 1.000 filas con el foco a una distancia de aproximadamente 5  $\mu$ m a una velocidad por fila en los tubos de muestra 24 de aproximadamente 5 m/s. Esto corresponde a un ciclo en el primer tubo de muestra 24. Seguidamente, se exploran todos los demás tubos de muestra 24 uno tras otro, de manera que cada tubo de muestra 24 completa un ciclo. Tras un tiempo de espera de 40 s tras la exploración del primer tubo de muestra 24, se inicia el siguiente ciclo, y esto se repite hasta que cada tubo de muestra 24 haya completado 35 ciclos. De izquierda a derecha en la Figura 11, los tres primeros tubos de muestra 24 han recibido la dicha mezcla de PCR, que incluye el fragmento de Klenow 29 y dNTP. Los tubos de muestra 24 cuatro a seis contienen el fragmento de Klenow 29, pero no tienen dNTP, y los tubos de muestra 24 siete a nueve contienen dNTP, pero no fragmento de Klenow 29. Los tubos de muestra 24 uno, cuatro y siete no contienen original 12, dos, cinco y ocho contienen original 12 10 pM, y tres, seis y nueve contienen original 12 20 pM

como se muestra en la fila de debajo del diagrama de la Figura 11. Una vez que todos los tubos de muestra 24 han completado 35 ciclos, se retiran del baño de agua 26. Una sonda de ensayo 21 que corresponde a la de la Figura 9 se usa en el análisis de la reacción de amplificación. Para la hibridación con la sonda de ensayo 21, se usa un tampón de fosfato modificado (PBS 13 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,02 %, EDTA 1 mM, citrato de sodio 20 mM, 1 µg/ml de PVP10, pH 7,5). 10 µl de solución de hibridación contienen 3,35 µl del tampón fosfato modificado, 3,3 µl de formamida, 0,6 µl de NaCl 5 M, 0,25 µl de la solución de sonda de ensayo 200 pM y 2,5 µl de la solución de PCR correspondiente tras la amplificación).

La verificación de la conexión de las primeras nanopartículas 3 y sondas de ensayo 21 se lleva a cabo por excitación optotérmica de las nanopartículas 8. La Figura 11 muestra el cambio de transmisión que se produce por el pulso láser y la deshibridación resultante del ADN entre las nanopartículas 8 y que es una medida de la presencia de enlaces de oro-ADN-oro en la solución; la concentración del original 12 antes de la reacción se muestra debajo del diagrama. En la parte izquierda de la Figura 11, en la sección A, se muestran los resultados para los tubos de muestra 24 uno a tres, que contienen los componentes de fragmento de Klenow 29 y dNTP necesarios para la PCR. En este caso, es evidente que con una cantidad creciente de copias del original 12, el cambio de transmisión medido como indicador para la medida de la medición de enlaces de oro-ADN-oro disminuye. En esta realización, el fragmento de Klenow 29 no termoestable puede llevar a cabo una amplificación del original 12, a pesar de que no tolera altas temperaturas. Al igual que en la presente reacción de amplificación optotérmica, la muestra 11 solo se calienta localmente, el fragmento de Klenow 29 experimenta solo un poco de tensión térmica y puede amplificar el original 12 durante muchos ciclos sin ser destruido. En la Figura 11, en la mitad de la sección B, se muestran los resultados de los tubos de muestra 24 cuatro a seis, que no contienen dNTP. En este caso, no hay cambio significativo de transmisión detectable a ninguna de las concentraciones del original 12 usadas. Esto significa que no ha tenido lugar la amplificación. En la sección C de la Figura 11, a la derecha, se muestran los resultados de los tubos de muestra 24 siete a nueve, que no contienen el fragmento de Klenow 29. En este caso, de nuevo, no se ha producido amplificación. Este ejemplo muestra que el fragmento de Klenow 29 no termoestable también se puede usar en la realización de una reacción de amplificación.

En la realización mostrada en la Figura 12, se muestra la amplificación optotérmica en función del movimiento del haz láser a través del volumen de reacción 2. En este caso, se seleccionan las concentraciones del original de 0, 1, 5, 20 y 50 pM de los tubos de muestra 24 de 100 µl, como se muestra en la fila de debajo del diagrama de la Figura 12. Los tubos de muestra 24 tienen la temperatura controlada a 60 °C en una cubeta de vidrio 25 en un baño de agua 26 como se muestra en la Figura 7, en la que 60 °C es la temperatura de hibridación, así como la temperatura de elongación. El calentamiento optotérmico es creado por el láser 16, que consiste en un láser Nd:YAg bombeado por diodos de frecuencia duplicada (Coherent Verdi V10), que se enfoca en los tubos de muestra 24 del baño de agua 26 con una potencia de salida de 3 W con una lente F-theta (Jenoptik, distancia focal de 100 mm) detrás de un escáner con espejo 18 (Cambridge technologies, Pro Series 1). La Figura 12 muestra, a la izquierda de la sección A, cinco tubos de muestra 24 con concentraciones crecientes del original 12, cada uno excitado optotérmicamente durante un segundo, estando el foco de láser en reposo en mitad del volumen de reacción 2 sin movimiento. Una vez irradiado el primer tubo de muestra 24 de esta manera durante un segundo, no se irradia durante 40 s. Esto corresponde a un ciclo en el primer tubo de muestra 24. Durante el periodo de espera de 40 s, los tubos de muestra 24 restantes completan el primer ciclo. Los ciclos se repiten 35 veces en total. La detección de la hibridación entre las nanopartículas 8, que contienen secuencias cebadoras 5 y las sondas de ensayo 21 se lleva a cabo por medio de la excitación optotérmica de las nanopartículas 8 como ya se ha mostrado en la Figura 10. Como se muestra en la Figura 12, a la izquierda de la sección A, sin movimiento del foco del láser, no se puede observar ninguna influencia de la concentración del original 12 en el cambio de transmisión. Esto muestra que no ha tenido lugar una amplificación significativa del original 12. La razón es que solo una pequeña fracción de todo el volumen de reacción 2 está en el foco y solo las nanopartículas 8 de este volumen parcial forman parte en la reacción. En el lado derecho de la Figura 12, en la sección B, se muestran cinco tubos de muestra 24 con una concentración creciente del original 12 de izquierda a derecha, siendo cada uno de los tubos de muestra 24 excitados durante un segundo, moviéndose además el foco del láser a través del volumen de reacción 2. De esta manera, como ya se ha mostrado en la Figura 3, se explora todo el volumen de reacción 2 fila por fila y, por lo tanto, se incluye en la reacción optotérmica. En cada tubo de muestra 24, se exploran 1.000 filas a una distancia de aproximadamente 5 µm con el foco a una velocidad por fila en el tubo de muestra 24 de aproximadamente 5 m/s. Esto corresponde a un ciclo en el primer tubo de muestra 24. Posteriormente, se exploran los siguientes tubos de muestra 24 uno tras otro, hasta que se exploran los cinco tubos de muestra 24. Tras un periodo de espera de 40 s medido a partir de la exploración del primer tubo de muestra 24, se inicia el siguiente ciclo y esto se repite 35 veces. A la luz de la Figura 12, a la derecha en la sección B, es evidente que al aumentar la concentración del original 12, se reduce el cambio de transmisión medido. Esto es una indicación de la medida decreciente de los enlaces de oro-ADN-oro. Solo a través del movimiento del foco, y a una potencia del láser y una duración de la irradiación invariables, tiene lugar la amplificación, pues el movimiento del foco incluye una gran parte de las nanopartículas 8 de la muestra 11 en la reacción de amplificación.

En la Figura 13, se muestra un aparato para realizar el método de acuerdo con la invención, en el que una fuente de luz 17 dirige un haz de luz a través de un primer objetivo 30 opcional sobre un elemento deflector 32, por ejemplo, un espejo, y a través de un segundo objetivo 31 opcional en un tubo de muestra 24. En este caso, el tubo de muestra 24 está montado en una unidad giratoria 33 junto con otros tubos de muestra 24, de modo que girando la unidad 33, se pueden iluminar los diferentes tubos de muestra 24 en diferentes momentos. Por lo tanto,

ventajosamente, se puede lograr excitar un gran número de nanopartículas 8 presentes en los tubos de muestra 24, incluso con una fuente de luz 17 a una potencia baja.

La Figura 14 muestra una sección de una nanopartícula 8 de acuerdo con la invención que contiene moléculas de carga 9 y oligonucleótidos 4 en su superficie. ADN polimerasas convencionales 10 sintetizan una cadena complementaria (en línea discontinua) a lo largo de los oligonucleótidos 4. Durante este tiempo, las ADN polimerasas convencionales 10, de gran tamaño, experimentan impedimento estérico a través de las moléculas de carga de la Figura 14a. En la Figura 14b, las ADN polimerasas 10 experimentan impedimento estérico por oligonucleótidos 4 vecinos. El impedimento estérico de la Figura 14a y 14b puede conducir a la rotura prematura de la cadena recién sintetizada. El fragmento de Klenow 29 de la Figura 14c puede - debido a que es más pequeño que las ADN polimerasas convencionales 10 - alcanzar las moléculas de carga 9 y los oligonucleótidos 4 y, por lo tanto, puede terminar la síntesis de la nueva cadena hasta el final. Incluso aunque el fragmento de Klenow 29 no pueda alcanzar las moléculas de carga, el fragmento de Klenow 29 puede seguir alcanzando más cerca del impedimento estérico las moléculas de carga 9 con su centro activo, por lo tanto, solo después se produce una posible rotura de la cadena recién sintetizada. Por lo tanto, las polimerasas más pequeñas permiten un uso más eficaz de las secuencias cebadoras cerca de superficies de las partículas. Además, el calor producido a nivel local se puede usar de forma especialmente eficaz para la etapa de desnaturalización en las proximidades de la superficie de las nanopartículas. Además, se muestra una secuencia homóloga 34 con la secuencia A'. La secuencia homóloga 34 es complementaria a un oligonucleótido 4 con la secuencia A de la nanopartícula 8, y sirve para neutralizar los oligonucleótidos 4 con la secuencia A, que se desprende involuntariamente de las nanopartículas 8, de modo que los oligonucleótidos 4 no pueden actuar como cebadores libres 7.

En la realización de la Figura 15, se muestra la amplificación optotérmica usando conjugados de nanopartículas y oligonucleótidos, en los que el enlace covalente entre las primeras nanopartículas 3 y las secuencias cebadoras 5 se lleva a cabo con dos tioles. Con este fin, las primeras nanopartículas 3 de oro con un diámetro de 60 nm se funcionalizan con oligonucleótidos 4 (de acuerdo con J. Hurst, *supra*). En este caso, se usan oligonucleótidos 4 ID10 (IDT Technologies, Inc.) que, en comparación con el oligonucleótido ID1, portan un ditiol en lugar de un tiol en su extremo 5'. Tras la funcionalización y las seis etapas de lavado, las primeras nanopartículas 3 están presentes en un tampón de PBS (PBS 20 mM, NaCl 10 mM, Tween 20 al 0,01 %, azida al 0,01 %, EDTA 1 mM, pH 7,5) a una concentración de 200 pM. La reacción de amplificación se realiza en un volumen total de 10 µl en tubos de muestra 24 de 200 µl (5 µl de mezcla maestra para PCR DreamTaq x 2 (Fermentas), 0,1 µl de NaCl 5 M, 0,1 µl de MgCl<sub>2</sub> 250 mM, 0,1 µl de MgSO<sub>4</sub> 250 mM, 1 µl de las primeras nanopartículas funcionalizadas 200 pM, 1 µl de cebador inverso ID6 500 nM, 1 µl de oligonucleótido 4 ID3 (como un original 12 que se va a amplificar) disuelto a una concentración de 0 o 200 pM, respectivamente, en agua con oligonucleótido 4 ID4 100 nM (en este caso, el oligonucleótido 4 ID4 sirve para saturar las superficies, por ejemplo, durante el almacenamiento del original 12 antes de la reacción), 1,7 µl de agua). Como se muestra en la Figura 7, los tubos de muestra 24 se encuentran a una temperatura controlada de 60 °C en una cubeta de vidrio 25 en un baño de agua 26, que es la temperatura de hibridación, así como la temperatura de elongación. Se introducen los dos primeros tubos de muestra 24 en el baño de agua como controles negativos, pero no son alcanzados por el haz láser. Las concentraciones del original 12 se escogen para que sean de 0 pM en el primer tubo de muestra 24 y de 20 pM en el segundo tubo de muestra 24. El tercer y cuarto tubo de muestra se tratan optotérmicamente. El calentamiento optotérmico es realizado por el láser 16, que consiste en un láser Nd:YAg bombeado por diodos de frecuencia duplicada (Coherent Verdi V10), que se enfoca en los tubos de muestra 24 del baño de agua 26 a una potencia de salida de 3 W con una lente F-theta (Jenoptik, distancia focal de 100 mm) detrás de un escáner con espejo 18 (Cambridge technologies, Pro Series 1). Por cada tubo de muestra 24, se exploran 500 filas con una distancia de aproximadamente 10 µm con el foco a una velocidad por fila en los tubos de muestra de aproximadamente 5 m/s. Esto corresponde a un ciclo en el tercer tubo de muestra 24. Seguidamente, se explora el cuarto tubo de muestra 24, de modo que el tercer y cuarto tubo de muestra ha completado un ciclo. Tras un período de espera de 40 s tras la exploración del tercer tubo de muestra 24, se inicia el siguiente ciclo, y esto se repite hasta que el tercer y cuarto tubo de muestra 24 hayan completado 35 ciclos. Como concentración de partida del original 12, en el tercer tubo de muestra 24, se selecciona 0 pM, y en el cuarto tubo de muestra 24, se escoge 20 pM. Una vez que el tercer y cuarto tubo de muestra 24 han completado 35 ciclos, se retiran todos los tubos de muestra 24 del baño de agua 26. Para examinar el efecto de los ciclos de láser y de la concentración del original 12, se usa una sonda de ensayo 21 que, preferentemente, es capaz de hibridarse bajo el cebador y en las condiciones de hibridación seleccionados para las primeras nanopartículas 3 funcionalizadas con las secuencias cebadoras 5, no estando las primeras nanopartículas 3 bloqueadas por copias complementarias del original 12 que se produjeron en la reacción de amplificación. Esto corresponde a la sonda de ensayo 21 mostrada en la Figura 9. La producción de la sonda de ensayo 21 y las condiciones de hibridación ya se han descrito en la Figura 10. Los diagramas de la Figura 15 muestran los espectros de absorción de la solución de hibridación, que contiene la sonda de ensayo 21, así como la solución de PCR correspondiente de la reacción de amplificación optotérmica, que contiene las primeras nanopartículas 3. Los espectros de absorbancia se registraron en una cubeta de cuarzo con una trayectoria óptica de 3 mm en un espectrómetro Varian Cary 50. En los diagramas, la línea continua muestra el espectro de absorbancia inmediatamente después de mezclar la solución de PCR y la reacción de amplificación optotérmica, que contiene las primeras nanopartículas 3 con la sonda de ensayo 21; la línea discontinua se registra 6 minutos después de la hibridación; y la línea de puntos tras 12 minutos de la hibridación. En la Figura 15a, se muestran los espectros durante la hibridación de la sonda de ensayo 21 con las nanopartículas 8 del producto de PCR del primer tubo de muestra, que no contenía original 12 antes de la reacción

de amplificación y que no experimentado ningún tratamiento optotérmico. Se observa un claro viraje al rojo y la ampliación de la resonancia de plasmón de las nanopartículas 3 al aumentar el tiempo de hibridación, cuando tiene lugar una hibridación entre las sondas de ensayo 21 y las secuencias cebadoras 5 en las primeras nanopartículas 3. También se puede observar una hibridación comparable en la Figura 15b, que muestra la hibridación de la sonda de ensayo 21 con nanopartículas 8 del producto de PCR del segunda tubo de muestra, que contenía original 12 20 pM antes de la reacción de amplificación y no ha recibido ningún tratamiento optotérmico. También se puede observar una hibridación comparable en la Figura 15c, que muestra la hibridación de la sonda de ensayo 21 con las nanopartículas 8 del producto de PCR del tercer tubo de muestra, que no contenía original 12 antes de la reacción de amplificación, pero que recibió un tratamiento optotérmico. La hibridación de la Figura 15c muestra que las secuencias cebadoras 5 siguen unidas a las primeras nanopartículas 3 tras el tratamiento optotérmico. Solo en la Figura 15d, que muestra la hibridación de la sonda de ensayo 21 con nanopartículas 8 del producto de PCR del cuarto tubo de muestra, que contenía original 12 20 pM antes de la reacción de amplificación y que recibió un tratamiento optotérmico, casi no se observa ningún cambio de los espectros de absorbancia al aumentar el tiempo de hibridación. Solo en este último caso, se produjo un número suficiente de copias del original 12 durante la reacción de amplificación, copias que ahora bloquean las secuencias cebadoras 5 de las primeras nanopartículas 3 y que, de este modo, impiden una hibridación con las sondas de ensayo 21. Este ejemplo muestra que la reacción de amplificación optotérmica también funciona si las secuencias cebadoras 5 están unidas covalentemente a ditioles en la superficie de las primeras nanopartículas 3 y que los espectros de absorbancia para la detección de la concentración de las copias del original 12 se pueden usar tras la reacción de amplificación.

Las características desveladas en la presente descripción, las reivindicaciones y las figuras pueden ser de importancia tanto individualmente como en cualquier combinación para la realización de la invención en sus diversas realizaciones.

**25 Lista de números de referencia**

- 1 ácido nucleico
- 2 volumen de reacción
- 3 primeras nanopartículas
- 30 4 oligonucleótido
- 5 secuencia cebadora
- 6 secuencia espaciadora
- 7 cebador
- 8 nanopartícula
- 35 9 molécula de carga
- 10 ADN polimerasa
- 11 muestra
- 12 original
- 13 complemento
- 40 14 cebador directo
- 15 cebador inverso
- 16 láser
- 17 fuente de luz
- 18 escáner con espejo
- 45 19 espejo
- 20 primer oligonucleótido
- 21 sonda de ensayo
- 22 segunda nanopartícula
- 23 segundo oligonucleótido
- 50 24 tubo de la muestra
- 25 cubeta de vidrio
- 26 baño de agua
- 27 primer láser
- 28 segundo láser
- 55 29 fragmento de Klenow
- 30 primer objetivo
- 31 segundo objetivo
- 32 elemento deflector
- 33 unidad de giro
- 60 34 secuencia homóloga
- 35 35 fotodiodo

**Listado de secuencias**

<110> GNA Biosolutions GmbH

5 <120> Método de amplificación de ácidos nucleicos

<140> DE10 2012 201 475.6  
<141> 01-02-2012

10 <160> 10

<170> BiSSAP 1.0

15 <210> 1  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

20 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..65  
<223> /tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID1 modif. tiol 5'" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 1  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagataa gataatgtag tccctggcct 60  
caaag 65

25

<210>2  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

30

<220>  
<221 > fuente  
<222> 1..25  
<223> /tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID2 modif. tiol 5'" /organismo="secuencias artificiales"

35

<400> 2

40 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 25

<210>3  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

45

<220>  
<221 > fuente  
<222> 1..53  
<223>/tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID3" /organismo="secuencias artificiales"

50

<400> 3

55 atgcaaccta aggaggagag ttccttgag gccagggact acattatctt atc 53

<210>4  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

60

<220>  
<221 > fuente

ES 2 596 452 T3

<222> 1..30  
<223>/tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID4" /organismo="secuencias artificiales"

5 <400> 4  
gttgtcttat agcattgggtg ccgatttggg 30

10 <210> 5  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

15 <220>  
<221 > fuente  
<222> 1..65  
<223> /tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID5 modif. tiol 5'" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 5

20 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaataca aatgcaacct aaggaggaga 60  
gttcc 65

<210>6  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

25 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..24  
<223>/tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID6" /organismo="secuencias artificiales"

30 <400> 6  
atgcaaccta aggaggagag ttcc 24

35 <210>7  
<211 > 33  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

40 <220>  
<221 > fuente  
<222> 1..33  
<223> /tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID7 modif. tiol 5'" /organismo="secuencias artificiales"

45 <400> 7  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaggac tac 33

50 <210>8  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

55 <220>  
<221 > fuente  
<222> 1..30  
<223>/tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID8" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 8

60 gataagataa tgtagtcctt ggcctcaaag 30

<210> 9  
<211> 44

ES 2 596 452 T3

<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

5 <220>  
<221 > fuente  
<222> 1..44  
<223> /tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID9 modif. tiol 5'" /organismo="secuencias artificiales"

10 <400> 9  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagataa gataatgtag tccc 44

15 <210> 10  
<211> 65  
<212> ADN  
<213> secuencias artificiales

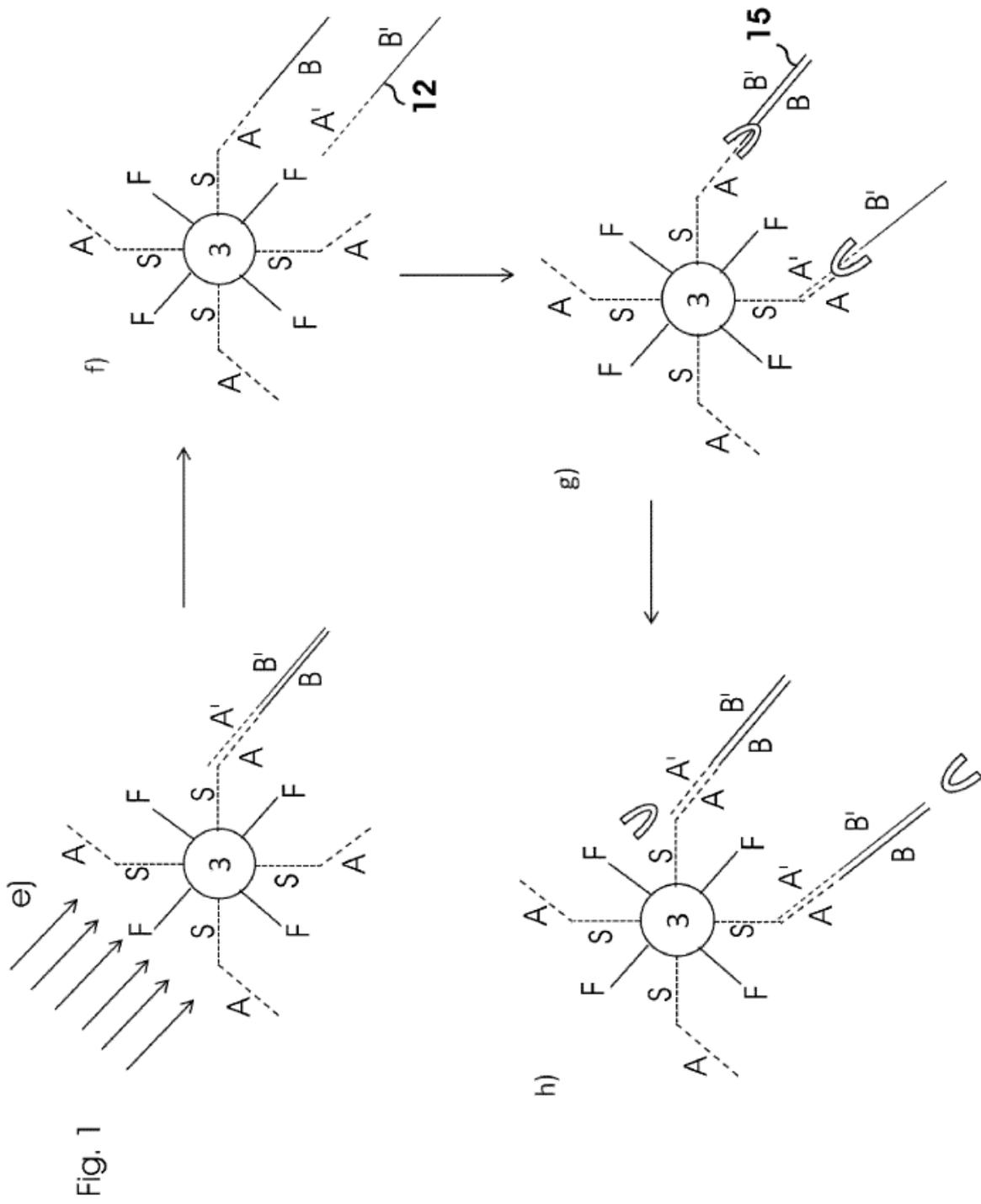
20 <220>  
<221 > fuente  
<222> 1..65  
<223> /tipo\_mol="ADN" /nota="oligonucleótido ID10 modif. tiol 5'" /organismo="secuencias artificiales"

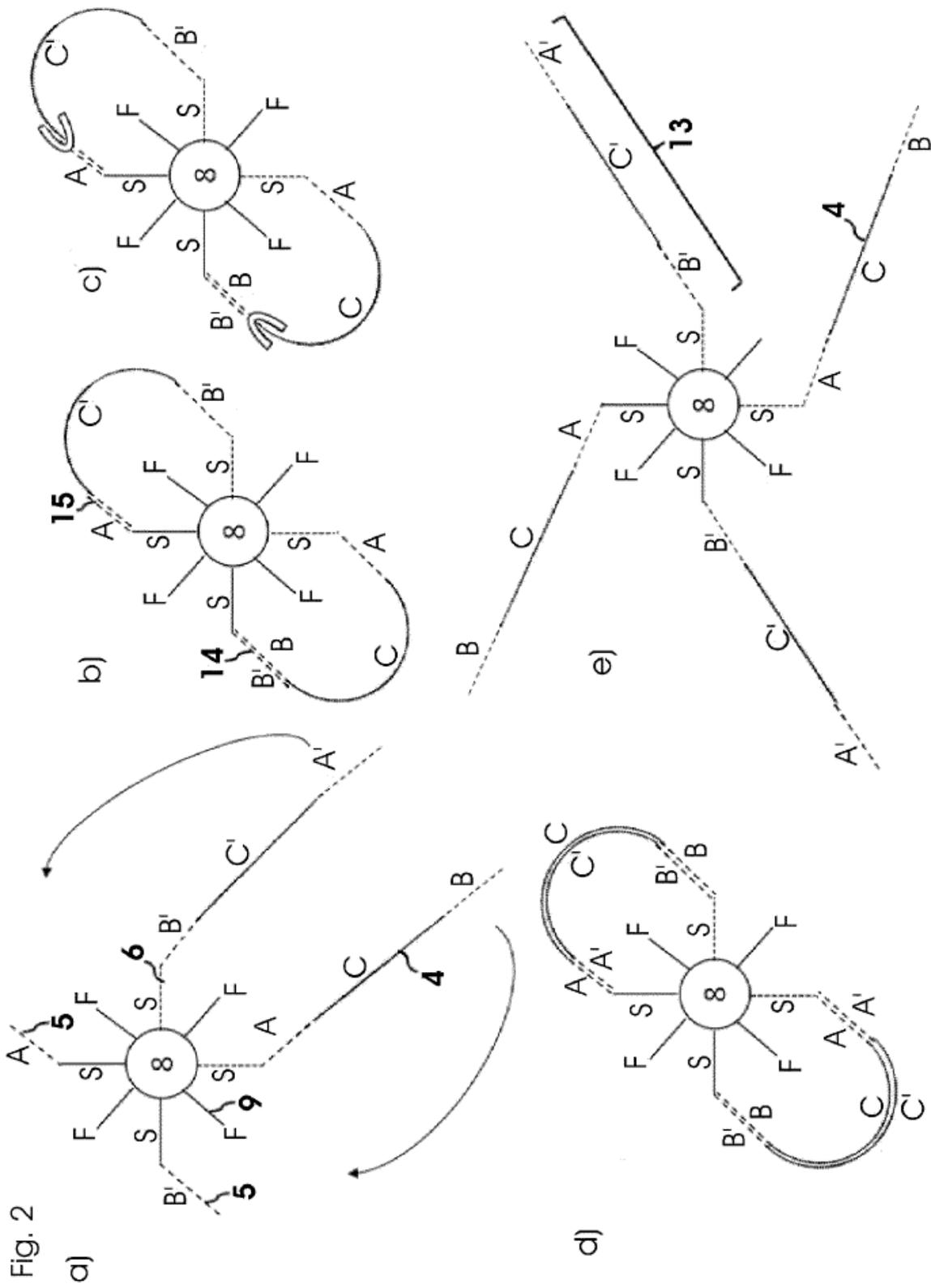
25 <400> 10  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagataa gataatgtag tcctggcct 60  
caaag 65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de amplificación de ácidos nucleicos (1), en el que, en un volumen de reacción (2), nanopartículas (8) conjugadas con oligonucleótidos (4) transfieren calor a su entorno mediante excitación, **caracterizado por que**, mediante la excitación de las nanopartículas (8), el entorno de las nanopartículas (8) se calienta localmente, en donde el intervalo de excitación se selecciona para que sea menor o igual a un tiempo de excitación crítico  $t_1 = (s_1 * |x|)^2 / D$ , en donde  $s_1 = 100$ ,  $|x|$  es la distancia media de las nanopartículas y D es la difusividad térmica del medio entre las partículas (8).
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** los ácidos nucleicos (1) se amplifican mediante una reacción en cadena de la polimerasa.
- 15 3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** las nanopartículas (8) se excitan mediante un láser (16).
- 20 4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** una clase de conjugados de nanopartículas (8) y oligonucleótidos (4) se conjuga con cebadores directos (14), así como con cebadores inversos (15).
- 25 5. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, en el método se usan secuencias homólogas (34) que pueden unirse a dichos oligonucleótidos (4), que se han separado por sí mismas de las nanopartículas (8) a las que se habían unido previamente.
- 30 6. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** se unen moléculas de carga (9) a las nanopartículas (8).
- 35 7. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** los oligonucleótidos (4) de las nanopartículas (8) contienen una secuencia espaciadora (6) como secuencia parcial.
- 40 8. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el calor que se transfiere al entorno de las nanopartículas (8) mediante la excitación de las nanopartículas (8) es suficiente para deshibrar los oligonucleótidos (4) en la superficie de las nanopartículas (8) de los ácidos nucleicos (1) hibridados con los oligonucleótidos (4).
- 45 9. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el método comprende una etapa de calentamiento global.
- 50 10. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la temperatura de hibridación es igual a la temperatura de elongación.
11. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, en cualquier momento durante el método, solo se calienta por excitación una parte de las nanopartículas (8).
12. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** tiene lugar un movimiento dirigido de la muestra (11) con respecto al campo de excitación, de modo que, en diferentes momentos, se excitan nanopartículas (8) en diferentes volúmenes parciales de la muestra (11).
13. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, en el método, se usa una ADN polimerasa (11) termolábil.
14. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la concentración del producto de la reacción de amplificación se determina usando sondas de ensayo (21).







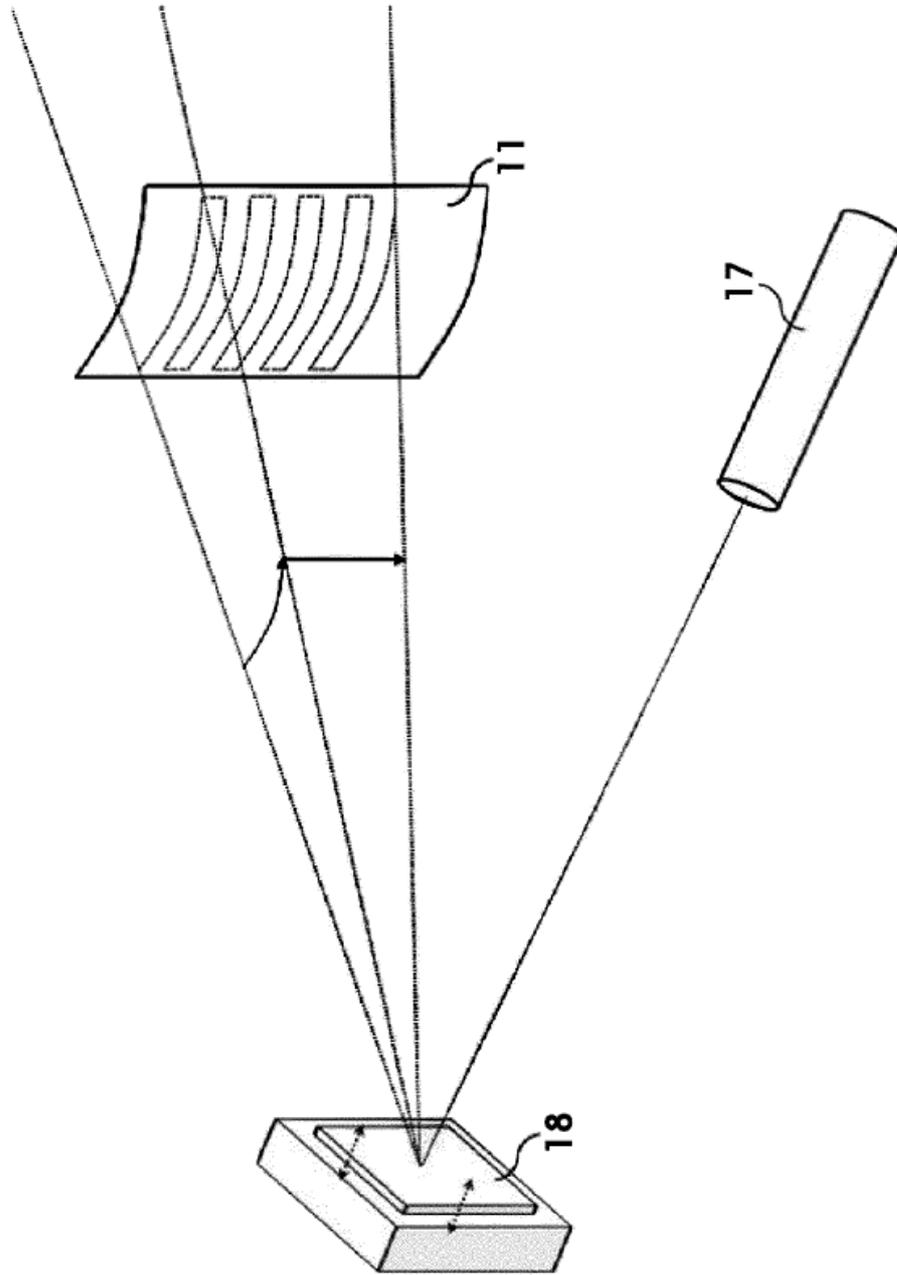


Fig. 3

Fig. 4

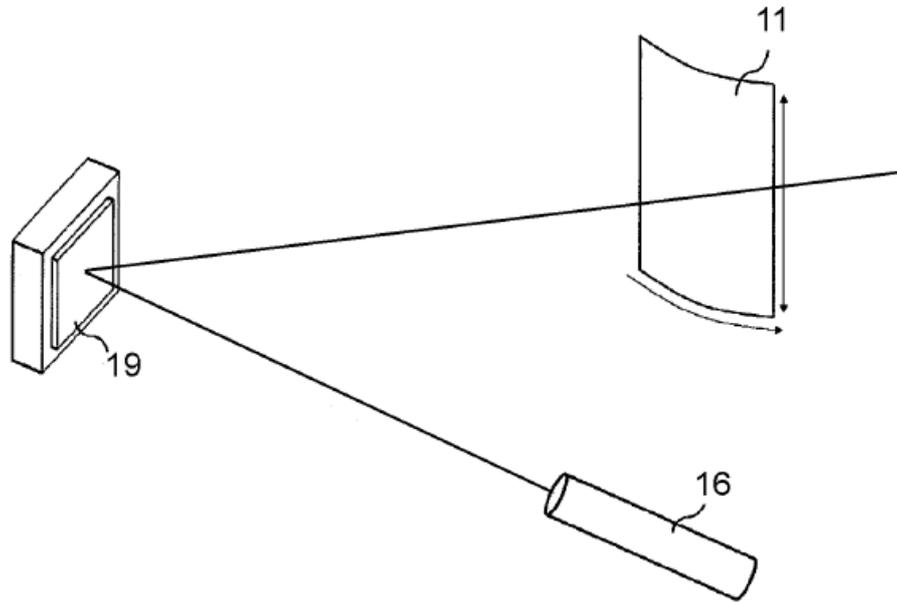
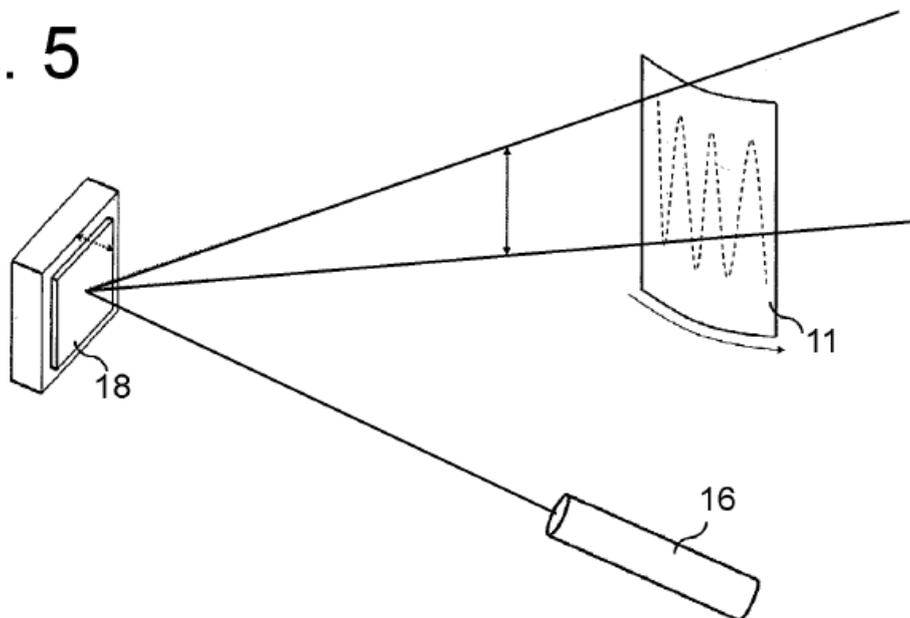


Fig. 5



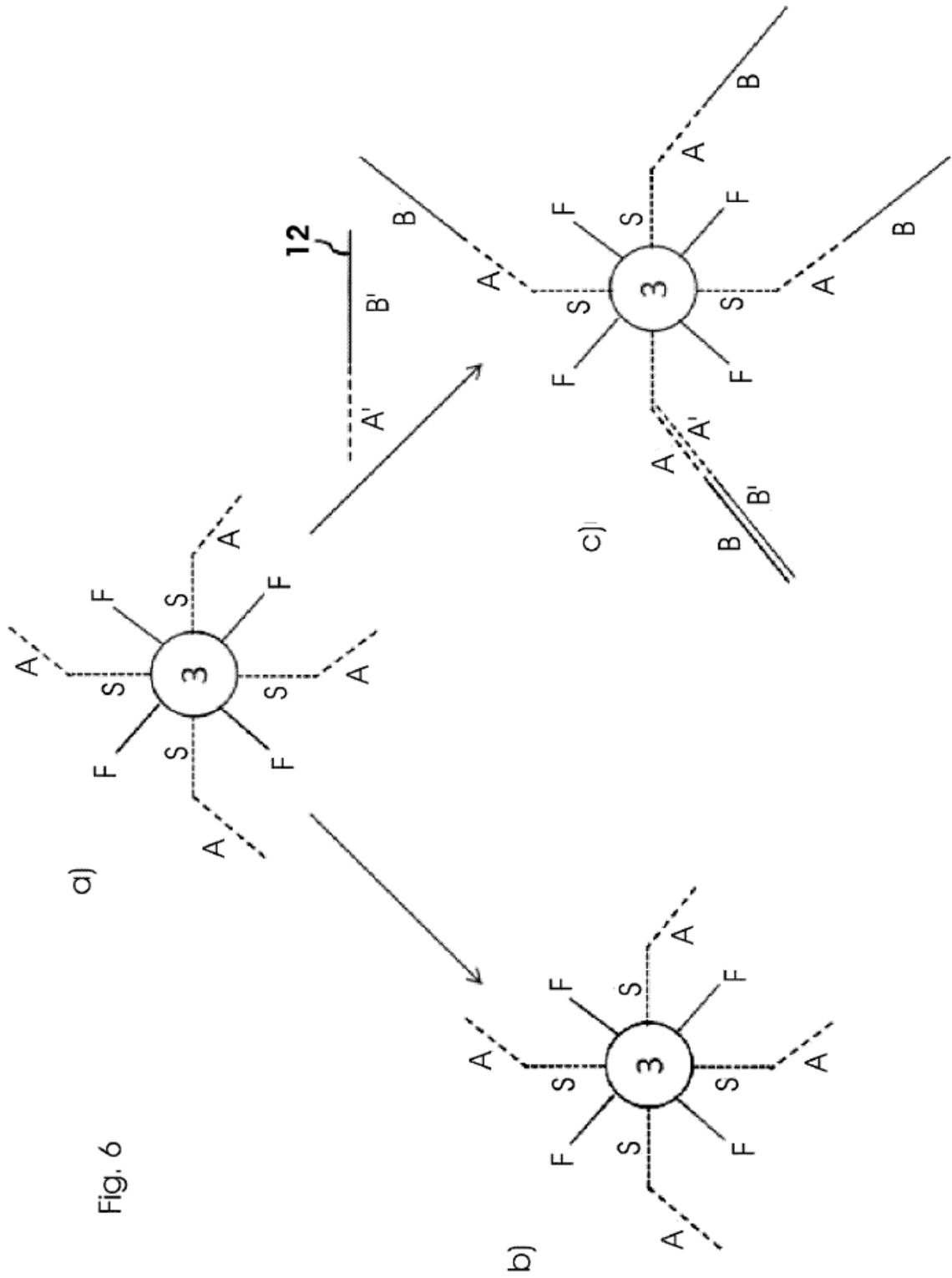


Fig. 6

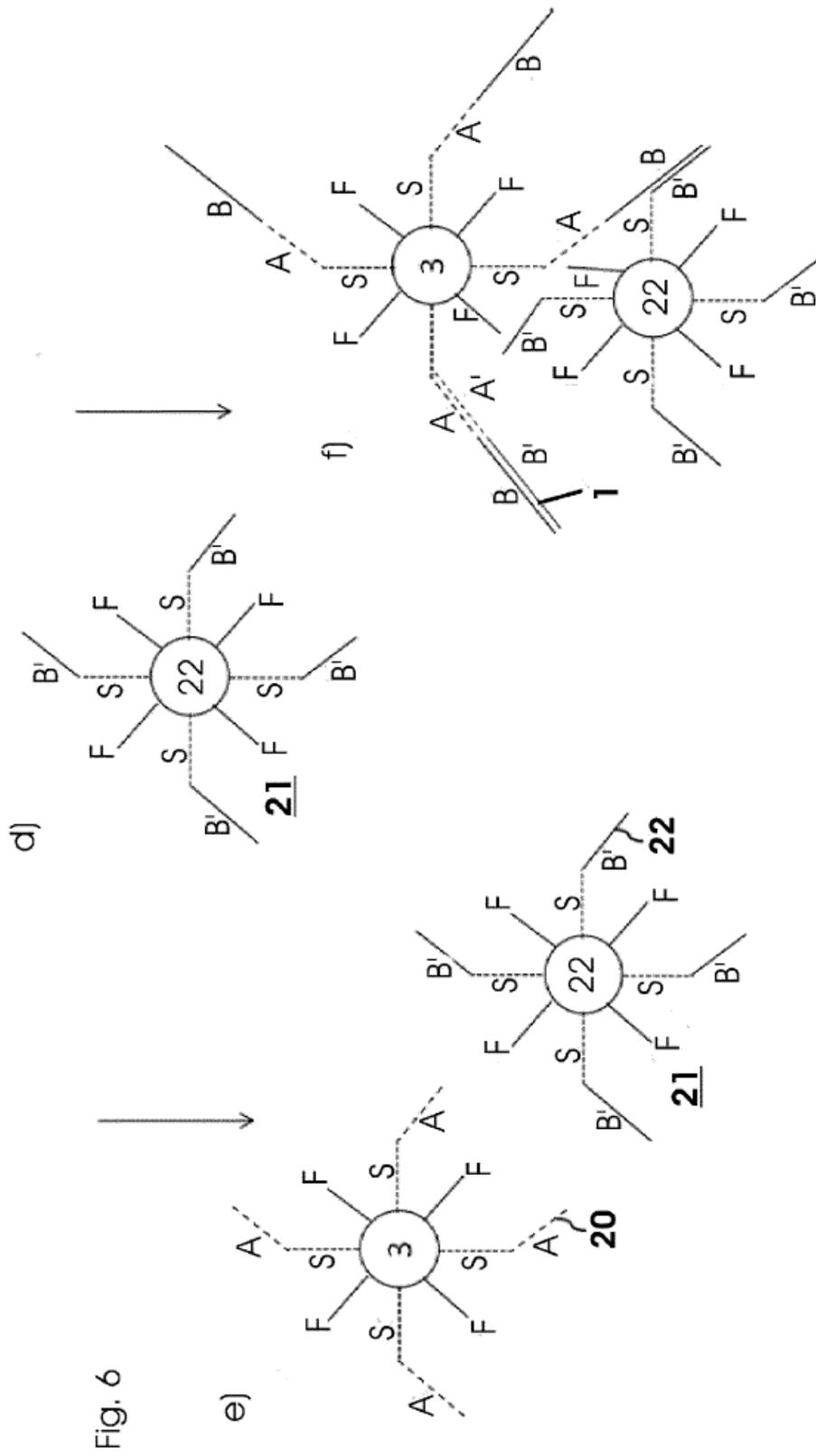


FIG. 6

Fig. 7

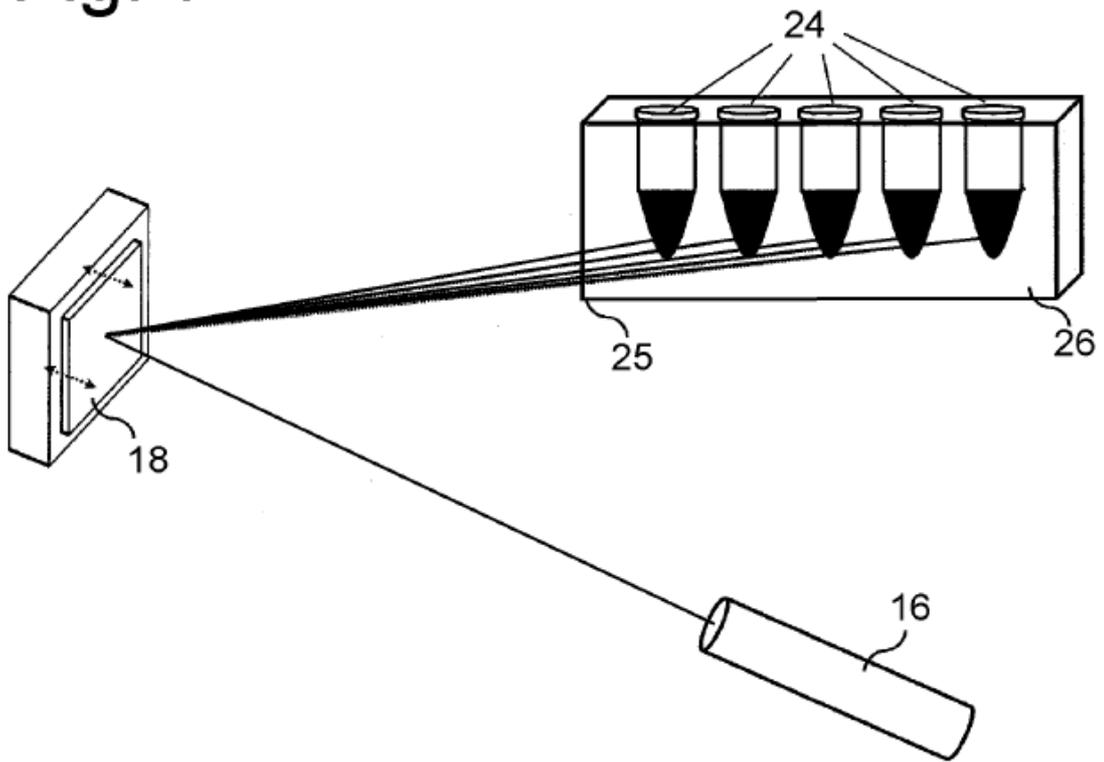


Fig. 8 a)

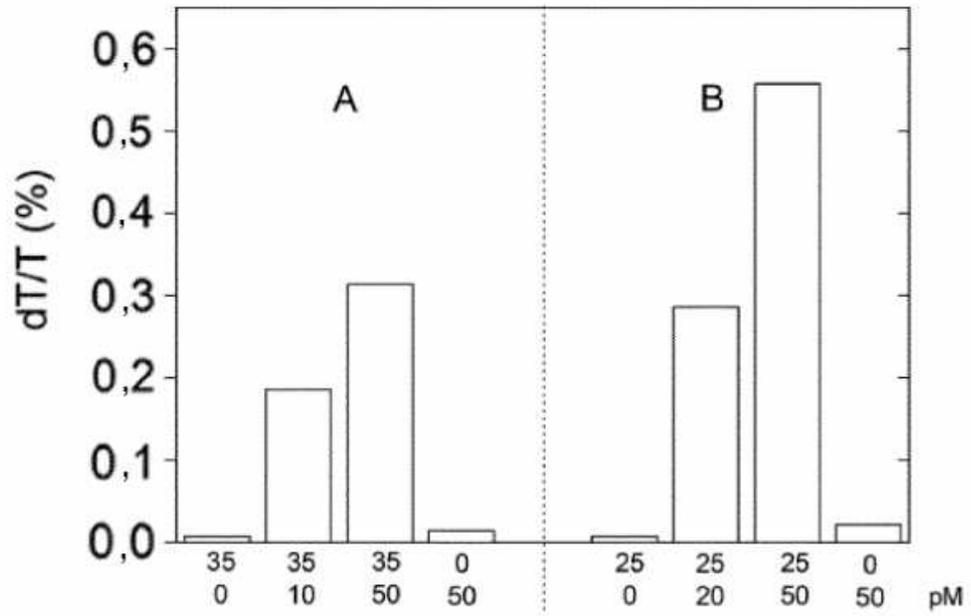
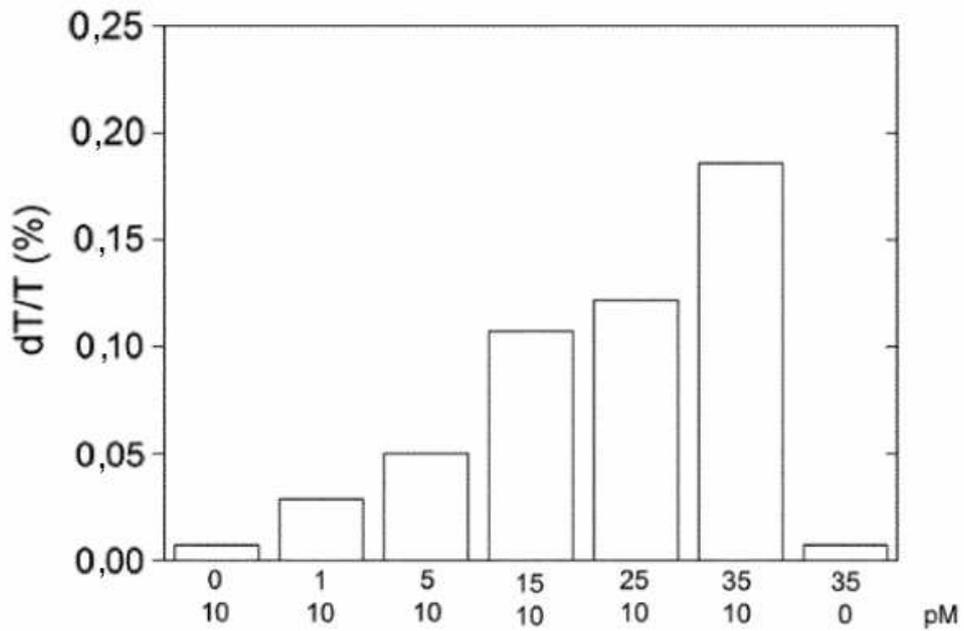


Fig. 8 b)



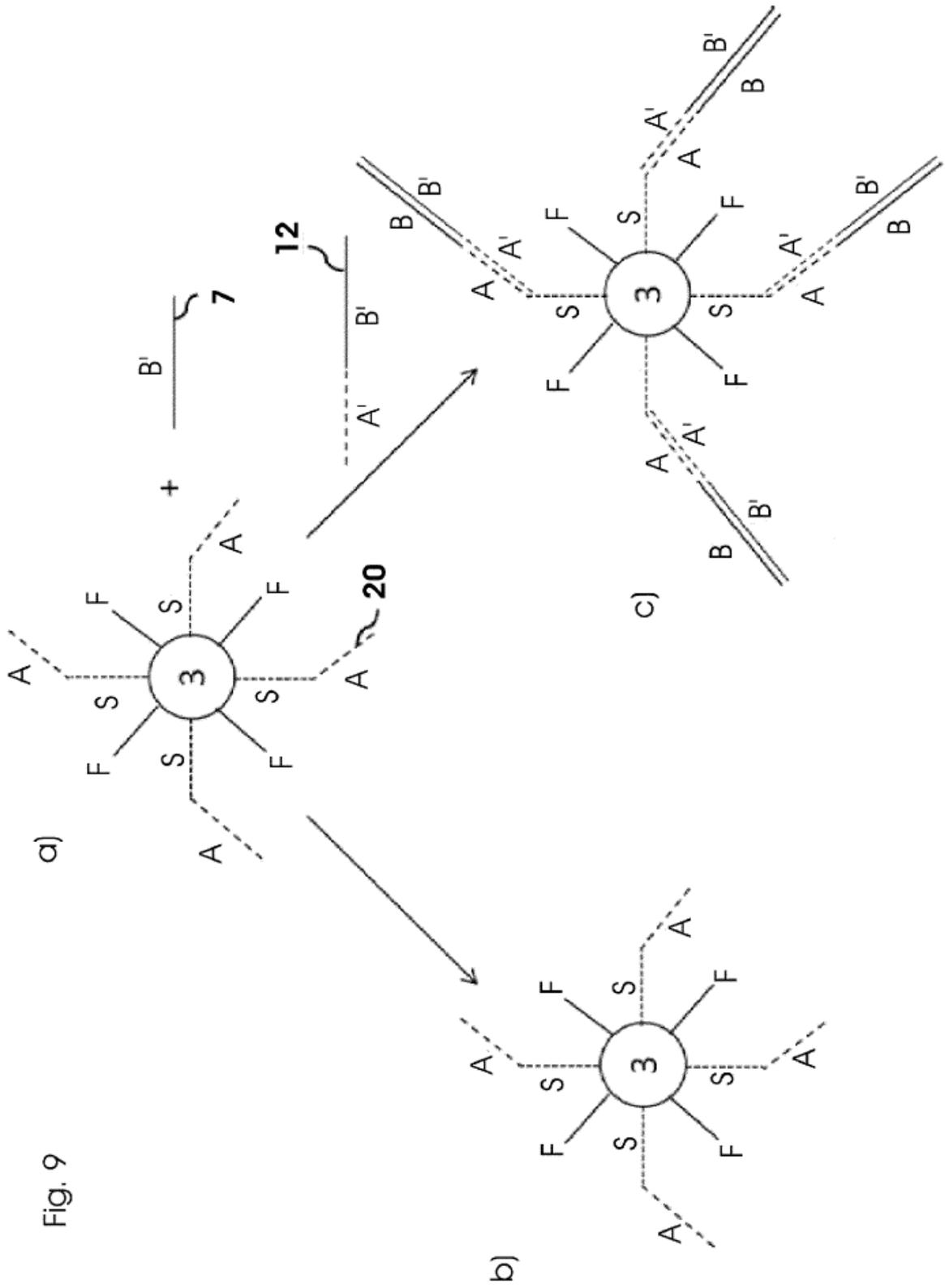


Fig. 9

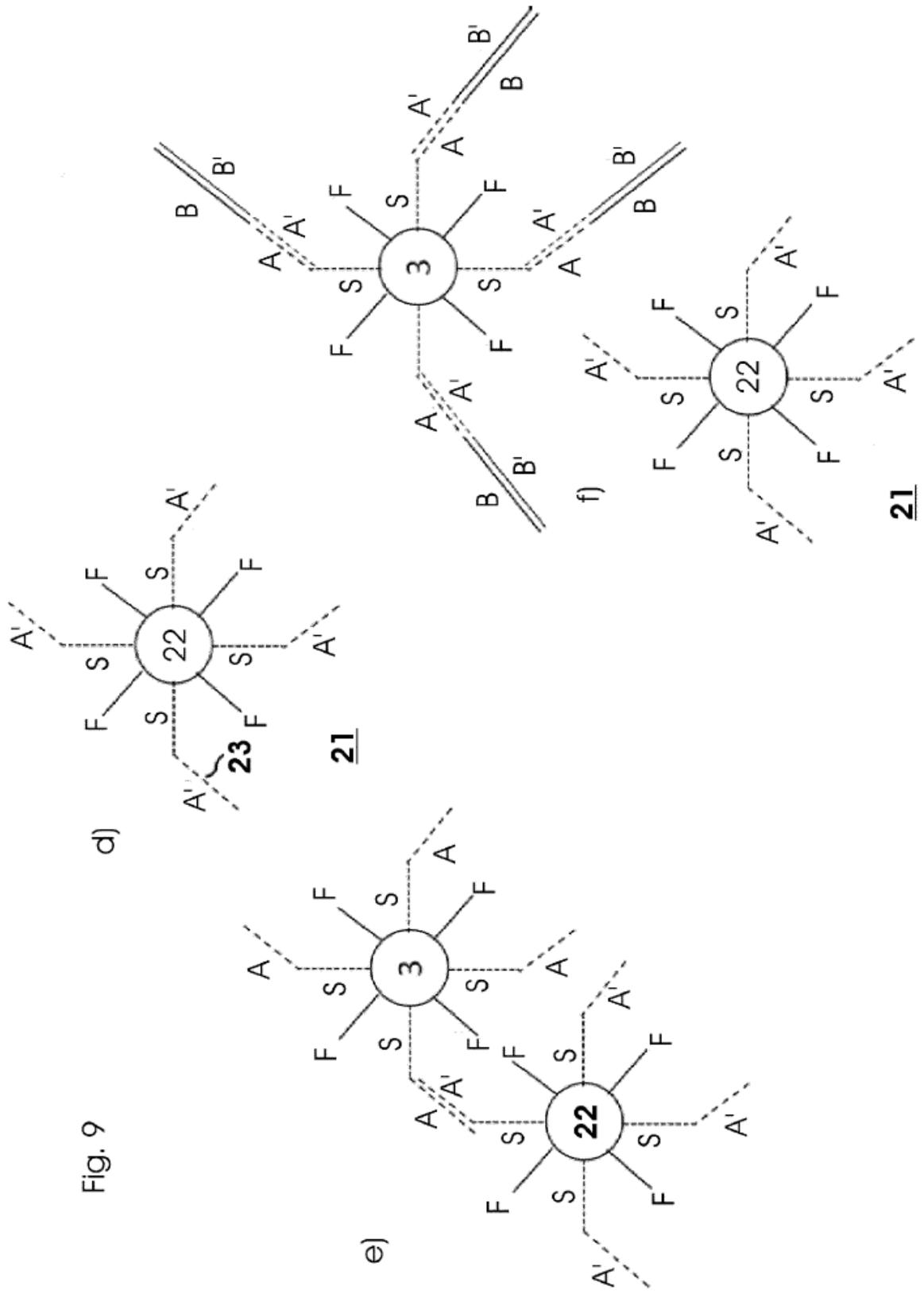


Fig. 9

Fig. 10 a)

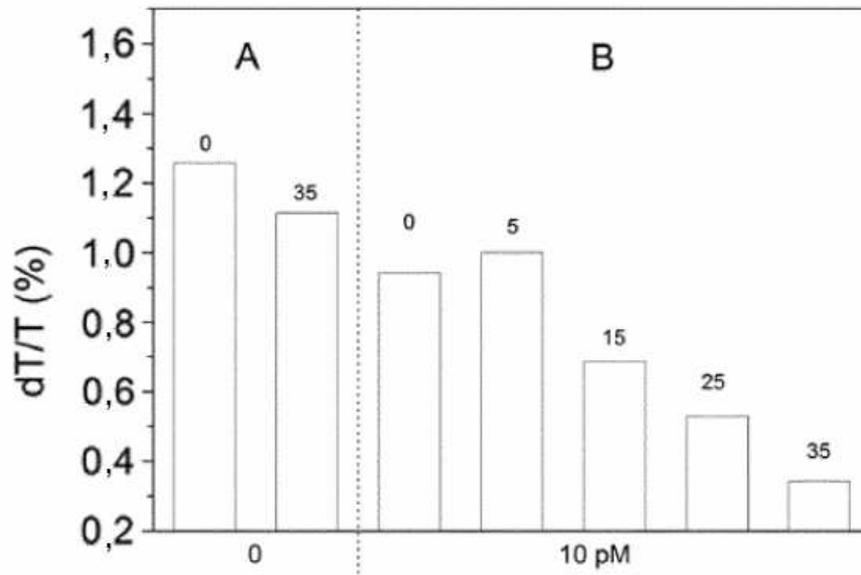


Fig. 10 b)

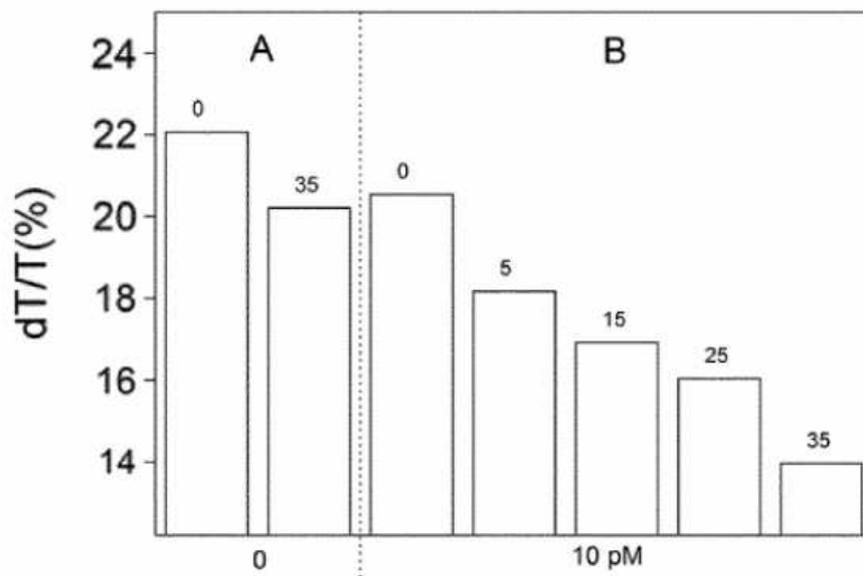


Fig. 11

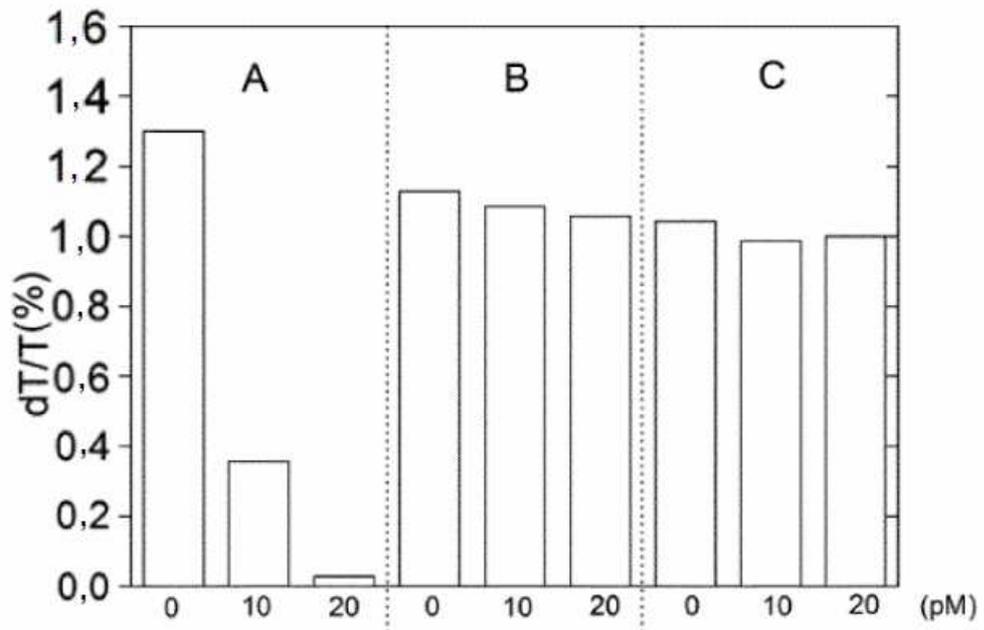
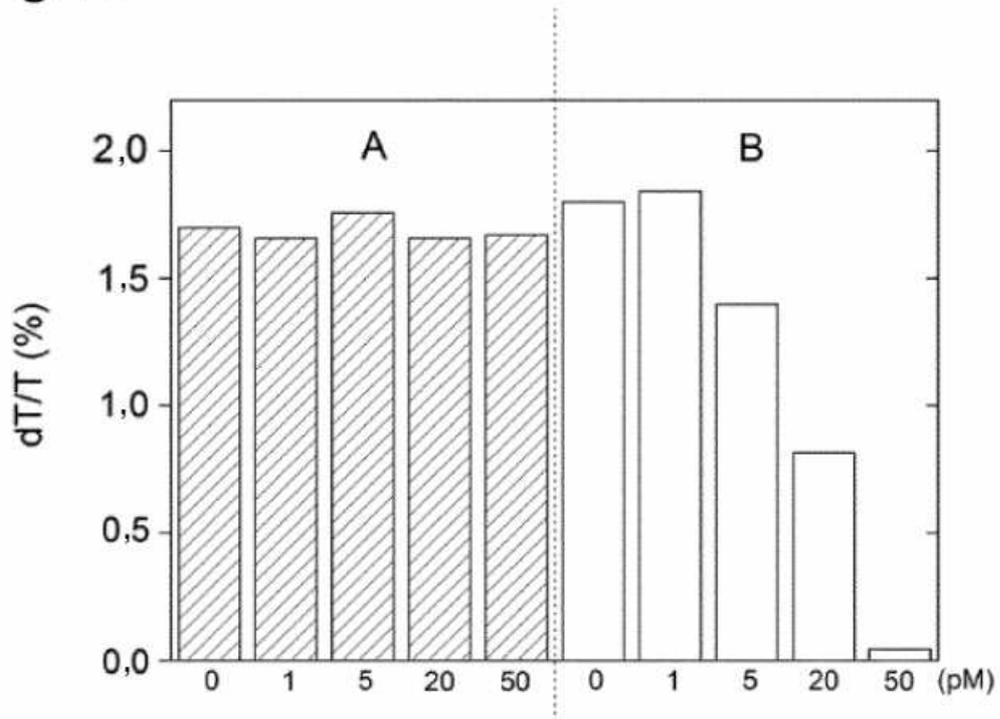


Fig. 12



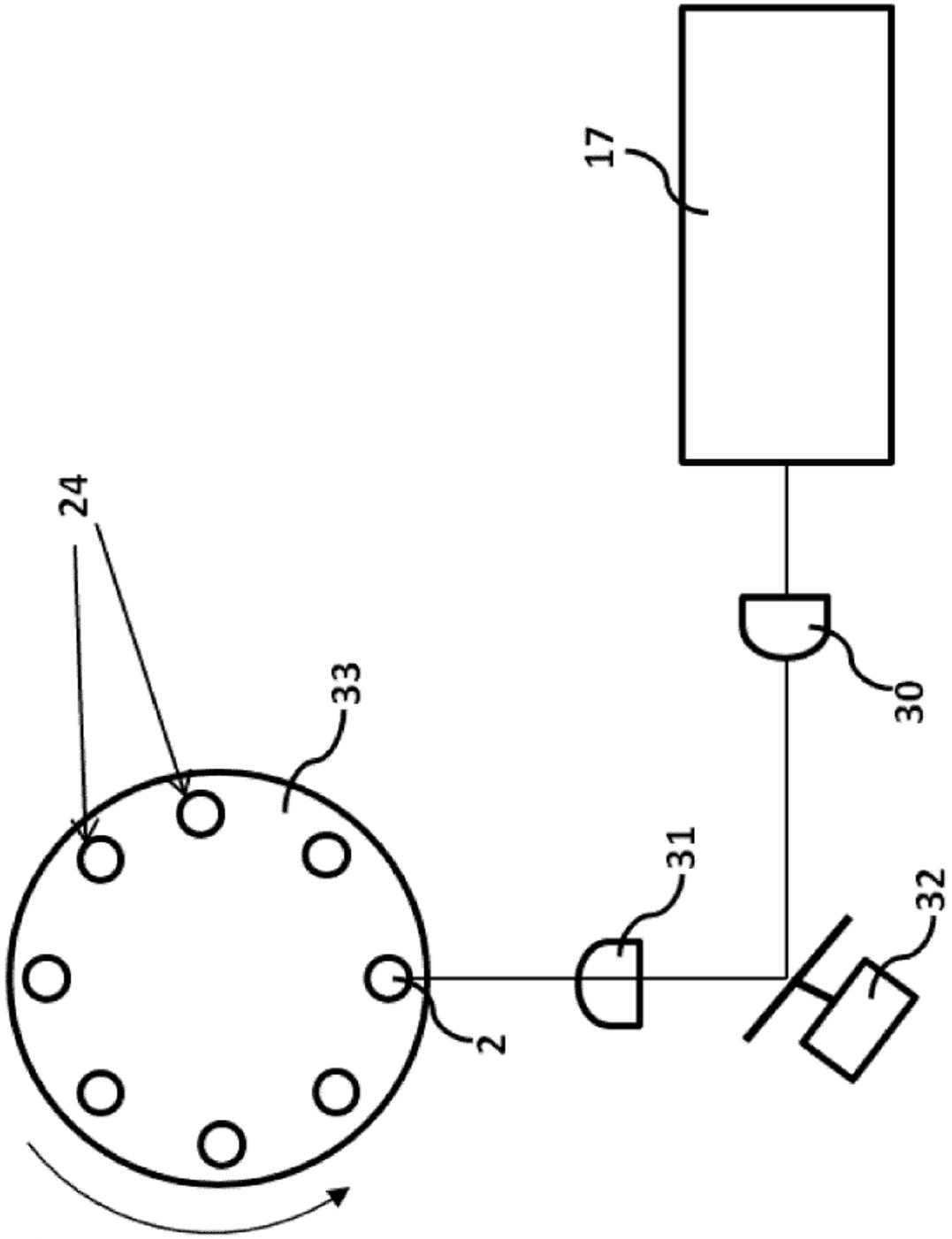


Fig. 13

Fig. 14

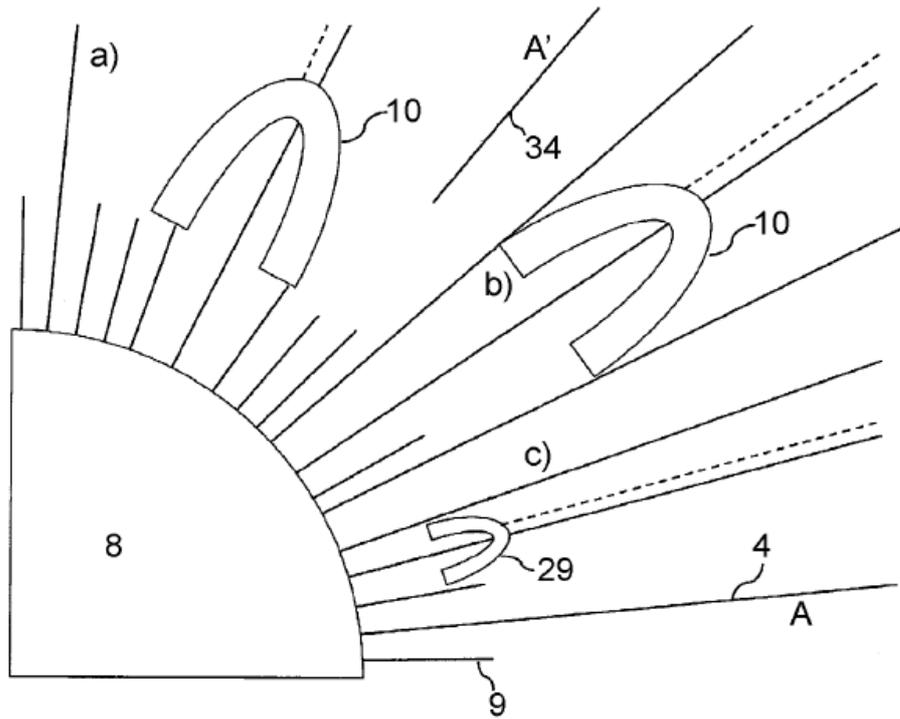
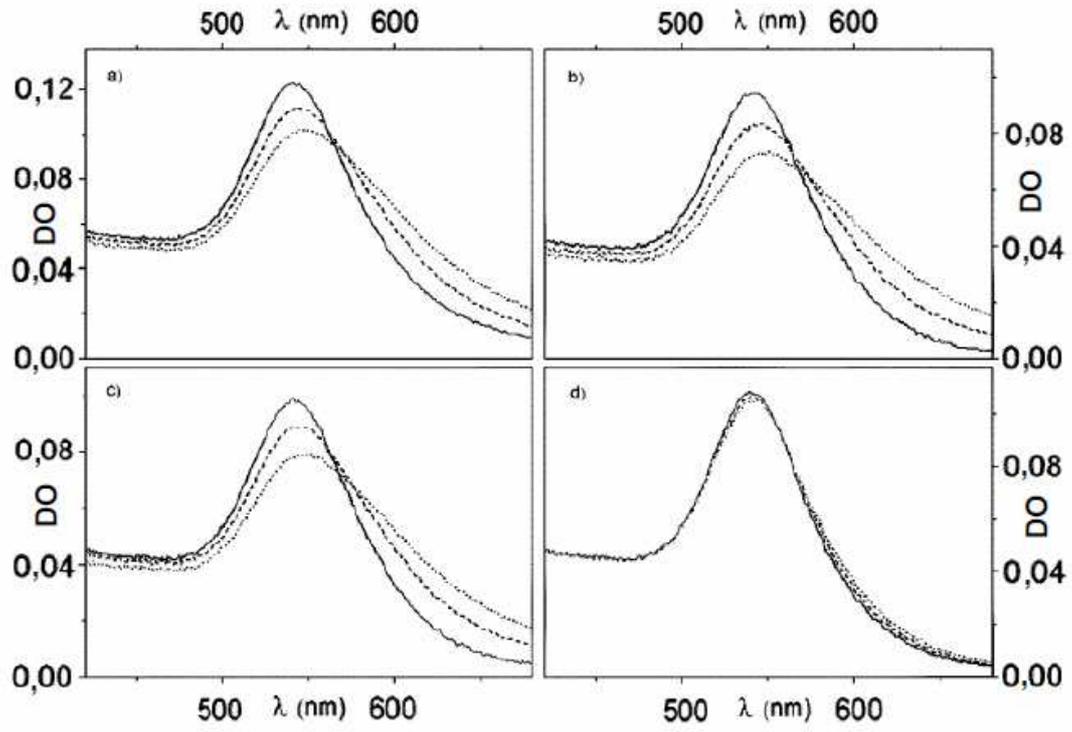


Fig. 15



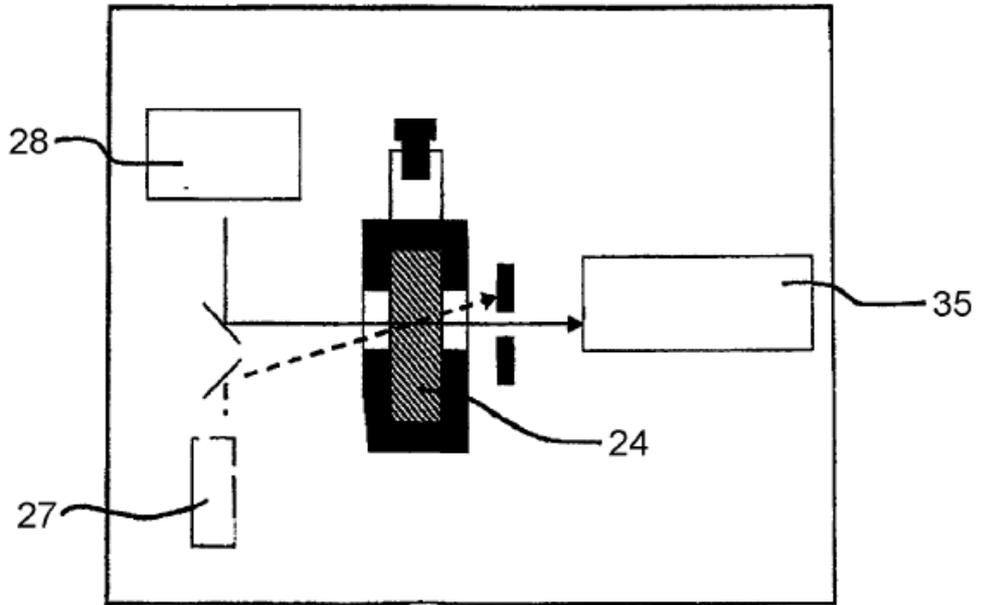


Fig. 16