

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 863**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013 PCT/GB2013/052594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO2014053853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013 E 13798365 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2904114**

54 Título: **Método de detección de una diana de nucleótido sencillo**

30 Prioridad:

**04.10.2012 GB 201217770**

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

**26.05.2017**

73 Titular/es:

**BASE4 INNOVATION LTD (100.0%)  
Broers Building, J. J. Thomson Avenue  
Cambridge, Cambridgeshire CB3 0FA, GB**

72 Inventor/es:

**FRAYLING, CAMERON ALEXANDER;  
BALMFORTH, BARNABY;  
SOARES, BRUNO FLAVIO NOGUEIRA DE  
SOUSA;  
ISAAC, THOMAS HENRY;  
BREINER, BORIS;  
NATALE, ALESSANDRA y  
AMASIO, MICHELE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 613 863 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 detección de una diana de nucleótido sencillo

5 La presente invención se refiere a métodos para detectar la presencia de nucleótidos sencillos complementarios como se define en las reivindicaciones 1 a 10.

10 Las sondas biológicas, que generalmente comprenden oligonucleótidos de cadena sencilla de orden de secuencia conocido de menos de 1.000 nucleótidos de longitud, se usan mucho en biología molecular analítica. Tales sondas generalmente funcionan acoplándose por sí mismas a la diana (por ejemplo, una derivada del ADN de un patógeno que se da de forma natural) cuando existe complementariedad de secuencia completa o suficientemente completa entre las bases de nucleótido de la sonda y la diana. Generalmente, los nucleótidos de tales sondas se marcan con elementos detectables tales como marcadores radiactivos o fluorescentes de manera que cuando la sonda se usa para tratar una solución de analito o sustrato en o sobre el que se cree que se ha capturado la diana, la presencia o ausencia de la diana se revela investigando y detectando la propiedad de detección característica del elemento de detección.

20 Una clase de tales sondas está representada por materiales conocidos en la técnica como "balizas moleculares"; descritas, por ejemplo, en el documento WO 02/06531 o US 8211644. Estas sondas están comprendidas de oligonucleótidos de cadena sencilla que a todos los efectos se han plegado de nuevo sobre sí mismos para crear un bucle de cadena sencilla residual que actúa como sensor de sonda y un tallo corto donde los nucleótidos adyacentes a los dos extremos se unen uno a otro a través de emparejamiento de base de nucleótido complementaria; creando de ese modo una región de doble cadena. Esta disposición, la cual se asemeja a una horquilla en la que el bucle de cadena sencilla se acopla a cadenas complementarias del mismo extremo de un hipotético oligonucleótido de doble cadena (es decir, el tallo), está altamente tensa. A los extremos 3' y 5' libres del oligonucleótido (ahora adyacentes uno del otro y en el extremo apartado del tallo) se acoplan respectivamente un fluoróforo y un desactivador de fluorescencia (*quencher*). Su proximidad uno del otro asegura que no se dé fluorescencia significativa. En el uso, la diana se une al bucle de cadena sencilla causando tensión adicional que, a continuación, causa que el tallo se abra distanciando de ese modo el fluoróforo y el desactivador de fluorescencia y permitiendo al primero emitir fluorescencia. Una desventaja de estas sondas es que el bucle necesita ser relativamente largo, por ejemplo, de 20 a 30 nucleótidos, haciéndolas inadecuadas para detectar dianas más pequeñas y especialmente aquellas que comprenden nucleótidos sencillos.

35 El documento US 2006/063193 describe un método de detección que comprende poner en contacto un analito de cadena sencilla con una matriz de diferentes tipos de sonda teniendo cada uno una secuencia diferente; hibridar el analito con su sonda complementaria y determinar la secuencia mediante la realización de espectroscopía de masa sobre la sonda hibridada. Sin embargo, este método, que es diferente al de la presente invención, no es especialmente adecuado para la identificación de nucleótidos sencillos.

40 El documento EP 1662006 enseña una sonda de ADN derivada de dos cadenas de oligonucleótidos complementarias de diferentes longitudes, la más larga de las cuales está diseñada para ser el complemento de secuencia de una diana de cadena sencilla. Por lo tanto, en su estado sin usar, la sonda comprende una región de doble cadena y una región de cadena sencilla que puede reconocer y llegar a estar parcialmente acoplada a la diana por hibridación. A continuación, la más corta de las dos cadenas en la sonda y el resto de la secuencia de la diana se pueden intercambiar permitiendo que el analito llegue a estar completamente hibridado con la sonda. En una realización, los correspondientes nucleótidos sobre las dos cadenas de la sonda están funcionalizados con pares de fluoróforos y desactivadores de fluorescencia que vuelven la sonda sin usar no fluorescente. Sin embargo, cuando la cadena más corta se extrae por intercambio por el resto de la diana los fluoróforos están disponibles para emitir fluorescencia.

50 El documento WO 2006/071776 describe un método de amplificación de ARN basado en ligación que implica el uso de un ácido nucleico que comprende una región de doble cadena y una región terminal 3' de cadena sencilla. En este método el extremo 5' del ARN está acoplado a la región de cadena sencilla y el extremo 3' a la cadena de la región de doble cadena que es 5'. A continuación, el ARN se puede amplificar usando técnicas conocidas. Sin embargo, el ácido nucleico no parece estar marcado con elementos detectables.

60 El documento WO 2009/120372 enseña un método en el que un oligonucleótido de doble cadena de secuencia desconocida se convierte primero en un ácido nucleico molde acoplado primero las regiones primera y segunda de cadena sencilla de la horquilla a sus extremos. Después, el molde así producido se puede usar para secuenciar simultáneamente el oligonucleótido de doble cadena en ambas direcciones sentido y antisentido usando un método de secuenciación mediado por polimerasa convencional que implica cebar las horquillas; separar las cadenas constituyentes del oligonucleótido de doble cadena; y prolongar los cebadores a lo largo de las cadenas separadas. Sin embargo, ninguno de los nucleótidos dentro del molde parece estar marcado con elementos detectables.

65 El documento WO 2006/115570 describe una sonda detectora que comprende una estructura de tallo-bucle de doble cadena, una región de cadena sencilla complementaria a diana, una región de doble cadena adicional y dos

moléculas indicadoras adecuadas para la detección de pequeñas moléculas de ácido nucleico.

El documento US 2003/058799 describe un método para detectar un nucleótido sencillo que se ha separado de una molécula de ácido nucleico diana más larga por actividad de la exonucleasa por espectroscopía de Raman o por espectroscopía de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.

Actualmente hemos desarrollado sondas biológicas alternativas en las que los elementos detectables son básicamente indetectables a menos que se activen específicamente por una secuencia de reacciones bioquímicas/enzimáticas que liberan uno o una cascada de los elementos detectables a partir de la sonda en un estado más fácilmente detectable. Tales sondas biológicas son útiles en situaciones donde la concentración de la diana es muy pequeña y así especialmente donde la diana comprende un grupo de nucleótidos sencillos cuya ordenación de base de nucleótido asociada corresponde a la de una biomolécula desconocida cuya secuencia necesita ser determinada. Esto crea la posibilidad de usar las sondas de la presente descripción en dispositivos de secuenciación de ADN de alto rendimiento.

La presente descripción proporciona una sonda biológica caracterizada por que comprende una región de nucleótidos de cadena sencilla cuyos extremos están, cada uno de ellos, acoplado a dos regiones oligonucleotídicas de doble cadena diferentes, comprendiendo al menos una de las regiones oligonucleotídicas, elementos detectables que tienen una propiedad de detección característica y estando los elementos detectables dispuestos sobre la región de oligonucleótidos de tal manera que la propiedad detectable es menos detectable que cuando el mismo número de elementos detectables se unen a un número correspondiente de nucleótidos sencillos.

En un aspecto preferido los elementos detectables comprenden fluoróforos y la propia sonda es básicamente no fluorescente en aquellas longitudes de onda donde los fluoróforos están diseñados para ser detectados. Por tanto, aunque un fluoróforo puede presentar fluorescencia de fondo general de bajo nivel a través de una extensa zona del espectro electromagnético generalmente habrá una o un pequeño número de longitudes de onda o envolventes de longitud de onda específicos donde la intensidad de la fluorescencia está en un máximo. Es en uno o más de estos máximos donde se detecta característicamente que el fluoróforo no debería dar fluorescencia. En el contexto de la presente descripción mediante el término "básicamente no fluorescente" o redacción equivalente se quiere decir que la intensidad de fluorescencia del número total de los fluoróforos acoplados a la sonda en la(s) longitud(es) de onda relevante(s) o envolvente de longitud de onda es menor que 25 %; preferiblemente menor que 10 %; más preferiblemente menor que 1 % y lo más preferiblemente menor que 0,1 % de la correspondiente intensidad de fluorescencia de un número equivalente de fluoróforos libres.

En un principio, se puede usar cualquier método para asegurar que en el estado sin usar de la sonda los fluoróforos emiten menos fluorescencia que cuando cada uno se une a su propio nucleótido sencillo. Un planteamiento es además acoplar desactivadores de fluorescencia en proximidad cercana a los mismos. Otro está basado en la observación de que cuando múltiples fluoróforos están acoplados a la misma sonda en proximidad cercana unos de otros, tienden a desactivarse la fluorescencia uno a otro lo suficientemente bien que el criterio descrito en el párrafo anterior se puede conseguir sin la necesidad de desactivadores de fluorescencia. En este contexto de esta patente, lo que constituye "proximidad cercana" entre fluoróforos o entre fluoróforos y desactivadores de fluorescencia dependerá de los particulares fluoróforos y desactivadores de fluorescencia usados y posiblemente de las características estructurales de la(s) región(es) de oligonucleótidos. Por consiguiente, se pretende que este término se construya en referencia al resultado requerido en lugar de a cualquier disposición estructural particular en la sonda. Sin embargo, y para los fines de proporcionar ejemplo, se indicó que cuando se separan fluoróforos adyacentes o fluoróforos y desactivadores de fluorescencia adyacentes por una distancia que corresponde a su distancia Förster característica (generalmente menos de 5 nm) se conseguirá suficiente desactivación de fluorescencia.

Preferiblemente al menos una de las regiones de oligonucleótidos que comprenden la sonda está marcada con hasta 20, preferiblemente hasta 10 y lo más preferiblemente hasta 5 fluoróforos. Para obtener máxima ventaja, se prefiere que al menos una de las regiones de oligonucleótidos esté marcada con al menos 2 preferiblemente al menos 3 fluoróforos. Por consiguiente, en el presente documento específicamente se prevén intervalos construidos a partir cualquier permutación de estos máximos y mínimos. Si se emplean desactivadores de fluorescencia, igualmente se prefiere que la sonda esté marcada con hasta 20, preferiblemente hasta 10 y lo más preferiblemente hasta 5 del mismo. Pese a que se prevé que más de un tipo de fluoróforo se puede acoplar a la sonda, por ejemplo, para dar una huella característica, se prefiere que todos los fluoróforos acoplados a una sonda dada sean del mismo tipo. Preferiblemente, los fluoróforos y desactivadores de fluorescencia están sobre diferentes cadenas de la región de oligonucleótidos u opuestos uno de otro donde se crean por plegamiento de un precursor de oligonucleótidos de cadena sencilla.

Con relación a los propios fluoróforos, en un principio, se pueden elegir entre cualquiera de los convencionalmente usados en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, restos de xanteno, por ejemplo, fluoresceína, rodamina y sus derivados tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina B y similares; restos de cumarina (por ejemplo, hidroximetil- y aminocumarina) y restos de cianina tales como Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7. Ejemplos específicos incluyen fluoróforos derivados de los siguientes colorantes comúnmente usados: colorantes Alexa, colorantes de cianina,

colorantes Atto Tec y colorantes de rodamina. Los ejemplos también incluyen: Atto 633 (ATTO-TEC GmbH), Rojo Texas, Atto 740 (ATTO-TEC GmbH), Rosa Bengala, Alexa Fluor™ 750 C<sub>5</sub>-maleimida (Invitrogen), Alexa Fluor™ 532 C<sub>2</sub>-maleimida (Invitrogen) y Rojo Rodamina C<sub>2</sub>-maleimida y Verde Rodamina así como colorantes de fosforamadita tales como Quasar 570. Alternativamente se puede emplear un punto cuántico o un colorante cerca del infrarrojo tal como los suministrados por LI-COR Biosciences. El fluoróforo generalmente se acopla a los oligonucleótidos por una base de nucleótido que usa métodos químicos conocidos en la técnica.

Desactivadores de fluorescencia adecuados son aquellos que funcionan por un mecanismo de transferencia de energía por resonancia Foster (FRET, *Förster resonance energy transfer*). Como ejemplos no limitantes de desactivadores de fluorescencia disponibles en el comercio, que se pueden usar en asociación con los fluoróforos anteriormente mencionados, se incluyen, pero sin limitación, DDQ-1, Dabcyl, Eclipse, Iowa Black FQ y RQ, IR Colorante -QC1, BHQ-1, -2 y -3 y QSY-7 y -21.

Volviendo a la región de nucleótidos de cadena sencilla de la sonda, esta puede tener una longitud de hasta 1.000 nucleótidos, preferiblemente de hasta 300 nucleótidos y o bien esté generada desde el inicio por síntesis química o proceda de una fuente que se da de manera natural tal como ADN bacteriano. En un aspecto de la descripción, la región de nucleótido tiene adecuadamente una longitud de hasta 100 nucleótidos, preferiblemente de hasta 50 nucleótidos y lo más preferiblemente de hasta 30 nucleótidos. En los métodos de la invención la región de cadena sencilla comprende un solo nucleótido lo que hace que la sonda sea extremadamente selectiva para la detección del nucleótido libre que tiene una base de nucleótido complementaria. En el caso de dianas derivadas de ADN o ARN de origen natural esto crea la posibilidad de emplear una mezcla de sondas biológicas multicomponente que comprende hasta cuatro sondas biológicas diferentes, cada una de ellas selectiva para una base de nucleótido diferente característica de la diana (es decir, para ADN una de guanina, citosina, adenina y timina o para ARN una de guanina, citosina, adenina y uracilo) y empleando cada una un elemento detectable diferente; en particular diferentes fluoróforos que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda o envolventes de longitud de onda característicos.

Volviendo a la(s) región(es) de oligonucleótidos de doble cadena, se prefiere que sean derivadas o derivables de dos precursores de oligonucleótidos, cada uno preferiblemente en bucle cerrado en el extremo apartado de la región de nucleótidos de cadena sencilla, o de un precursor de oligonucleótido de cadena sencilla común mediante el plegamiento de los dos últimos extremos sobre ellos mismos para crear dos regiones de oligonucleótidos de bucle cerrado con un hueco (*gap*) intermediario que constituye la región de nucleótidos de cadena sencilla. En todos los casos el efecto es el mismo; adyacentes a los extremos de la región de nucleótidos de cadena sencilla estarán los extremos libres 3' y 5' en la otra cadena de la región de oligonucleótidos a la que se pueden acoplar los correspondientes extremos 5' y 3' de la diana. Por tanto, el uso de la sonda implica un proceso de acoplar la región de nucleótido de cadena sencilla a una diana que tenga una secuencia complementaria de las bases de nucleótido juntándose a dichos extremos 3' y 5' para generar una sonda usada que es de doble cadena a lo largo de toda la longitud.

Cuando la sonda biológica comprende dos oligonucleótidos de doble cadena distintos se prefiere que cada extremo apartado de la región de nucleótidos sea un bucle cerrado. Adecuadamente, la región, o regiones, oligonucleotídica(s) tiene(n) una longitud de hasta 50 pares de nucleótidos, preferiblemente de hasta 45 pares de nucleótidos, más preferiblemente en el intervalo de 5 a 40 pares de nucleótidos y lo más preferiblemente en el intervalo de 10 a 30 nucleótidos. Se pueden usar regiones de oligonucleótidos más largas pero el riesgo potencial de que el acceso a la región de nucleótidos pueda llegar a estar completamente restringido llegando a estar enredada con ellos hace que esta realización sea menos atractiva.

Es preferible que los elementos detectables unidos a las regiones de oligonucleótidos estén localizados apartados de la región de nucleótido. Cuando se emplean dos regiones de oligonucleótidos distintas se prefiere que los elementos detectables estén localizados o agrupados en o hacia uno o ambos de los extremos de las mismas que están apartados de la región de nucleótidos. En una realización preferida al menos una de las regiones de oligonucleótidos comprende un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción preferiblemente adyacente a la región donde se localizan o agrupan los elementos detectables. Tal sitio de reconocimiento de la enzima de restricción generalmente comprenderá una secuencia específica de desde 2 a 8 pares de nucleótidos. En otra realización preferida el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción se crea mediante la unión de la diana a la región de nucleótido.

En principio, las sondas biológicas de la presente descripción se pueden fabricar mediante cualquiera de las metodologías de ensamblaje de nucleótidos conocidas en la técnica, que incluyen el método de H-fosfonato, la síntesis de fosfodiéster, la síntesis de fosfortriéster y la síntesis de fosfito triéster. Los métodos preferidos son los que emplean fosforamadita de nucleótido que construye bloques debido a su actividad. En estos métodos, la síntesis se da por adición secuencial de la fosforamadita de nucleótido elegida, a la cadena de nucleótidos en crecimiento en la posición 5' en un proceso de cuatro etapas cíclico, que implica el desbloqueo, el acoplamiento, la terminación de cadena (*capping*) y la oxidación. La naturaleza cíclica de este proceso lo hace especialmente dispuesto a la automatización y las máquinas para hacer que estos estén fácilmente disponibles en el mercado. Cuando se introducen desactivadores de fluorescencia y/o fluoróforos, se emplea la fosforamadita de nucleótido

apropiadamente marcada en el punto requerido. En una realización muy preferida, el método de fosforamada se usa para hacer que un precursor de oligonucleótido de cadena sencilla se pliegue mediante un ciclo de calentamiento rápido y enfriamiento lento en una sonda que tiene las características deseadas.

- 5 Generalmente, las sondas se utilizan en solución pero si se desea, se pueden inmovilizar ventajosamente sobre un sustrato tal como polímero, membrana, micromatriz y similares o en un nanoporo o un nanocanal.

En un segundo aspecto de la descripción se proporciona un método para usar la sonda biológica para detectar una diana caracterizada por comprender la etapa de (a) acoplamiento de la diana a la región de nucleótidos de cadena sencilla de una sonda biológica del tipo anteriormente descrito para crear una sonda usada que es completamente de doble cadena. Generalmente esta etapa (a) tiene lugar por medio de una polimerasa que une el extremo 5' de la diana a un extremo 3' del oligonucleótido y una ligasa para juntar los extremos libres restantes de la diana y el oligonucleótido u otro oligonucleótido juntos. Se pueden usar un amplio rango de polimerasas y ligasas que incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de fuentes bacterianas fácilmente disponibles tales como bacteriófago T4, *Escherichia coli* y *Thermus aquaticus* (Taq). Preferiblemente la etapa (a) se lleva a cabo en un medio acuoso en presencia de sonda en exceso con adecuadamente la relación molar de diana y sonda que está en el intervalo de 1:1 a 1:2.000, preferiblemente 1:1 y 1:200, más preferiblemente 1:2 y 1:50 y con 1:5 y 1:20 que es lo más preferido. Adecuadamente, la diana es un nucleótido sencillo o un oligonucleótido de cadena sencilla que tiene una base de nucleótido o una secuencia de bases de nucleótido complementaria a la de la región de nucleótidos de la sonda biológica. En los métodos de la invención, la diana es un nucleótido sencillo característico de ADN o ARN que se da de forma natural. Adecuadamente se emplea un exceso estequiométrico de cada una de las dos enzimas sobre la diana cuando el medio de reacción está diluido.

Preferiblemente, el método de la presente invención comprende además la etapa de (b) tratar la sonda usada obtenida en la etapa (a) con una enzima de restricción (endonucleasa de restricción) y una exonucleasa para liberar el(los) elemento(s) detectable(s) de la misma y en una forma en la cual se puede detectar. A continuación, en una etapa (c) el(los) elemento(s) detectable(s) así liberado(s) es(son) detectado(s) mediante la observación de la propiedad detectable asociada a los mismos. Por tanto, cuando los elementos detectables en la sonda son fluoróforos relativamente no fluorescentes, la etapa (b) los libera en una forma que los permite emitir fluorescencia óptimamente. A continuación, esta fluorescencia se puede detectar y medir usando técnicas convencionales para proporcionar un conjunto de datos de salida o grupo de datos que se pueden usar para fines analíticos. En la etapa (b) esta liberación de los fluoróforos sucede primero por la enzima de restricción que hace un corte de cadena doble en la sonda usada en el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción anteriormente mencionada. A continuación, los fragmentos cortos creados así son degradados más por la exonucleasa en nucleótidos sencillos al menos algunos de los cuales se marcarán con fluoróforos. Cuando la sonda comprende fluoróforos múltiples esto conduce a una cascada de fluoróforos liberados que, debido a que ya están separados uno de otros o de sus desactivadores de fluorescencia asociados, son ya libres de emitir fluorescencia de la manera normal. Preferiblemente, esta fluorescencia se detecta en la etapa (c) mediante un fotoprotector o un dispositivo equivalente afinado a la longitud de onda de fluorescencia característica o a envoltorio de longitud de onda del fluoróforo. Esto causa por turnos que el fotodetector genere una señal eléctrica que se puede procesar y analizar de la manera normal. Generalmente la etapa (b) se lleva a cabo en un medio acuoso con un exceso de enzimas. Para evitar que se degrade la sonda biológica sin usar es preferible que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción sea el formado por la adición de la diana a la región de nucleótido de cadena sencilla o alternativamente que la enzima de restricción se elija de manera que no reaccionará con los oligonucleótidos de doble cadena que contienen muescas (*nicks*) en los mismos. Por tanto, la enzima de restricción se elegirá con las características del sitio de la enzima de restricción en mente y, en particular, será una que muestre alta fidelidad al sitio si las sondas son a realizar óptimamente. Exonucleasas adecuadas incluyen ADNasa I (ARNasa-libre), Exonucleasa I o III (ex *E. coli*), Exonucleasa T, Exonucleasa V (RecBCD), Lambda Exonucleasa, Micrococcal Nucleasa, Nucleasa de Frijol Mungo (*Mung Bean*), Nucleasa BAL-31 RecJ<sub>f</sub> T5 Exonucleasa y T7 Exonucleasa.

Un uso preferido del método es donde la diana es un nucleótido sencillo y donde está en contacto con una mezcla de cuatro sondas biológicas diferentes, teniendo cada una una región de nucleótidos de cadena sencilla que comprende un nucleótido sencillo diferente seleccionado entre aquellos cuya base de nucleótido asociada comprende (1) guanina, citosina, adenina y timina o (2) guanina, citosina, adenina y uracilo. Sin embargo, si se desea, se pueden emplear otros nucleótidos que corresponden a otras bases de nucleótido (por ejemplo, aquellos constitutivos de otros polinucleótidos sintéticos). En todos los casos se prefiere que cada sonda tenga un elemento detectable asociado diferente preferiblemente un fluoróforo diferente. En una realización muy preferida, la diana comprende un grupo de nucleótidos sencillos cuya ordenación corresponde a la secuencia de nucleótidos en una muestra de ADN o ARN cuya secuencia es conocida o solamente parcialmente conocida. Por tales medios, el método puede proporcionar la base para el diseño y el funcionamiento de un dispositivo de secuenciación de ADN o ARN.

Ahora, la presente invención se ilustrará con los siguientes Ejemplos y Figuras.

65

Ejemplo 1

Un precursor de oligonucleótido de cadena sencilla de 103 nucleótidos (ex. ATDBio) que tiene la secuencia de bases de nucleótido:

5

(5')GGCACGATGGXXAXXGCCCGCACTTCAGCGGGCAAYAACCATCGTGCCTGCAGGCTCGACCTTTATTCCG  
CGGCACTTCAGCCGGAATAAAGGTCGAGCCTGC(3')

en la que X son bases T marcadas con Quasar 570 (fluoróforo) y en la que Y son bases T marcadas con desactivadores de fluorescencia BHQ-2, se pliega aproximadamente en la 49ª base de nucleótido mediante calentamiento de una solución acuosa de este a 95 °C y, a continuación, enfriamiento lento de vuelta a la temperatura ambiente a un índice de 10 minutos por °C. Al final de este tiempo, se forma una sonda terminada en bucle-cerrado según la presente invención en la que la 49ª base de nucleótido (en el presente T) comprende la región de nucleótidos de cadena sencilla y dos oligonucleótidos de doble cadena, respectivamente 24 y 27 pares de bases de nucleótidos de longitud, que la flanquean.

10

15

Ejemplos 2 a 4

El método del Ejemplo 1 se repite tres veces más excepto que el precursor de 103 nucleótidos está modificado de manera que la base de nucleótidos en la posición 49ª sea G (Ejemplo 2), C (Ejemplo 3) y A (Ejemplo 4) para crear tres sondas adicionales selectivas para diferentes bases de nucleótido. Las bases X usadas en cada uno de estos ejemplos son bases T respectivamente marcadas con: Fluoresceína (517 nm), Rojo Texas (612 nm) y cianina-5 (667 nm).

20

25

Ejemplo 5

Se crea una mezcla de sonda mezclando cantidades equimolares de las cuatro sondas de los Ejemplos 1 a 4 en solución acuosa a temperatura ambiente.

30

Ejemplo 6

La mezcla del Ejemplo 5 se interroga con luz láser de 547 nanómetros y el grado de fluorescencia se mide a 570 nm usando un fotodetector. A continuación, se añade una solución acuosa que comprende nucleótidos sencillos que tienen bases A asociadas (relación molar de nucleótido sencillo y sonda de 1:50) junto con cantidades catalíticas de polimerasa de fragmento Klenow (producido por la ADN polimerasa I (ex. *E. coli*) y subtilisina) y ADN ligasa de *E. coli*. Después de una hora, la fluorescencia se mide de nuevo antes de que se añada una solución acuosa de la enzima de restricción Sbf1 y Lambda Exonucleasa en cantidades catalíticas. Después de que haya transcurrido una hora más se mide de nuevo el grado de fluorescencia. La fluorescencia medida a 570 nm en los dos primeros ejemplos se encuentra que es menor que 99 % de la medida en el último.

35

40

La Figura 1 usa los datos cromatográficos de gel para ilustrar el funcionamiento de la etapa de captura de nucleótido. El carril A muestra un resultado obtenido a partir de una muestra de una sonda sin usar del tipo anteriormente descrito. El carril B muestra un resultado de una muestra similar después del ácido nucleico relevante (en la forma de dNTP), se han añadido polimerasa y ligasa. Se puede ver la presencia de una segunda banda, indicativo de la presencia de la sonda completada.

45

La Figura 2 usa datos cromatográficos de gel para ilustrar el funcionamiento de una endonucleasa de restricción en la fragmentación de la sonda completa. El carril A muestra la sonda completa y el carril B muestra la situación después de que la sonda se haya puesto en contacto con la enzima de restricción durante un periodo de tiempo. La presencia de las múltiples bandas en el Carril B es indicativa del hecho de que ha tenido lugar la fragmentación en dos fragmentos.

50

Finalmente, la Figura 3 muestra gráficamente el desarrollo de la fluorescencia a lo largo del tiempo después de que una sonda completa "oscura" fragmentada del tipo anteriormente descrito se someta a progresiva degradación exonucleolítica para liberar sus fluoróforos constituyentes en un estado activo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de detección de una diana de nucleótido sencillo, caracterizado por que comprende la etapa de acoplamiento de dicha diana a una sonda usando una polimerasa y una ligasa para crear una sonda usada que es completamente de doble cadena, en la que la sonda comprende un sitio de captura que consiste en un nucleótido sencillo complementario a dicha diana cuyos extremos están acoplados a dos regiones de oligonucleótidos de doble cadena en el que al menos una de las regiones oligonucleotídicas comprende elementos detectables que tienen una propiedad de detección característica y en el que los elementos detectables están dispuestos sobre la región de oligonucleótidos de manera que la propiedad de detección es menos detectable que cuando el mismo número de elementos detectables se une a un número correspondiente de nucleótidos sencillos.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa adicional de tratamiento de la sonda usada con una enzima de restricción y una exonucleasa para liberar el(los) elemento(s) detectable(s) en una forma en la que se puede detectar.
- 15 3. Un método según la reivindicación 2, caracterizado por que comprende además la etapa de observación de la propiedad detectable presentada por el(los) elemento(s) detectable(s) liberado(s).
- 20 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el(los) elemento(s) detectable(s) es(son) fluoróforo(s).
- 25 5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la sonda usada comprende un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción que se ha formado mediante el acoplamiento de la diana al sitio de captura.
- 30 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la diana se pone en contacto con una mezcla de cuatro sondas biológicas diferentes, teniendo cada una de ellas, una región de nucleótidos de cadena sencilla que comprende un nucleótido sencillo diferente seleccionado entre (1) guanina, citosina, adenina y timina o (2) guanina, citosina, adenina y uracilo.
- 35 7. Un método según la reivindicación 6, caracterizado por que cada una de las cuatro sondas tiene un elemento detectable diferente.
8. Un método según la reivindicación 7, caracterizado por que los diferentes elementos detectables son fluoróforos.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la diana comprende uno de un grupo de nucleótidos sencillos que corresponden a la secuencia de nucleótidos en una muestra de ADN o ARN.
- 40 10. El uso de un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para secuenciar ADN o ARN.

Figura 1

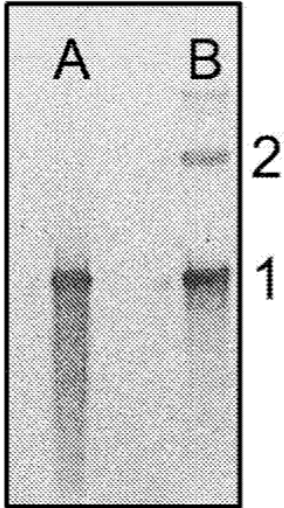


Figura 2

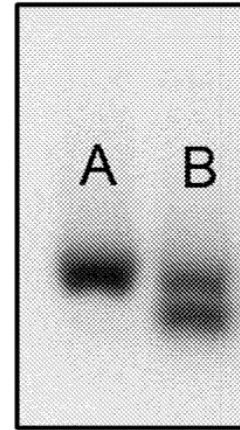




Figura 3

